

Trabajo final de Grado para la obtención del título en Licenciatura en Biología:

Título:

**Análisis de la Microbiota del Suelo
Asociada a Puentes Verdes de Verano
Basadas en Leguminosas**

Estudiante Mateo Vega Ferre

Tutores Responsables, María A. Morel Revetria y

Patricia Vaz Jauri

1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. El suelo como ambiente	6
1.1.2. Biodiversidad del suelo	7
1.1.3. Microorganismos del suelo	8
1.1.4. Interacción de la microbiota del suelo con las plantas	9
1.2. Puentes verdes	10
1.2.1. La Práctica de los Puentes Verdes	11
1.3. Los rizobios y su simbiosis con las leguminosas	12
1.3.1. El nitrógeno en los ambientes	12
1.3.2. El ciclo del Nitrógeno	13
1.3.3. FBN en rizobios	14
1.4. Indicadores de la salud del suelo	17
1.4.1 Técnicas de análisis microbiano en suelos	17
1.4.1.1. Diferenciación y diversidad mediante amplificación de elementos repetitivos intergénicos	17
1.4.1.2. Secuenciación masiva de amplicones	18
1.4.1.3. El gen ARNr 16S de la subunidad menor de los ribosomas	19
1.4.1.4. Espacio transcrito interno del ARN del ribosoma nuclear (ITS)	19
1.4.2. Otros indicadores de salud de suelos	20
1.5. Antecedentes del trabajo	20
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo general	22
2.2. Objetivos específicos	22
2.3. Objetivos educativos	22
3. METODOLOGÍA	23
3.1. Diseño experimental del ensayo en campo	23
3.2. Análisis de bacterias endófitas de nódulos radiculares	25
3.2.1. Aislamiento de bacterias desde nódulos	25
3.2.2. Pruebas de nodulación	25
3.2.3. Diferenciación mediante amplificación de elementos repetitivos intergénicos (ERIC)	27
3.2.4. Identificación de aislamientos	28
3.3. Análisis de los suelos	29
3.3.1. Purificación de ADN y Análisis de datos de secuenciación	30
3.3.3. Productividad vegetal	33
3.4. Análisis de datos	33
4. RESULTADOS	33
4.1. Análisis de bacterias endófitas de nódulos radiculares	33
4.2. Análisis de los suelos por secuenciación masiva de amplicones	35
4.2.1 Independencia de las variables de respuesta de las comunidades microbianas	36
4.2.2 Diversidad y Riqueza	37
4.2.3. Distancia Unifrac	39

4.2.5. NMDS	40
4.2.6. DESeq	41
4.3. Análisis del suelo por RB	42
4.4. Rendimiento de los cultivos	47
5. DISCUSIÓN	50
5.1. Análisis de bacterias endófitas de nódulos radiculares	50
5.2. Análisis de los suelos	51
5.2.1. Respiración basal	51
5.2.2. Comunidades microbianas del suelo	53
Bibliografía	55

Abreviaturas

MO, Microorganismos

FBN, Fijación Biológica de Nitrógeno

PVV, Puentes Verdes de Verano

OM, del inglés *Organic Matter*, Materia orgánica

RB, Respiración Basal

PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*

ERIC, del inglés *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*

EDTA, del inglés *EthyleneDiamineTetraacetic Acid*

TAE, del inglés *Tris-acetate-EDTA*

UV, Ultra Violeta

H₂O_d, agua destilada

NCBI, del inglés *National Center for Biotechnology Information*

χ^2 , Prueba de chi cuadrado

ASV, Amplicon Sequence Variant

ITS, Internal Transcribed Space

SSU, Unidad menor de ribosomas

LSU, Unidad mayor de ribosomas

NGS, del inglés Next Generation Sequencing

UFC, Unidades Formadoras de Colonia

CRS, Centro Regional Sur

DGSA, Dirección general de Servicios Agrícolas

DO, Densidad Óptica

BLASTn, del inglés Basic Local Alignment Search Tool nucleotide

NCBI, del inglés National Center for Biotechnology Information

RESUMEN

En Uruguay, el uso de puentes verdes de verano (PVV) basados en leguminosas del género *Crotalaria* se explora como forma de beneficiar la salud de los suelos. Estas leguminosas introducidas son de origen subtropical, y debido a que su uso todavía no se ha popularizado en el país no se cuenta con un inoculante recomendado para nuestros suelos.

Recientemente se identificó en Facultad de Agronomía, un rizobio nativo, aislado de un nódulo de *Crotalaria ochroleuca*. El mismo se describió como una nueva especie llamada *Bradyrhizobium monzae* cepa Oc8. Esta cepa es capaz de nodular a *Crotalaria juncea*, *Crotalaria spectabilis* y *Cajanus cajan*, además de su planta de origen. La cepa Oc8 se propone como potencial inoculante para las *Crotalaria* spp. en Uruguay, y está siendo evaluada de manera experimental en el campo.

Los objetivos de este trabajo fueron analizar los cambios en suelos expuestos a PVV de *Crotalaria* spp. cuyas semillas se inocularon con *B. monzae* Oc8, evaluar la ocupación de los nódulos de estas leguminosas, y generar una colección de rizobios eficientes.

Se partió de un ensayo en campo con *C. juncea*, *C. ochroleuca* y *C. spectabilis*. Se incluyeron en el diseño experimental parcelas testigos, de suelo sin cultivar (barbecho) y de suelo en el que se sembró soja (*Glycine max*) como cultivo de verano. La soja se inoculó con el inoculante comercial recomendado en Uruguay que contiene las cepas *Bradyrhizobium elkanii* U1301 y U1302. A los 5 meses de crecimiento de los cultivos, estos se terminaron (cortaron), y los residuos vegetales cortados se dejaron sobre el suelo durante un mes. Finalmente, se sembró trigo sobre el mismo suelo.

Durante todo el ensayo, se registraron variables agronómicas sobre los PVV y el trigo, y sobre el suelo además, variables microbiológicas. Se colectaron muestras de suelo en los momentos de siembra de PVV ("Precultivo"), terminación de PVV ("Prematanza"), siembra de trigo ("Pretrigo") y cosecha de trigo ("Posttrigo"). A su vez, se colectaron muestras de nódulos de las raíces de *Crotalaria* spp. previo a "Prematanza", muestras de biomasa aérea de los PVV previo y durante su terminación y granos de trigo al momento de la cosecha.

De los nódulos se aislaron y diferenciaron por ERIC-PCR cepas que se evaluaron en cuanto a nodulación en su hospedero de origen. Algunas de ellas se identificaron mediante secuenciación parcial del gen ARNr 16S. Aunque no se encontró a la cepa Oc8 ocupando los nódulos, se identificaron dos cepas pertenecientes al género *Bradyrhizobium*. Ambas provienen de nódulos de *C. spectabilis*.

De las muestras de suelo se purificó el ADN total con el que se amplificaron parcialmente el gen 16S rRNA y la región ITS y se secuenciaron los amplicones obtenidos por tecnología dNBSeq (BGI Genomics, Hong Kong). Los resultados del análisis de las ASVs mostraron que los suelos luego de la matanza de los PVV y luego de la descomposición parcial de los mismos no presentaron diferencias en las comunidades procariotas y fúngicas respecto al suelo previo al ensayo. Sin embargo sí se encontraron cambios en la comunidad microbiana en el último momento de muestreo ("Posttrigo"), respecto a los anteriores. Tanto la riqueza

como la diversidad procariota aumentaron en "Posttrigo", mientras que la riqueza y la diversidad fúngica disminuyeron en "Posttrigo", en relación a los otros tres momentos de muestreo. No se observaron diferencias en estos índices respecto al cultivo de PVV sembrado en las parcelas, e incluso las parcelas control con barbecho no mostraron variaciones en las comunidades microbianas en relación a suelos con cultivos.

En el suelo se determinaron además los contenidos de C y N y la respiración basal (RB) en los 4 momentos de muestreo. Los resultados indicaron que la RB de los suelos aumentó hacia el período "Posttrigo", aunque no se observaron diferencias significativas en la RB de los suelos con los diferentes PVV. Por otro lado, el C y N en suelos de parcelas con *C. juncea* fue significativamente mayor al presente en los suelos del resto de los cultivos. Esto último se observó también con la producción de biomasa aérea. *C. juncea* fue el PVV que generó mayor biomasa.

Finalmente, no se encontraron diferencias en el rendimiento en grano del trigo crecido en suelos que tuvieron previamente PVV, soja o barbecho.

1. INTRODUCCIÓN

El cometido de este apartado será el de contextualizar al lector con la ecología en los suelos, centrándose en los microorganismos que los habitan, y sobre todo, en cómo estudiarlos, orientándose principalmente a los rizobios y al estudio metagenómico de los microorganismos del suelo.

1.1. El suelo como ambiente

“Los suelos son considerados cuerpos naturales, que cubren grandes superficies terrestres y soportan el crecimiento vegetal, y que sus propiedades son dependientes del efecto conjunto del clima y los organismos actuando sobre la materia parental, condicionado por el relieve, en un periodo de tiempo determinado.” (Tan, 2009)

El subsuelo es la capa de tierra que se encuentra justo debajo de la superficie. Cuenta con tres fases: la sólida, compuesta por minerales y materia orgánica, la líquida, compuesta por el agua y material en solución, y la gaseosa, compuesta por gases y aire, ocupando, junto a la fase líquida, los espacios vacíos de la fase sólida. La particularidad del subsuelo es que estas tres fases interactúan, volviendo el sistema heterogéneo y complejo. La distribución y composición de estas fases determinan cómo se desarrolla el ecosistema a micro y macro escala (Figura 1).

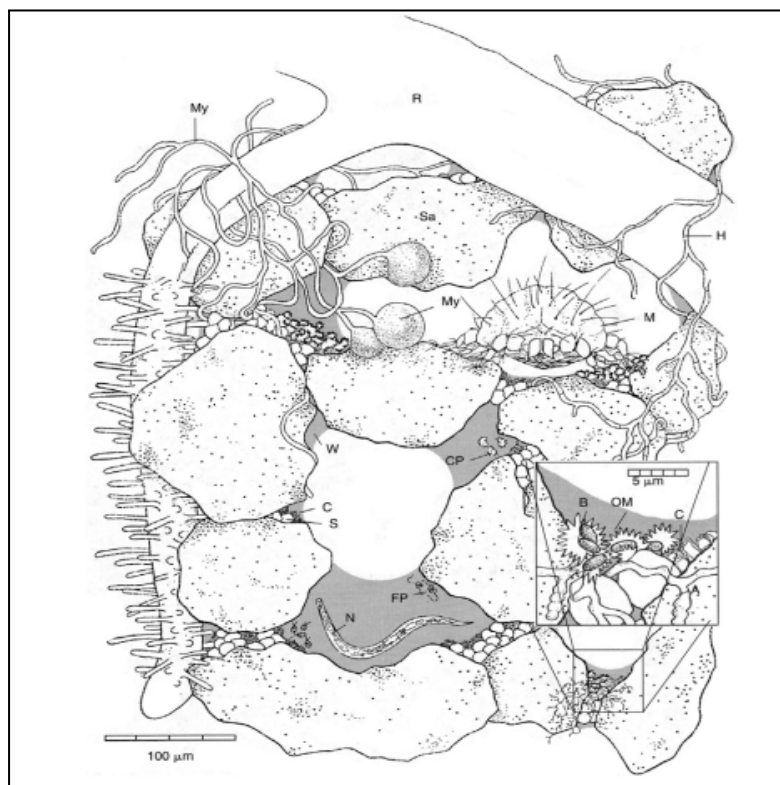


Figura 1. Hábitat del suelo que contiene partículas minerales [arena (Sa), limo (Si) y arcilla (C)], materia orgánica (OM), agua (W), raíces vegetales con pelos radicales (R) y organismos del suelo [bacterias (B), actinomicetos (A), esporas e hifas de micorrizas (My), hifas de hongos saprofitos (H), nematodos (N), protozoos ciliados (CP), protozoos flagelados (FP) y ácaros (M)]. Figura original de Kim Luoma (2021).

El suelo es un hábitat complejo y diverso; incluso en áreas muy pequeñas puede contener microhábitats que van desde zonas ácidas hasta alcalinas, húmedas a secas, aeróbicas y anaeróbicas, reducidas a oxidadas y desde pobres hasta ricas en nutrientes (Figura 1).

Los suelos soportan el 95% de los alimentos que consumimos (Spanner & Napolitano, 2015), y el secuestro de carbono (C) que sucede en ellos es el triple que en la atmósfera y la vegetación (Zomer et al., 2017). Son un soporte crucial en la salud combinada e interconectada de las personas, animales y ecosistemas, dentro del concepto de Una Salud. El concepto de «Una Salud» en el contexto del suelo se refiere a la capacidad continuada de un suelo para funcionar como un ecosistema vital que sostiene la vida de plantas, animales y seres humanos, donde la microbiota del suelo —la comunidad de bacterias, hongos y otros microorganismos— es fundamental para mantener su fertilidad, estructura y funciones, y donde su salud está intrínsecamente ligada a la salud humana a través de la cadena alimentaria y la producción sostenible (One Health Joint Plan of Action 2022–2026).

1.1.1. Biodiversidad del suelo

El suelo es un medio fundamental para el desarrollo de la vida, influye en el crecimiento de las plantas, los procesos del agua y otras funciones y servicios ecosistémicos que brinda (Figura 2).

Los organismos del suelo se pueden clasificar en función de su tamaño. La Macrofauna, aquellos organismos visibles a simple vista que incluyen artrópodos, lombrices de tierra, nemátodos, caracoles, mamíferos pequeños y reptiles; la Macroflora, principalmente representada por las raíces de las plantas; y la Microbiota, formada por organismos microscópicos como los protozoarios, bacterias, arqueas, hongos, algas y líquenes; se incluyen también en ella a los virus (Tan, 2009).

Los roles de los MO que componen esta biodiversidad son variados; participa en la descomposición de la materia orgánica, en los ciclos de los nutrientes, en la estructuración, resiliencia y resistencia de los suelos, en mantener su salud (Delgado-Baquerizo et al., 2025). La biodiversidad del suelo es importante en cada aspecto de nuestro día a día, desde la producción de alimentos, hasta la restauración ecosistémica, y los servicios culturales (Figura 2).

La diversidad del suelo nos afecta a todos (Jansson & Hofmockel, 2020).

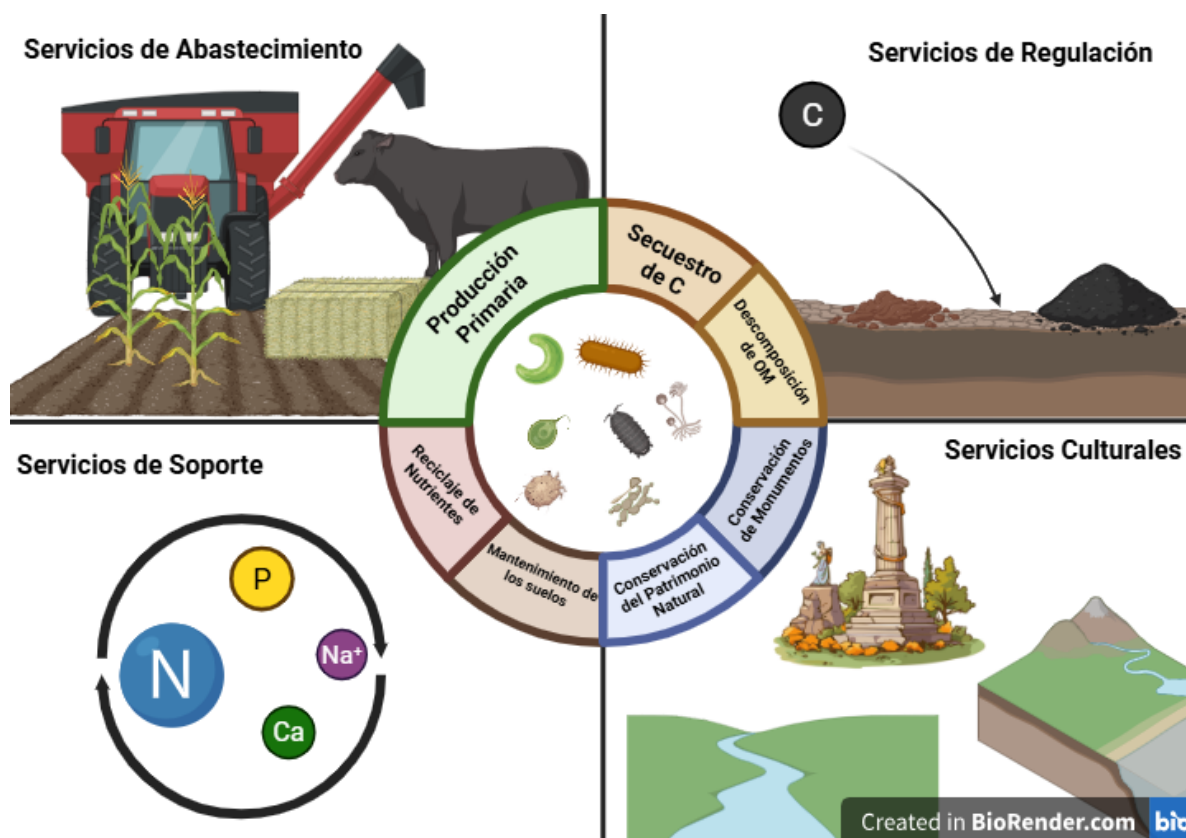


Figura 2. Esquema de servicios ecosistémicos que el suelo provee y en los que los organismos del suelo son clave. Creado en <https://BioRender.com>.

1.1.2. Microorganismos del suelo

“Es un error común, tanto entre biólogos como no biólogos, pensar que las bacterias son relativamente conocidas debido a su gran importancia en la medicina, la ecología y la genética molecular. Lo cierto es que la gran mayoría de los tipos de bacterias siguen siendo completamente desconocidos, sin nombre ni indicios de medios para detectarlos.” - Edward O. Wilson (Clarke, 1994).

La cita anterior, aunque habla de las bacterias, expone la realidad de la investigación de los microorganismos del suelo, aunque hoy en día con las técnicas modernas de secuenciación se ha avanzado a pasos agigantados en el campo, todavía queda mucho por descubrir y comprender. La innovación y la profundización del estudio de estos seres vivos son vitales para ampliar la comprensión del ecosistema suelo y el desarrollo tecnológico.

El suelo soporta una enorme diversidad microbiana. Un solo gramo de suelo puede contener miles de especies y millones de microorganismos (MO) (Yarwood et al., 2020). Este conjunto de bacterias, arqueas, hongos, constituye la microbiota del suelo. El microbioma es el conjunto formado por esta microbiota, sus genes, sus metabolitos y las interacciones que se dan con el entorno (Trubl & Probst, 2025).

El microbioma en un sistema productivo es crítico a la hora de asegurar la producción de alimento y la sostenibilidad de la agricultura, y a su vez, protege de la entrada de patógenos a la cadena productiva, protegiendo a todos los seres vivos en una salud (Delgado-Baquerizo

et al., 2020; Zhou et al., 2023). Conocer y comprender este microbioma es clave en la conservación y restauración de los suelos.

Las bacterias y las arqueas son organismos unicelulares procariotas encontrados en los diferentes ecosistemas del mundo. Son seres diminutos y de organización estructural “simple” si se los compara con las células eucariotas. Sus células constan de una envoltura que contiene el citoplasma, el material genético, ribosomas y proteínas catalíticas. Es destacable en ellas su capacidad de adaptarse a los cambios ambientales y a condiciones extremas, lo que las convierte en ubicuas. La presencia de pili, plásmidos, flagelos, endosporas y otras estructuras las vuelve muy resilientes. Poseen amplia versatilidad metabólica, pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno (O), e incluso alternar entre respiración aeróbica y anaeróbica en base a la concentración de O disponible. Las hay autótrofas y heterótrofas, simbióticas, mutualistas y parásitas, entre otras formas de vida. A través de sus capacidades metabólicas determinan la disponibilidad de nutrientes esenciales como el Nitrógeno (N), el Fósforo (P) y el azufre (S). Como resultado de esta gran versatilidad, juegan un rol vital en la descomposición de la materia orgánica, la fertilidad de los suelos y el ciclado de nutrientes (Tan, 2009).

Por otro lado, dentro de los microorganismos del suelo también resaltan los hongos. Estos presentan células eucariotas, algunos son capaces de crecer de manera unicelular (levaduras, quitridos y oomycetes), otros crecen interconectados en un micelio, expandiéndose a través del sustrato de crecimiento, permitiendo el uso de más recursos en el suelo. Poseen estructuras de resistencia (esporas) que les permiten dispersarse y resistir condiciones adversas. En el suelo, presentan variados roles ecológicos: los hay desde patógenos, a simbioses o saprófitos, entre otros roles que mejoran la fertilidad, estructura y aireación del suelo (Tan, 2009).

1.1.3. Interacción de la microbiota del suelo con las plantas

La microbiota del suelo es importante para las plantas al interactuar con ellas de distintas formas, tanto facilitando como restringiendo su crecimiento. En términos de promoción del crecimiento vegetal, los microorganismos presentan variados mecanismos de acción que afectan tanto el crecimiento como el desarrollo y la salud de las plantas. En este sentido, es importante la comunidad microbiana de la rizosfera (Berendsen et al., 2012).

El término rizosfera fue acuñado por primera vez por Hiltner en 1904 para describir la zona del suelo bajo influencia directa de las raíces (Hiltner, 1904). Hiltner lo describió en base a la asociación simbiótica de bacterias fijadoras de dinitrógeno; hoy, el término se extiende al área circundante a la raíz, o el volumen de suelo influenciado por la raíz. La rizosfera ni es uniforme ni está bien caracterizada o definida, pero se refiere al área de mayor actividad microbiana que rodea a las raíces. Es una zona rica en nutrientes debido a los exudados de la raíz y al mucílago vegetal.

En comparación con el suelo no influenciado, o alejado de las plantas, la rizosfera es algo así como un “oasis nutritivo”, que atrae una amplia variedad de MO, principalmente bacterias (10^6 - 10^9 UFC/g) y hongos (10^6 UFC/g) (Rouatt et al., 1960). Entre ellos destaca un grupo variado de MO conocidos como microorganismos promotores del crecimiento vegetal. Tal como su nombre lo indica, este grupo engloba a bacterias y hongos capaces de

promover el desarrollo y crecimiento vegetal y que se encuentran en rizosfera, superficies de las raíces, e incluso dentro de los tejidos vegetales (Backer et al., 2018).

La promoción del crecimiento vegetal se puede llevar a cabo mediante mecanismos directos o indirectos. Estos se diferencian en que los directos implican la disponibilidad de nutrientes o producción de fitohormonas para las plantas, mientras que los indirectos actúan protegiendo a la planta de patógenos mediante la producción de antibióticos y/o sideróforos, la competencia por recursos o la inducción de resistencia sistémica (Backer et al., 2018).

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal pueden ser epífitos o endófitos. Los epífitos habitan en la superficie externa de la planta, mientras que los endófitos mantienen parte o todo su ciclo de vida dentro de la planta sin parasitar, y se pueden encontrar en raíces, tallos y hojas. Las bacterias del suelo conocidas como rizobios son un ejemplo de endófitos y son el foco parcial de esta tesis, por su capacidad de promoción del crecimiento vegetal por fijación biológica de N_2 (FBN) en simbiosis con plantas, tal como se describe más adelante.

1.2. Puentes verdes

Los puentes verdes son cultivos de cobertura y su denominación se debe a que se desarrollan entre dos cultivos de renta. De este modo, un puente verde invernal es aquel cultivo que se desarrolla entre dos cultivos de verano sucesivos, como puede ser la soja, mientras que un puente verde de verano (PVV) se desarrolla en el período estival, entre dos cultivos de invierno, como la cebada o el trigo (Figura 3).

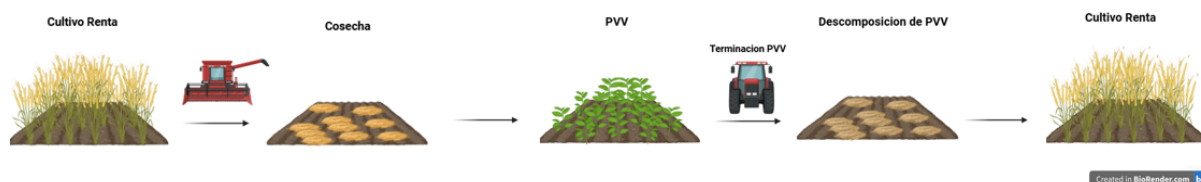


Figura 3. Transición temporal del uso de PVV como cultivo de cobertura. Creado con <https://BioRender.com>.

Las prácticas agrícolas convencionales, como las basadas en monocultivos, tienden a disminuir la salud del suelo debido a la alta demanda de nutrientes, generando un agotamiento de los mismos, que suele corregirse con fertilizantes químicos. Esto ha dado lugar a una creciente presión social, que impulsa un cambio en la manera en que cultivamos nuestro alimento, lo que motiva investigaciones orientadas a desarrollar prácticas agro-sustentables que mejoren la producción sin comprometer el patrimonio natural (Gómez Perazzoli et al., 2024).

La inclusión de puentes verdes en las rotaciones agrícolas tiene como principal función la cobertura del suelo y tiene múltiples efectos beneficiosos sobre la salud del suelo, mejorando su estructura, disminuyendo la erosión, y/o enriqueciendo de carbono (C) y nutrientes (Berriel, 2022).

1.2.1. La Práctica de los Puentes Verdes

Como puentes verdes se suelen usar gramíneas y leguminosas, en forma pura o en mezclas. En la elección del cultivo, destacan las especies de rápida implantación y rápido desarrollo, que tengan ciclos de vida más bien cortos o que tengan buen desarrollo en los meses de puente verde (Berriel, 2022).

En la práctica, el puente verde se suprime previo a la siembra del próximo cultivo, y sus restos pueden dejarse sobre la superficie del suelo como colchón o mulch, para su descomposición, o incorporarse al suelo, como abono verde. Al comparar un suelo cubierto por rastrojos de puentes verdes en relación al barbecho (suelo descubierto, sin cultivo) es esperable que el primero logre un significativo secuestro de C en el suelo (Macedo et al., 2015). Cuando los residuos se entierran como abono verde, se descomponen más rápidamente y la actividad microbiana en el suelo se acelera (Aguilar-Paredes et al., 2023).

Al utilizar leguminosas como puente verde, el aporte de N al suelo puede ser mayor, debido a que la mayoría de las leguminosas forman interacciones simbióticas mutualistas con rizobios. El N proveniente de la FBN realizada por los rizobios, regresa al suelo luego con los rastrojos o abonos verdes derivados del puente verde de leguminosas (Berriel, 2022).

1.3. Los rizobios y su simbiosis con las leguminosas

Los llamados rizobios son bacterias gram negativas que se pueden encontrar dentro del perfil del suelo, y son de gran interés por su capacidad de FBN en asociación simbiótica con leguminosas.

La relevancia de los rizobios radica en su papel fundamental en la agricultura sostenible, principalmente a través de esa FBN que realizan en simbiosis con las leguminosas, que reduce la dependencia de fertilizantes químicos nitrogenados en el campo cuando se cultivan leguminosas. La FBN, como se describe más adelante, es un proceso del ciclo de N que lleva a disponibilizar el N para los seres vivos.

1.3.1. El nitrógeno en los ambientes

Todo lo que existe, existe en ciclos. Si fue, volverá a ser.

El N junto al C, O, e Hidrógeno (H) son los macroelementos clave que se encuentran mediando las reacciones biológicas llevadas a cabo por los organismos y formando parte de la biomasa de todos los seres vivos. El N se encuentra en todos los ambientes, pero no todas sus formas químicas son accesibles para la mayoría de los organismos. Este elemento transiciona a través de diversas formas químicas dentro de su ciclo natural. Antes de profundizar en cómo accedemos los seres vivos al N, debemos saber dónde se encuentra y en qué formas (Galloway et al., 2004).

Una enorme porción del N del planeta se encuentra en la litósfera, en las rocas ígneas del manto rocoso, en forma de minerales y de manera no accesible para ser tomado por los seres vivos, representando el 97% del N global; el resto se distribuye de manera

biodisponible en la atmósfera (2%) y biósfera (0,02%). Del N disponible para los seres vivos, en la atmósfera se encuentra un 78%, donde está presente en su forma más estable: el dinitrógeno molecular (N_2), aunque también existe como óxido nitroso (N_2O), óxido nítrico (NO), dióxido de nitrógeno (NO_2) y amoníaco (NH_3) (Galloway et al., 2004).

En el suelo, el 80-90% del N se encuentra en la materia orgánica (Farzadfar et al., 2021), el resto, como amonio (NH_4) y otras formas inorgánicas (NO_2^- , NO_3^-). El N de la materia orgánica del suelo no es asimilable por los seres vivos y debe pasar por los pasos del ciclo que lo llevan a una forma química inorgánica asimilable. Si bien la acumulación de fuentes orgánicas con N en el suelo alimenta al ciclo, el exceso de algunas formas inorgánicas de N en el suelo representa un riesgo de contaminación, especialmente sobre los ríos, lagunas y napas subterráneas, donde el exceso de nutrientes puede llevar al proceso llamado eutrofización, por el crecimiento excesivo de algas y bacterias, que representan un gran riesgo al ecosistema y la salud humana y animal (Tan, 2009).

1.3.2. El ciclo del Nitrógeno

La fijación de N es el proceso de conversión de N_2 en formas reactivas de N. Este proceso implica la rotura del triple enlace de la molécula de N_2 . El proceso ocurre naturalmente de forma biótica, a través de ciertas bacterias y arqueas, o abiótica, a través de los relámpagos [Figura 4, (1)]. Esta última es una reacción electroquímica que se da a través de tormentas eléctricas. La alta energía liberada durante el evento de una descarga eléctrica podría ser capaz de romper los triples enlaces del N_2 . El N libre se asocia al oxígeno (O_2) libre, y luego las lluvias lo depositan en el suelo en forma de ácido nítrico o nitratos. La fijación del N biótica es la FBN, que se puede dar en algunas bacterias o arqueas de dos formas: en asociaciones simbióticas (ej: *Rhizobium*) [Figura 4, (2)] o en vida libre (ej: *Azotobacter*) [Figura 4, (3)]. La asociación simbiótica mutualista entre leguminosas y rizobios es ejemplo de la primera, es foco de la tesis y se describe en el punto 1.3.3.

Siguiendo en el ciclo del N, la amonificación es el proceso biológico por el cual los compuestos nitrogenados, en los restos biológicos de los seres vivos, son descompuestos generando amonio (NH_4^+) (ej: *Pseudomonas*). Desde este, la nitrificación es el proceso biológico de formación de nitrito (NO_2^-) (ej *Nitrosomasi*) primero [Figura 4, (5)], y nitrato (NO_3^-)(ej: *Nitrobacter*) después [Figura 4, (6)].

La asimilación de nitrógeno [Figura 4, (7)] es el proceso en el que a partir de compuestos inorgánicos de N se forman compuestos orgánicos de N, que forman la biomasa de plantas y microorganismos (en este último caso, también se llama inmovilización) (ej: *Escherichia*). En las plantas, estas pueden absorber el NO_3^- y NH_4^+ del suelo.

El ciclo global se completa con dos procesos, el de desnitrificación (*Pseudomonas*) [Figura 4, (8)], donde microorganismos anaerobios del suelo convierten los nitratos en N_2 , en un proceso con varias etapas e intermediarios gaseosos, algunos con efecto invernadero (Tan, 2009) y el de Anammox (ej: Planctomicetes) [Figura 4, (9)], que también retorna N_2 a la atmósfera, pero a partir de la oxidación anaerobia del NH_4^+ , con nitrito (Strous et al., 1999). Este último proceso es de particular interés biotecnológico en tratamientos de efluentes para eliminar el N (Ren et al., 2022).

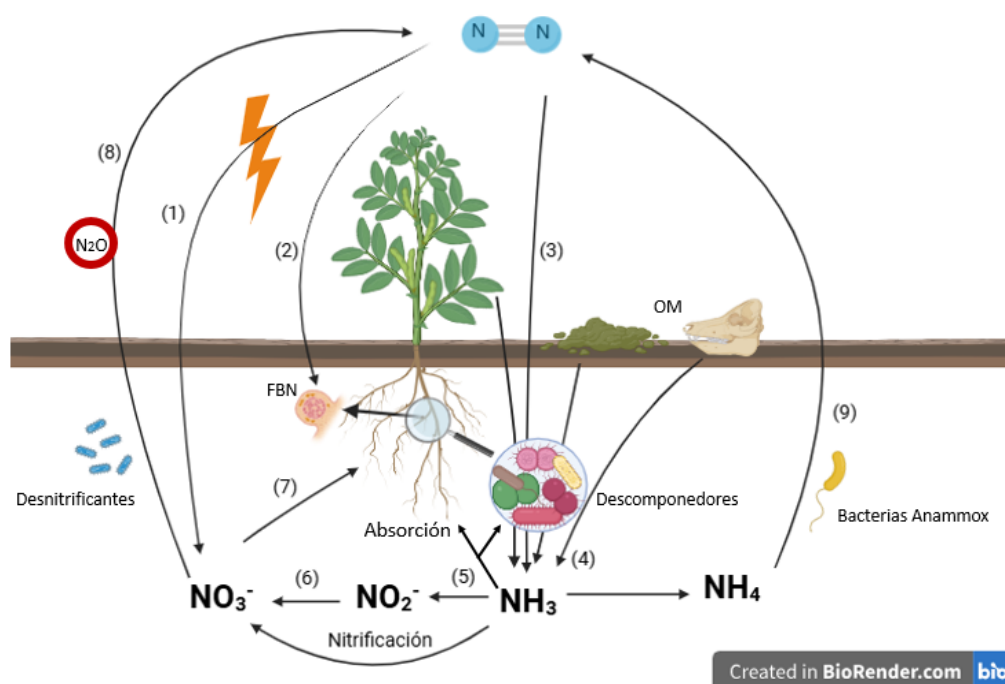


Figura 4. Ciclo del Nitrógeno: 1) Fijación natural abiótica del N; 2) Fijación biológica del N en simbiosis; 3) Fijación biológica del N en vida libre; 4) Descomposición de la materia orgánica y amonificación; 5) y 6) pasos de Nitrificación; 7) Absorción y asimilación/inmovilización; 8) Desnitrificación; 9) Anammox. Creado en <https://BioRender.com>.

Los desbalances de concentración de los compuestos nitrogenados pueden ser riesgosos para la salud y el ambiente. El accionar humano es la principal causa de estos desbalances en el ciclo, por ejemplo, por el uso desmedido de fertilizantes en la agricultura, o por desechos industriales no tratados (Galloway et al., 2008).

Cuidar el ecosistema es respetar sus ciclos.

1.3.3. FBN en rizobios

Los rizobios son, probablemente, los microorganismos benéficos asociados a plantas más estudiados. La primera especie de rizobio identificada fue *Rhizobium leguminosarum* en 1889 (Frank, 1890), aunque su denominación inicial fue *Bacillus radicola* por Beijerinck en 1888 (Beijerinck, 1888). La clasificación taxonómica de los rizobios evolucionó con los años, y con el desarrollo de técnicas moleculares, el avance fue aún más notorio.

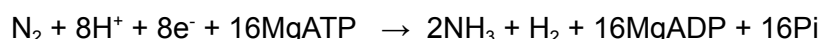
Los rizobios se encuentran dentro de los grupos de alfa- y beta-proteobacterias. Hasta el 2022, se conocían 168 especies repartidas en 17 géneros de alfa-rizobios (Kuzmanović et al., 2022). Los beta rizobios se han descrito dentro de los géneros *Paraburkholderia*, *Trinickia* y *Cupriavidus* (Gyaneshwar et al., 2011). La particularidad de todos ellos es su

capacidad de romper la molécula N_2 , que es muy estable debido al triple enlace entre los átomos de N, y lo hacen en simbiosis con plantas.

Se requiere de gran energía para romper el triple enlace del N_2 (945 kJ/mol) y la habilidad de romperlo está presente en algunas bacterias y arqueas del suelo conocidas como diazotrofas (o fijadoras de N), entre las que se encuentran los rizobios, que lo hacen cuando se asocian simbióticamente a leguminosas.

Los rizobios, como todos los diazotrofos, logran realizar la FBN a través del complejo enzimático llamado nitrogenasa. Dos grandes proteínas conforman los componentes de la nitrogenasa, que trabajan en conjunto: la proteína hierro-cofactor metálico (componente 1), generalmente con Molibdeno como cofactor (FeMo-co), también existen nitrogenasas alternativas dependientes de Vanadio (FeV-co) o Hierro (FeFe-co), y la proteína férrica (Fe) dinitrogenasa reductasa (componente 2). En la primera se da la fijación del N_2 , la segunda es la que transfiere a la primera los electrones necesarios para la reacción de reducción. La nitrogenasa necesita iones Mg^{2+} , consume ATP como forma de energía que impulsa la reacción, y se inhibe por ADP, formas reactivas de N y O. La inhibición suele ser irreversible frente al O.

La nitrogenasa utiliza N_2 y $8 H^+$ para formar $2 NH_3$ y H_2 ; la ecuación global es la siguiente (Sylvia et al., 2005):



En diazotrofos con nitrogenasa Mo-dependiente (la más común) el cluster de genes *nif* es el encargado de la expresión y regulación del complejo nitrogenasa y está conformado por 20 o más genes (Postgate, 1998).

En rizobios, la nitrogenasa se sintetiza y es funcional cuando se da la asociación simbiótica con leguminosas. Esta se produce a nivel de las raíces, resultando en la formación de nódulos. Esta nodulación de las plantas solo se da si el suelo es deficiente en N (Dénarié et al., 1992). El resultado final de la simbiosis es el intercambio de productos, los compuestos nitrogenados obtenidos a partir de la FBN por los rizobios son cedidos a la planta, que a cambio, cede a las bacterias fotoasimilados (principalmente malato y succinato) (Hellriegel & Wilfarth, 1888).

La infección o el ingreso de los rizobios a las raíces, comprende una serie de pasos que inician con el reconocimiento entre ambas partes. Aunque existen variaciones, los pasos generales del tipo de proceso de infección más estudiado, son los siguientes (Figura 5):

- 1) Los rizobios, y otras bacterias de la rizosfera, son atraídos hacia las raíces a través de compuestos quimioatrayentes, secretados por las raíces, en sus exudados radiculares.
- 2) Entre estos compuestos exudados, resaltan los flavonoides, metabolitos secundarios que son reconocidos por el rizobio específico. Este es el primer paso de especificidad, definido por el tipo de flavonoide.
- 3) Los flavonoides inducen en los rizobios la expresión de los genes *nod*. Los genes *nod* son un grupo de genes que codifican para aproximadamente 25 proteínas requeridas para la síntesis y exportación de los factores Nod. Estos últimos son compuestos

químicos del tipo lipoquitooligosacáridos, que son la respuesta del rizobio a las señales de la planta y constituyen un segundo nivel de especificidad en el establecimiento de la simbiosis. De forma similar a los flavonoides, cada par leguminosa-rizobio presenta factores Nod específicos, con una estructura característica, que desencadenan los procesos siguientes.

- 4) Los factores Nod son reconocidos por receptores en las raíces de la leguminosa específica, y se activan cambios en la raíz que inician la nodulación.
- 5) Frente a la presencia de los factores Nod y la adhesión de las bacterias a la raíz, los pelos radiculares se deforman y se curvan.
- 6) La pared de los pelos radiculares encorvados se degrada (Mateos et al., 1992), permitiendo la entrada de los rizobios a la raíz, a través de la formación de un canal de infección, un “tubo” por donde ingresan y se dividen las bacterias, atravesando el pelo y penetrando a la raíz.
- 7) El avance de los rizobios por el canal de infección se da hasta el primordio nodular. La formación y el número de nódulos están altamente regulados por la planta. Una vez en los nódulos, las bacterias dejan el canal de infección, y por endocitosis, quedan englobadas en estructuras llamadas simbiosomas, rodeadas de una membrana peri bacterial, que separa a las bacterias del citoplasma de las células del nódulo.
- 8) En los simbiosomas, los rizobios sufren una severa transformación, muchas veces irreversible, en la que pierden capacidades reproductivas, se reducen actividades metabólicas y sintetizan la nitrogenasa. Este nuevo estado celular es llamado bacteroide, y está especializado en realizar la FBN (Gage, 2004).

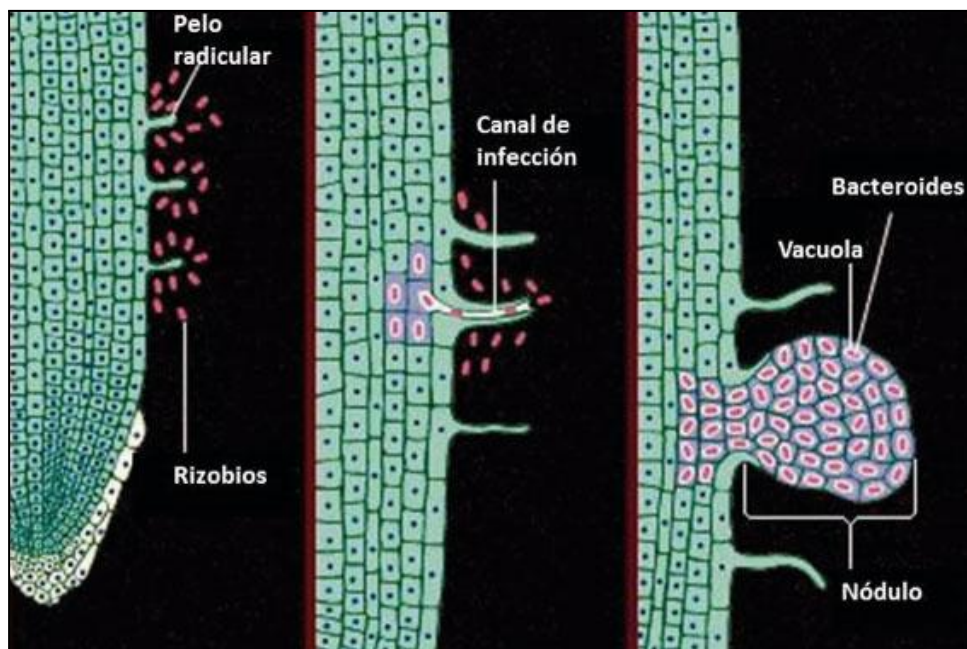


Figura 5. Proceso de formación de nódulos por infección de rizobios en leguminosa, de izquierda a derecha ingreso de los rizobios por el canal de infección y formación del nódulo (Quiñones, 2021).

1.4. Indicadores de la salud del suelo

Los indicadores de salud de suelos son parámetros físicos, químicos y biológicos que permiten evaluar la capacidad del suelo para funcionar como un ecosistema productivo y resiliente, cumpliendo con las funciones y servicios ecosistémicos (Figura 2) de forma sostenida. Entre los indicadores físicos resaltan la textura y la porosidad, entre los químicos, el pH y el contenido de materia orgánica y nutrientes y entre los biológicos, la diversidad microbiana, la respiración basal y las actividades enzimáticas, entre muchos otros. Los tres últimos reflejan la actividad, la funcionalidad y/o la diversidad de los organismos presentes en el suelo, principalmente de los MO (Doran & Zeiss, 2000).

1.4.1 Técnicas de análisis microbiano en suelos

Las técnicas de análisis microbiano en suelos permiten evaluar abundancia, diversidad y actividad de los MO y se dividen dependientes del cultivo de los MO utilizando métodos clásicos, y en independientes del cultivo de los MO utilizando técnicas bioquímicas-moleculares. A continuación se describen las técnicas desarrolladas durante el trabajo.

1.4.1.1. Diferenciación y diversidad mediante amplificación de elementos repetitivos intergénicos

El genotipado de cepas microbianas por amplificación de elementos repetitivos intergénicos es una técnica dependiente del cultivo. Las técnicas dependientes de cultivo son métodos que requieren el uso de medio de cultivo para hacer crecer y estudiar microorganismos o células. Entre sus ventajas, destaca que permiten trabajar con cepas microbianas puras. Esto es de particular interés para la identificación y caracterización del crecimiento, la susceptibilidad antimicrobiana y otros atributos, en determinadas cepas, sobre todo de interés clínico (patógenos que hay que combatir, por ej.) o biotecnológico (para aplicaciones, como inoculantes para el agro, por ej.).

Por un lado, el aislamiento consiste en cultivar MO, promoviendo su crecimiento en un entorno controlado, utilizando medios adecuados. Una vez obtenido un cultivo aislado puro, es posible identificarlo. La identificación implica determinar la nomenclatura o caracterizar genética y fenotípicamente al microorganismo. Los métodos de identificación combinan técnicas, como por ejemplo, la tinción de Gram, las pruebas bioquímicas y las técnicas moleculares basadas en ADN purificado del MO estudiado. Estas últimas constituyen una aproximación poderosa a la hora de diferenciar e identificar MO (Woese, 1987). Entre ellas, el genotipado de las cepas por amplificación con PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es una técnica muy utilizada para discriminar entre cepas bacterianas. La amplificación de elementos genéticos repetitivos usando secuencias ERIC (del inglés *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) es una de ellas, se describe brevemente a continuación.

Las secuencias ERIC, de aproximadamente 126 pb (Anexo), y secuencias asociadas a ERIC, se han identificado en una alta diversidad de especies bacterianas. Estas secuencias están distribuidas en regiones intergénicas del genoma bacteriano y, al amplificar por PCR ,

generan amplicones característicos de cada cepa, de forma tal que otorgan "huellas genéticas". Con ellos es posible detectar las diferencias en los fragmentos amplificados por PCR, permitiendo distinguir aislamientos por los patrones de bandas en una electroforesis (De Bruijn, 1992). La longitud y número de los amplicones obtenidos por amplificación de las secuencias ERIC, es un marcador utilizado en el estudio de variabilidad genética de bacterias, permitiendo diferenciar cepas y compararlas con otras (Hulton et al., 1991).

1.4.1.2. Secuenciación masiva de amplicones

Un gran desafío al estudiar las poblaciones de MO es la gran diversidad que existe en algunos entornos como el suelo. Esto genera dificultades con las técnicas dependientes del cultivo descritas en el apartado anterior, ya que para ser cultivado cada MO, se debería conocer sus diversos requerimientos, y contar con medios de crecimiento adecuados. En la práctica, lo que ocurre es que se establece un gran sesgo, al no ser posible reproducir en el laboratorio todos los requerimientos de los MO o simplemente desconocer esos requerimientos (Amann et al., 1995).

Existen diversas técnicas de análisis de la microbiota sin necesidad de cultivarla previamente, que van desde métodos moleculares basados en PCR como la qPCR (PCR cuantitativa), a técnicas de secuenciación masiva (NGS, Secuenciación de Nueva Generación) del ADN y ARN de los MO. Otras técnicas no dependientes del cultivo, incluyen análisis proteómicos, lipidómicos, estudios basados en microscopía, entre otros (Steen et al., 2019; Wilmes & Bond, 2006; Yan et al., 2016). El análisis de la actividad y funcionalidad de los suelos evaluando la actividad metabólica y enzimática también se realiza sin un paso previo de aislamiento ni crecimiento de MO en medios de cultivo.

La secuenciación masiva de amplicones es una técnica de secuenciación que analiza fragmentos específicos de ADN, para determinar la diversidad de comunidades microbianas en una muestra. Esta técnica devuelve muchísima información que es posible asociar a géneros microbianos y analizar la composición de la población y sus características generales (Diversidad, Abundancia, Especies representativas, variación a través del tiempo, etc).

La metodología consiste en la extracción total del ADN (ADN metagenómico) de la muestra, por ejemplo, suelo, la amplificación por PCR de fragmentos de interés y la secuenciación masiva de los amplicones obtenidos, generando millones de lecturas cortas de amplicones que luego es necesario analizar mediante bioinformática. La PCR se dirige a regiones específicas, generalmente regiones hipervariables flanqueadas por conservadas, que poseen características rastreables, como el ARNr 16S en procariotas o la región ITS en hongos, tal como se describe a continuación.

1.4.1.3. El gen ARNr 16S de la subunidad menor de los ribosomas

La identificación con el gen codificante para un segmento del ARN ribosomal de la subunidad menor del ribosoma procariota se basa en la secuenciación del gen ARNr 16S, el cual actúa como un marcador genético único para identificar y clasificar bacterias y arqueas.

Este gen contiene tanto secuencias altamente conservadas como hipervariables lo que lo vuelve un excelente marcador genético, ya que permite identificar a la cepa que lo posee, a nivel de género, por sus zonas variables.

El gen completo del gen ARNr 16S consiste en 1500 pb y 50 dominios aproximadamente, repartidas en 9 zonas hipervariables, separadas por 11-12 zonas conservadas. La mayoría de los estudios basados en el análisis comparativo del ARNr 16S utilizan secuencias parciales del gen (Yang et al., 2016). Este análisis comparativo del ARNr 16S se utiliza tanto para identificar cepas puras (aisladas mediante cultivo) como para identificar amplicones secuenciados de forma masiva y obtenidos de ADN metagenómico.

El método molecular de identificación de aislamientos bacterianos puros mediante secuenciación del ARNr 16S consiste en el aislamiento del ADN desde la cepa de interés, la amplificación por PCR de la secuencia del ARNr 16S utilizando primers universales, secuenciación de los amplicones obtenidos por Sanger (Sanger et al., 1977) y el procesamiento informático de la información obtenida hasta llegar a la identificación de la cepa a nivel de género.

En el caso de la metagenómica, las plataformas de secuenciación masiva, como Illumina, o DNBSseq, generan millones de lecturas cortas de los amplicones, que luego, por procesamiento bioinformático se filtran por calidad, se definen las ASVs (Variantes de Secuencia de Amplicones), y se comparan con bases de datos para la asignación taxonómica.

1.4.1.4. Espacio transcrito interno del ARN del ribosoma nuclear (ITS)

El “Internal Transcribed Spacer” (ITS) es una región del ADN ribosomal presente en eucariotas, localizada entre las subunidades 18S (SSU) y 28S (LSU), separada por el gen conservado 5.8S, y dividida en las regiones ITS1 e ITS2. Esa estructura la hace amplificable mediante cebadores universales que se adhieren a las regiones conservadas, de forma similar a lo relatado para el gen ARNr 16S (Langsiri et al., 2023).

Una de las razones por las que el ITS es conveniente para identificar hongos es que presenta una alta variabilidad interespecífica, es decir, diferencias suficientemente grandes entre especies, lo que permite distinguirlas con cierto grado de precisión. Además, como muchas especies ya tienen secuencias ITS disponibles en bases de datos bien curadas (ej: UNITE, GenBank), se puede realizar la comparación directa (“barcoding”) para asignar identidad taxonómica (Badotti et al., 2017).

Al igual que el gen ARNr 16S, el análisis comparativo de ITS se utiliza tanto para identificar cepas puras como para identificar amplicones secuenciados de forma masiva y obtenidos de ADN metagenómico.

1.4.2. Otros indicadores de salud de suelos

Dentro de los indicadores biológicos de la salud del suelo se pueden encontrar otras técnicas que exploran la actividad de los microorganismos, ejemplos son la Respiración

Basal (RB), o la actividad de determinadas enzimas, principalmente relacionadas con el ciclado de nutrientes.

En el caso de la RB, la técnica mide la producción de dióxido de carbono (CO₂) o el consumo de O por parte de los microorganismos del suelo. En la práctica, son mas comunes los métodos basados en medir el CO₂ producido. Los resultados se expresan como una tasa de emisión o producción de CO₂ por unidad (gramo) de suelo en un tiempo determinado (días, horas). La RB es reflejo de la actividad microbiana y de la disponibilidad de materia orgánica presentes. Los MO respiran al descomponer materia orgánica, y cuanto mayor la respiración, mayor la actividad biológica del suelo. La técnica utilizada para medir RB, junto al análisis de algunas propiedades químicas del suelo, serán detalladas en profundidad en el apartado de Metodología.

1.5. Antecedentes del trabajo

En Uruguay, se han analizado el desempeño agronómico de plantas de *Crotalaria juncea*, *C. ochroleuca* y *C. spectabilis*, su adaptación a condiciones de déficit hídrico, frecuentes en los veranos de Uruguay, su eficiencia en el uso del agua, y la FBN asociada a los suelos nacionales (Berriel, 2022; Berriel et al., 2021).

En relación a la FBN, las investigaciones previas incluyeron el aislamiento de rizobios de nódulos de las 3 *Crotalaria* spp. antes mencionadas, sembradas en campos experimentales del país. Dentro de los aislamientos de rizobios nativos, la cepa rizobiana denominada Oc8, que fue aislada de un nódulo de *C. ochroleuca*, fue identificada por análisis polifásico. Oc8 pertenece al género *Bradyrhizobium* y mostró ser capaz de nodular a *C. juncea*, *C. spectabilis*, *C. ochroleuca* y *Cajanus cajan*, esta última otra leguminosa tropical potencialmente útil como cobertura estival (Berriel et al. 2021). Luego de la caracterización bioquímica de la cepa Oc8 y del análisis comparativo de su genoma, se propuso la designación de una nueva especie, *Bradyrhizobium monzae*, para la cuál Oc8 es la cepa tipo (Morel et al., 2025). Además, se evaluó su eficiencia simbiótica en términos de producción de biomasa en *C. juncea*, *C. spectabilis*, *C. ochroleuca* y *Cajanus cajan* en macetas (Morel et al., 2025).

A partir de estos antecedentes, se propuso la evaluación en campo de la cepa Oc8, utilizada como inoculante experimental para leguminosas del género *Crotalaria*. Este es el punto de partida del trabajo de tesis.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Analizar la microbiota del suelo asociada a PVV basados en cultivos de *Crotalaria juncea*, *C. ochroleuca* y *C. spectabilis* inoculados con *Bradyrhizobium monzae* Oc8.

2.2. Objetivos específicos

- I. Analizar la ocupación de los nódulos por la cepa Oc8
- II. Generar una colección de rizobios nativos capaces de nodular a *C. juncea*, *C. ochroleuca* o *C. spectabilis*
- III. Analizar las comunidades fúngicas y procariotas del suelo, a través de secuenciación masiva de amplicones.
- IV. Analizar la actividad biológica del suelo mediante respiración basal.

2.3. Objetivos educativos

- I. Obtener formación teórica y práctica en investigación científica
- II. Ganar experiencia en técnicas microbiológicas básicas, ensayos de inoculación de plantas, análisis de secuenciación masiva de amplicones y técnicas analíticas.

3. METODOLOGÍA

3.1. Diseño experimental del ensayo en campo

En el marco de un proyecto Innovagro (FSA-ANII), se realizó un ensayo de campo, entre diciembre de 2023 y diciembre de 2024, en el Centro Regional Sur (CRS) de la Facultad de Agronomía (Canelones). Del mismo se colectaron las muestras de raíces con nódulos y de suelo con las que se trabajó en esta tesis. El ensayo comprendió dos etapas de crecimiento vegetal: una primera etapa estival (con PVV) y la segunda invernal (con trigo).

En la primera etapa del ensayo, comprendida entre diciembre de 2023 y mayo de 2024, se sembraron PVV con *C. juncea*, *C. ochroleuca* y *C. spectabilis*, todas inoculadas con la cepa Oc8 de *Bradyrhizobium monzae*. A su vez se incluyó a la soja (*Glycine max.*) inoculada con los rizobios del inoculante comercial nacional de soja (*Bradyrhizobium elkanii* U301+U302) como cultivo típico de verano del país. Las inoculaciones se realizaron previo a la siembra, sobre las semillas, utilizando inoculantes a base de turba para Oc8 y líquido para U1301+U1302), con las concentraciones mínimas de rizobios requeridas en las formulaciones comerciales (2×10^9 UFC/g) por la Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSA) del MGAP (MGAP-DGSA 2026). El ensayo contó con 3 parcelas de 2,7 x 15 mts. por cultivo y 3 parcelas de suelo desnudo sin sembrar (barbecho) como control (T, testigo en Figura 6.). Las parcelas se distribuyeron al azar en el terreno, y fueron flanqueadas por Maíz (*Zea mays*). Esta primera etapa comprendió el crecimiento y matanza de los PVV evaluados (Figura 6, Cuadro 1)



Figura 6. Diseño experimental para el ensayo en campo con las tres crotalarias (*C. juncea*, *C. ochroleuca* y *C. spectabilis*) y soja. Se dejaron 3 parcelas control sin sembrar (barbecho). A su vez, se sembró maíz en los bordes.

En la segunda etapa del ensayo, comprendida entre julio de 2024 y diciembre de 2024, todas las parcelas de la primera etapa se sembraron con trigo como cultivo renta. La etapa consistió en evaluar el crecimiento y cosecha del trigo (Cuadro 1). En esta segunda etapa, se agregó una condición de fertilización nitrogenada: la mitad de cada parcela pre-definida en la etapa 1, recibió fertilización con urea (30 kg/ha) en el momento de la siembra del trigo,

100 kg/ha en el estadio z22 y 30 kg/N en el estadio z30 (Zadoks et al., 1974). Según la escala Zadoks, z22 es el estadio de macollaje avanzado, mientras que z30 es el inicio de la encañazón o elongación del tallo.

El Cuadro 1 muestra los momentos de muestreo durante todo el ensayo anual. "Precultivo" refiere al momento previo a la siembra de los PVV y define el inicio del ensayo. "Prematanza" es el momento previo a la terminación de los PVV, a partir de aquí los rastrojos comienzan su descomposición en el campo. "Pretrigo" es el tiempo donde se termina voluntariamente la descomposición de los rastrojos, se fertiliza la mitad de cada parcela con N, y se siembra el trigo. "Posttrigo" refiere a la cosecha del trigo y define la finalización del ensayo. *PVV-NÓDULOS*, refiere al momento en el que únicamente se tomaron muestras de raíces con nódulos, para el aislamiento de endófitos de nódulos.

Cuadro 1. Tiempos o Momentos de muestreo definidos a lo largo del ensayo.

Tiempo	Mes	Muestras	Análisis de muestras
"Precultivo"	Diciembre 2023	Suelo	Análisis químico de suelos, Respiración Basal (RB), Secuenciación masiva de amplicones
PVV-NÓDULOS	Marzo 2024	Raíces Plantas	Aislamiento de rizobios
"Prematanza"	Mayo 2024	Suelo y Plantas	Análisis químico de suelos, RB, Secuenciación masiva de amplicones. Producción de biomasa de PVV
"Pretrigo"	Julio 2024	Suelo	Análisis químico de suelos, RB, Secuenciación masiva de amplicones
"Posttrigo"	Diciembre 2024	Suelo y Plantas	Análisis químico de suelos, RB, Secuenciación masiva de amplicones Rendimiento

3.2. Análisis de bacterias endófitas de nódulos radiculares

3.2.1. Aislamiento de bacterias desde nódulos

Se tomaron raíces de cada parcela sembrada con PVV, durante la primera etapa del ensayo, a los 4 meses desde la siembra (PVV-NÓDULOS, Cuadro 1). Estas raíces se conservaron a -20 °C hasta el momento de su uso.

De las raíces, se separaron los nódulos que se desinfectaron superficialmente siguiendo el procedimiento de Howieson y Dilworth (2016):

- 1) Lavado con agua destilada (H₂O des.) estéril para descartar los residuos de tierra.
- 2) Incubación en Etanol al 70% durante 1 minuto, en agitación.
- 3) Incubación en Hipoclorito de sodio (NaClO) al 4% durante 4 minutos, en agitación
- 4) Reiterados lavados con H₂O dest. estéril .

Se realizaron controles de desinfección arrastrando un nódulo desinfectado por la superficie de una placa con medio YEM sólido (extracto de levadura-manitol, Anexo). Luego de la incubación de la placa a 28°C durante 2-3 días, la ausencia de crecimiento es indicativo de una correcta desinfección.

Para el aislamiento de rizobios, se accedió al interior de los nódulos desinfectados utilizando portaobjetos de vidrio, estériles. Para ello, se colocaron los nódulos desinfectados sobre los portaobjetos estériles y utilizando por encima otros portaobjetos de vidrio estériles, se aplastaron los nódulos, presionando los vidrios hasta que el contenido de los nódulos se libera. Utilizando un ansa esterilizada por calor se colectó la solución resultante y se sembró por estriado en la superficie de medio YEM sólido con rojo Congo (Anexo). El rojo congo se utilizó para diferenciar los crecimientos de acuerdo con la capacidad de interiorizar al colorante. Los rizobios no son capaces de ingresarlo entonces, al crecer en este medio desarrollan colonias de color blanco, crema o translúcidas. Las placas se incubaron a 28°C por 4-6 días (Sosa et al., 2004).

A partir de los crecimientos observados en placa, se seleccionaron las colonias blancas, cremosas o translúcidas y se repicaron (re sembraron) en nuevo medio YEM sólido, 2 a 3 veces de manera consecutiva, para obtener cultivos puros.

3.2.2. Pruebas de nodulación

Con el fin de confirmar que los aislamientos obtenidos hasta el momento eran capaces de nodular a la planta de origen, se realizaron ensayos de nodulación, en condiciones controladas, tal como se describe a continuación.

Las semillas de *Crotalaria* spp. se desinfectaron de la misma manera descrita anteriormente para nódulos (punto 2.1). Para las semillas de *C. juncea* fue necesario modificar el protocolo por las características de las semillas, de mayor tamaño y con pliegues más pronunciados,

que posiblemente dificultaron la desinfección (Figura 7). El cambio para estas semillas fue la extensión del tiempo en hipoclorito a 8 minutos. Las semillas, una vez desinfectadas, germinaron en placas con agar-agua (al 0,8%) incubadas a 28 °C por 48hs.



Figura 7. Imágenes de semillas de *Crotalaria* spp., de izquierda a derecha, semillas de *Crotalaria ochroleuca*, semillas de *Crotalaria spectabilis*, semillas de *Crotalaria juncea*.

Para la preparación de los inóculos, se tomaron colonias frescas desde placas con YEM sólido, y se suspendieron en suero fisiológico (0,9% NaCl en H₂O), alcanzando una densidad óptica (DO) aproximada de 0,5, medida a 620 nm .

Las semillas pregerminadas se inocularon de manera individual con 100µl de inóculo. Originalmente se probó la nodulación en semillas inoculadas y sembradas en medio Jensen semisólido sin nitrógeno (Anexo) dispuesto en tubos. Sin embargo, se corroboró que en este sistema de crecimiento las *Crotalaria* spp. no nodularon durante el período de crecimiento de 45 días (Figura 8.). Por este motivo, se continuaron las pruebas de nodulación en macetas conteniendo mezclas de arena y vermiculita (1:1) estériles.

Las plantas se incubaron en un cuarto con temperatura (26°C) y fotoperíodo controlados (8/16 hs de oscuridad/luz), y se regaron con agua y solución de Hoagland (Anexo) libre de N diluída al décimo (Anexo 1,2) de forma alternada. Como control positivo se utilizó a Oc8 como inóculo y como control negativo las semillas recibieron suero fisiológico estéril. Luego de un mes y medio de crecimiento, se controló en las raíces de las plantas la presencia de nódulos.

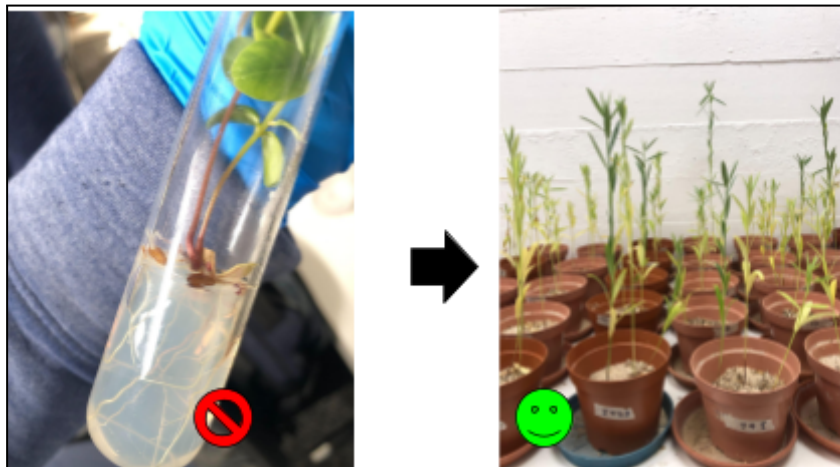


Figura 8. Pruebas de nodulación realizadas. A la izquierda, planta en medio Jensen semi-sólido libre de N, a la derecha, sistema de crecimiento en macetas con sustrato estéril.

3.2.3. Diferenciación mediante amplificación de elementos repetitivos intergénicos (ERIC)

Para diferenciar los aislamientos obtenidos, se partió de su ADN, que se amplificó por la técnica de PCR. Los cebadores específicos utilizados fueron los ERIC descritos en la Introducción (Hulton et al., 1991) y cuya secuencia se muestra en el Anexo 1,4.

Para todas las PCR se utilizó los equipos Labnet-Multigenell y Bioer-GeneExplorer.

Para la amplificación (ERIC-PCR) fue necesario realizar la lisis celular de los aislamientos. Para ello, se partió en algunos casos de cultivos en medio sólido y en otros, de medio líquido. La lisis celular fue puesta a punto y resultó en el siguiente protocolo:

1. a) Si se parte de YEM líquido, centrifugar 1 ml de cultivo líquido a 13.000 rpm, 2 min, para obtener el *pellet* celular.
b) Si se parte de cultivo en medio YEM sólido, se carga el ansa con abundantes colonias.
2. Resuspender el pellet celular o las colonias en 100 µl de NaOH 0,05M estéril
3. Incubar a 100°C 10 min
4. Enfriar rápidamente, en hielo y/o freezer -20°C hasta que congele
5. Agregar 500 µl de agua miliQ estéril
6. Centrifugar a 13.000 rpm por 2 min y conservar el sobrenadante.

El sobrenadante se utilizó como molde de ADN en la amplificación por PCR.

La mix para una reacción (25 µl) de ERIC-PCR consistió en: 2,5 µl de Buffer (10X), 0,5 µl de dNTPs (10 nM), 2 µl de cada cebador (E1 y E2, 10nM), 0,4 µl Taq polimerasa (Bioron, 5 U/µl), 5 µl de ADN (sobrenadante) y 12,6 µl de H₂O miliQ estéril.

El ciclado utilizado en la PCR consistió en :

- 1) una etapa de pre-desnaturalización a 95°C x 1 min
- 2) Desnaturalización de hebras a 94°C 1 min
- 3) Hibridación de las hebras a 54°C 1 min
- 4) Elongación de hebras a 64 °C 6 min, se realizaron 30 ciclos de las etapas 2, 3 y 4
- 5) Extensión final a 65°C 16 min.

Se agregó en las ERIC-PCR como control de ADN molde, al lisado celular de la cepa Oc8, utilizada como inoculante, con el fin de verificar su presencia en los nódulos evaluados.

Los productos se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,3% utilizando buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X (Anexo), utilizando como intercalante fluorescente GoodView II bajo UV. Luego de la corrida electroforética (90-110 V, 60 min) el gel es expuesto a luz UV para visualizar los patrones de bandas generados con los amplicones. Luego de la comparación de perfiles de bandas de amplificación de cada aislamiento, se mantuvo uno de cada perfil diferente.

3.2.4. Identificación de aislamientos

Luego de obtener una colección de cepas nodulantes y diferenciadas por ERIC-PCR, se continuó con la identificación de las mismas a nivel de género, mediante la amplificación parcial del gen rRNA 16S por PCR.

Se partió de lisados celulares obtenidos de la misma forma descrita anteriormente, que se utilizaron como ADN molde, y de los cebadores universales 27F y 1392R (Anexo).

La mix para una reacción (25 µl) de 16S-PCR consistió en: 2,5 µl de Buffer (10X), 0,5 µl de dNTPs (10 nM, 0,5 µl de cada cebador (27F y 1392R, 10 nM), 0,3 µl Taq polymerase (Bioron, 5 U/µl), 5 µl de ADN (sobrenadante) y 15,7 µl de H₂O miliQ estéril.

El ciclado utilizado en la 16S-PCR consistió en :

- 1) una etapa de pre-desnaturalización a 95°C x 1 min
- 2) Desnaturalización de hebras a 94°C 1 min
- 3) Hibridación de las hebras a 54°C 1 min
- 4) Elongación de hebras a 64 °C 6 min, se realizaron 30 ciclos de las etapas 2, 3 y 4
- 5) Extensión final a 65°C 16 min.

Los productos de amplificación se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% utilizando buffer TAE 1X, utilizando como intercalante a GoodView, a 90-100 V y 20-30 min tiempo. Luego los productos se enviaron para su secuenciación a través del método de Sanger a la compañía Macrogen (<https://dna.macrogen.com/>) .

Las secuencias obtenidas se procesaron con el programa CHROMAS (Technelysium Pty Ltd., 1998), con el que se cortaron los extremos de baja calidad. Luego, utilizando en BIOEDIT (Hall, 1999). Se alinearon las secuencias *Forward* y *Reverse* y se ensamblaron, generando un *Contig* o secuencia parcial del gen rRNA 16S para cada cepa. Utilizando estas secuencias se identificaron los aislamientos mediante EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>). Además, se realizó un BLASTn contra la base de datos de NCBI del segmento 16S (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Con las cepas o taxones más cercanos (mayor porcentaje de similitud) obtenidos de la base de NCBI y EzBioCloud se realizaron construcciones filogenéticas utilizando el programa MEGA 11 (Tamura, Stecher, and Kumar, 2021).

3.3. Análisis de los suelos

En cada momento de muestreo de suelos (Cuadro 1), se tomaron muestras compuestas de suelo (9 submuestras, de 10 cm de profundidad), que se tamizaron por malla de 36mm y se fraccionaron en dos. Una fracción de suelo se congeló a -80°C para la purificación de ADN y otra se mantuvo a 4°C para su uso inmediato en respiración basal y análisis químicos.

3.3.1. Purificación de ADN y Análisis de datos de secuenciación

A partir del suelo tamizado y conservado a -80 °C (1-4 meses) se extrajo el ADN utilizando el kit DNeasy PowerSoil de Qiagen y siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. La calidad de las extracciones se constataron por corrida electroforética en gel de agarosa 1,0% para observar la calidad de la extracción. La pureza se chequeó por medidas de absorbancia (260 y 280 nm) NanoDrop Thermo Fisher Scientific. Las muestras de ADN purificado fueron almacenadas a -20°C.

El ADN extraído de las muestras se envió a un servicio de secuenciación provisto por la compañía BGI (Hong Kong, <https://www.bgi.com/global>). A partir del ADN se amplificaron segmentos del gen ARNr 16S (región V3-V4) y de la región ITS2 y se secuenciaron los productos de amplificación mediante tecnología DNBSeg.

Con los datos de la secuenciación, que incluyen las secuencias y su calidad, se procedió a construir un objeto *phyloseq* en Rstudio, utilizando el pipeline de Github (McMurdie, P. J., & Holmes, S., 2013). Para esto se procesaron las secuencias obtenidas utilizando el paquete dada2 (Callahan et al., 2016), y se generaron objetos *phyloseq* con una tabla de ASV (Amplicon Sequence Variants), una tabla taxonómica, y una tabla de metadata, que contiene información acerca de cada una de las muestras. La tabla de ASV contiene la abundancia de las variantes de secuencia obtenidas tras el filtrado de errores de amplificación y secuenciación. La tabla taxonómica se obtuvo a partir de las bases de datos

de referencia SILVA v138.2 (*SILVA: Silva*, s. f.) y UNITE v10.0 (*UNITE*, s. f.), y que vinculó cada ASV con su respectiva asignación taxonómica (desde filo hasta género).

La mayoría de los ASV se pudieron asociar taxonómicamente, lo que permitió identificar los géneros, o taxones mayores, presentes en las muestras. Esta asociación permitió contar las lecturas por taxón y generar una tabla de número de lecturas por taxón y por muestra. La tabla de metadata incluyó las variables del experimento y la categoría de cada muestra. En este caso las variables de respuesta fueron: Cultivo (PVV, soja o barbecho), Tiempo (momento de muestreo: "Precultivo", "Prematanza", "Pretrigo", "Posttrigo"), Mes del año (asociado con factores de clima, especialmente la temperatura, en mayo, junio, diciembre) y Nitrógeno (fertilización nitrogenada, o no, solo para el último muestreo de "Posttrigo"). Con los objetos del paquete *phyloseq* y *vegan* (Oksanen et al., 2025), de R, se analizó la composición de las comunidades microbianas en el ensayo según las variables categóricas de interés definidas.

La comunidad microbiana fue investigada por diversos índices (Simpson, Shannon) y la riqueza observada, los cuales se calcularon utilizando el paquete *vegan* en Rstudio. Cabe aclarar que el índice de Simpson se observó por su complemento ($S = 1 - \sum p_i^2$). La distancia Bray-Curtis (16S e ITS) se visualizó mediante NMDS (del inglés, *Non-metric Multidimensional Scaling*) y se realizó análisis estadístico de la comunidad mediante adonis también del paquete *vegan*.

3.3.2. Respiración basal de suelos

A partir del suelo tamizado se determinó la RB, como indicador de actividad biológica. Para ello, se siguió el protocolo propuesto por la Universidad de Cornell (Schindelbeck, 2017) que cuantifica el CO₂ generado por la respiración de la comunidad microbiana presente en suelos, tal como se describe a continuación (Figura 9).

- 1) Las muestras de suelo se secaron en estufa a 40°C.
- 2) Se tomaron 15 gr de suelo seco que se colocaron sobre una canasta de papel aluminio con 9 agujeros en la base, para permitir el pasaje del agua.
- 3) Las canastas con suelo se colocaron sobre 2 capas de papel de filtro (Whatman No 1), colocadas en el piso de frascos de vidrio.
- 4) Se colocaron soportes plásticos con forma de mesa, por encima de la canasta, sin tocar el suelo.
- 5) Sobre los soportes se colocaron viales conteniendo 10 ml de Hidróxido de Potasio (KOH) 0,5 M.
- 6) El papel de filtro del fondo del recipiente se hidrató con 5 ml de H₂O.
- 7) El frasco de vidrio se cerró fuertemente, para evitar el intercambio de aire (gases).

- 8) Se incubaron los frascos durante 4-7 días en oscuridad, a 26 °C.
- 9) Como control o blanco, se prepararon frascos de vidrio con papel de filtro hidratado, soporte con vial y KOH 0,5 M y canasta de papel de aluminio sin suelo.

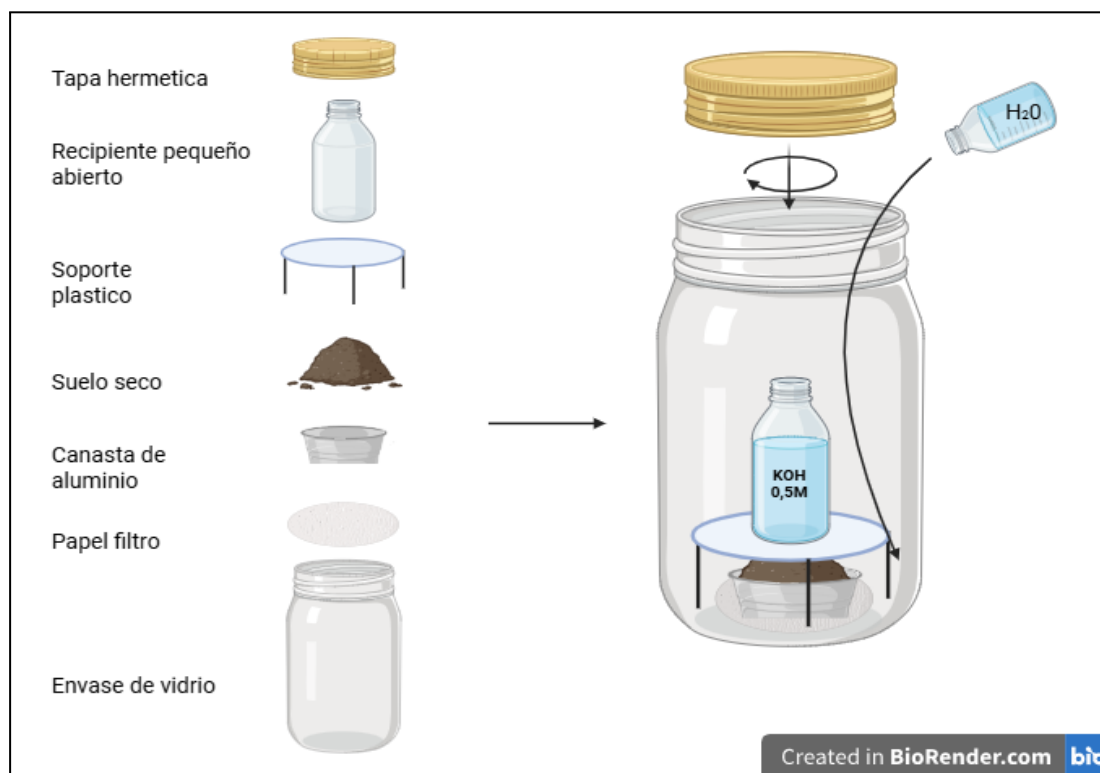
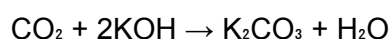


Figura 9. Esquema del ensayo de respiración basal descrito por la universidad de Cornell, creado en <https://BioRender.com>.

Fundamento de la técnica: Al hidratar el suelo se activan los MO allí presentes y que, por respiración, liberan CO_2 a la atmósfera interna del frasco. El CO_2 reacciona con el KOH presente en los viales, formando carbonato de potasio (K_2CO_3) y agua (H_2O) en la siguiente reacción:



Esta reacción provoca un cambio en la conductividad eléctrica de la solución presente en los viales; a mayor concentración de K_2CO_3 formado, menor es la conductividad eléctrica. A través de la medición de la conductividad eléctrica de la solución de los viales luego del período de incubación, y de soluciones estándares de KOH 0,5 M y K_2CO_3 saturado, es posible realizar el cálculo de la concentración de CO_2 que reacciona con el KOH (Schindelbeck, 2017).

Es necesario incluir dentro del ensayo frascos blanco o testigos, que no contienen suelo, para considerar en los cálculos el CO_2 del interior de los frascos que no proviene de la respiración. Es posible de esta forma conocer cuánto CO_2 proviene de la respiración del suelo por actividad microbiana. Las medidas se realizaron con un medidor de conductividad

eléctrica (Peak S-620). Los cálculos de la RB se expresaron en mg de CO₂ producido por RB/g de suelo seco/día (Schindelbeck, 2017).

3.3.2. Productividad vegetal

La productividad vegetal fue evaluada en la Facultad de Agronomía, Laboratorio de Química, Departamento de Suelos y Aguas. Se determinó el rendimiento en biomasa aérea de los PVV en dos momentos de los cultivos de PVV: cercano al momento de colecta de raíces con nódulos (PVV Nódulos) y en "Prematanza" (Cuadro 1).

Además se evaluó el rendimiento en grano de trigo en la etapa "Posttrigo" (Cuadro 1).

Los resultados se expresaron en kg/ha de biomasa seca o granos, respectivamente.

3.4. Análisis de datos

Todos los ensayos y mediciones se realizaron al menos por triplicado. Para el análisis de datos de productividad vegetal se utilizó el programa Infostat (Universidad Nacional de Córdoba, 2010), para el resto, Graphpad (*GraphPad Prism*, s. f.).

Los datos fueron sujetos a test de Normalidad (Shapiro-Wilk test y Kolmogorov-Smirnov distance) y de homocedasticidad (Brown-Forsythe test y Bartlett's test). Para los datos con distribución normal se realizaron análisis de varianza (ANOVA). En aquellos casos en los que el ANOVA mostró diferencias significativas entre medias de tratamientos, se realizaron pruebas "a posteriori", mediante tests de Tukey ($p < 0.05$). En los casos en los que los datos no presentaron distribución normal u homogeneidad de varianza se emplearon pruebas no paramétricas de Wilcoxon rank-sum test. Los datos obtenidos por la secuenciación masiva de amplicones se analizó utilizando Rstudio (Posit Team, 2025).

4. RESULTADOS

4.1. Análisis de bacterias endófitas de nódulos radiculares

A partir de los nódulos obtenidos de las diferentes *Crotalaria* spp., se obtuvo una colección de aislamientos. Los mismos fueron sometidos a pruebas de nodulación para identificar aquellas cepas nodulantes en la planta de origen (Figura 10.A) y a pruebas de diferenciación por ERIC-PCR para distinguir cepas (Figura 10.B).

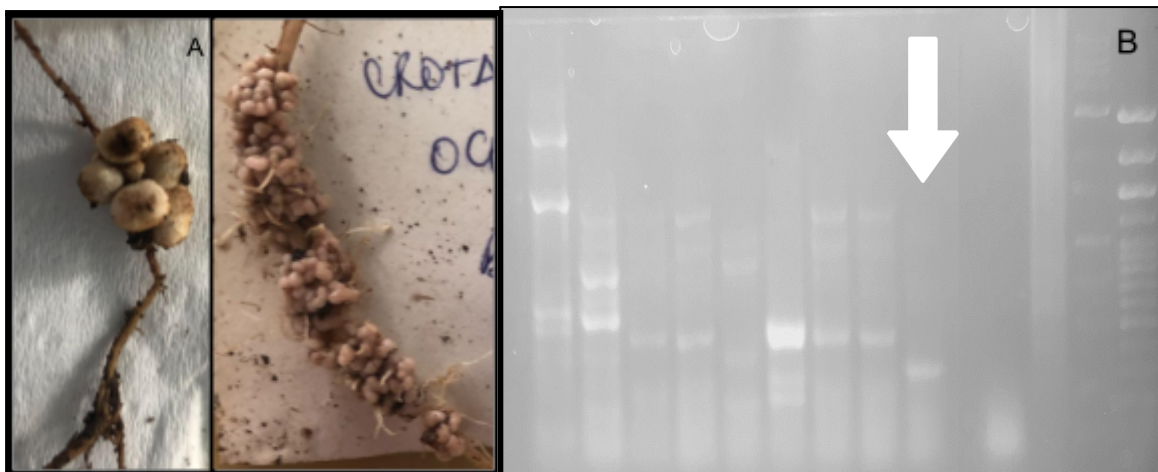


Figura 10. A. Nódulos de Soja (Izquierda) y *C. ochroleuca* (Derecha); B. Gel representativo, de agarosa con perfiles ERIC de diversas cepas obtenidas de nódulos de *C. spectabilis* y Soja. De izquierda a derecha CSp1, CSp2, S2, S4, S5, S8, S25,S26, Oc8 (Flecha blanca), carril vacío, (-), (+) y marcadores de peso moleculares de 1 kb y 100 pb.

La cepa *Bradyrhizobium monzae* Oc8, utilizada para inocular las semillas de las 3 *Crotalaria* spp. en el ensayo en campo, no se encontró entre los aislamientos.

Se continuó con la identificación a nivel de género de las cepas que al inocularse en la planta de origen, indujeron la nodulación. De todas ellas, se pudo identificar a nivel de géneros rizobianos solo a dos cepas aisladas de nódulos de *C. spectabilis*; estas fueron las cepas Csp1 y Csp2.

Los análisis por BLASTn y EzBiocloud indican que ambas cepas son *Bradyrhizobium* spp. En el análisis filogenético realizado en MEGA, la cepa Csp1 se ubica fuera del gran grupo principal formado por las cepas de *Bradyrhizobium* seleccionadas para el análisis (Figura 11).

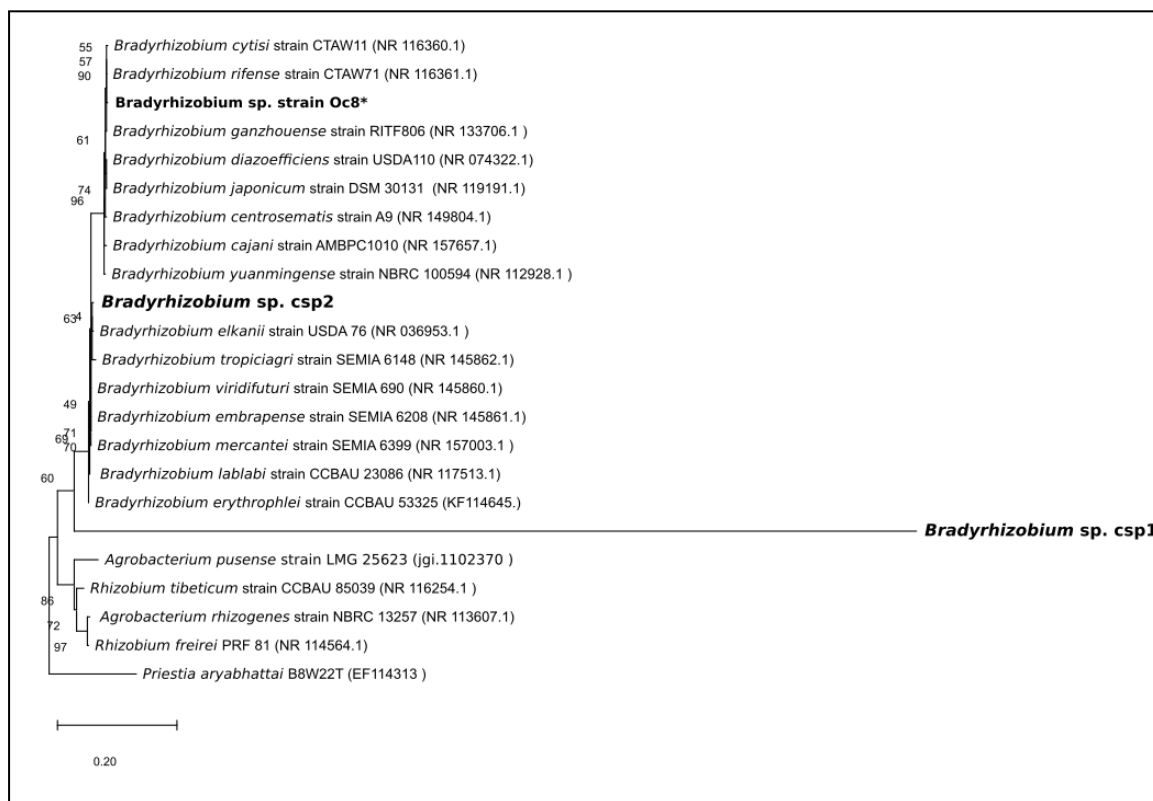


Figura 11. Árbol filogenético inferido usando el método de Neighbor-Joining, con las secuencias parciales (1416 pb) del gen rRNA 16S de las cepas nodulantes y diferenciadas (**csp1 y csp2**), la cepa utilizada como inoculante (**Oc8***) y cepas cercanas obtenidas de la NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y EzBiocloud (<https://www.ezbiocloud.net/>). Se muestran en los nodos los valores de bootstrap (5000 réplicas) mayores de 50%. Como raíz externa se utilizó a *Priestia aryabhattai*. Las distancias evolutivas se calcularon por Kimura 2 y se muestra el número de sustituciones de bases por sitio. El análisis se llevó a cabo en MEGA 11 (Tamura, Stecher, and Kumar, 2021).

4.2. Análisis de los suelos por secuenciación masiva de amplicones

Se obtuvieron en total 1185534 lecturas en 6181 ASVs del gen ARNr 16S (procariotas) y 3308215 lecturas en 5080 ASVs de ITS (hongos) y un promedio de lecturas por muestra de 35107. En procariotas se utilizó la asignación taxonómica hasta nivel de género, y en hongos hasta especie, mediante las bases de datos SILVA y UNITE, respectivamente.

4.2.1 Independencia de las variables de respuesta

Para evaluar si las variables categóricas registradas en el diseño experimental —Tiempo, Mes, Cultivo y Nitrógeno — presentan algún tipo de dependencia entre sí, se aplicó una

serie de pruebas de Chi-cuadrado (χ^2) por pares de variables para el conjunto de datos (ASVs de ITS y 16S juntos). Las pruebas de χ^2 revelaron asociaciones entre algunas de estas variables con un p value $<0,05$ (Cuadro 2).

Cuadro 2. Resultados de las interdependencias evaluadas a través de test de Chi cuadrado entre en las variables Tiempo, Més, Cultivo y Nitrógeno, gl:grados de libertad, p value (límite $< 0,05$).

Variable 1	Variable 2	χ^2	gl	p value	Asociación
Mes	Cultivo	3,764706	10	0,9573379	No significativa
Mes	Nitrógeno	17,286915	2	0,0001762764	Significativa
Mes	Tiempo	128	6	3,388852E-25	Significativa
Cultivo	Nitrógeno	1,306122	5	0,9343004	No significativa
Cultivo	Tiempo	64	15	0,00000005111802	Significativa
Nitrógeno	Tiempo	22,204082	3	0,00005915392	Significativa

4.2.2 Diversidad y Riqueza

Los índices de diversidad (Shannon y Simpson) y riqueza observada mostraron variaciones significativas según las variables experimentales consideradas ($p < 0.001$). Al comparar entre tiempos de muestreo, la comunidad procariota mostró un pico en diversidad y riqueza en el tiempo "Posttrigo" (Figura 12). En cambio, la comunidad fúngica disminuyó tanto en diversidad como riqueza conforme avanza el tiempo (Figura 13).

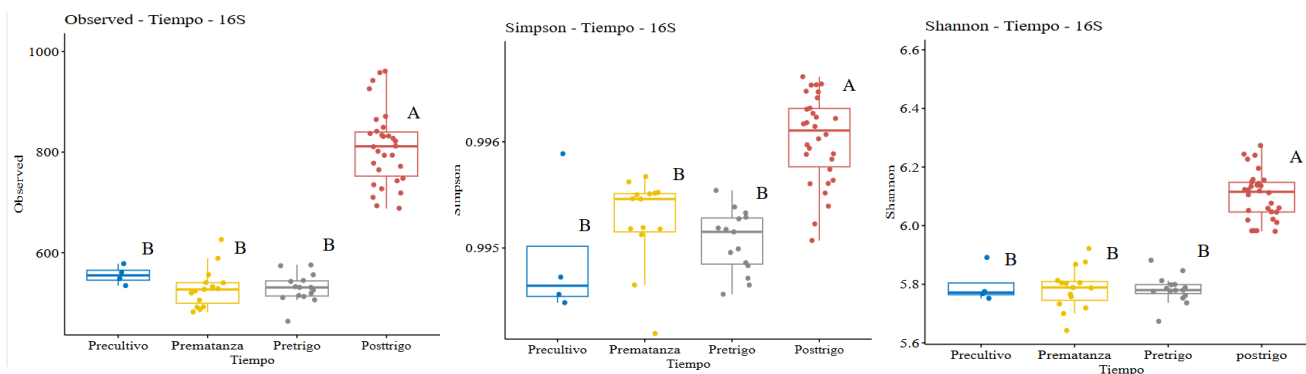


Figura 12. Variación de los índices de diversidad Simpson (izquierda) y Shannon (medio) y de riqueza observada (derecha) para las comunidades procariotas, en función de los 4 momentos de muestreo (variable Tiempo).

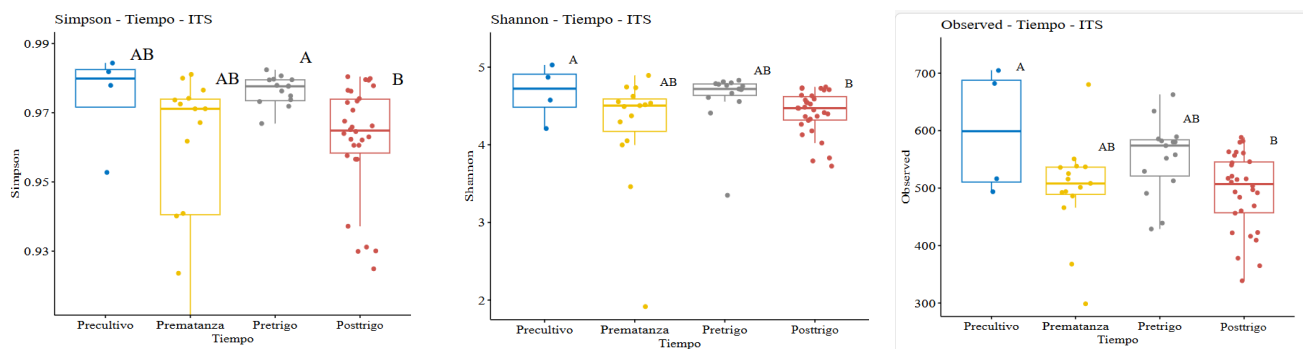


Figura 13. Variación de los índices de diversidad Simpson (izquierda) y Shannon (medio) y de riqueza observada (derecha) para las comunidades fúngicas, en función de los 4 momentos de muestreo (variable Tiempo).

No se hallaron diferencias significativas al observar el efecto de la fertilización con nitrógeno (Figura 14), tampoco se hallaron diferencias significativas en los índices de diversidad entre cultivos (Figura 15).

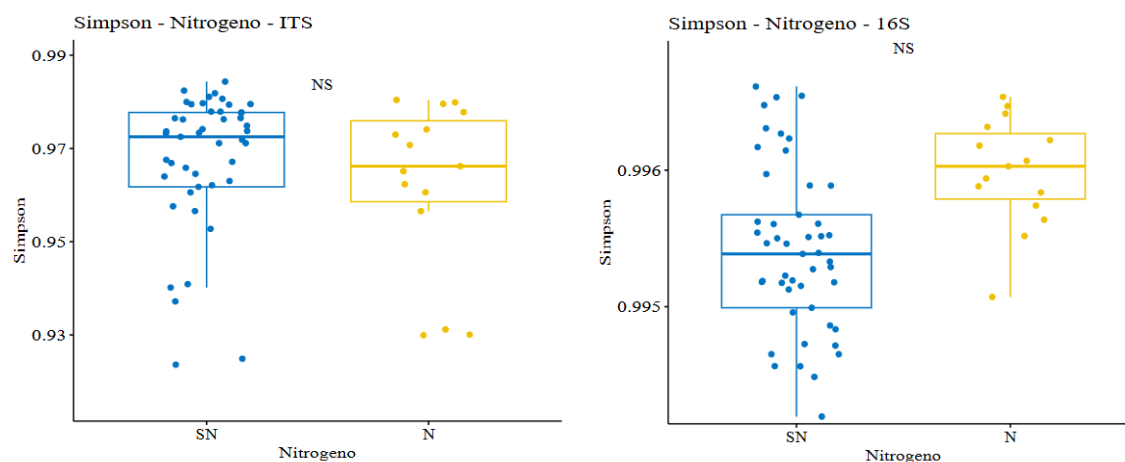


Figura 14. Variación del índice de diversidad Simpson para las comunidades procariota (derecha) y fúngica (izquierda), en función de la presencia (CN) o ausencia (SN) de fertilización con N en la segunda etapa de la experimentación. NS: diferencias no significativas.

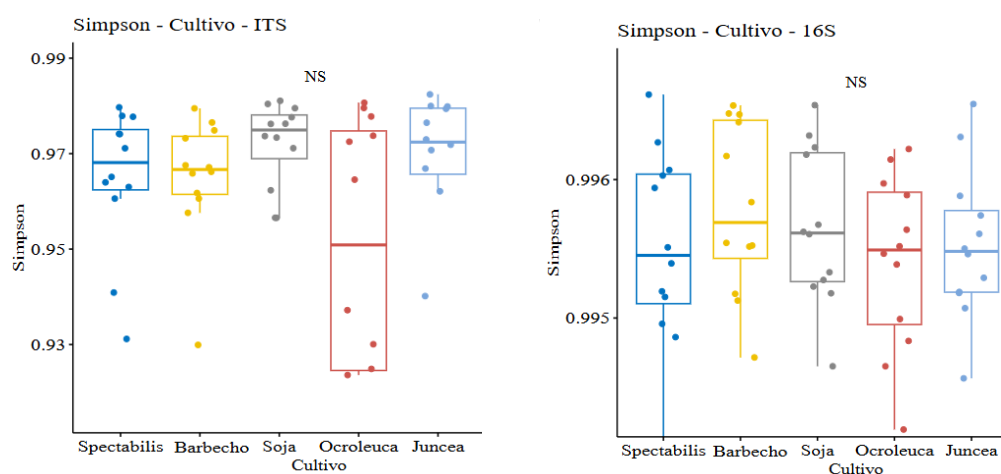


Figura 15. Variación del índice de diversidad Simpson para las comunidades procariotas (derecha) y fúngicas (izquierda), en función del Cultivo de PVV a los que fueron expuestas las parcelas en la primera etapa de la experimentación. NS: diferencias no significativas.

La diversidad asociada a los meses arroja que los procariotas aumentan su diversidad en diciembre comparada con los otros meses, mientras que la comunidad fúngica mantiene su diversidad similar en todos los meses (Figura 16).

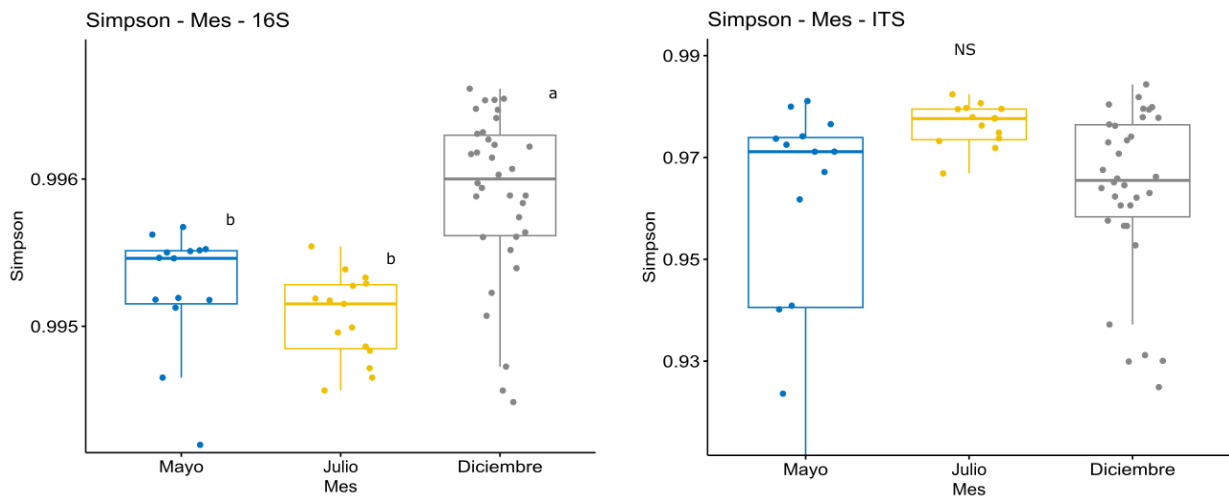


Figura 16. Variación del índice de diversidad Simpson para las comunidades procariotas (Izquierda) y fúngica (derecha), en función del Mes a los que fueron expuestas las parcelas en la primera etapa de la experimentación.

4.2.3. Diversidad Beta

Se aplicó un análisis NMDS basado en la distancia de Bray-Curtis entre muestras para visualizar las diferencias en la composición de las comunidades entre factores (Figuras 17 y 18).

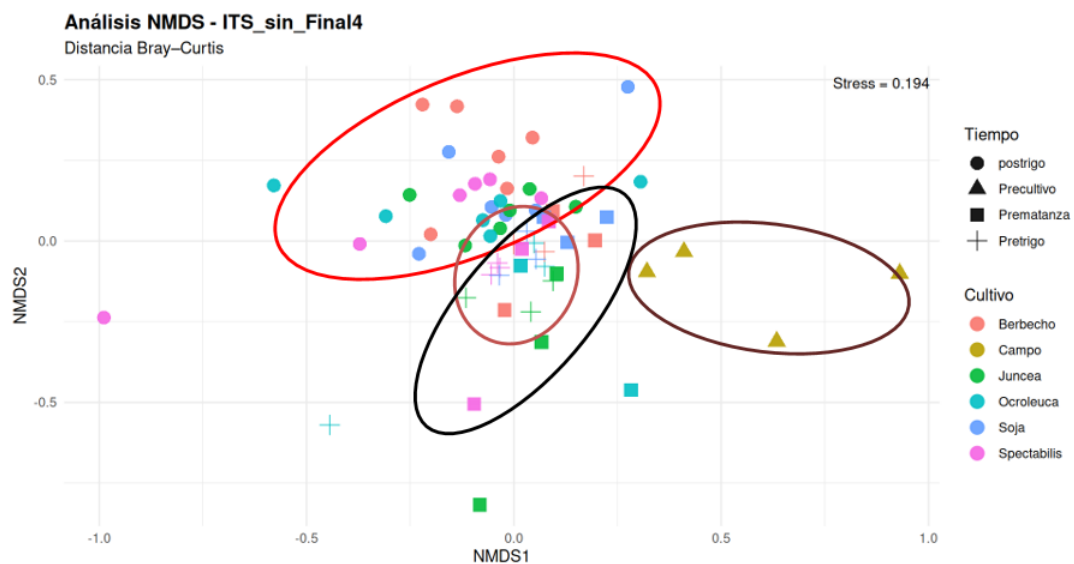


Figura 17. Análisis NMDS basado en distancia de Bray-Curtis mostrando la estructura de comunidades microbianas del suelo de las comunidades fúngicas (ITS).

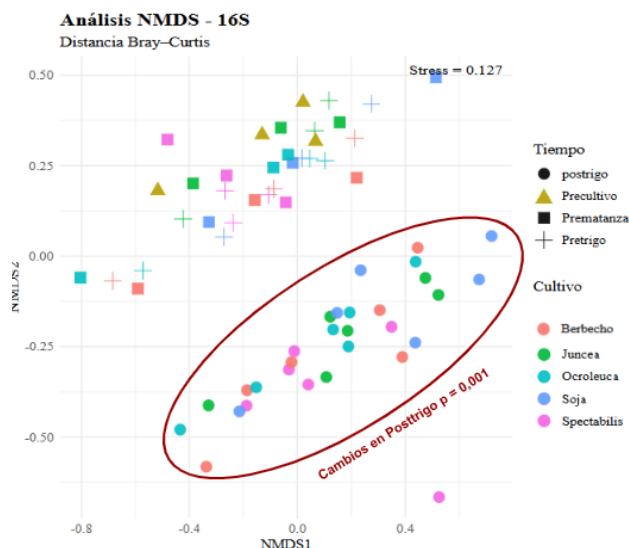


Figura 18. Análisis NMDS basado en distancia de Bray-Curtis mostrando la estructura de comunidades microbianas del suelo de las comunidades procariotas (16S).

El análisis de varianza multivariado basado en distancias (PERMANOVA, Bray-Curtis) reveló nuevamente que el Tiempo fue el factor que explicó la mayor proporción de la variación en la composición procariota ($R^2 = 0.20$; $p = 0.001$) y fúngica ($R^2 = 0.10$; $p = 0.001$), la variable mes también presenta diferencias significativa tanto para procariota ($R^2 = 0.16$; $p = 0.001$) y fúngica ($R^2 = 0.06$; $p = 0.005$). El tipo de Cultivo de PVV también presentó una influencia significativa en ambas comunidades ($R^2 = 0.10$; $p = 0.005$ para procariotas y $R^2 = 0.13$; $p = 0.001$ para hongos). En cambio, el factor Nitrógeno no mostró un efecto estadísticamente significativo. En conjunto, estos resultados sugieren que la dinámica temporal es el principal motor de cambio en las comunidades bacterianas, seguida por variaciones asociadas al tipo de cultivo, mientras que el aporte de nitrógeno no ejerce un impacto detectable sobre la estructura microbiana bajo las condiciones evaluadas.

4.2.4. DESeq

DESeq es una herramienta estadística utilizada para identificar diferencias significativas en la abundancia de cada taxón entre grupos de muestras. Se utilizó para investigar cómo varían los taxones frente a las 4 variables evaluadas. Se realizaron con los comandos *Deseq* (Love et al., 2014) utilizando el log2FoldChange que indica cuánto cambia la abundancia de cada taxón entre dos condiciones o variables, expresado en escala logarítmica base 2. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 1e-7$ para 16S y $p = 1e-16$ para ITS).

Para la comunidad procariota (16S), se observó en suelos con Barbecho un aumento en el filo de Planctomycetes, y en especial del género *Singulisphaera*, al ser comparado con *C. juncea*, Soja y *C. spectabilis*. En suelos expuestos a *C. ochroleuca* se observó un aumento en los filos de Planctomycetes, Actinobacterias y Firmicutes, en comparación con *C. juncea*, Soja y *C. spectabilis*. Al analizar la variable Mes se observó que en Diciembre hay un aumento en los phylum Planctomycetes, Actinobacterias, Firmicutes, Chloroflexi y Verrucomicrobia comparado con Julio y Mayo. Cabe destacar que en el mes de Julio hay un aumento de Proteobacteria. Al analizar los tiempos de muestreo, se ve un aumento de los filos Planctomycetes, Actinobacterias, Firmicutes, Chloroflexi y Verrucomicrobia en "Posttrigo" en relación a "Precultivo", "Prematanza" y "Pretrigo", y una disminución de Cianobacteria y Epsilonbacteraeota en "Posttrigo" comparado con "Prematanza" y "Precultivo". En base a la fertilización con Nitrógeno, se observa una mayor abundancia de Firmicutes de la clase Clostridia en SN.

En la comunidad fúngica se observa una mayor variabilidad tal como se mostró anteriormente en la matriz NMDS. En torno a la variable Cultivo, no fue posible determinar taxones indicadores. En función del Mes, cuando se compara Diciembre con Julio, en Diciembre aumenta la abundancia de especies pertenecientes a la Clase Dothideomycetes mientras que en el periodo de Julio el aumento es de las Clase Leotiomycetes, Sordariomycetes, Pezizomycetes, Microbotryomycetes, Orbiliomycetes, Tremellomycetes, Leotiomycetes. Si se compara con Mayo existe un aumento de los Chytridiomycota comparado con los otros meses. En relación a la variable Tiempo, la mayor diferencia entre el principio y final del ensayo es el aumento de los géneros *Coniochaeta*, *Fusarium*, *Plectosphaerella*, *Phomatospora*, *Pseudopithomyces*, *Aspergillus*, *Neopyrenochaeta*, *Lectera* y *Epicoccum* y la disminución de los géneros *Cladosporium*, *Dinemasporium*, y *Pyrenochaetopsis*.

En cuanto a la fertilización con N, cuando no se fertiliza aumenta *Sordariomycetes* y *Pezizomycetes* mientras que al fertilizar con N aumenta *Eurotiomycetes*. Estos datos se presentan a continuación a través de los géneros más abundantes de procariotas por Tiempo (Figura 19) y los géneros más abundantes para comunidad fúngica (Figura 20).

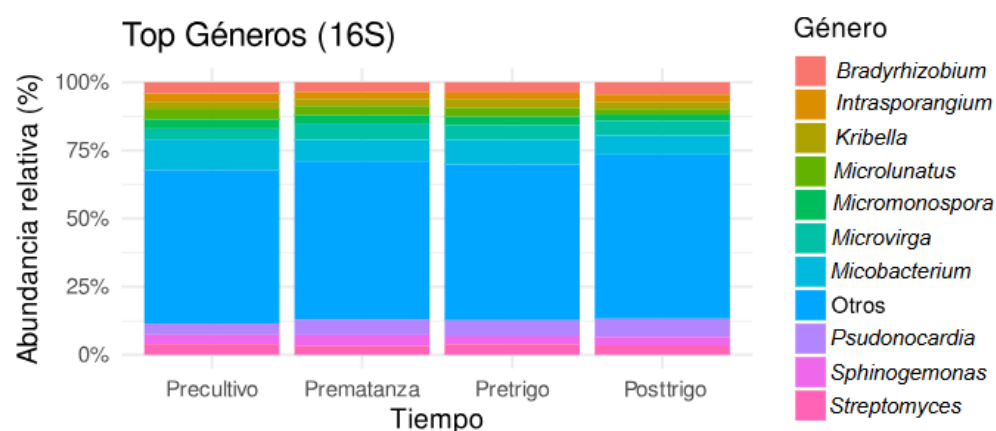


Figura 19. Géneros más abundantes por Tiempo para la comunidad procariota (16S).

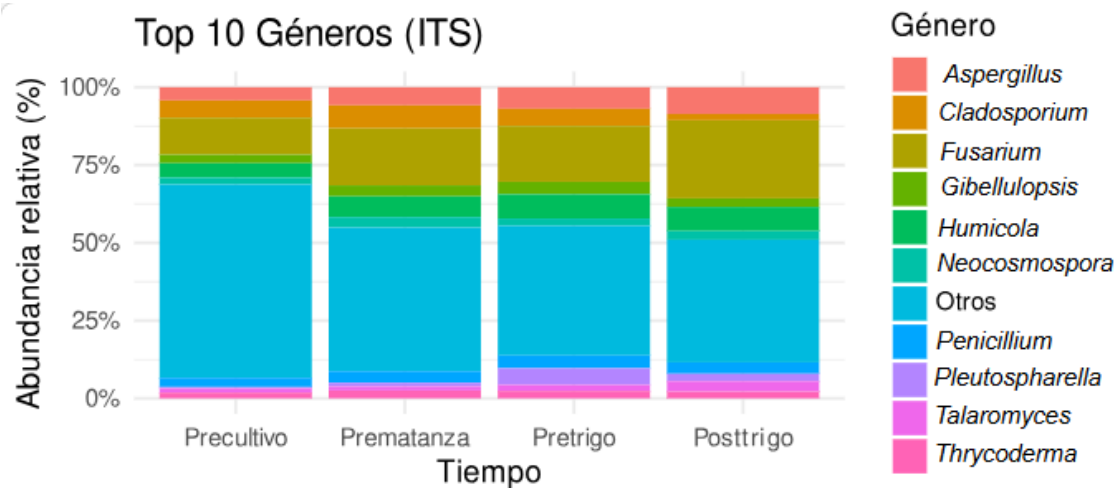


Figura 20. Géneros más abundantes por Tiempo para la comunidad fúngica (ITS).

4.3. Análisis del suelo por RB

Los análisis estadísticos con los datos de RB indicaron que no existen diferencias al comparar la RB entre tratamientos, para "Prematanza" y "Pretrigo" (Figura 21). La sola excepción fue para el muestreo "Posttrigo", donde se observa que los suelos con soja y *C. spectabilis* presentaron menor actividad que los suelos con *C. juncea* y barbecho cuando no se le agrega N al campo (SN) (Figura 22).

El único tratamiento en "Prematanza" que mostró diferencias significativas en la RB con suelos de "Precultivo" fue el de *C. ochroleuca* ($p = 0,0021$) (Figura 21). Un aumento en RB, respecto al inicio del ensayo ("Precultivo"), se observó también en los suelos con *C. ochroleuca*, soja y barbecho muestreados en "Pretrigo", ($p \leq 0,02$) (Figura 21).

Al comparar la RB de los suelos en "Posttrigo" con la RB de los suelos en "Precultivo", se observó que la actividad aumentó hacia el final del ensayo para todos los tratamientos ($p \leq 0,01$), excepto para los suelos que tuvieron tratamientos con Soja o *C. spectabilis* y que no fueron fertilizados con N durante el trigo (SN) (Figura 22).

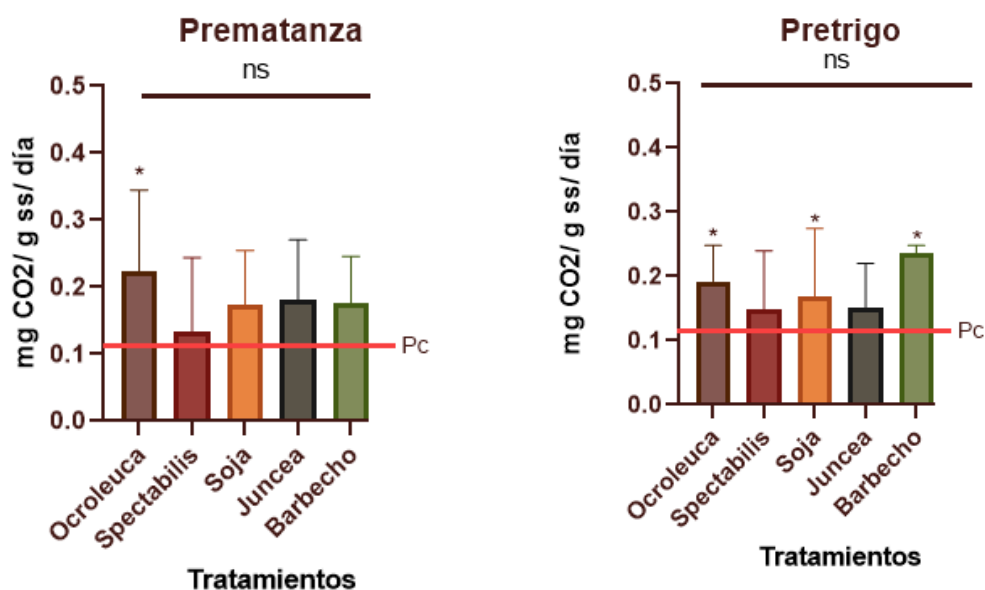


Figura 21. Respiración basal (RB) en los distintos momentos de muestreo. ns, sin diferencias significativas; la línea horizontal Pc indica la RB del suelo previo a la siembra de PVV (a tiempo cero, o "Precultivo"). Izquierda: Tiempo de muestreo "Prematanza". Derecha: Tiempo de muestreo "Pretrigo". * indica diferencias significativas con la RB de "Precultivo" (Pc).

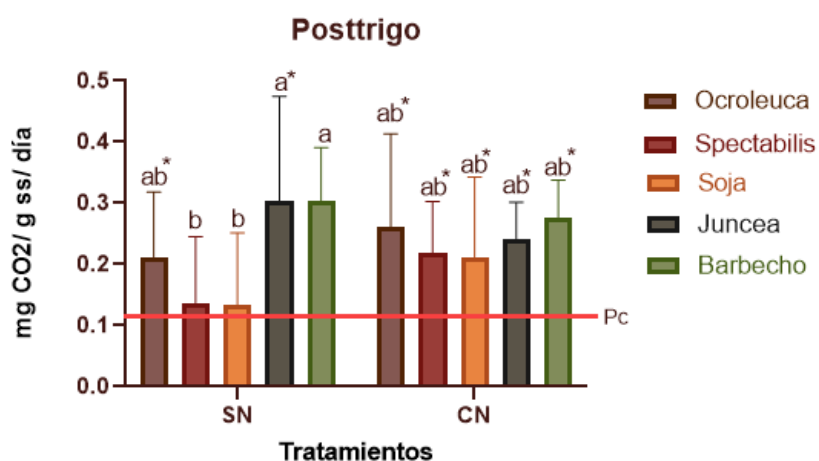


Figura 22. Respiración basal en los distintos momentos de muestreo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, línea pc indica el promedio inicial a tiempo cero ("Precultivo"). Tiempo "Posttrigo", SN (Sin Nitrógeno) para los no fertilizados con nitrógeno a la derecha y N (Nitrógeno) para los fertilizados con nitrógeno a la izquierda. * indica diferencias significativas con la RB de "Precultivo" (Pc).

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la RB de los suelos en "Prematanza" y en "Pretrigo" entre ningún "Cultivo".

Al observar el último intervalo "Pretrigo"- "Posttrigo", es interesante notar que para el tratamiento con *C. juncea*, la actividad aumenta con diferencias estadísticas cuando no se le agrega N (SN), mientras que cuando se le agrega N (CN), la actividad se mantiene.

De los tratamientos SN en "Posttrigo" también destaca *C. juncea* que se diferencia significativamente de soja, *C. spectabilis* y *C. juncea* en "Pretrigo" (Figura 23).

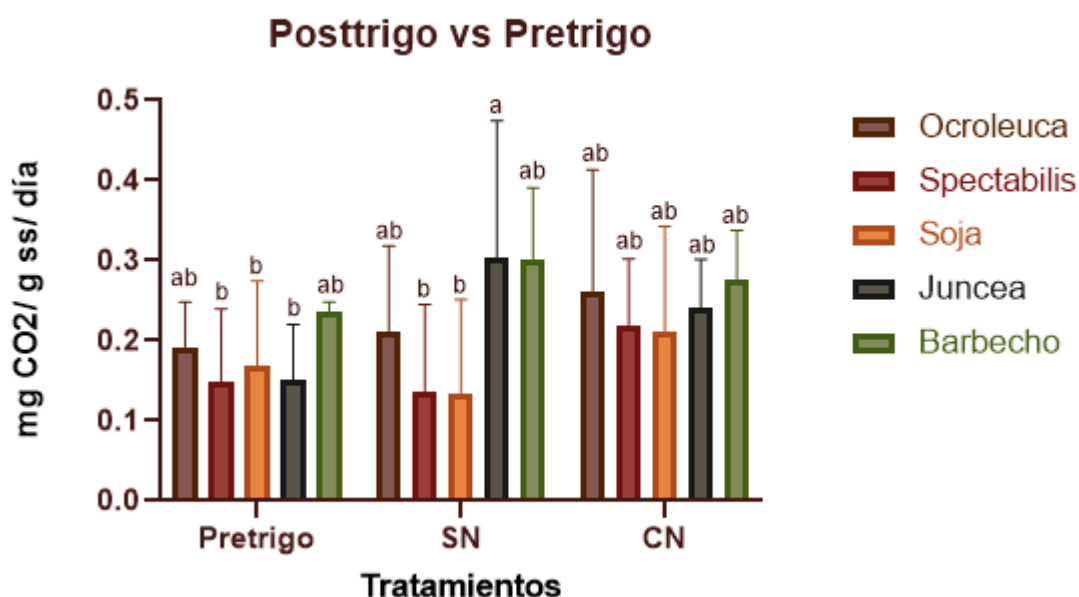


Figura 23. Respiración basal por tratamiento, comparando los suelos expuestos a PVV en "Pretrigo" y "Posttrigo". CN y SN, indican tratamientos que recibieron, o no, fertilización nitrogenada, respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

Al promediar la actividad de los cultivos dentro de cada tiempo de muestreo, se halló que hay una tendencia al aumento significativo de la RB en el tiempo, siendo "Prematanza" y "Pretrigo" significativamente superior que "Precultivo", y a su vez "Posttrigo SN" significativamente mayor que estos dos (Figura 24).

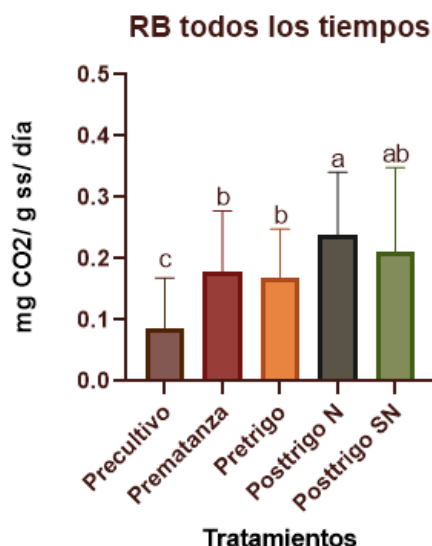


Figura 24. Actividad basal comparada entre los tiempos de muestreo. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre grupos.

4.4. Rendimiento de los cultivos

En relación al rendimiento de los cultivos evaluados como PVV, se destacó *C. juncea* en los dos períodos de evaluación del rendimiento, sin diferencias significativas, al momento de la "Prematanza", con *C. ochroleuca* y soja, pero con mayor rendimiento que *C. spectabilis* (Figura. 25).

Al realizar un ANOVA para evaluar el efecto de los factores Cultivo (especie de PVV) y momento de muestreo (Tiempo) sobre el rendimiento, se observó que el Cultivo tuvo un efecto claro sobre el rendimiento, pero el momento de muestreo no influyó de forma clara. Al analizar la interacción entre PVV y momento de muestreo, se observó que el efecto del PVV no varía según la fecha del muestreo (Figura 25).

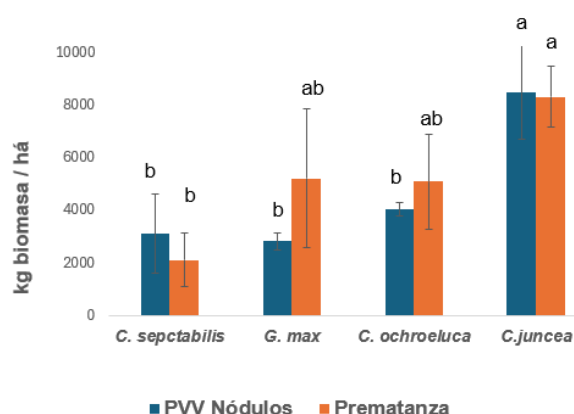


Figura 25. Producción de materia seca en kg/ha de los cultivos evaluados como PVV. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). La tabla muestra el ANOVA de tipo III, utilizado para evaluar el efecto de los distintos factores sobre la variable dependiente. *Especie* refiere al cultivo de PVV, *Fecha* refiere al momento de muestreo, y *Especie*Fecha* refiere a la interacción entre ambos. El análisis fue realizado con Infostat (Universidad Nacional de Córdoba, 2010). Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre grupos.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	122111808,67	7	17444544,10	7,64	0,0004
Especie	110320676,33	3	36773558,78	16,11	<0,0001
Fecha	1994113,50	1	1994113,50	0,87	0,3638
Especie*Fecha	9797018,83	3	3265672,94	1,43	0,2706
Error	36512788,67	16	2282049,29		
Total	158624597,33	23			

En relación al rendimiento del trigo, no se observaron diferencias significativas entre los rendimientos del trigo sembrado en las parcelas que previamente tuvieron PVV, soja o barbecho (Figura. 26). Tampoco se observaron diferencias entre las parcelas que fueron fertilizadas con N y las que no recibieron fertilización nitrogenada.

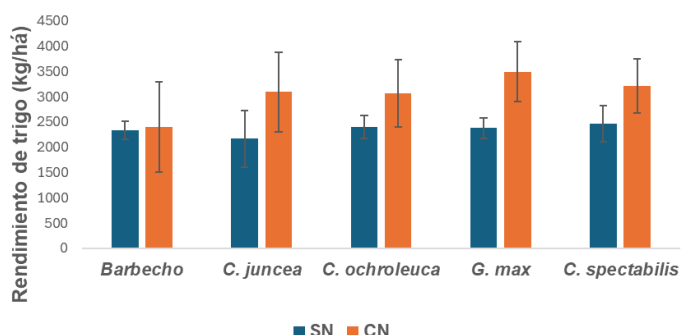


Figura 26. Rendimiento (kg/ha) en grano del trigo sembrado sobre parcelas que tuvieron en la etapa previa PVV o barbecho. CN y SN, refiere a parcelas que fueron fertilizadas con N o no, respectivamente.

5. DISCUSIÓN

5.1. Análisis de bacterias endófitas de nódulos radiculares

Uno de los aspectos clave de la simbiosis entre rizobios y leguminosas es su especificidad. Los rizobios son específicos sobre qué especies de leguminosas nodulan. En el campo, los agricultores comúnmente inoculan las semillas de leguminosas de interés agrícola con rizobios recomendados, incluso cuando los suelos presentan poblaciones de rizobios capaces de formar nódulos en esas leguminosas, como forma de asegurar la implantación del cultivo. Para el caso de *Crotalaria* spp., estas plantas son de origen tropical, introducidas a un país en el que no existe historia del cultivo, por lo que la inoculación puede ser aún más relevante para el rendimiento. En esta investigación se evaluó la inoculación de *Crotalaria* spp. con la cepa nativa *Bradyrhizobium monzae* Oc8. Esta cepa se seleccionó de una colección de rizobios nativos capaces de nodular eficientemente plantas exóticas de *Crotalaria* spp. y *Cajanus cajan* (Berriel et al. 2022). La selección se basó en su desempeño simbiótico en *Crotalaria* spp. en condiciones controladas (Berriel, 2022; Morel et al., 2025). Se desconocía, hasta el momento, su desempeño en condiciones agronómicas de campo y su tasa de ocupación de los nódulos.

La ocupación de nódulos hace referencia a conocer qué cepa de rizobio está presente dentro de los nódulos de las raíces. Esto es de particular importancia cuando no se conoce la competencia entre cepas nativas y una cepa inoculada. En este trabajo, lo que se observó fue que los 3 cultivos de *Crotalaria* spp. presentaron abundantes nódulos en sus raíces, pero la cepa Oc8 no se encontró ocupando los nódulos evaluados. Este hallazgo no es extraño en el agro: las plantas forman nódulos, pero las cepas inoculadas en las semillas no necesariamente son las que terminan ocupando esos nódulos (Asad et al., 1991; Bogino et al., 2008; Mendoza-Suárez et al., 2021).

Aunque Oc8 presenta un gran potencial de uso como inoculante debido a su eficiencia simbiótica confirmada *in vitro* (Morel et al., 2025), un ambiente ecológico real es muy diferente a un ambiente controlado, pudiendo afectar el comportamiento, y su desempeño en términos de ocupación de nódulos en campo no fue prometedor. La variabilidad climática a campo comparado con *in vitro* sumado a la competencia biológica son grandes influyentes en el rendimiento (Hogg et al., 2002). La ausencia de la cepa Oc8 dentro de los nódulos evaluados sugiere una baja competitividad de esta cepa frente a otros rizobios nativos, más adaptados y compatibles con las *Crotalaria* spp.

Cuando los inoculantes rizobianos se basan en cepas nativas se espera un buen desempeño en el campo debido a sus adaptaciones genéticas al entorno local (Bogino et al., 2008; Mendoza-Suárez et al., 2021). Entre los factores causantes de la nula ocupación de los nódulos de las *Crotalaria* spp., además de la presencia de rizobios autóctonos mejor adaptados y/o más competitivos, con ventajas ecológicas (Fukami, 2015), sobre todo a la hora de ocupar sitios de nodulación (Denison & Kiers, 2011; Triplett & Sadowsky, 1992), destaca la selección impartida por las plantas, que favorece unos rizobios

frente a otros, determinando qué cepas ocupan sus nódulos (Porter et al., 2024; Rahman et al., 2023; Ramana et al., 2025).

Si un inoculante rizobiano muestra una baja ocupación de nódulos, puede tener varias consecuencias agronómicas. Una de ellas es que si la cepa inoculada es eficiente pero no logra ocupar los nódulos, la planta termina asociándose con rizobios nativos que pueden ser poco eficientes, o incluso ineficientes, reduciendo el N que llega al cultivo, poniendo en peligro el rendimiento vegetal buscado. Si la FBN es baja, la planta compensa absorbiendo más N mineral del suelo y en términos prácticos, para que no se afecte el rendimiento del cultivo, el agricultor podría recurrir a fertilizaciones nitrogenadas, comprometiendo la sustentabilidad del sistema. Como perspectiva, el proyecto podría a futuro cubrir más aspectos del comportamiento a campo de Oc8. En relación a la inoculación, no se evaluó la sobrevivencia de Oc8 sobre las semillas luego de la inoculación, ni tampoco se evaluó la población de rizobios nodulantes de *Crotalaria* spp. en el suelo, mediante Número Más Probable (NMP), por ejemplo.

Otro factor a tener en cuenta en los resultados de ocupación de nódulos es el momento de muestreo. Las raíces con nódulos se tomaron con más de 3 meses de diferencia respecto de la siembra de las semillas inoculadas. Es posible que este tiempo sea demasiado prolongado. Se ha visto que en fases tempranas, muy cerca de la inoculación y la siembra de las semillas, pueden predominar las cepas del inoculante, porque llegan primero a la rizosfera y a la raíz en desarrollo, y la planta aún no ha desarrollado sistemas de selección. Sin embargo, en etapas más tardías, la ocupación de los nódulos puede ser muy distinta, y pueden dominar cepas más competitivas que reemplazan al inoculante y la planta ya favorece simbiontes más eficientes que no necesariamente son los del inoculante (Mendoza-Suárez et al. 2021).

En definitiva, los nódulos evaluados fueron colonizados por otras cepas nativas diferentes a Oc8. Entre ellas, se identificaron dos cepas del género *Bradyrhizobium*. El género *Crotalaria* incluye varias especies de leguminosas que nodulan eficientemente con un rango de rizobios limitado. Dos grupos de alfa-rizobios diferenciados en su velocidad de crecimiento nodulan *Crotalaria* spp.: los de crecimiento lento y los de crecimiento rápido (Samba et al., 1999). Los primeros son los más reportados en estudios con *Crotalaria* y corresponden a cepas de varias especies de *Bradyrhizobium* (Aserse et al., 2012; Barnish & Spinelli, 2011; Bisson & Mason, 2010; Gao et al., 1994; Huang et al., 2018; Isidoro & Messier, 2009; Liu et al., 2007; Menna et al., 2006). Si bien se cuenta con tres cepas del género *Bradyrhizobium*, entre ellas Oc8, para profundizar sobre la eficiencia simbiótica, resulta interesante ampliar la colección de hospederos de *Crotalaria* spp. y continuar evaluando su ocupación en los nódulos.

5.2. Análisis de los suelos

5.2.1. Respiración basal

La RB del suelo es un indicador útil para comparar el efecto de diferentes cultivos sobre el suelo, aunque refleja solo una parte del funcionamiento microbiano y está fuertemente influida por factores externos. En nuestro caso, los resultados indicaron pocas diferencias en la RB entre los suelos expuestos a los diferentes PVV en cada uno de los distintos momentos de comparación. Entre las diferencias, se encontró un incremento en la RB del suelo original, con respecto al tratamiento de siembra con *C. ochroleuca* en "Prematanza". Esta es la única diferencia observada en la RB en toda la primera etapa, que comprendió desde la siembra de PVV hasta la siembra del trigo. En esa etapa, la RB de los suelos expuestos a PVV resultó igual entre cultivos e igual al control de suelo con barbecho cuando analizamos cada momento de muestreo de forma independiente. Esto significa que no hay efecto del tipo de cultivo, o que si lo hay es pequeño comparado con otros factores presentes.

Se ha reportado que la RB es insuficiente para comparar diferentes cultivos porque está muy influida por el C orgánico, la humedad y temperatura y porque tiene fuerte variación temporal (Anderson & Domsch, 1993). Quizás su mayor fortaleza está en detectar cambios de manejo de suelo y no en discriminar cultivos (Pardo-Plaza et al., 2019). Únicamente en el tiempo "Posttrigo" fue posible determinar algunos tratamientos con mayor actividad que otros, siendo *C. spectabilis* y Soja no fertilizadas con N, los dos que destacan por poseer menor RB que Barbecho y Juncea, ambos tampoco fertilizados con N. Contrario a lo esperado, la fertilización con N en el período de crecimiento del trigo no afectó la RB.

Al comparar la RB a lo largo de todo el ensayo se pudo notar que independientemente del tratamiento hay una tendencia al aumento. Los reportes sobre el efecto estacional de la RB indican que ésta aumenta en la estación húmeda y cálida (Raich & Schlesinger, 1992). Este efecto se observó entre los períodos de "Prematanza" y "Posttrigo" y entre "Pretrigo" y "Posttrigo", ambos períodos van desde una estación fría a una cálida. En invierno, la temperatura suele ser el factor más limitante para la RB (Chen et al., 2023).

El valor de la RB en la etapa inicial de "Precultivo", que fue en verano, fue el menor de todos. En verano, la humedad puede ser el limitante principal para la RB. En 2022-2023, Uruguay experimentó una fuerte sequía, y en diciembre 2023 el país todavía mostraba impactos importantes de esa sequía histórica (Informe de situación hídrica - Diciembre 2023), mientras que en 2024, especialmente de noviembre en adelante, las precipitaciones fueron superiores, llevando a condiciones húmedas mejores (Informe de situación hídrica - Diciembre 2024). Parece claro que el aumento en la RB en los suelos a lo largo de todo el ensayo, destacándose en "Posttrigo", se debe a una combinación de dos factores: cultivo (trigo) y estación.

Es destacable la situación de los suelos con barbecho, que se mantuvieron libres de vegetación durante todo el período, y que no presentaron diferencias significativas en RB con los suelos sembrados con PVV, salvo hacia el final del ensayo. Dos factores podrían explicar esta situación. Un factor a tener en cuenta es que el barbecho durante el ensayo

fue relativamente prolongado (diciembre de 2023 a junio 2024). En barbechos prolongados, la microbiota puede adaptarse a las condiciones de baja entrada de carbono por la ausencia o escasa vegetación, manteniendo una actividad basal constante, que se observó a través de los momentos de muestreo. De forma similar, en un estudio realizado por Domínguez & Rivas Barcellandi (2021) se muestra como en suelos con barbecho prolongado, la actividad microbiana se mantiene relativamente estable (Domínguez & Rivas Barcellandi, 2021b). El rendimiento del trigo observado en los suelos que previamente tuvieron barbecho refleja esa adaptación funcional de la microbiota, relacionada con la resiliencia del suelo.

En el rendimiento del trigo no se observaron diferencias entre el rendimiento obtenido en los suelos expuestos a los diferentes PVV, soja o barbecho. A pesar de la ausencia de cultivos previos en barbecho, la microbiota fue capaz de sostener una actividad basal suficiente para el establecimiento del cultivo del trigo y su desarrollo sin pérdidas en el rendimiento final. El hecho de que el barbecho no necesariamente implica una pérdida de funcionalidad biológica va en contra de lo esperado desde el punto de vista agronómico. El barbecho se asocia con la falta de materia orgánica fresca en el suelo por la ausencia de cobertura vegetal, y con la mayor susceptibilidad a la erosión, que implica cambios a nivel del suelo, incluyendo una potencial pérdida de biodiversidad microbiana.

Otro factor es el relacionado con el tamaño de las parcelas. Parcelas pequeñas pueden derivar en valores similares de variables como la RB, incluso entre parcelas con manejos diferentes, y que en la teoría, sería esperable que se diferencien. Una causa de esto se relaciona con la variación que la RB puede tener incluso dentro de un mismo sitio (Yang et al., 2023a), resaltando que parcelas pequeñas no captan bien el efecto del manejo en variables como la RB. A esto se suma el llamado “efecto de borde” bien documentado en bosques. Se ha reportado que la RB puede afectarse por efectos de borde, en las zonas de transición, donde se han visto incrementos en la actividad microbiana (Smith et al., 2019), asociados a gradientes en la temperatura del suelo (Smith et al., 2019) y a cambios relacionados con las raíces y la rizosfera del borde (Schedlbauer & Miller, 2022).

En parcelas pequeñas, además, la variabilidad en la RB puede darse debido a variaciones espaciales (microambientes), que enmascaran las diferencias debido al manejo o a la cobertura (Yang et al., 2023b). En definitiva, esta evidencia respalda que los efectos de borde y el tamaño de las parcelas, que sospechamos es reducido y que implica que las raíces de los cultivos vecinos pueden invadir las parcelas vecinas, y el viento, el escurrimiento, gradientes de temperaturas y humedad y los microambientes existentes, pueden uniformizar los valores de RB, reduciendo o eliminando el contraste entre coberturas y con el barbecho. Además, la RB podría ser más sensible a cambios de manejo a mediano largo plazo y no a corto plazo, como en este estudio.

5.2.2. Comunidades microbianas del suelo

Los resultados con las ASVs de 16S e ITS revelaron que todas las interacciones que incluían la variable Tiempo fueron significativas. Es decir, el comportamiento de los datos con la variable Tiempo, que refiere al momento de muestreo, cambia con el mes de muestreo, el cultivo de PVV y la fertilización nitrogenada en el cultivo de trigo.

Tanto la riqueza como la diversidad procariota aumentaron en el final del ensayo, en el período entre "Pretrigo" y "Posttrigo". En este intervalo, el cambio estacional fue evidente, los suelos atravesaron todo el invierno. Este resultado coincide con la investigación de Zhao et al. (2022), quienes encontraron que la diversidad bacteriana se correlaciona positivamente con las variaciones climáticas estacionales en tierras de cultivo. En este caso, la estacionalidad climática podría explicar parte de la variación en la diversidad y riqueza bacterianas entre "Pretrigo" y "Posttrigo". Sin embargo, también se observaron diferencias entre "Precultivo" y "Posttrigo", momentos que se dieron en la misma estación y mes (verano), pero con diferente cobertura, "Posttrigo" fue en la cosecha del trigo, mientras que en "Precultivo", el campo se encontraba cubierto por pastos, y en diferentes años (con diferencias hídricas).

En este caso, es el cultivo de trigo que explicaría parte de la variación en diversidad y riqueza procariotas entre estos dos momentos, ya que se observó que las comunidades procariotas en los suelos en "Precultivo", "Prematanza" y "Pretrigo" no presentaron cambios o diferencias en los índices de diversidad y riqueza, a pesar de existir variaciones estacionales entre esos momentos, principalmente por humedad y temperatura. "Prematanza" y "Pretrigo" coinciden con momentos fríos: condiciones ambientales menos favorables para la vida. El primer período, de "Precultivo", coincidió con momentos de desajustes o estrés para la comunidad microbiana, por los impactos de la fuerte sequía que tuvo el país, sumado a movimientos, siembra, aplicaciones de herbicidas. No es posible determinar si el cambio observado de "Pretrigo" a "Posttrigo" se debe únicamente a la lluvia o al trigo o ambas, es necesario más experimentos para concluir.

Nuestro resultado concuerda con lo reportado por Jiang et al. (2024) que encontraron que aún con variaciones estacionales, los suelos expuestos a calor y frío exhiben resiliencia, manteniendo una riqueza y una diversidad constantes. Los mismos autores sugieren que los microorganismos desarrollan mecanismos de adaptación para soportar las condiciones extremas de sequía y calor. Esta asociación de los resultados con el cultivo del trigo hacia el final del ensayo y no con la identidad del cultivo de PVV (o soja, o barbecho) indicaría que existe un fuerte control del cultivo de grano, así como podría afectar también el efecto acumulativo del manejo.

Es posible que la combinación del fin de la sequía (primer verano, 2023) con el restablecimiento del recurso limitante (agua) que podría haber reactivado la microbiota (Jarvis et al., 2007) en los meses siguientes, sumado al aumento en el stock de C por los rastros de los PVV, en una dinámica de pulsos de recursos (Placella et al., 2012; Yang et al., 2008), las parcelas pequeñas y el efecto del trigo, que como cultivo extractivo no se espera sea bueno, sea lo que explica el aumento en la diversidad y riqueza procariotas. Puede que la introducción del trigo no sea el motor principal sino otros combinados, como la mejora en la humedad, descomposición de OM, el clima.

En este estudio, la estructura de la comunidad procariota no presentó cambios en cuanto a su estructura de la comunidad (diversidad beta) durante los primeros tres muestreos hasta "Posttrigo", donde se encontró una reestructuración de la comunidad, que cabe recordar

coincide con el cambio estacional y fin del cultivo de trigo. Diversos estudios han señalado que las comunidades bacterianas del suelo tienden a estar fuertemente determinadas por propiedades edáficas relativamente estables, como pH, textura y contenido de carbono, mostrando una respuesta más gradual frente a cambios en cobertura vegetal (Chen et al., 2022; He et al., 2023; Lauber et al., 2008). En sistemas agrícolas clásicos, la comunidad bacteriana del suelo se ha observado que frecuentemente responde de forma menos evidente a las rotaciones de cultivo que las comunidades fúngicas. Por ejemplo, en rotaciones de *Pisum sativum* (arveja) y trigo se observó que la composición bacteriana fue mucho menos afectada por la identidad del cultivo o el manejo rotacional que la comunidad fúngica (Woo et al., 2022).

Las comunidades fúngicas del suelo son dinámicas y, al igual que las procariotas, suelen responder de manera inmediata a cambios en el manejo agrícola. Esto se observó en los datos, donde se detectó una disminución progresiva en los índices de diversidad y riqueza fúngicas a lo largo del ensayo, mostrando diferencias significativas entre el muestreo inicial ("Precultivo") y el final ("Posttrigo"). En estancias agrícolas con rotación y cultivos de cobertura, se ha observado que la comunidad fúngica es más sensible y reactiva a los cambios de manejo y de cultivo presente, y que está regulada por las plantas y la variación temporal del sistema (clima) (Cloutier et al., 2020; Narayana et al., 2022). El patrón observado sobre la sensibilidad de la comunidad fúngica frente a estos factores, coincide con los resultados obtenidos en el ensayo, donde la diversidad y riqueza disminuyen y se reestructura la población de manera continua.

La comunidad fúngica exhibió cambios en la estructura de su comunidad (diversidad beta) en todos los tiempos de muestreo, lo que se podría correlacionar con una mayor sensibilidad con el manejo y la cobertura vegetal. En diversos estudios se ha reportado cómo la comunidad fúngica es más reactiva frente a los cambios en la vegetación, disponibilidad de materia orgánica y clima (Chen et al., 2022b; Cuartero et al., 2021; Gan et al., 2022).

En conjunto, estos resultados sugieren que, mientras la comunidad procariota mostró una estabilidad estructural relativa hasta "Posttrigo", las comunidades fúngicas fueron más dinámicas y sensibles a las variaciones ambientales y de manejo a lo largo de todo el ensayo.

No se observaron cambios asociados a la fertilización con nitrógeno ni el "Cultivo". La ausencia de diferencias significativas entre cultivos incluido barbecho o de las parcelas fertilizadas o no fertilizadas, sólo confirma que bajo estas condiciones la influencia en el sistema está dada por el Tiempo y el ingreso de trigo como se venía discutiendo.

5.2.3 Rendimiento de los cultivos

Como cultivo de PVV, *C. juncea* destacó en producción de biomasa, lo que la convierte en cultivo promisorio de cobertura estival para Uruguay. En trigo, los cultivos de PVV previos no afectaron su rendimiento. Como cultivo extractivo, el trigo toma nutrientes esenciales del suelo para formar su grano, afectando de manera dinámica a la microbiota, pudiendo agotar la fertilidad del suelo si no se maneja adecuadamente. La fertilización de suelos y la rotación con cultivos, en especial de leguminosas, por la FBN, se utilizan como manejos para reponer nutrientes al suelo (Giller, 2001; Peoples et al., 1995). Sin embargo, las variables asociadas con ambos factores, Cultivo (de PVV) y Nitrógeno (agregado en el último muestreo, "Posttrigo") tuvieron efectos no significativos.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones evaluadas, la cepa *Bradyrhizobium monzae* Oc8 no fue detectada en los nódulos analizados de *Crotalaria* spp., lo que podría indicar una baja competitividad en el campo. Esto manifiesta la necesidad de profundizar en la evaluación de esta cepa con potencial como inoculante en cuanto a su competitividad y eficiencia a campo.

Las cepas obtenidas en este ensayo: CSp1 y CSp2, aisladas de *Crotalaria spectabilis* identificadas dentro del género *Bradyrhizobium*, junto con Oc8, constituyen un material importante para cumplir con el objetivo central del proyecto Innovagro de generar un inoculante eficiente, competitivo y persistente para *Crotalaria* spp..

En relación con la actividad biológica del suelo, no se hallaron diferencias significativas en la RB entre los distintos cultivos, mientras que si se registró un incremento respecto al tiempo, principalmente asociado al trigo. Como perspectiva, se plantea la repetición del ensayo con aumento del tamaño de las parcelas o de un periodo más prolongado, a fin de poder observar mejor los efectos relacionados.

La comunidad microbiana se vio afectada tanto en su diversidad, riqueza y estructura con el tiempo de muestreo y, principalmente, con la presencia de trigo, que fue un gran reestructurante de la población microbiana. No se detectaron diferencias en las comunidades procariotas y fúngicas de los cultivos de cobertura. La combinación de las variables temporales (momentos de muestreo) a través del ensayo junto con la introducción del trigo fueron los motores de los cambios en la comunidad.

Aunque *C. juncea* mostró alto potencial como cultivo de cobertura por su producción de biomasa, ni el tipo de PVV ni la fertilización nitrogenada modificaron el rendimiento del trigo ni la estructura microbiana del suelo. Esto sugiere que, bajo las condiciones evaluadas, el

sistema presentó una elevada estabilidad biológica y que los cambios en la microbiota estuvieron más asociados a la dinámica temporal y al cultivo de trigo que al manejo previo o al aporte puntual de N.

En términos generales, este trabajo aporta información sobre el desempeño agronómico de puentes verdes basados en *Crotalaria* spp. en Uruguay y sobre su interacción con la microbiota edáfica. Hasta donde se tiene conocimiento, constituye el primer estudio del microbioma del suelo asociado a *Crotalaria* spp. en el país, generando una base de referencia para futuras investigaciones orientadas a optimizar el manejo de cultivos de cobertura.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Paredes, A., Valdés, G., Araneda, N., Valdebenito, E., Hansen, F., & Nuti, M. (2023). Microbial community in the composting process and its positive impact on the soil biota in sustainable agriculture. *Agronomy*, 13(2), 542.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59(1), 143-169.
- Anderson, T.-H., & Domsch, K. H. (1993). The metabolic quotient for CO₂ (q CO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. Cabidigitallibrary
- Asad, S., Malik, K. A., & Hafeez, F. Y. (1991). Competition between inoculated and indigenous Rhizobium/Bradyrhizobium spp. Strains for nodulation of grain and fodder legumes in Pakistan. *Biology and Fertility of Soils*, 12(2), 107-111.
- Aserse, A. A., Räsänen, L. A., Aseffa, F., Hailemariam, A., & Lindström, K. (2012). Phylogenetically diverse groups of Bradyrhizobium isolated from nodules of Crotalaria spp., Indigofera spp., Erythrina brucei and Glycine max growing in Ethiopia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65(2), 595-609.
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & 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.
- Badotti, F., De Oliveira, F. S., Garcia, C. F., Vaz, A. B. M., Fonseca, P. L. C., Nahum, L. A., Oliveira, G., & Góes-Neto, A. (2017). Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi). *BMC Microbiology*, 17(1), 42.
- Barnish, A., & Spinelli, C. (2011). Analysis of Leghemoglobin present in Chipilin-Rhizobia symbiosis [PhD Thesis, WORCESTER POLYTECHNIC INSTITUTE].
- Beijerinck, M. W. (1888). The root-nodule bacteria. *Bot. Zeitung*, 46, 725-804.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*, 17(8), 478-486.
- Berriel, V. (2022). Identificación de cultivos de cobertura basados en especies de leguminosas tropicales: Combinación de criterios de eficiencia de uso de agua y de fijación de N. Doctoral dissertation, Universidad de la República (Uruguay)
- Berriel, V., Morel, M. A., Filippi, C. V., & Monza, J. (2021). Draft genome sequence of *Bradyrhizobium* sp. Strain Oc8 isolated from *Crotalaria ochroleuca* nodule. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100074.
- Bisson, A., & Mason, T. (2010). Identification of Rhizobia species that can establish nitrogen-fixing nodules in *Crotalaria longirostrata*. Major qualifying project report for the degree of bachelor of sciences, Worcester Polytechnic Institute.
- Bogino, P., Banchio, E., Bonfiglio, C., & Giordano, W. (2008). Competitiveness of a *Bradyrhizobium* sp. Strain in Soils Containing Indigenous Rhizobia. *Current Microbiology*, 56(1), 66-72.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583.

- Chen, L.-F., Yang, S.-P., He, Z.-B., Zhao, W.-Z., Kong, J.-Q., Feng, X.-Y., & Li, X.-G. (2023). Divergent seasonal patterns and drivers of soil respiration in alpine forests of northwestern China. *Agricultural and Forest Meteorology*, 343, 109787.
- Chen, Y., Xi, J., Xiao, M., Wang, S., Chen, W., Liu, F., Shao, Y., & Yuan, Z. (2022). Soil fungal communities show more specificity than bacteria for plant species composition in a temperate forest in China. *BMC Microbiology*, 22, 208.
- Clarke, A. L. (1994). *The Diversity of Life-The Diversity of Life*. Edward O. Wilson. Cambridge, MA: Belknap Press of Harvard University Press, 1992, 424 pp. US\$14.95 paper. ISBN 0-393-31047-7. WW Norton, 500 Fifth Ave., New York, NY 10110, USA. *Politics and the Life Sciences*, 13(1), 129-130.
- Cuartero, J., Özbolat, O., Sánchez-Navarro, V., Egea-Cortines, M., Zornoza, R., Canfora, L., Orrù, L., Pascual, J. A., Vivo, J.-M., & Ros, M. (2021). Changes in Bacterial and Fungal Soil Communities in Long-Term Organic Cropping Systems. *Agriculture*, 11(5).
- Delgado-Baquerizo, M., Eldridge, D. J., Liu, Y.-R., Liu, Z.-W., Coleine, C., & Trivedi, P. (2025). Soil biodiversity and function under global change. *PLoS Biology*, 23(3), e3003093.
- Delgado-Baquerizo, M., Guerra, C. A., Cano-Díaz, C., Egidi, E., Wang, J.-T., Eisenhauer, N., Singh, B. K., & Maestre, F. T. (2020). The proportion of soil-borne pathogens increases with warming at the global scale. *Nature Climate Change*, 10(6), 550-554.
- Dénarié, J., Debellé, F., & Rosenberg, C. (1992). Signaling and host range variation in nodulation. *Annual review of microbiology*, 46, 497-531.
- Domínguez, F. A., & Rivas Barcellandi, L. G. (2021a). *Estrategias alternativas de barbecho: Su efecto sobre la actividad microbiana del suelo* [PhD Thesis, Universidad Nacional de La Plata].

- Domínguez, F. A., & Rivas Barcellandi, L. G. (2021b). *Estrategias alternativas de barbecho: Su efecto sobre la actividad microbiana del suelo* [PhD Thesis, Universidad Nacional de La Plata].
- Doran, J. W., & Zeiss, M. R. (2000). Soil health and sustainability: Managing the biotic component of soil quality. *Applied soil ecology*, 15(1), 3-11.
- Farzadfar, S., Knight, J. D., & Congreves, K. A. (2021). Soil organic nitrogen: An overlooked but potentially significant contribution to crop nutrition. *Plant and Soil*, 462(1-2), 7-23.
- Frank, B. (1890). *Ueber die Pilzymbiose der Leguminosen*. P. Parey.
- Fungal community shifts in soils with varied cover crop treatments and edaphic properties* | *Scientific Reports*. (s. f.). Recuperado 1 de marzo de 2026, de
- Gage, D. J. (2004). Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 280-300.
- Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., Asner, G. P., Cleveland, C. C., Green, P. A., Holland, E. A., Karl, D. M., Michaels, A. F., Porter, J. H., Townsend, A. R., & Vosmart, C. J. (2004). Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. *Biogeochemistry*, 70(2), 153-226.
- Galloway, J. N., Townsend, A. R., Erisman, J. W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J. R., Martinelli, L. A., Seitzinger, S. P., & Sutton, M. A. (2008). Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. *Science*, 320(5878), 889-892.
- Gan, H., Li, X., Wang, Y., Lü, P., Ji, N., Yao, H., Li, S., & Guo, L. (2022). Plants Play Stronger Effects on Soil Fungal than Bacterial Communities and Co-Occurrence Network Structures in a Subtropical Tree Diversity Experiment. *Microbiology Spectrum*, 10(3), e0013422.

- Gao, J. L., Sun, J. G., Li, Y., Wang, E. T., & Chen, W. X. (1994). Numerical taxonomy and DNA relatedness of tropical rhizobia isolated from hainan province, China. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(1), 151-158.
- Giller, K. E. (2001). Nitrogen fixation in tropical cropping systems. Cabi.
- Gómez Perazzoli, A., Gazzano, M. I., & Dieguez Cameroni, F. (2024). Agroecological family farming in Uruguay, innovative and counter-hegemonic contributions to sustainability. *Agrociencia Uruguay*, 28.
- GraphPad Prism (Versión 10.0.0). (s. f.). [Windows]. Recuperado www.graphpad.com
- Gyaneshwar, P., Hirsch, A. M., Moulin, L., Chen, W.-M., Elliott, G. N., Bontemps, C., Estrada-de Los Santos, P., Gross, E., Dos Reis, F. B., Sprent, J. I., Young, J. P. W., & James, E. K. (2011). Legume-Nodulating Betaproteobacteria: Diversity, Host Range, and Future Prospects. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(11), 1276-1288.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 41(41), 95-98.
- Hellriegel, H., & Wilfarth, H. (1888). Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen.
- Hiltner, L. (1904). Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der deutschen landwirtschaftlichen gesellschaft*, 98, 59.
- Hogg, B., Davies, A. E., Wilson, K. E., Bisseling, T., & Downie, J. A. (2002). Competitive nodulation blocking of cv. Afghanistan pea is related to high levels of nodulation factors made by some strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*: 15(1), 60-68.
- Howieson, J. G., & Dilworth, M. J. (2016). Working with rhizobia. Australian Centre for International Agricultural Research Canberra.
- Huang, C.-T., Hish, K.-T., Wang, C.-N., Liu, C.-T., & Kao, W.-Y. (2018). Phylogenetic analyses of *Bradyrhizobium* symbionts associated with invasive *Crotalaria*

- zanzibarica* and its coexisting legumes in Taiwan. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(6), 619-628.
- Hulton, C. S. J., Higgins, C. F., & Sharp, P. M. (1991). ERIC sequences: A novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology*, 5(4), 825-834. j
- Informe de situación hídrica—Diciembre 2023*. (s. f.). Sistema Nacional de Emergencias. Recuperado 23 de febrero de 2026.
- Informe de situación hídrica—Diciembre 2024*. (s. f.). Sistema Nacional de Emergencias. Recuperado 23 de febrero de 2026.
- Isidoro, M., & Messier, R. (2009). Selection of optimal Rhizobia strain for *Crotalaria Longirostrata*. Bachelor thesis), Worcester Polytechnic Institute, USA.
- Jansson, J. K., & Hofmockel, K. S. (2020). Soil microbiomes and climate change. *Nature Reviews Microbiology*, 18(1), 35-46.
- Jiang, H., Chen, X., Li, Y., Chen, J., Wei, L., & Zhang, Y. (2024). Seasonal dynamics of soil microbiome in response to dry–wet alternation along the Jinsha River Dry-hot Valley. *BMC Microbiology*, 24(1), 496.
- Kuzmanović, N., Fagorzi, C., Mengoni, A., Lassalle, F., & diCenzo, G. C. (2022). Taxonomy of Rhizobiaceae revisited: Proposal of a new framework for genus delimitation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(3).
- Langsiri, N., Worasilchai, N., Irinyi, L., Jenjaroenpun, P., Wongsurawat, T., Luangsa-ard, J. J., Meyer, W., & Chindamporn, A. (2023). Targeted sequencing analysis pipeline for species identification of human pathogenic fungi using long-read nanopore sequencing. *IMA Fungus*, 14(1), 18.
- Liu, X. Y., Wang, E. T., Li, Y., & Chen, W. X. (2007). Diverse bacteria isolated from root nodules of *Trifolium*, *Crotalaria* and *Mimosa* grown in the subtropical regions of China. *Archives of Microbiology*, 188(1), 1-14.

- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550.
- Macedo, I., Otaño, C., Barrios, E., Beyhaut, E., Rossi, C., Sawchick, J., & Terra, J. A. (2015). Leguminosas anuales de verano como opciones de cobertura en sistemas agrícolas. *Rev. INIA Urug*, 43, 50-54.
- Mateos, P. F., Jimenez-Zurdo, J. I., Chen, J., Squartini, A. S., Haack, S. K., Martinez-Molina, E., Hubbell, D. H., & Dazzo, F. B. (1992). Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6), 1816-1822.
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). *Phyloseq* (Versión versión commit abc123) [Rstudio]. <https://github.com/joey711/phyloseq/commit/abc123>
- Mendoza-Suárez, M., Andersen, S. U., Poole, P. S., & Sánchez-Cañizares, C. (2021). Competition, nodule occupancy, and persistence of inoculant strains: Key factors in the rhizobium-legume symbioses. *Frontiers in Plant Science*, 12, 690567.
- Menna, P., Hungria, M., Barcellos, F. G., Bangel, E. V., Hess, P. N., & Martínez-Romero, E. (2006). Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(4), 315-332.
- Morel, M., Veronica, B., Sanjuan, J., & Velazquez, E. (2025). *Bradyrhizobium monzae* sp. Nov. Isolated from a root nodule of the introduced legume *Crotalaria ochroleuca* in Uruguay. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 75(11), 006973.
- Narayana, N. K., Kingery, W. L., Jacobs, A. A., Allison, J. K., & Shanmugam, S. G. (2022). Effects of Tillage and Winter Cover Management in a Maize Soybean Rotation on Soil Bacterial and Fungal Community Composition. *Land*, 11(12).

- Pardo-Plaza, Y. J., Paolini Gómez, J. E., & Cantero-Guevara, M. E. (2019). Biomasa microbiana y respiración basal del suelo bajo sistemas agroforestales con cultivos de café. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 22(1).
- Peoples, M. B., Herridge, D. F., & Ladha, J. K. (1995). Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? *Plant and Soil*, 174(1-2), 3-28.
- Posit Team. (2025). *Rstudio* [Software].
- Postgate, J. R. (1998). *Nitrogen fixation*. Cambridge University Press.
- Quiñones, M. Á. (2021). *Simbiosis leguminosa-rizobio: Beneficiosa para las plantas, para las bacterias y para nosotros y nosotras*.
- Raich, J. W., & Schlesinger, W. H. (1992). The global carbon dioxide flux in soil respiration and its relationship to vegetation and climate. *Tellus B*, 44(2), 81-99.
- Ren, Z.-Q., Wang, H., Zhang, L.-G., Du, X.-N., Huang, B.-C., & Jin, R.-C. (2022). A review of anammox-based nitrogen removal technology: From microbial diversity to engineering applications. *Bioresource Technology*, 363, 127896.
- Rouatt, J. W., Katznelson, H., & Payne, T. M. B. (1960). Statistical Evaluation of the Rhizosphere Effect. *Soil Science Society of America Journal*, 24(4), 271-273.
- Samba, R. T., de Lajudie, P., Gillis, M., Neyra, M., Spencer Barreto, M. M., & Dreyfus, B. (1999). Diversity of rhizobia nodulating *Crotalaria* spp. From Senegal. *Symbiosis*, 27(3), 259-268.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Schedlbauer, J. L., & Miller, J. (2022). Edge effects increase soil respiration without altering soil carbon stocks in temperate broadleaf forests. *Ecosphere*, 13(6), e4092.
- Schindelbeck. (2017). Soil Health Manual Fact Sheets | Cornell Soil Health Laboratory.
- SILVA: Silva. (s. f.). Recuperado 5 de noviembre de 2025.

- Smith, I. A., Hutyra, L. R., Reinmann, A. B., Thompson, J. R., & Allen, D. W. (2019). Evidence for Edge Enhancements of Soil Respiration in Temperate Forests. *Geophysical Research Letters*, 46(8), 4278-4287.
- Sosa, A., Elías, A., García, O. A., & Sarmiento, M. (2004). Aislamiento y caracterización fenotípica parcial de cepas de rizobios que nodulan leguminosas rastreras. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 38(2), 197-201.
- Steen, A. D., Crits-Christoph, A., Carini, P., DeAngelis, K. M., Fierer, N., Lloyd, K. G., & Thrash, J. C. (2019). High proportions of bacteria and archaea across most biomes remain uncultured. *The ISME journal*, 13(12), 3126-3130.
- Strous, M., Fuerst, J. A., Kramer, E. H., Logemann, S., Muyzer, G., Van De Pas-Schoonen, K. T., Webb, R., Kuenen, J. G., & Jetten, M. S. (1999). Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, 400(6743), 446-449.
- Sylvia, D. M., Fuhrmann, J. J., Hartel, P. G., & Zuberer, D. A. (2005). Principles and applications of soil microbiology. Pearson.
- Tamura, Stecher, and Kumar. (2021). *MEGA11* (Versión 11) [Software].
- Tan, K. H. (2009). Environmental Soil Science (third edition). CRC Press.
- Technelysium Pty Ltd. (1998). *Chromas* (Versión versión 2.6.6) [Software]. <https://technelysium.com.au/wp/chromas/>
- Trubl, G., & Probst, A. J. (2025). Clarifying Terminology in Microbial Ecology: A Call for Precision in Scientific Communication. *Environmental Microbiology*, 27(9), e70177.
- UNITE. (s. f.). Recuperado 5 de noviembre de 2025, de <https://unite.ut.ee/>
- Universidad Nacional de Cordoba. (2010). *Infostat* [Software].
- Wilmes, P., & Bond, P. L. (2006). Metaproteomics: Studying functional gene expression in microbial ecosystems. *Trends in microbiology*, 14(2), 92-97.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2), 221-271.

- Yan, J., Friedrich, S., & Kurgan, L. (2016). A comprehensive comparative review of sequence-based predictors of DNA- and RNA-binding residues. *Briefings in Bioinformatics*, 17(1), 88-105.
- Yang, B., Wang, Y., & Qian, P.-Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 135.
- Yang, H., Huang, T., Li, Y., Liu, W., Fu, J., Huang, B., & Yang, Q. (2023a). Spatial heterogeneity and influence mechanisms on soil respiration in an old-growth tropical montane rainforest with complex terrain. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10, 1107421.
- Yang, H., Huang, T., Li, Y., Liu, W., Fu, J., Huang, B., & Yang, Q. (2023b). Spatial heterogeneity and influence mechanisms on soil respiration in an old-growth tropical montane rainforest with complex terrain. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10, 1107421.
- Yarwood, S. A., Bach, E. M., Busse, M., Smith, J. E., Callaham Jr, M. A., Chang, C.-H., Chowdhury, T. R., & Warren, S. D. (2020). Forest and rangeland soil biodiversity. En *Forest and Rangeland Soils of the United States Under Changing Conditions: A Comprehensive Science Synthesis* (pp. 75-97). Springer International Publishing Cham.
- Zadoks, J. C., Chang, T. T., & Konzak, C. F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14(6), 415-421.
- Zhao, X.-F., Shu, W.-S., & Hao, Y.-Q. (2022). Seasonal Climate Variations Promote Bacterial α -Diversity in Soil. *Microbial Ecology*, 83(2), 513-517.
- Zhou, Y., Yang, Z., Liu, J., Li, X., Wang, X., Dai, C., Zhang, T., Carrión, V. J., Wei, Z., & Cao, F. (2023). Crop rotation and native microbiome inoculation restore soil capacity to suppress a root disease. *Nature communications*, 14(1), 8126.

7. ANEXO

1) Composición medio “Yeast Extract Agar” (YEM) + Rojo Congo

Medio YEM 1L. - pH 6,8

K₂HPO₄ - 0,5 g
MgSO₄ 7H₂O - 0,2g
NaCl - 0,1 g
Manitol - 10 g
Extracto de Levadura - 0,5 g
FeCl₃ 6H₂O al 10% - 0,05 ml
MgSO₄ al 10% - 0,05 ml
Rojo Congo 1/400 - 5ml
Agar - 15 g/L

2) Composición solución de riego Hoagland sin Nitrógeno Solución de riego Hoagland sin N 1L.

KH ₂ PO ₄	0.136 g
K ₂ SO ₄	0.348 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.294 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.246 g
Micronutriente - 1 ml	

3) Composición medio Jensen Medio Jensen semisolido (0,8%) 1L CaHPO₄ - 1 g K₂PO₄ - 0,2 g FeCl₃ (6H₂O) - 0,1 g H₂O - 1 L Micronutrientes - 1 ml

Agar - 8 gr

4) Micronutrientes

$$\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,2 \text{ g}$$

$M_4SO_4 \cdot H_2O$ - 0,1 g

ZnSO₄·7H₂O - 0,02 g

MoO₃.H₂O - 0,008 g

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,008 g

csp - 100ml

5) Secuencia de primers de “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences” (ERIC)

Nombre	Secuencia (5' → 3')
1	5'-GGG-3'
2	5'-GGG-3'
3	5'-GGG-3'
4	5'-GGG-3'
5	5'-GGG-3'
6	5'-GGG-3'
7	5'-GGG-3'
8	5'-GGG-3'
9	5'-GGG-3'
10	5'-GGG-3'
11	5'-GGG-3'
12	5'-GGG-3'
13	5'-GGG-3'
14	5'-GGG-3'
15	5'-GGG-3'
16	5'-GGG-3'
17	5'-GGG-3'
18	5'-GGG-3'
19	5'-GGG-3'
20	5'-GGG-3'
21	5'-GGG-3'
22	5'-GGG-3'
23	5'-GGG-3'
24	5'-GGG-3'
25	5'-GGG-3'
26	5'-GGG-3'
27	5'-GGG-3'
28	5'-GGG-3'
29	5'-GGG-3'
30	5'-GGG-3'
31	5'-GGG-3'
32	5'-GGG-3'
33	5'-GGG-3'
34	5'-GGG-3'
35	5'-GGG-3'
36	5'-GGG-3'
37	5'-GGG-3'
38	5'-GGG-3'
39	5'-GGG-3'
40	5'-GGG-3'
41	5'-GGG-3'
42	5'-GGG-3'
43	5'-GGG-3'
44	5'-GGG-3'
45	5'-GGG-3'
46	5'-GGG-3'
47	5'-GGG-3'
48	5'-GGG-3'
49	5'-GGG-3'
50	5'-GGG-3'
51	5'-GGG-3'
52	5'-GGG-3'
53	5'-GGG-3'
54	5'-GGG-3'
55	5'-GGG-3'
56	5'-GGG-3'
57	5'-GGG-3'
58	5'-GGG-3'
59	5'-GGG-3'
60	5'-GGG-3'
61	5'-GGG-3'
62	5'-GGG-3'
63	5'-GGG-3'
64	5'-GGG-3'
65	5'-GGG-3'
66	5'-GGG-3'
67	5'-GGG-3'
68	5'-GGG-3'
69	5'-GGG-3'
70	5'-GGG-3'
71	5'-GGG-3'
72	5'-GGG-3'
73	5'-GGG-3'
74	5'-GGG-3'
75	5'-GGG-3'
76	5'-GGG-3'
77	5'-GGG-3'
78	5'-GGG-3'
79	5'-GGG-3'
80	5'-GGG-3'
81	5'-GGG-3'
82	5'-GGG-3'
83	5'-GGG-3'
84	5'-GGG-3'
85	5'-GGG-3'
86	5'-GGG-3'
87	5'-GGG-3'
88	5'-GGG-3'
89	5'-GGG-3'
90	5'-GGG-3'
91	5'-GGG-3'
92	5'-GGG-3'
93	5'-GGG-3'
94	5'-GGG-3'
95	5'-GGG-3'
96	5'-GGG-3'
97	5'-GGG-3'
98	5'-GGG-3'
99	5'-GGG-3'
100	5'-GGG-3'

ERIC1R **ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC**

ERIC2F **AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG**

(Versalovic et al., 1991)

6) Secuencia ERIC

[illegible]

Imagem tomada de (Hulton et al., 1991)

7) Solución (Tris–Acetato–EDTA) TAE

Tris base **242.0 g**
(Tris(hidroximetil)aminometano)

Ácido acético glacial (CH_3COOH)	57.1 mL
EDTA disódico ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	100 mL de una solución 0.5 M, pH 8.0

8) Secuencia de los primers de 16S (27F y 1392R)

Nombre	Secuencia (5' → 3')
27F	AGAGTTTGATC MTGGCTCAG
1392R	ACGGGCGGTGT GTRC

(Lane, 1991)