



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO

**Diversidad funcional de la población bacteriana rizosférica de maíz de
temporal (*Zea mays* L.) en México**

Tesis que presenta

Ing. Carlos Gerardo Chávez Marmolejo

Para Obtener el Grado de

Maestro en Ciencias

En la Especialidad de

Biotecnología de Plantas

Director de Tesis: Dr. Juan José Peña Cabriales

Co Director de Tesis: Dr. Luis José Delaye Arredondo

Irapuato, Guanajuato.

Junio 2018.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Departamento de Biotecnología y Bioquímica y en el Laboratorio de Genómica Evolutiva del Departamento de Ingeniería Genética del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato, bajo la co-dirección del Dr. Juan José Peña Cabriales y del Dr. Luis José Delaye Arredondo. El presente proyecto fue realizado en el marco del proyecto “Importancia de los microbios benéficos de la rizósfera en la producción sustentable de maíz (SEP-CONACyT-2012-179319)” financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

DEDICATORIA

A mis padres:

Luz María Marmolejo y Gerardo Chávez. Que han estado junto a mí desde que me trajeron al mundo, con su apoyo incondicional, sus buenos ejemplos, sus cariños, sus regaños, pero sobre todo con su corazón.

A mis hijos:

Carlos Yael y Ángel Kaleb, porque son la razón y la inspiración para seguir adelante, son mi paz y mi amor.

A mi esposa:

Que ha estado a mi lado desde hace ya 10 años compartiendo tantas experiencias juntos.

A mis hermanos:

Wendy y Daniel por contagiarme de esa alegría que los caracteriza y por siempre estar ahí para convivir y brindarme su apoyo.

A mis Abuelos y Tíos:

Estela Santacruz, Ricardo Marmolejo I, Hilda Marmolejo, Lupita Marmolejo, Dora Marmolejo, Lidia Marmolejo, Mary Marmolejo, Sanjuanita Marmolejo, Ricardo Marmolejo II y Marcial Marmolejo. Por su gran ejemplo de vida, su apoyo y sus consejos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por todo el apoyo financiero otorgado mediante la beca número 340491, así como de recursos literarios y de investigación.

Al Dr. Peña que me abrió las puertas de su laboratorio para desarrollarme personal y profesionalmente, por su espíritu de solidaridad y por enseñarme a apreciar las cosas valiosas de la vida.

Al Dr. Luis Delaye por su paciencia y su apoyo a lo largo de este proyecto, por despertar en mí esa curiosidad por la ciencia desde una óptica de computación aplicada.

A Toño Vera por su firme compromiso por la enseñanza y el apoyo incondicional en todo este tiempo tanto profesional como humano, sus buenos consejos y sus asertivas observaciones al proyecto.

A mi comité sinodal, Dr. Ariel Álvarez Morales y Dr. John Paul Délano Frier, por su apoyo, sus valiosas observaciones y sugerencias en la realización de este proyecto y la revisión del presente manuscrito.

A Sergio Abraham por darme la oportunidad y la paciencia de involucrarme en la ciencia, por darme la oportunidad de colaborar con él y transmitirme sus experiencias científicas a lo largo de mi estancia en Cinvestav.

A Mónica Liliana Rodríguez Uribe mi compañera de generación y amiga incondicional, por hacer de mi estancia en el laboratorio más amena.

A Jaime Mendoza y Omar Avilés por su apoyo en la realización de los experimentos referentes a este proyecto y por darme la oportunidad de contribuir en su formación académica.

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Ambiental: Luis León López, Isidoro Reyes, Magdalena Cervantes, Abraham García, Conrado Guzmán, Milton Barcos, Aníbal Silva, Luis Ernesto Hernández, Jonatán Jaramillo, Daniel Martínez, Fernando Barajas, Aránxa Pérez, Jorge Sánchez, Manuel Pérez, David Camarena, Yamilí y Fernanda de Julián, por todo su apoyo y solidaridad.

A mis amigos Noé Baruch, Érika Landa, Ury Díaz, Marisa Rodríguez y Marisol Hernández por su valiosa amistad y compañerismo.

Al Cinvestav por proveer los medios necesarios para realizar mis estudios y a su personal de las distintas áreas: Administrativo, intendencia, mantenimiento, compras y vigilancia, por proveer de los recursos necesarios para el desarrollo de la ciencia.

“La agricultura se ve fácil cuando el arado es un lápiz y se está a mil millas del campo de maíz”

- Dwight Eisenhower

CONTENIDO

RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. ANTECEDENTES	1
1.1. Generalidades del Maíz	1
1.1.1. Origen.....	1
1.1.2. Botánica y Taxonomía	1
1.1.3. Valor nutricional.....	2
1.1.4. Fenología.....	4
1.2. Producción Mundial de Maíz	5
1.3. Producción Nacional de Maíz.....	6
1.3.1. Principales Estados Productores	7
1.3.2. Sistemas de Cultivo de Maíz en México	8
1.4. Uso de Fertilizantes.....	9
1.5. Rizósfera	10
1.6. Diversidad Bacteriana en la Rizósfera de Maíz.....	14
1.7. Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal.....	16
1.7.1. Mecanismos de Promoción de Crecimiento Vegetal	16
II. JUSTIFICACIÓN	19
III. HIPÓTESIS	20
IV. OBJETIVOS	20
4.1. Objetivo General	20
4.2. Objetivos Específicos	20
V. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1. Sitios de Estudio y Muestreo.....	22
5.1.1. Caracterización de los Sistemas de Cultivo.....	22
5.1.2. Caracterización Físicoquímica del Suelo	22
5.2. Aislamiento Bacteriano.....	23
5.3. Características de Promoción de Crecimiento Vegetal	24
5.3.1. Producción de Indoles	24
5.3.2. Solubilización de Fósforo Inorgánico (Pi)	24
5.3.3. Crecimiento en Medio de Cultivo Semiselectivo Libre de N	25
5.4. Efecto Microorganismo-planta <i>in vitro</i>	26
5.4.1. Promoción del Crecimiento en <i>Arabidopsis thaliana</i>	26

5.5.	Análisis Molecular de los Aislados Bacterianos	26
5.5.1.	Identificación de los Aislados Bacterianos.....	26
5.6.	Determinación de la Diversidad Bacteriana	28
5.6.1.	Extracción de ADN	28
5.6.2.	Ampliación y Secuenciación de la Región Hipervariable V4-V6 del Gen 16S Ribosomal	28
5.6.3.	Análisis Bioinformático de la Diversidad Bacteriana	29
5.7.	Interacción Microorganismo-Planta-Fertilizante	31
5.7.1.	Producción de Biomasa por Maíz en Condiciones de Invernadero ...	31
5.8.	Análisis Estadístico	33
VI.	RESULTADOS.....	34
6.1.	Caracterización de los Sistemas de Cultivo	34
6.2.	Aislamiento Bacteriano Rizosférico.....	35
6.2.1.	Población Bacteriana con Capacidad de Fijación de Nitrógeno y Solubilización de Fósforo.....	35
6.3.	Aislamiento y Selección de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno y Solubilizadoras de Fósforo.....	36
6.4.	Características de Promoción del Crecimiento Vegetal	37
6.4.1.	Producción de Indoles	37
6.4.2.	Solubilización de Fósforo.....	39
6.4.3.	Promoción del Crecimiento Vegetal.....	41
6.5.	Promoción del Crecimiento Vegetal <i>in vitro</i>	42
6.5.1.	Promoción del Crecimiento en <i>Arabidopsis thaliana</i>	42
6.6.	Diversidad de Rizobacterias Cultivables	44
6.6.1.	Abundancia Relativa de las Rizobacterias Cultivables	44
6.7.	Diversidad Bacteriana Rizosférica	45
6.8.	Promoción del Crecimiento Vegetal en Condiciones de Invernadero	48
6.9.	Absorción de ³² P y ¹⁵ N	50
VII.	DISCUSIÓN.....	53
VIII.	CONCLUSIONES.....	57
IX.	PERSPECTIVAS.....	59
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	60
XI.	ANEXOS	65

Índice de figuras

Figura 1. Producción de maíz en México (10^6 ton) por modalidad hídrica, (2005–2015).	7
Figura 2. Aplicación de fertilización total por cultivos a nivel mundial (2013).	9
Figura 3. Componentes de la rizósfera.	11
Figura 4. Factores que afectan la diversidad microbiana de acuerdo al tipo de sistema.	12
Figura 5. Microorganismos que habitan la rizósfera.....	13
Figura 6. Enfoques de Asignación de OTU's soportados por QIIME.....	30
Figura 7. Población bacteriana presunta positiva con capacidad de fijación de nitrógeno (LGI) y solubilización de fósforo (PVK) en sistemas de producción de maíz de temporal en México. a) Michoacán, b) Estado de México, c) Guanajuato.	36
Figura 8. Población presunta positiva para el aislamiento de bacterias con capacidad de solubilización de fósforo (PVK) y fijación de nitrógeno (LGI) en sistemas de producción de maíz de temporal en México.	37
Figura 9. Producción de indoles por aislados bacterianos con capacidad de fijación de nitrógeno (FBN) y de solubilización de fósforo (SP) en sistemas de producción de maíz de temporal en México.	39
Figura 10. Solubilización de fósforo por aislados bacterianos con capacidad de fijación de nitrógeno (FBN) en sistemas de producción de maíz de temporal en México analizados en este estudio.	40
Figura 11. Diagrama de Venn de las actividades asociadas con la promoción del crecimiento vegetal por los aislados bacterianos obtenidos de los sistemas de producción de maíz de temporal analizados en este estudio.....	42
Figura 12. Producción de biomasa fresca en plantas de <i>A. thaliana</i> inoculada con aislados bacterianos de sistemas de producción de maíz de temporal de México analizados en este estudio.	43
Figura 13. Abundancia relativa de bacterias con capacidad de promoción del crecimiento vegetal provenientes de sistemas de producción de maíz de temporal en México analizados en este estudio.	44
Figura 14. Rarefacción de la diversidad Alfa.....	46
Figura 15. Diversidad bacteriana rizosférica, de acuerdo con el índice de Shannon, en etapas fenológicas de maíz determinada en sistemas de producción de maíz de temporal en México analizados en este estudio.	47
Figura 16. Diversidad bacteriana rizosférica, de acuerdo con el índice de Shannon, en sistemas de producción de maíz de temporal de México analizados en este estudio.	47
Figura 17. Factores principales (x_1 =sistemas, x_2 =etapas) en la diversidad bacteriana rizosférica en sistemas de producción de maíz de temporal de México.	48

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz.	2
Tabla 2. Composición nutrimental del grano de maíz para consumo humano.....	3
Tabla 3. Etapas fenológicas del maíz	5
Tabla 4. Principales entidades federativas en México productoras de maíz.....	8
Tabla 5. Estudios sobre algunos de los efectos que el agroecosistema ejerce sobre la estructura microbiana de la rizósfera.....	15
Tabla 6. Características de los sistemas de producción de maíz de temporal de México analizados en este trabajo.	34
Tabla 7. Caracterización de los sistemas de producción de maíz de temporal de México.	35
Tabla 8. Aislados bacterianos con capacidad de fijación de nitrógeno (FBN) y solubilización de fósforo (SP) en sistemas de producción de maíz de temporal en México.	37
Tabla 9. Producción de indoles por aislados bacterianos seleccionados por su capacidad de fijar nitrógeno (FBN) y solubilizar fósforo (SP) en sistemas de producción de maíz de temporal en México analizados en este estudio.....	38
Tabla 10. Solubilización de fósforo por aislados bacterianos seleccionados con capacidad de fijación de nitrógeno (FBN) en sistemas de producción de maíz de temporal en México.	40
Tabla 11. Diversidad bacteriana rizosférica en sistemas de producción de maíz de temporal de México.	45
Tabla 12. Producción de biomasa contenido de clorofila en la planta de maíz inoculada con los aislados bacterianos provenientes de los sistemas de producción de maíz de temporal de México en condiciones de invernadero.....	49
Tabla 13. Absorción de ³² P-fertilizante por la planta de maíz inoculada con cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de promoción del crecimiento vegetal aisladas de sistemas de producción de maíz de temporal de México.....	51
Tabla 14. Absorción de ¹⁵ N-fertilizante por la planta de maíz inoculada con cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de promoción del crecimiento vegetal aisladas de sistemas de producción de maíz de temporal de México.....	52

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la población bacteriana rizosférica con actividad de promoción del crecimiento vegetal gracias a su capacidad de fijar nitrógeno, producir indoles y solubilizar fósforo, de tres sistemas de producción de maíz de temporal en México. Se aislaron un total de 115 bacterias con capacidad de fijación de nitrógeno y solubilización de fósforo. Las actividades relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal fueron variables en función de la cepa. Grupalmente, los aislados bacterianos del Estado de México presentaron la mayor capacidad de producir indoles ($14\text{-}20\ \mu\text{g mL}^{-1}$), destacando los aislados del género *Rhizobium*, seguido de los géneros *Advenella*, *Phyllobacterium* y *Burkholderia*. El género *Burkholderia* presentó la capacidad de solubilización de fósforo mayor en el rango $133\text{-}188\ \text{mg P mL}^{-1}$. Asimismo predominó entre los tres sistemas de producción. La población bacteriana con capacidad de fijación de nitrógeno en los sistemas de producción de maíz de temporal fue similar oscilando en el rango $10^6\text{-}10^7$ unidades formadoras de colonias (UFC) g^{-1} suelo. Los géneros mayormente representados en las capacidades metabólicas cuantificadas, independientemente del sistema de producción fueron *Burkholderia* (45-65%), *Pseudomonas* y *Mesorhizobium*. La capacidad de promoción del crecimiento vegetal *in vitro* por los aislados bacterianos rizosféricos fue variable siendo 40, 48 y 72% en Guanajuato, Michoacán y Edo. México, respectivamente. Los géneros *Burkholderia* spp. SCP18, *Rhizobium* spp. FCP7, y *Acinetobacter* spp. SCV10 generaron mayor producción biomasa de maíz y una mayor cantidad de clorofila. Las etapas fenológicas del maíz influyeron en las comunidades bacterianas asociadas a la raíz, ya que la diversidad de las rizobacterias incrementó con forme a la etapa fenológica de maíz, llegando a su punto más alto en la etapa reproductiva de la planta y decreciendo en la etapa de senescencia. Además, las características edafoclimáticas y el sistema de cultivo intensivo afectan la composición de las comunidades bacterianas asociadas a la raíz. De manera que las condiciones de los campos analizados en este estudio, de Michoacán y Estado de México contienen una mayor diversidad de rizobacterias.

ABSTRACT

Studies indicate that the native microbiota of cultivated soils is affected by the use of synthetic pesticides and fertilizers that reduce their nutrient cycling, fertility and agricultural profitability. The objective of the present work was to characterize the bacterial population with plant growth promotion activity (nitrogen fixation, indoles production and phosphorus solubilization) present in maize production systems in Mexico. A total of 115 bacteria were isolated with nitrogen fixation and phosphorus solubilization capacities. The activities related to the plant growth promotion varied according to the strain. Isolates of the genus *Rhizobium*, followed by the genera *Advenella*, *Phyllobacterium* and *Burkholderia*, showed the highest indoles production (14-20 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The genus *Burkholderia* presented the highest phosphorus solubilization capacity, which was in the range 133-188 mg P mL^{-1} . It also predominated in the three production systems. The bacterial population with nitrogen fixation capacity in unirrigated maize production systems was similarly fluctuated in the range 106-107 colony forming units (CFU) g^{-1} soil. The genera mostly represented in quantified metabolic capacities, independent of the production system were *Burkholderia* (45-65%), *Pseudomonas* and *Mesorhizobium*. The capacity of *in vitro* plant growth promotion by the rhizosphere bacterial isolates was variable, being 40, 48 and 72%, in the states of Guanajuato, Michoacán and Estado de Mexico, respectively. The genera *Burkholderia* SCP18, *Rhizobium* FCP7, and *Acinetobacter* SCV10 generated the highest maize biomass production. The phenological stages of maize influenced the bacterial communities associated with the root, since the diversity of the rhizobacteria increased together with the phenological stage of maize, reaching its highest point in the reproductive stage of the plant and decreasing as it senesced. Soil and climatic conditions and the intensive cultivation system also affected the composition of the bacterial communities associated with the root. Thus, the fields sampled in Michoacan and the Estado de Mexico contained the greatest diversity of rhizobacteria.

I. ANTECEDENTES

1.1. Generalidades del Maíz

A nivel mundial, el maíz (*Zea mays*) es, después del trigo y el arroz, el cereal más importante del mundo, por su aporte alimenticio y nutrimental tanto para el consumo humano como animal. Es un cultivo versátil que sirve como materia prima para la producción de alimentos (*i.e.* bebidas alcohólicas, edulcorantes) y otros productos como combustibles, aceites, pinturas, cauchos, entre otros. (Tollenaar & Dwyer, 1999).

1.1.1. Origen

El centro de origen del maíz se encuentra en Centroamérica, concretamente en México, hace menos de 12000 años. A través de estudios científicos con enfoque genético, se sabe que el ancestro silvestre del maíz es el teocintle (Kato Yamakake, 2009; Meyer & Purugganan, 2013). La evolución y diversificación de este cereal son producto de la interacción de procesos biológicos, ecológicos y una fuerte influencia antropogénica (Benz, 1997). La diversificación y propagación, hasta llegar al maíz actual comenzó cuando los antiguos agricultores mesoamericanos iniciaron la domesticación, seleccionando características convenientes para su producción y consumo. Posteriormente, la semilla de maíz fue distribuida hacia el sur y norte de América y, finalmente, alrededor del mundo (Tollenaar & Dwyer, 1999).

1.1.2. Botánica y Taxonomía

El maíz (*Zea mays*) es una gramínea perteneciente al género *Zea* y a la familia Poaceae o Gramínea (Tabla 1). Es una planta anual, de sexualidad monoica, de tallo largo y recto, robusto, sin ramificaciones. Llega a alcanzar alturas de 1.5 a 5 m, con hojas grandes y alargadas, alternadas a lo largo del tallo (Kato Yamakake, 2009).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz.

Taxón	Descripción
Clase	Monocotyledoneae
Subclase	Glumiflorae
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Subfamilia	Pinicoideae
Género	<i>Zea</i>
Especie	<i>mays</i>

Fuente: (Tollenaar & Dwyer, 1999)

Posee un sistema radicular fibroso o fasciculado que provee un perfecto anclaje al sustrato ("Biology of Maize," 2011). En algunos casos sobresalen unos nudos a nivel del suelo de donde brotan raíces secundarias o adventicias. El maíz es una especie que se reproduce por polinización cruzada. Su inflorescencia es monoica con flor masculina y femenina separada dentro de la misma planta. La inflorescencia masculina se presenta en una panícula que posee una cantidad muy elevada de polen. En cada florecilla que compone la panícula se presentan tres estambres donde se desarrolla el polen. En cambio, la flor femenina se forma en unas estructuras vegetativas llamadas espádices (mazorca) que se disponen en los laterales del tallo. La mazorca puede generar entre 400 a 1000 granos a lo largo de 24 hileras. Las hojas son largas, lanceoladas y con vellosidades en su haz ("Biology of Maize," 2011) (Doebley & Iltis, 1980; Kato Yamakake, 2009; Rouf Shah, Prasad, Kumar, & Yildiz, 2016; Tollenaar & Dwyer, 1999).

1.1.3. Valor nutricional

A nivel mundial, el maíz se utiliza principalmente para la alimentación animal, aunque también es considerado como uno de los alimentos básicos para humanos, principalmente en México y países de Centro y Sur América. La versatilidad de este cereal para producir una gran diversidad de productos derivados se debe a su amplia composición nutrimental.

El grano de maíz es la parte comestible y nutritiva de la planta, el cual aporta carbohidratos, grasas, azúcares, fibra, entre otros (Tabla 2). También contiene vitamina B1, B2, B3, B5, B6, vitamina C y K, ácido fólico, selenio y potasio. Debido a su valor nutricional, así como por compuestos fitoquímicos y sus efectos benéficos a la salud, ha sido objeto de diversos estudios (Kumar, 2013; Rouf Shah *et al.*, 2016).

Tabla 2. Composición nutrimental del grano de maíz para consumo humano.

Compuesto	Contenido (g 100 g⁻¹)
Carbohidratos	71.88
Proteínas	8.84
Grasas	4.57
Fibra	2.15
Ceniza	2.33
Humedad	10.23
Fósforo	0.348
Sodio	0.0159
Azufre	0.114
Riboflavina	0.0001
Amino ácidos	0.00178
Minerales	1.5
Calcio	0.01
Hierro	0.0023
Potasio	0.286
Tiamina	0.042
Vitamina C	0.00012
Magnesio	0.139
Cobre	0.00014

Fuente: (Rouf Shah *et al.*, 2016)

1.1.4. Fenología

El maíz divide sus etapas fenológicas en dos categorías (Tabla 3): La Vegetativa: comienza con la siembra y germinación de la semilla, una vez que el coleóptilo emerge del sustrato y se desarrolla la plántula. En esta etapa, la planta dirige la mayor energía al desarrollo de follaje y elongación del tallo y raíz. Esta etapa se subdivide a su vez en estadios (V) que comienzan con la emergencia (VE) y continúan con la generación de hojas en donde V1 es igual a una hoja y continúa en función del número de hojas desarrolladas hasta Vn, siendo (n) la última hoja antes de la emergencia de la panoja (VT). A su vez, la reproductiva dirige la mayor parte de la energía al desarrollo de la mazorca y la maduración del grano una vez que la planta ha alcanzado su máximo crecimiento, inicia cuando los estigmas de la planta son visibles fuera de las vainas y ocurre la floración de la planta (R1). En este estadio ocurre la polinización; después, en el estadio R2 la mazorca ya ha alcanzado su tamaño final y los embriones se desarrollan lentamente. En esta etapa el grano contiene alrededor del 85% de humedad. En R3 el grano acumula almidón y su aspecto tiene una tonalidad de blanca a amarilla tenue debido a que el fluido interno es lechoso. En ésta etapa los embriones se desarrollan rápidamente; en el siguiente estadio (R4) la acumulación de almidón en los embriones continúa y el líquido interior se espesa y forma una consistencia pastosa por lo que su aspecto se torna blanco/amarillo con una tonalidad más intensa; en R5 los granos se secan comenzando por la parte externa formando una capa de almidón duro, mientras que en el estadio R6 todos los granos alcanzan su máximo peso seco y se forma una abscisión de tonalidad café a oscura en la zona de inserción del grano a la mazorca indicando el final de la maduración del grano. En esta etapa la humedad del grano es de aproximadamente 35%. La última etapa es la senescencia de la planta, en la que las hojas comienzan a caer y la planta se torna de tonalidad café claro ("Biology of Maize", 2011; Tollenaar & Dwyer, 1999; Bolaños & Edmeades, 1993; Hanway, 1963).

Tabla 3. Etapas fenológicas del maíz

Etapas Vegetativas			Etapas Reproductivas		
	Etapa	Dds		Etapa	Dds
VE	Emergencia	5	R1	Visibilidad de estigmas	59
V1	Primera hoja	9	R2	Blíster	71
V2	Segunda hoja	12	R3	Grano lechoso	80
V3	Tercera hoja	16	R4	Grano pastoso	90
V(n)	Enésima Hoja	16 - 50	R5	Grano dentado	102
VT	Panojamiento	55	R6	Grano maduro	112

Dds= Días después de la siembra

1.1.4.a. Desarrollo de las raíces

El maíz desarrolla dos tipos de raíces: 1) Raíces seminales, que se originan en el embrión y en las cuales la profundidad a la que se desarrollan inicialmente dependerá de la profundidad de la siembra. El crecimiento de estas raíces decrece después del estadio VE. Al llegar al estadio V3, su desarrollo es casi nulo; 2) Raíces adventicias se originan en el tallo después de la germinación, estas raíces comienzan a desarrollarse en la etapa VE y comienzan a elongarse a partir de V1. De V1 hasta R3 se desarrollan raíces adventicias en nudos (de 7 a 10 aproximadamente); en estas etapas, se desarrolla casi en su totalidad el sistema radical, ya que a partir de R3 el crecimiento es limitado. Tanto las raíces seminales como las adventicias crecen horizontalmente y aproximadamente a la 4ta semana después de la siembra se desarrollan en profundidad (Hanway, 1966).

1.2. Producción Mundial de Maíz

A nivel mundial, los cereales son el principal producto para la nutrición humana como el trigo, el maíz, etc. El uso de estos granos se ha incrementado desde el forraje hasta una alta gama de productos (FAO, 2015). Actualmente, el maíz es el cereal con mayor volumen de producción mundial con 1×10^9 ton año⁻¹. Los países productores de maíz emplean un área superior al de cualquier otro cultivo, alcanzando un área cosechada de 178.6×10^6 ha (FIRA, 2015). Estados Unidos de América (EUA) es el país líder, aportando el 36%, seguido de China con 21.5%, Brasil 8.11%, la Unión Europea 6.36%, Argentina el 3.36%; y México ocupa el 7°

lugar aportando el 2.32% de la producción mundial. En términos de rendimiento, EUA ocupa el primer lugar con un rendimiento promedio de 10.5 ton ha⁻¹. Le siguen China, con 6 ton ha⁻¹, Brasil, con 5.2 ton ha⁻¹ y la Unión Europea, con 5.1 Mg ha⁻¹. Mientras que el rendimiento promedio global es de 5.7 ton ha⁻¹; el rendimiento en México es de 3.4 ton ha⁻¹ (posición 83 de 168 países productores) (FAOSTAT, 2016; Agriculture, 2016).

1.3. Producción Nacional de Maíz

A nivel nacional, en 2015 la producción de maíz tuvo un incremento del 7% con respecto a 2014, para totalizar 24.7×10⁶ ton, siendo éste el nivel más alto en los últimos 15 años. La producción es 89% de maíz blanco, 10% de maíz amarillo y el resto de otro tipo de maíz. El rendimiento promedio nacional es de 3.4 ton ha⁻¹, 51% menos con respecto al rendimiento medio global. México cuenta con un déficit en la producción de este grano dado que su consumo anual es de 33.6×10⁶ ton, razón por la que importa cerca de una tercera parte del maíz que consume, en mayor medida maíz amarillo para fines pecuarios e industriales, siendo EUA su principal proveedor (FIRA, 2015).

La producción de maíz en México se genera principalmente durante el ciclo primavera-verano, equivalente al 77% de la producción (SAGARPA, 2015). Respecto a la modalidad hídrica, la producción de maíz de temporal muestra un mayor dinamismo en el crecimiento de producción. En diez años, la producción de maíz de temporal ha crecido a una tasa anual media de 3.7%, tres veces más alta que la producción de maíz de riego (Fig. 1) (FIRA, 2015). La superficie bajo temporal se incrementó a una tasa media anual de 6.5%, sembrándose 7.6×10⁶ ha durante el ciclo 2015.

1.3.1. Principales Estados Productores

En México destacan como principales estados productores de maíz Sinaloa, Jalisco,

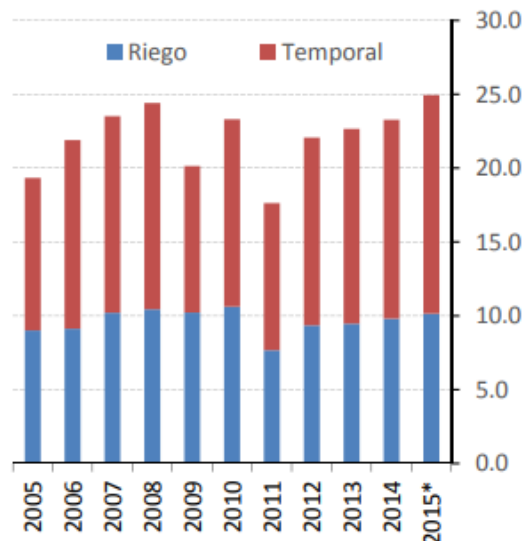


Figura 1. Producción de maíz en México (10⁶ ton) por modalidad hídrica, (2005–2015).

Michoacán, Estado de México y Guanajuato (SAGARPA, 2015). Estos últimos tres estados corresponden a los sitios de muestreo de nuestro estudio (Tabla 4).

Tabla 4. Principales entidades federativas en México productoras de maíz.

Estado	Área Cosechada (×10³ ha)	Producción (×10⁶ Mg)	Rendimiento (ton ha⁻¹)	Valor (×10⁶ MX\$)
Sinaloa	381	3.6	9.67	12.2
Jalisco	541	3.4	6.42	9.7
Michoacán	466	1.9	4.15	5.5
Edo. de México	516	1.8	3.6	5.8
Guanajuato	371	1.4	3.82	4
Chihuahua	225	1.3	6.11	3.6
Guerrero	464	1.3	2.87	4.5
Veracruz	569	1.2	2.22	4.7
Chiapas	664	1.1	1.79	3.8
Nacional	7,060	23.2	3.4	72.5

Fuente: SAGARPA, 2015.

1.3.2. Sistemas de Cultivo de Maíz en México

El manejo del cultivo de maíz es complejo y participan varios factores para sustentarlo. Esto le da características sociales, agrícolas, ecológicas y económicas distintas. A lo amplio del territorio nacional existen diversos tipos de sistemas y prácticas agronómicas en la producción de maíz. La revisión de los sistemas de cultivo puede ser dirigida desde distintos enfoques: agrícola, social, económico, etc. El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) define distintas características del sistema de cultivo de maíz. Estas características son: 1) preparación del terreno; 2) variedades cultivadas; 3) época de siembra; 4) método y densidad de siembra; 5) fertilización; 6) riego; 7) combate de malezas; 8) control de plagas y enfermedades y 9) cosecha. Sin embargo, desde un enfoque agroecológico, las condiciones edafo-climáticas juegan un papel fundamental en rendimiento del cultivo *i.e.* el tipo de suelo, el clima, la altitud, la precipitación pluvial,

entre otras. Sin embargo, la evolución y las expectativas de la producción, así como el consumo de este grano está directamente relacionado con el alto consumo de fertilizantes y agroquímicos para alcanzar un rendimiento alto (Haffer, 2013).

1.4. Uso de Fertilizantes

A nivel mundial, en 2013 el consumo de fertilizantes (N-P₂O₅-K₂O) se estimó de 183.2×10⁶ ton, con una tasa de crecimiento anual del 1.8%, con lo cual para 2018 se proyecta un consumo de fertilizantes de ca. 200.5×10⁶ ton (FAO, 2015). Aproximadamente, 50% del consumo de fertilizantes es aplicado en cereales, siendo el cultivo de maíz el de mayor consumidor (Fig. 2) (Haffer, 2013).

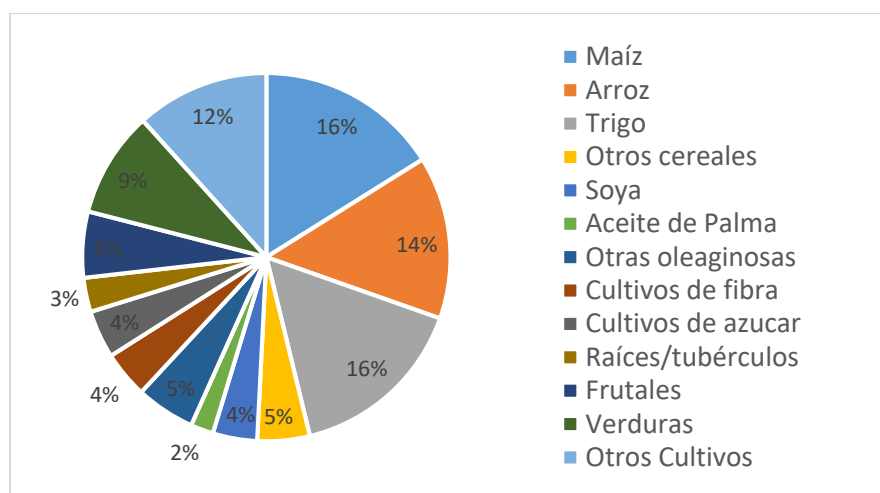


Figura 2. Aplicación de fertilización total por cultivos a nivel mundial (2013).

México consume alrededor de 1.7×10⁶ Mg fertilizantes NPK año⁻¹, de los cuales el N representa el 69, P el 20, y el K 11%. México importa el 60% de los fertilizantes que usa, esto representa un déficit en la producción de fertilizantes para abastecer al país (Haffer, 2013).

El uso excesivo de fertilizantes para aumentar el rendimiento de los cultivos ha representado un costo elevado para el medio ambiente. Se estima que menos del 50% de los fertilizantes son aprovechados por los cultivos. El resto se pierde por diversos fenómenos físico-químicos y biológicos como la lixiviación, la inmovilización, la volatilización, y el escurrimiento (Ladha *et al.*, 2005).

El costo de la producción de fertilizantes depende directamente de la extracción de materia fósil (petróleo), por lo que el costo de producción de los fertilizantes se ha incrementado. Esto representa un mayor costo en la producción agrícola, además, su uso desencadena una serie de fenómenos contaminantes a gran escala (Canfield *et al.*, 2010; Ladha *et al.*, 2005). Es necesario que el desarrollo agrícola de los cultivos, especialmente el maíz, sea dirigido hacia un desarrollo sustentable mediante un mejor manejo y aprovechamiento de los recursos naturales para generar un menor impacto en el medio ambiente.

Diversos factores intervienen en la producción de maíz. Uno de estos es el suelo y el microecosistema que se forma en la rizósfera, que es el nicho con una gran diversidad de microorganismos. En la rizósfera, existen microorganismos benéficos para el cultivo que pueden ser utilizados para generar un desarrollo agrícola sustentable. Sin embargo, la comprensión de las interacciones planta-microorganismo aún no ha sido dilucidada en su totalidad.

1.5. Rizósfera

La rizósfera se define como la zona estrecha de suelo que está alrededor de la raíz y que es influenciada por la planta (Fig. 3a). En esta zona, distintos tipos de interacciones bioquímicas complejas se llevan a cabo por las plantas y los microorganismos (Gregory, 2006). Estas interacciones son de las más dinámicas y complejas en el planeta. El resultado de estas interacciones se refleja en el rendimiento, la nutrición y la salud de las plantas, así como en el balance y actividad de los microorganismos que participan directa o indirectamente en la estructura del suelo y el ciclaje de nutrimentos (Philippot *et al.*, 2013).

Existen diferencias químicas y biológicas considerables entre la rizósfera y el suelo no rizosférico, inducidas directamente por la actividad de las raíces en conjunto con la actividad de la microflora de la rizósfera (Fig. 3b) (Bakker *et al.*, 2015; Baudoin *et al.*, 2003; Hinsinger, 2001). Algunas de las interacciones en la rizósfera son responsables, en cierta medida, de lo siguiente: 1) la descomposición de la materia orgánica; 2) estructura física del suelo; 3) regulación de hormonas de las plantas; 4) disponibilidad de nutrientes; 5) interacciones antagonistas; 6) intercambio de fuentes de carbono; 7) fijación biológica de nutrientes; 8) tolerancia al estrés; 9) ajustes de pH, entre otras (Arruda *et al.*, 2013).

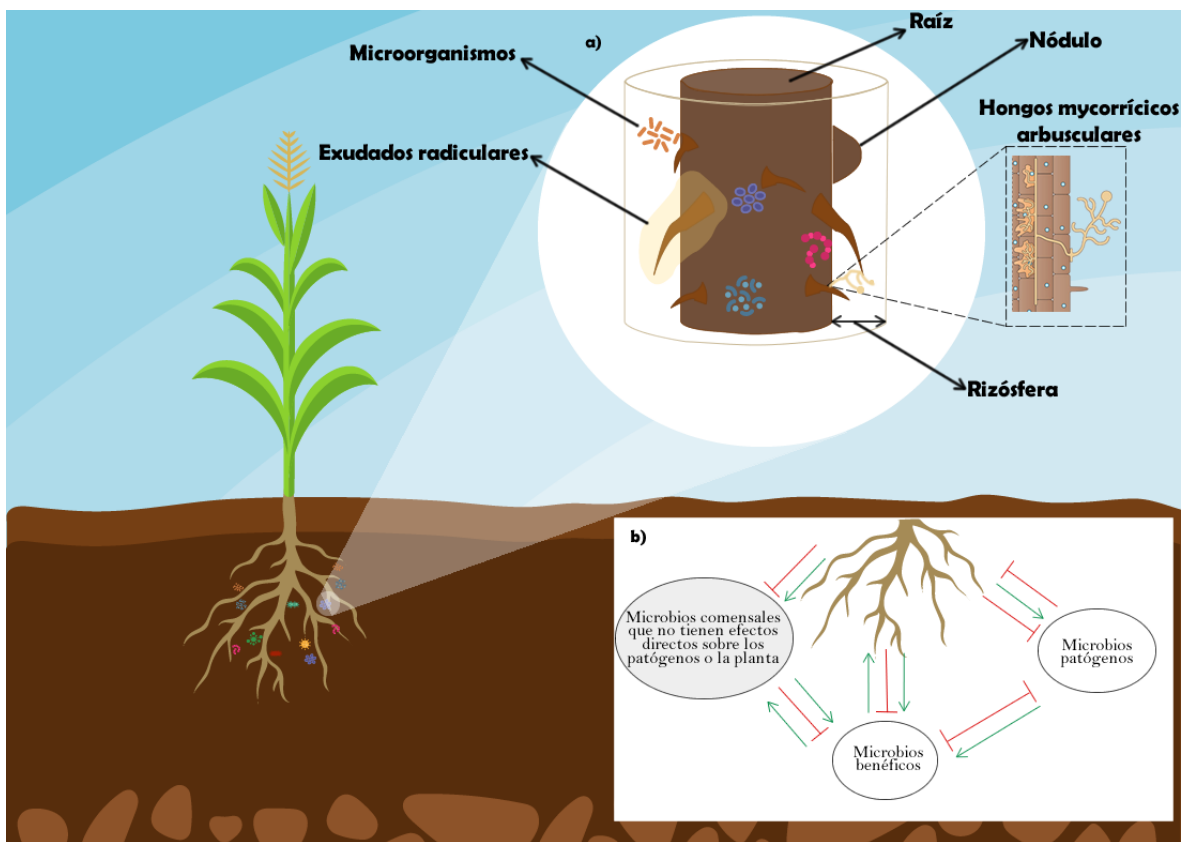


Figura 3. Componentes de la rizósfera.

a) estructura de la rizósfera, b) interacciones microbianas (las flechas indican intercambio de compuestos beneficios; las líneas rojas indican un intercambio de compuestos inhibitorios). Modificado de Berendsen *et al.*, 2012 y Philippot *et al.*, 2013.

La diversidad de microorganismos en la rizósfera es afectada por distintos factores *i. e.* tipo de suelo, insumos adicionados al cultivo, genotipo del hospedero, clima,

manejo agrícola, entre otros (Peiffer *et al.*, 2013). En el caso de los sistemas naturales, la diversidad es afectada por las interacciones bióticas, la especie de la planta y la diversidad de plantas que interactúan a su alrededor. Éstas contribuyen a formar relaciones más estrechas por la consolidación de relaciones específicas que se han dado a lo largo del tiempo sin perturbaciones considerables a su ecosistema nativo (Fig. 4a). En el caso de los sistemas agrícolas, las prácticas agrícolas representan un mayor efecto en la diversidad, al reducir la dependencia de la planta de las interacciones bióticas suministrando nutrientes directamente a la planta. Estas prácticas cambian las condiciones en el suelo que a su vez limitan las condiciones favorables para las interacciones bióticas (Fig. 4b) (Philippot *et al.*, 2013).

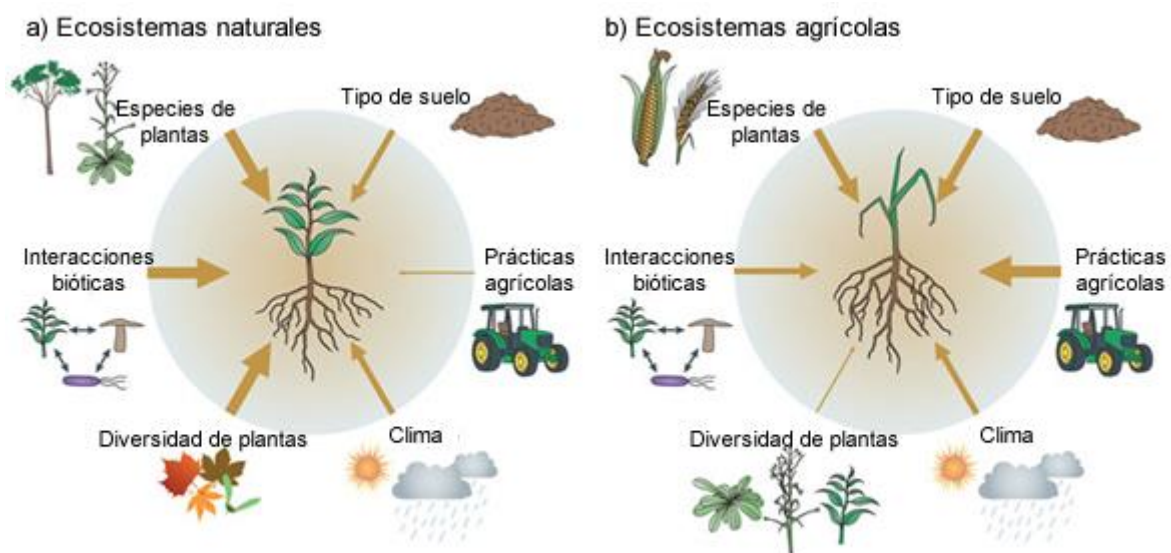


Figura 4. Factores que afectan la diversidad microbiana de acuerdo al tipo de sistema.

El espesor de las flechas indica la importancia de cada factor sobre la diversidad de acuerdo al tipo de sistema al que pertenecen. a) Ecosistemas naturales, b) Ecosistemas agrícolas. (Fuente: Philippot *et al.*, 2013)

Un gran número de microorganismos colonizan la rizósfera y son tan diversos y abundantes que llegan a superar en cantidad de células y genes a los propios de la planta huésped (Fig. 5). En la rizósfera han sido identificados microorganismos tales como bacterias, arqueas, hongos, oomicetos, protozoos, algas, nematodos y

artrópodos. Estos microorganismos forman parte de una dinámica alimenticia compleja que utiliza como materia prima los exudados que libera la planta (Mendes *et al.*, 2013; Philippot *et al.*, 2013).

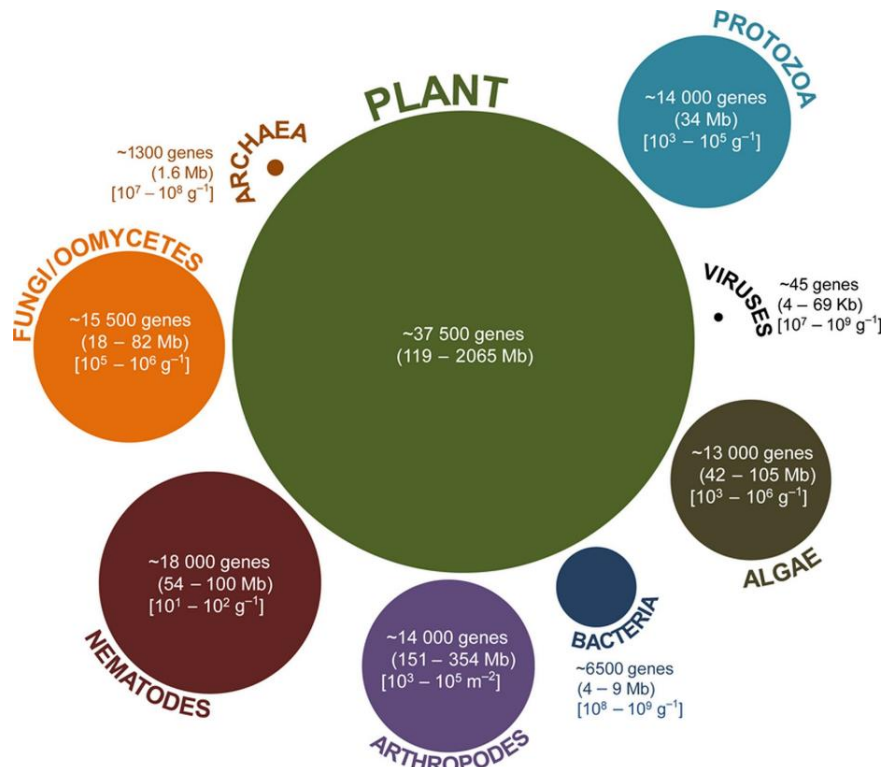


Figura 5. Microorganismos que habitan la rizósfera.

El tamaño de los círculos está dado en función de la medida del número de genes presentes en el genoma de especies representativas de cada grupo de organismos; el tamaño de sus respectivos genomas se indica entre paréntesis. Los números de su abundancia aproximada para cada uno de estos microorganismos se indican entre corchetes.

Fuente: (Mendes, Garbeva, & Raaijmakers, 2013)

Dada su importancia, diversos estudios se han enfocado a dilucidar las interacciones en la rizósfera, y la función de los microorganismos en este dinámico microecosistema. Estos estudios han utilizado técnicas basadas en el cultivo de los microorganismos y técnicas independientes de cultivo *i.e.* técnicas moleculares como secuenciación masiva, metagenomas, utilización de isótopos estables, entre otros (Arruda *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2001; Peiffer *et al.*, 2013; Smalla *et al.*, 2007).

El estudio de la riqueza genética y de la diversidad de estos microorganismos con potencial agronómico, resulta atractivo para la generación de conocimiento que permita comprender la estructura y función de dichas especies en los sistemas de cultivo de maíz y su conservación (Rodríguez-Guzmán *et al.*, 2011). Es importante conocer la estructura de las comunidades bacterianas con el objetivo de identificar el efecto que ejerce el agroecosistema sobre estas (Li *et al.*, 2014).

1.6. Diversidad Bacteriana en la Rizósfera de Maíz

Diversos estudios han sido dirigidos a dilucidar la estructura microbiana en la rizósfera de maíz, el efecto que la fertilización y el manejo agrícola generan sobre estas comunidades. Sin embargo, la diversidad microbiana del suelo es conocida por la dificultad para ser dilucidada. Diferentes estudios reportan cambios en las comunidades bacterianas del maíz debido a diferentes factores como el tipo y la cantidad de fertilizantes aplicada, el genotipo del maíz huésped, factores climáticos y el estatus fisicoquímico del suelo (Tabla 5).

Tabla 5. Estudios sobre algunos de los efectos que el agroecosistema ejerce sobre la estructura microbiana de la rizósfera.

Factor	País	Conclusión	Autor
Tipo de suelo	Alemania	El contenido de carbono disponible incrementa la diversidad bacteriana.	Marschner <i>et al.</i> , 2001
Control<NPK< estiércol	Alemania	La fertilización aumenta la diversidad y abundancia bacteriana, principalmente la fertilización orgánica.	Böhme <i>et al.</i> , 2005
N-inorgánico	China	La diversidad es influenciada negativamente por los largos periodos de fertilización con N.	Shen <i>et al.</i> , 2010
Campos de cultivo	EUA	La diversidad es influenciada mayormente por las condiciones ambientales.	Peiffer <i>et al.</i> , 2013
Tipo de suelo	Brasil	La textura del suelo, principalmente el contenido de arcilla afecta la diversidad bacteriana.	Arruda <i>et al.</i> , 2013
Control<NPK< NPK+Estiércol	China	La fertilización equilibrada de fertilizantes inorgánicos + orgánicos incrementan la diversidad bacteriana.	Luo <i>et al.</i> , 2015
Genotipos	EUA	Los exudados liberados por los genotipos varían la diversidad bacteriana.	Aira <i>et al.</i> , 2010

1.7. Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal

Las bacterias presentes en la rizósfera juegan un papel clave para la nutrición y promoción de crecimiento vegetal. Mediante distintos mecanismos, como la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de fósforo y fierro, entre otros, estas bacterias proveen a las plantas de nutrientes que no pueden aprovechar directamente. También protegen a las plantas de patógenos mediante la producción de antibióticos y/o la inducción sistémica de resistencia, la resistencia a estrés y la modificación la estructura radicular mediante la liberación de fitohormonas.

1.7.1. Mecanismos de Promoción de Crecimiento Vegetal

1.7.1.a. Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)

El gas nitrógeno (N_2) es el elemento más abundante en la atmósfera y es un componente fundamental para el desarrollo de la vida. A pesar de ser el elemento más abundante, solo un número reducido de organismos pueden aprovecharlo directamente. Una cantidad limitada de procesos son capaces de convertir el nitrógeno atmosférico a una composición asimilable. Entre estos casos se encuentran: i) procesos abióticos principalmente generados por descargas eléctricas o procesos de combustión; ii) procesos biológicos en los que participa un pequeño grupo de procariontes que son capaces de transformar el N_2 en amoníaco (NH_3); iii) por el proceso industrial de la conversión del N_2 en amoníaco (NH_3) y nitrato (NO_3) mediante el proceso Haber-Bosch (Wagner, 2012).

La FBN es un proceso exclusivo de los procariontes. Este grupo incluye organismos acuáticos *i. e.* cianobacterias, bacterias de vida libre como *Azotobacter* y bacterias que forman relaciones simbióticas (planta-microorganismo) como *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, entre otros. Todos ellos utilizan el complejo enzimático conocido como nitrogenasa para catalizar la conversión de N_2 a NH_3 (Montañez *et al.*, 2009; de Bruijn, 2015).

1.7.1.b. Solubilización Biológica de Fósforo (SP)

El fósforo (P) es el segundo elemento más importante, después del N, para el correcto desarrollo de las plantas. El P presente en suelos suele ser abundante y se presenta tanto en formas orgánicas como inorgánicas. Sin embargo, la disponibilidad de este elemento es limitada para su aprovechamiento por las plantas. El P es de vital importancia en las primeras fases de desarrollo de las plantas (Sharma *et al.*, 2013).

Para satisfacer las necesidades nutrimentales en la agricultura, el P es agregado como fertilizante químico. Sin embargo, las plantas solo aprovechan del 10 al 30% del P agregado. El resto se precipita y se fija en los suelos al unirse con otros elementos como el calcio, fierro, aluminio, etc. (Hinsinger, 2001). Esto provoca una eutrofización en los suelos y mantos freáticos causando efectos negativos en el medio ambiente (Sims, Simard, & Joern, 1998). Un gran número de microorganismos como bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Enterobacter* y hongos (*i. e.*, micorrízicos arbusculares) presentes en suelo intervienen en la solubilización del P insoluble mediante la liberación de ácidos orgánicos y/o el ajuste de pH, lo cual contribuye a mineralizar y solubilizar este elemento para mayor asimilación por la planta (Oberson & Frossard, 2005). En este sentido, las bacterias son más efectivas en la solubilización del P que los hongos (Mohammadi, 2012).

1.7.1.c. Producción de Indoles

Uno de los mecanismos más importantes de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal es la modificación fisiológica de la planta mediante la liberación de hormonas. Una de las más comunes es la producción de auxinas que regulan la división, diferenciación y elongación de las células. Las auxinas son metabolitos secundarios sintetizados por la vía del triptófano (Ahemad & Kibret, 2014).

Se sabe que más del 80% de las rizobacterias pueden producir y liberar auxinas. La liberación de esta fitohormona por las rizobacterias afecta principalmente al sistema radicular de la planta. A niveles adecuados aumenta la biomasa y longitud de la raíz, promueve la generación de raíces adventicias y pelos radiculares. Todos estos cambios aumentan el área de contacto con el suelo y por consiguiente, la obtención de nutrientes y el intercambio de compuestos con dichas bacterias, mejorando la nutrición de las plantas (Solano *et al.*, 2008; Asghar *et al.*, 2002;).

II. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, la producción de maíz se ha incrementado. Sin embargo, para suministrar alimentos a la población cada vez creciente es necesario aprovechar y potencializar al máximo el área sembrada. Los métodos predominantes para incrementar el rendimiento del cultivo de maíz están sustentados en el uso excesivo de fertilizantes y agroquímicos. Desafortunadamente, estas prácticas son fuente de perturbaciones medioambientales, tales como la eutrofización y el calentamiento global. Diversos factores intervienen en la producción de maíz. Uno de ellos es el suelo y el microecosistema denominado rizósfera, el cual es habitado por una gran diversidad de microorganismos. En la rizósfera existen microorganismos benéficos que pueden ser utilizados para generar un desarrollo agrícola sustentable. Sin embargo, aún no se comprende del todo cómo la diversidad de microorganismos del suelo afecta el crecimiento vegetal. En México existen pocos estudios con enfoque molecular y funcional que estén dedicados a comprender cómo las prácticas de manejo agrícolas (tradicional e intensiva) afectan a la diversidad microbiana de la rizósfera. De ahí la importancia de desarrollar estos estudios en nuestro país.

III. HIPÓTESIS

La diversidad de la comunidad bacteriana de la rizósfera asociadas al maíz de temporal en México se ve afectada negativamente por los sistemas de producción intensivos.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Contrastar la diversidad de bacterias rizosféricas de maíz cultivado en agrosistemas (tradicional e intensivo) de temporal de México (Guanajuato, Edo. de México y Michoacán).

4.2. Objetivos Específicos

1. Caracterizar los sistemas de producción de maíz de temporal de México (Michoacán, Estado de México y Guanajuato) a través de entrevistas *in situ* con los propietarios de las parcelas muestreadas.
2. Cuantificar la población bacteriana cultivable con capacidad de promoción del crecimiento vegetal (producción de índoles, solubilización de fósforo y fijación biológica de nitrógeno) de sistemas de producción de maíz de temporal en Michoacán, Estado de México y Guanajuato, a través de medios de cultivo semiselectivos.
3. Medir la actividad de promoción del crecimiento vegetal (producción de índoles, solubilización de fósforo y fijación biológica de nitrógeno) de aislados bacterianos de sistemas de producción de maíz de temporal en Michoacán, Estado de México y Guanajuato, por espectrofotometría.
4. Estimar la promoción del crecimiento vegetal en *Arabidopsis thaliana* por aislados bacterianos con capacidad de promoción del crecimiento vegetal obtenidos de sistemas de producción de maíz de temporal de Michoacán, Estado de México y Guanajuato.

5. Identificar molecularmente los aislados bacterianos con capacidad de promoción del crecimiento vegetal obtenidos de sistemas de producción de maíz de temporal de Michoacán, Estado de México y Guanajuato, a través de la técnica del 16S ARN.
6. Cuantificar la producción de biomasa por la planta de maíz inoculada por aislados bacterianos con capacidad de promoción del crecimiento vegetal, obtenidos de sistemas de producción de maíz de temporal de Michoacán, Estado de México y Guanajuato.
7. Estimar la diversidad de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal obtenidos de sistemas de producción de maíz de temporal de México (Michoacán, Estado de México y Guanajuato).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Sitios de Estudio y Muestreo

Se seleccionaron tres parcelas de tres entidades federativas con características diferenciales en los sistemas de producción de maíz de temporal: i) Michoacán representativo del cultivo de maíz tradicional en laderas (~2050 m altitud); ii) Guanajuato caracterizado por el cultivo de maíz intensivo en valles bajos (< 2000 m altitud) y iii) Estado de México, representativo del cultivo de maíz tradicional en valles altos (> 2000 m altitud). La selección de las parcelas se realizó en forma aleatoria. En cada parcela seleccionada con la ayuda de una pala “flameada” con alcohol, a través del sistema “cinco de oros” se muestrearon cinco plantas con suelo de 0.5 × 0.5 × 0.3 m de ancho, largo y profundidad, respectivamente, en la etapa reproductiva de prefloración (R2 a los 71 días después de la siembra) (junio de 2012). Las muestras se colocaron en bolsas plásticas con sello hermético y se almacenaron a 4°C hasta su manipulación posterior.

5.1.1. Caracterización de los Sistemas de Cultivo

Se diseñó una encuesta tipo cuyo objetivo fue caracterizar los sistemas de producción en cuanto a manejo de pesticidas, fertilizantes, semilla y rendimiento, la cual fue aplicada a los propietarios de las parcelas muestreadas. También, la caracterización de los diferentes sistemas de producción fue complementada con la revisión de datos de clima y precipitación pluvial correspondientes a los sitios muestreados.

5.1.2. Caracterización Físicoquímica del Suelo

La caracterización físico-química del suelo fue realizada por el Laboratorio de Análisis de Agua, Suelos y Fertilizantes del INIFAP - Campo experimental Bajío en Celaya, Guanajuato, de acuerdo a la norma NOM 021 RECNAT 2000.

5.2. Aislamiento Bacteriano

A partir de las muestras obtenidas de la rizósfera de cinco plantas de cada parcela correspondiente al muestreo realizado aproximadamente a los 70 días después de la siembra se separó el suelo adherido a la raíz con pinzas y espátulas esterilizadas previamente con etanol 70% para lo cual se tomaron 10 g de cada muestra y se suspendieron en 90 mL de solución salina (NaCl 0.85%) estéril, pH 7 y se agitó a 150 revoluciones por minuto (rpm) por 3 h a 28°C. Posteriormente, cada suspensión de 1 mL fue diluida serialmente en 9 mL de solución salina con agitación entre diluciones, hasta obtener diluciones de 10^{-4} y 10^{-5} . De cada dilución se tomó una alícuota de 0.1 mL y se sembró por triplicado por extensión de placa en caja de Petri con medios sólidos semi-selectivos (en g L⁻¹): LGI para fijadoras de nitrógeno (0.2 K₂HPO₄ + 0.6 KH₂PO₄ + 0.2 MgSO₄ + 0.02 CaCl₂ + 0.01 FeCl₃ + 0.002 Na₂MoO₄ + 0.075 azul de bromotimol + 15 agar bacteriológico, pH 6.2) y PVK, para solubilizadores de fosfato (0.5 (NH₄)₂SO₄ + 0.2 NaCl + 0.1 MgSO₄ + 0.2 KCl + 0.002 MnSO₄ + 0.002 FeSO₄ + Ca₃(PO₄)₂ + glucosa + 0.5 extracto de levadura + 0.1 púrpura de bromocresol + 15 agar bacteriológico, pH 7.2, adicionados con 80 µg mL⁻¹ de cicloheximida), ambos esterilizados por filtración usando una membrana hidrofílica Millipore de 0.22 µm de tamaño de poro. Las cajas de Petri se incubaron en cámara de crecimiento durante 96 h a 28 °C. Posteriormente, se realizó el conteo de del crecimiento como unidades formadoras de colonias (por gramo de suelo; UFC g⁻¹) por el método de extensión de placa.

A partir del crecimiento bacteriano, se procedió con la selección de las bacterias a aislar, tomando como criterio principal, en el caso de las placas con LGI (medio libre de N), crecimiento de las colonias, así como un viraje de color de verde a amarillo indicando actividad de la enzima nitrogenasa. En el caso de las placas con PVK, la formación de un halo alrededor de la colonia fue la respuesta de selección, la cual indica la actividad de solubilización de P. Un segundo criterio de selección se realizó con base en las diferencias morfológicas entre colonias. Una vez seleccionadas, se aislaron en medio mínimo R2A y se incubaron a 28 °C por 48 h. Una vez cuantificado

el crecimiento bacteriano, las cajas de Petri fueron almacenadas a 4 °C hasta su uso posterior.

5.3. Características de Promoción de Crecimiento Vegetal

5.3.1. Producción de Indoles

Se cuantificó la producción de indoles de los aislados seleccionados mediante el reactivo Salkowsky (50 mL HClO₄ 35% + 1 mL FeCl₃ 0.5 M) por detección colorimétrica, cuyo principio está fundamentado en la oxidación de las moléculas de tipo indol, producido por el ácido perclórico que produce una coloración de rosa a fucsia.

Los cultivos bacterianos se inocularon en 10 mL de caldo nutritivo adicionado con 500 µg mL⁻¹ de L-triptófano en tubos de ensaye de 15 mL. Los cultivos fueron incubados en oscuridad con agitación constante a 100 rpm durante 48 a 28°C . Posteriormente, se extrajo una alícuota de 1 mL de cada cultivo bacteriano y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron (Thermo Modelo Sorvall. Biofuge, Waltham, MA, EUA) a 7000 rpm por 5 minutos. Se extrajeron 100 µL de sobrenadante y se mezclaron con 200 µL de reactivo Salkowsky en pozos de microplaca (Nunc Edge, Invitrogen; Carlsbad, CA, EUA). La reacción se incubó durante 30 min en condiciones de oscuridad. Finalmente, se midió la absorbancia a 540 nm con un espectrofotómetro (Tecan A-5082 Modelo Genios; Männedorf, ZH, Suiza). Para determinar la producción de indoles se realizó una curva de calibración estándar con un gradiente de concentración conocida: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 µg mL⁻¹ de ácido indol acético (AIA, Sigma Chemical; St. Louis, MO, EUA), diluidas en caldo nutritivo. La medición se realizó con tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas (Celis & Gallardo, 2008).

5.3.2. Solubilización de Fósforo Inorgánico (Pi)

La solubilización de Pi se cuantificó mediante la formación de un complejo Pi-molibdato de amonio que es reducido por ácido ascórbico en presencia de antimonio, produciendo una coloración azul

Los cultivos bacterianos seleccionados como presuntos solubilizadores de Pi se inocularon en 25 mL de medio PVK líquido (sin púrpura de bromocresol) y se incubaron con agitación constante a 100 rpm y 28°C por 120 h. Posteriormente se extrajo una alícuota de 1 mL de cada cultivo bacteriano y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron (Thermo Biofuge) a 7000 rpm por 10 minutos para extraer el sobrenadante. Se le realizó una segunda centrifugación tomando ~0.7 mL y se extrajeron 0.06 mL del sobrenadante y se mezcló con 0.06 mL de reactivo B [0.0528 g de ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) diluido en 10 mL de Reactivo A (1.27 g de $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ diluido en 25 mL de H_2O + 0.0291 g de tartarato de antimonio de potasio ($C_8H_4K_2O_{12}Sb_2$) diluido en 10 mL de H_2O + 100 mL de H_2SO_4 5 N)] y 0.18 mL de agua desionizada en pozos de microplaca (Nunc Edge, Invitrogen). Finalmente, la reacción se incubó durante 15 minutos y se midió en un espectrofotómetro la absorbancia a 880 nm (xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer, BIO-RAD, Hercules, CA, EUA). Se determinó la cantidad de Pi soluble utilizando una curva de calibración con cantidad de P conocida (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, y 5 mg mL⁻¹) utilizando KH_2PO_4 (Mussa *et al.*, 2009). Simultáneamente, se midió el pH del cultivo.

5.3.3. Crecimiento en Medio de Cultivo Semiselectivo Libre de N

Los cultivos bacterianos se inocularon en 10 mL caldo nutritivo, se incubaron a 28 °C con agitación constante a 100 rpm durante 48 h. Posteriormente, se transfirió una alícuota de 1 mL de cada cultivo bacteriano y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron (Thermo Biofuge) a 7000 rpm por 10 min. El sobrenadante se eliminó y se adicionó 1 mL de solución salina estéril (85%) para re-suspender la pastilla. La centrifugación se repitió a las mismas condiciones antes mencionadas y nuevamente se adicionaron 5 mL de solución salina estéril (85%) para recuperar la pastilla.

Se prepararon viales de 22 mL de capacidad con 5 mL de medio de cultivo semisólido LGI. Se tomó una alícuota de 0.5 mL de los inóculos bacterianos

resuspendidos previamente y se inoculó en el vial, bajo la superficie del medio. Los viales se sellaron con un tapón serológico bajo condiciones estériles. Posteriormente, se incubaron los viales a 30 °C por 24 h. Una vez observado un viraje en el color del medio se cuantificó el crecimiento. Como control positivo se usó *Azospirillum brasilense* Sp7 y como control negativo *Escherichia coli*.

5.4. Efecto Microorganismo-planta *in vitro*

5.4.1. Promoción del Crecimiento en *Arabidopsis thaliana*

Se esterilizaron semillas de *A. thaliana* mediante una mezcla de cloro (5 mL de HCl concentrado y 100 mL de NaClO) en cámara de gases durante 4 h. Posteriormente, se sembraron las semillas en cajas de Petri con medio MS 0.5x. Para dar un tratamiento de vernalización se incubaron a 4°C durante 48 h, luego se colocaron en cámara de crecimiento (23°C, 16 h luz y 8 h oscuridad) con una inclinación de las placas a 65°. Una vez que las semillas germinaron se trasplantaron 10 plántulas por cada caja de Petri con medio MS 0.5x estéril y se dejaron 24 h en cámara de crecimiento. De manera paralela, se inoculó una asada de los aislados en 10 mL de caldo nutritivo y se incubaron por 48 h a 100 rpm y 28°C. Se tomó una alícuota por cada cultivo de 1 mL y se centrifugó a 7000 rpm por 5 min para obtener una pastilla del aislado, se descartó el sobrenadante y se re-suspendió la pastilla en 1 mL de solución salina (NaCl 0.85%). Se tomó una alícuota de 0.02 mL de cada aislado y se estrió en forma perpendicular a la raíz a una distancia de 1 cm de la punta de la raíz. Se incubaron nuevamente en cámara de crecimiento durante 14 días. Al finalizar el experimento, se midió peso fresco de las plantas y éstas se fotodocumentaron.

5.5. Análisis Molecular de los Aislados Bacterianos

5.5.1. Identificación de los Aislados Bacterianos

Partiendo de los aislados bacterianos purificados, éstos fueron inoculados en 15 mL de caldo nutritivo contenido en tubos de ensaye inclinados 60° e incubados a 28°C con agitación constante a 100 rpm durante 48 h para proceder a la obtención del ADN genómico utilizando el kit PureLink® Genomic DNA Kit (Invitrogen), siguiendo

las especificaciones del fabricante. La correcta extracción, concentración y pureza del ADN genómico se corroboró mediante geles de agarosa 1% (Anexo I) y la cuantificación por espectrofotometría a 260 nm (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

Para la identificación molecular se realizó la amplificación del gene 16S ARN ribosomal mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) utilizando los oligos: 27F (5' -AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5' -TACGGYTACCTTGTACGACTT-3') que amplifican de 1450 a 1500 pb. La PCR se realizó en un volumen de 50 μL [5 μL de Buffer 10x de la PCR, 1 μL de solución de nucleótidos (dNTP) (10 mM), 2.0 μL de MgCl_2 (50 mM), 1 μL de cada primer (27F y 1492R) (50 ng μL^{-1}), 0.2 μL de Platinum® Taq DNA Polymerase High *Fidelity* 5 U μL^{-1} (Invitrogen), 2 μL de ADN genómico purificado (~40 ng) y se llevó al volumen final con agua desionizada estéril] bajo las siguientes condiciones: 95°C por 180 s, 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 90 s para un total de 38 ciclos y una extensión final a 72°C durante 180 s.

La amplificación, concentración y pureza de los amplicones se comprobó mediante electroforesis con gel de agarosa 1% [250 mg de agarosa diluída en 25 mL de Buffer TBE, 0.8 μL *Gel Red*] y cuantificación por espectrofotometría a 260 nm (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). Una vez confirmada la amplificación, se procedió a purificar el producto de la PCR utilizando el kit PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, se enviaron 15 μL de producto de la PCR purificado (~45 ng μL^{-1}) al Laboratorio de Servicios Genómicos de la Unidad de Genómica Avanzada (UGA) del CINVESTAV-IPN, Unidad-Irapuato. Se utilizaron los primers 27F y 1492R para conocer la secuencia derecha y reversa complementaria respectivamente de los amplicones, mediante el método de la cadena dideoxiterminal (Sanger *et al.*, 1977) usando un secuenciador automático de ADN (ABI 37300xl DNA, PE Applied Biosystems, Foster City CA, EUA). Se utilizaron los electroferogramas resultantes de la secuenciación (derecha y reversa complementaria). Se procedió a obtener la

secuencia consenso ensamblando ambas secuencias con el software Geneious versión v9.1.2 (www.geneious.com, Kearse *et al.*, 2012), eliminando las bases de los extremos de la secuencia, tomando como criterio de corte un nivel de calidad *Phred* inferior a 50 para descartarlas. Finalmente, se compararon las secuencias en la base de datos Silva Database (www.arb-silva.de; Quast *et al.*, 2013) utilizando el algoritmo de alineación de secuencias SINA (Pruesse, Peplies, & Glöckner, 2012) y usando como criterio de corte el 98% de similitud.

5.6. Determinación de la Diversidad Bacteriana

5.6.1. Extracción de ADN

El suelo rizosférico de las cinco plantas muestreadas de cada parcela fue homogeneizado para formar una muestra compuesta por etapa fenológica (V6, R2 y R6) de cada estado. A continuación, se tomó muestra de un gramo y se procedió a la obtención de ADN genómico utilizando el kit PureLink® Microbiome DNA Purification Kit (Invitrogen), siguiendo las especificaciones del fabricante, obteniendo el DNA eluido en un volumen final de 100 µL. La correcta extracción, concentración y pureza del ADN genómico se corroboró mediante geles de agarosa 1% en cámara de electroforesis de 25 mL (250 mg de agarosa diluida en 25 mL de Buffer TBE, 0.8 µL Gel Red) y cuantificación por espectrofotometría a 260 nm (Nanodrop 2000).

5.6.2. Ampliación y Secuenciación de la Región Hipervariable V4-V6 del Gen 16S Ribosomal

Se enviaron 10 µL de producto de la PCR purificado (~45 ng µL⁻¹) al Laboratorio de Servicios Genómicos de la Unidad de Genómica Avanzada (UGA) del CINVESTAV-IPN, Unidad-Irapuato. Se utilizaron los “primers” 357F 5´CTCCTACGGGAGGCAGCAG 3´ y CD (R) 5´CTTGTGCGGGCCCCGTCAATTC 3´ para conocer la secuencia derecha y reversa complementaria, respectivamente, que corresponde a las regiones variables V4-V6 de los amplicones, mediante tecnología *Illumina MiSeq* y el kit de preparación de librerías de secuencia *Nextera XT DNA Library Preparation Kit*.

5.6.3. Análisis Bioinformático de la Diversidad Bacteriana

Las secuencias fueron analizadas en QIIME 1.9.1 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology, por sus siglas en inglés). (Khalid, Arshad, & Zahir, 2004) Se realizó el ensamblaje de las secuencias derecha y reversa a partir de cada muestra individual demultiplexada de origen en formato “fastq” utilizando el algoritmo PANDAseq (PAired-eND Assembler for DNA sequences), seleccionando las secuencias con buena calidad utilizando como valor de calidad Phred >33 y límite de calidad de ensamblaje de 0.9, se eliminaron los primers derecho y reverso de cada secuencia y se eliminaron lecturas de <30 y >250 pares de bases (Masella *et al.*, 2012). El siguiente paso fue realizar una tabla de asignación de secuencias (o “mapping_file”), la cual contiene el ID de cada muestra y sus respectivas características a las cuales está relacionado (días después de la siembra, fertilización, fósforo, etc.). Una vez generada, se validó antes de continuar el análisis.

Se procedió a la colocación de la etiqueta correspondiente a cada lectura ensamblada mediante el archivo de asignación (mapping_file). Se contó el número de secuencias resultantes del emparejamiento (15961 secuencias). Se procedió a agrupar las secuencias procesadas en unidades taxonómicas operacionales (OTU). Este agrupamiento se conforma con base a la similitud de secuencias utilizando una base de referencia. QIIME soporta tres enfoques para la asignación de OTUs (*de novo*, referencia-cerrada y referencia-abierta). El enfoque *de novo* (Figura 6a) agrupa secuencias basadas en la identidad de secuencias dentro del mismo lote de datos. El enfoque de referencia cerrada (Figura 6b) hace coincidir secuencias con una base de datos existente de secuencias como referencia. Si una secuencia no coincide con la base de datos, se descarta. El enfoque de referencia abierta (Figura 6c) también comienza con una base de datos existente e intenta emparejar las secuencias contra ellos. Si existen secuencias que no logran coincidir con alguna secuencia de referencia, se agrupan en un nuevo lote de datos que posteriormente será clasificada mediante el método *de novo* (Navas-Molina *et al.*, 2013).

Para realizar el agrupamiento se eligió el enfoque de asignación de OTU de referencia abierta, se modificaron los valores predeterminados de QIIME en el caso del método de clasificación, se eligió RDP (Ribosomal Database Project, por sus siglas en inglés) (Wang, Garrity, Tiedje, & Cole, 2007) y se habilitó la opción de emparejado con secuencias en sentido reverso, el valor de confianza en la asignación taxonómica de >0.6 . Las secuencias de menor similitud fueron descartadas. Se eliminaron las secuencias quiméricas mediante el método de *USEARCH* (Edgar, 2010) usando como referencia la base de datos de *GreenGenes* (DeSantis *et al.*, 2006).

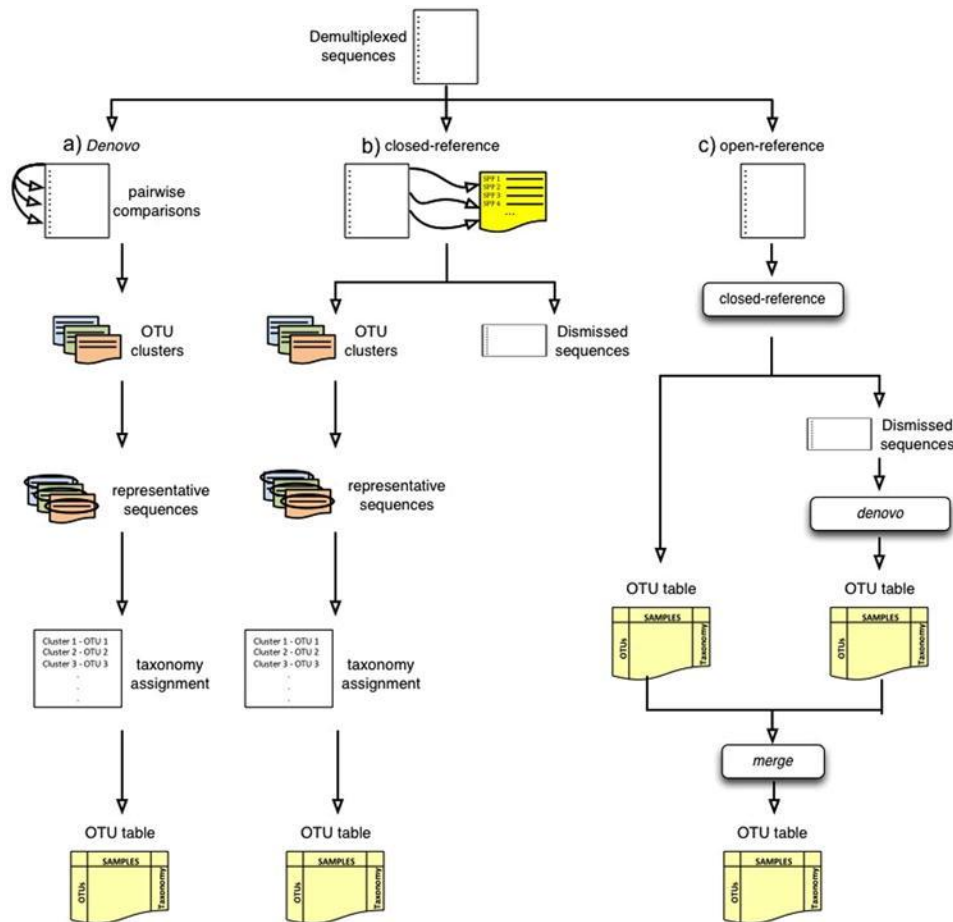


Figura 6. Enfoques de Asignación de OTU's soportados por QIIME

a) *de novo*, b) referencia cerrada y c) referencia cerrada.

5.6.3.a. Determinación de la Diversidad Alfa

Las curvas de rarefacción fueron obtenidas mediante el script *alpha_rarefaction.py* el cual permite obtener curvas de rarefacción (riqueza de especies por muestra leída) para el índice de diversidad de Shannon.

5.7. Interacción Microorganismo-Planta-Fertilizante

5.7.1. Producción de Biomasa por Maíz en Condiciones de Invernadero

El ensayo se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Unidad Irapuato, Guanajuato, en una cámara de radioactividad con atmósfera controlada 30-35°C, humedad relativa 50-70% dentro de un invernadero.

Se seleccionaron semillas de maíz variedad híbrida comercial PUMA 1181 (Asgrow), se revisó que el tamaño de las semillas fuese homogéneo y sin presencia de daño físico aparente. Posteriormente, se esterilizaron sumergiéndolas en etanol 70% v/v durante 1 minuto, después se eliminó el etanol y se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO 5% v/v) por 10 minutos en agitación constante, se eliminó el NaClO y se realizaron cinco enjuagues con agua destilada estéril, después las semillas se colocaron en cajas de Petri estériles para eliminar la humedad durante 24 h. Finalmente, las semillas se colocaron para su germinación dentro de cajas de Petri, sobre una capa de algodón humedecido de manera homogénea con 15 mL de agua destilada estéril, en series de 16 semillas por cada caja. Los procesos de esterilización y de germinación se realizaron en condiciones asépticas.

Se pesaron 40 kg de arena como sustrato, se dividieron en bolsas de polietileno con 5 kg de sustrato por bolsa y se les dio un tratamiento en autoclave a 120°C durante 1 h, el sustrato se dejó enfriar durante 4 h, este proceso se realizó tres veces. Posteriormente, se colocaron 250 g de sustrato por cada maceta de polipropileno.

Los cultivos bacterianos fueron inoculados por asada en 25 mL de caldo nutritivo, se incubaron a 28°C con agitación constante a 100 rpm durante 48 h. Posteriormente, se transfirió una alícuota de 1 mL (1×10^{-6} células viables mL^{-1}) de cada cultivo a tubos Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó a 7000 rpm, se descartó el sobrenadante y se re-suspendió la pastilla en solución salina 0.85%.

Se sembraron dos semillas germinadas por maceta depositándolas a 2 cm de profundidad y equidistantes entre sí, se colocaron de manera horizontal con el brote radicular hacia abajo. Posteriormente, se inocularon con 1 mL de cultivo bacteriano. El fertilizante base se aplicó en solución al momento de la siembra a cada 0.15 kg de suelo, mientras que el inóculo (1 mL inóculo + 20 mL H_2O desionizada-estéril) de una suspensión microbiana con una concentración de 10^8 UFC mL^{-1} , se aplicó a una profundidad de 2 cm sobre la semilla. El ensayo se instaló bajo un diseño estadístico completamente al azar con 5 réplicas por tratamiento.

5.7.1.a. Marcaje con ^{32}P

Para determinar el origen del P (suelo y fuente marcada con ^{32}P) se aplicó el isótopo ^{32}P . La aplicación de ^{32}P se realizó a la siembra con una solución marcada con ^{32}P y una actividad de 1 mCi de $^{32}\text{P}\text{-H}_3\text{PO}_4$ mL^{-1} (Amersham Biosciences). Se aplicó 3.33 μCi ^{32}P -ácido ortofosfórico kg^{-1} de suelo, diluidos en una solución de KH_2PO_4 con 5 mg P L^{-1} , para tener 60 μCi $^{32}\text{P}\text{-KH}_2\text{PO}_4$ maceta $^{-1}$. El fertilizante base se aplicó en solución al momento de la siembra a cada 0.15 kg suelo, a una profundidad de 2 cm. La actividad de ^{32}P fue cuantificada a los 21 días después de la germinación (ddg) a través del método Cherenkov (Nascimento, 1975).

5.7.1.b. Marcaje con ^{15}N

Para determinar el origen del N (suelo y fuente marcada con ^{15}N) se aplicó el isótopo ^{15}N . La aplicación de ^{15}N se realizó a la siembra con una solución de nitrato de amonio $\text{-NO}_3\text{NH}_4$ marcada con ^{15}N 1% ^{15}N átomos- (ISOTEC). Se aplicó 35 ppm NO_3NH_4 kg^{-1} de suelo, diluidos en una solución agua. El fertilizante base se aplicó en solución al momento de la siembra a cada 0.15 kg suelo, a una profundidad de

2 cm. La relación isotópica $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ fue cuantificada a los 21 días después de la germinación (ddg) por espectrofotometría de emisión óptica

5.8. Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos experimentales se realizó utilizando el Software estadístico JMP11 (SAS Institute Inc. Cary, NC, EUA). Las gráficas fueron realizadas en el Software SIGMAPLOT 11 (Systat Software, Inc. San Jose, CA, EUA). Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey-Kramer con un valor $p = 0.05$ con réplicas de $n = 5$ (véase en Anexos). Las gráficas del análisis molecular no-cultivable se realizó en la plataforma R, utilizando los paquetes “phyloseq” y “ggplot2”.

VI. RESULTADOS

6.1. Caracterización de los Sistemas de Cultivo

Las principales características de los sistemas de producción de maíz de temporal utilizados en este trabajo (Tabla 6) indican que los sistemas de producción difieren en términos de altitud. Por lo tanto, presentan una relación estrecha con la precipitación pluvial. Asimismo, los suelos de los sistemas de producción de interés tienen como común denominador ser, principalmente, de tipo franco. Además, la caracterización de dichos sistemas de producción muestra una relación directa entre fertilización y el rendimiento (Tabla 6).

Tabla 6. Características de los sistemas de producción de maíz de temporal de México analizados en este trabajo.

Factor	Michoacán	Estado de México	Guanajuato
Altitud (m)	2050	2500-3000	1700-1750
Clima	Templado subhúmedo	Templado subhúmedo	Templado seco
Precipitación (mm año ⁻¹)	755	628	573
Tipo de Suelo	Franco	Franco, Franco-arenoso	Franco, Franco-arcilloso
Sistema de Cultivo	Milpa de Temporal (asociados a maíz)	Temporal (monocultivo)	Temporal (monocultivo)
Fertilización (kg N ha ⁻¹)	Orgánica e inorgánica (110)	Orgánica e inorgánica (150)	Orgánica e inorgánica (300)
Variedad de semilla	Criolla	Criolla	Híbrida
Cultivo	Animal	Animal y mecanizado	Mecanizado
Rendimiento (t ha ⁻¹)	2	2	6

Fuente: Comunicación personal

Respecto a la caracterización físico-química de los suelos (Tabla 7) se observaron diferencias en el pH, contrastando Guanajuato con pH neutro y Michoacán, con pH ácido. Además, los suelos de Guanajuato presentaron valores de Nitrógeno (N), Fósforo (P) y Potasio (K) mayores en comparación con los suelos de Michoacán y el Estado de México. En términos de materia orgánica, no se observó diferencia significativa entre los suelos (Tabla 7).

Tabla 7. Caracterización de los sistemas de producción de maíz de temporal de México.

Estado	pH	Materia Orgánica	N-Inorgánico	Pi-Bray	K
		(%)	(ppm)	(ppm)	
Michoacán	5.16 ^{a*}	2.13 ^a	11.98 ^a	26.96 ^a	91.23 ^a
Edo. México	5.99 ^b	2.52 ^a	12.7 ^{ab}	5.66 ^b	221.3 ^a
Guanajuato	6.97 ^c	1.97 ^a	20.4 ^b	46.05 ^a	904.3 ^b

*Prueba Tukey-Kramer HSD $\alpha = 0.05$. $n=3$

6.2. Aislamiento Bacteriano Rizosférico

6.2.1. Población Bacteriana con Capacidad de Fijación de Nitrógeno y Solubilización de Fósforo

La población bacteriana con capacidad de fijar nitrógeno y solubilizar fósforo (Fig. 7), en los sistemas de producción de maíz de temporal fue similar ($\alpha = 0.05$) (Anexo XI.1a) en términos de presuntas bacterias positivas, con capacidad de fijación de nitrógeno oscilando en el rango 10^6 - 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) g^{-1} suelo. Sin embargo, para el caso de presuntas positivas de solubilización de fósforo se observó una diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) (Anexo XI.1b), destacando los suelos de Guanajuato (10^7 - 10^8 UFC g^{-1} suelo) con respecto a Michoacán y el Estado de México (10^6 UFC g^{-1} suelo⁻¹) (Fig. 6).

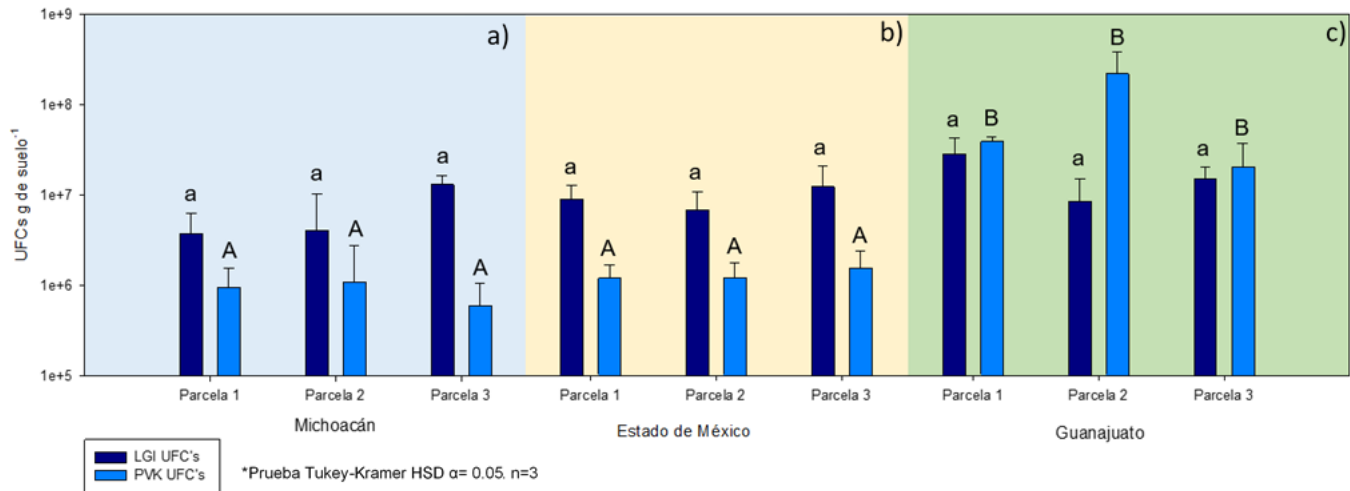


Figura 7. Población bacteriana con presunta capacidad de fijación de nitrógeno (LGI) y solubilización de fósforo (PVK) en sistemas de producción de maíz de temporal en México. a) Michoacán, b) Estado de México y c) Guanajuato.

6.3. Aislamiento y Selección de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno y Solubilizadoras de Fósforo

A partir de las bacterias con presunta capacidad positiva de fijar nitrógeno y solubilizar fósforo en los sistemas de producción de maíz de temporal, las cuales fueron agrupadas por morfología colonial (Fig. 8), se aislaron un total de 115 bacterias con capacidad de fijación de nitrógeno y solubilización de fósforo (Tabla 8). Aunque estadísticamente fueron similares ($\alpha=0.05$), se aisló mayor cantidad de bacterias solubilizadoras de fósforo (22) a partir del suelo rizosférico de las parcelas de Guanajuato, mientras que del suelo rizosférico de Michoacán, Edo. de México y Guanajuato se obtuvo igual número de aislados bacterianos con capacidad de fijación de nitrógeno (19).

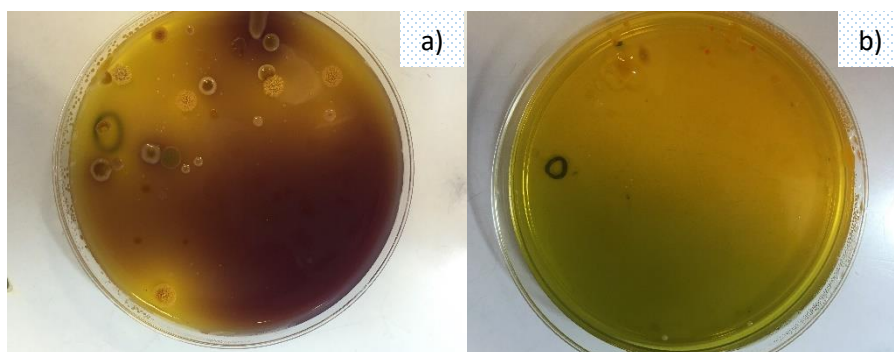


Figura 8. Población presunta positiva para el aislamiento de bacterias con capacidad de solubilización de fósforo (PVK) y fijación de nitrógeno (LGI) en sistemas de producción de maíz de temporal en México.

a) solubilizadoras de fósforo (SP: medio PVK), b) fijadoras de nitrógeno (FBN: medio LGI). El viraje de coloración amarillo indica la acidificación del medio.

Tabla 8. Aislados bacterianos con capacidad de fijación de nitrógeno (FBN) y solubilización de fósforo (SP) en sistemas de producción de maíz de temporal en México.

Estado	Unidades Taxonómicas Operacionales	
	(No. OTU)	
	FBN	SP
Michoacán	19	18
Estado de México	18	19
Guanajuato	19	22

6.4. Características de Promoción del Crecimiento Vegetal

6.4.1. Producción de Indoles

La producción de compuestos tipo indol por los aislados bacterianos se presenta en la Fig. 9, así como aquellos subsiguientemente seleccionados (Tabla 9) (Anexo XI.2). En general, la producción de indoles fue variable ($5\text{-}24 \mu\text{g mL}^{-1}$). Los aislados

bacterianos provenientes de Michoacán presentaron una producción de indoles baja. Sin embargo, en este grupo un aislado del género *Rhizobium* presentó la producción de indoles mayor ($24 \mu\text{g mL}^{-1}$) en comparación con los otros aislados. Grupalmente, los aislados bacterianos del Estado de México presentaron la mayor cantidad de indoles ($14\text{-}20 \mu\text{g mL}^{-1}$), destacando los aislados del género *Rhizobium*, seguido de los géneros *Advenella*, *Phyllobacterium* y *Burkholderia*. En relación a los aislados del estado de Guanajuato. Estos mostraron una producción de indoles baja, siendo los aislados del género *Pseudomonas* los que presentaron una mayor producción de indoles ($5\text{-}8 \mu\text{g mL}^{-1}$). El género *Rhizobium* destacó con la mayor producción de indoles independientemente del tipo de agrosistema (Fig. 9).

Tabla 9. Producción de indoles por aislados bacterianos seleccionados por su capacidad de fijar nitrógeno (FBN) y solubilizar fósforo (SP) en sistemas de producción de maíz de temporal en México analizados en este estudio.

Estado	Cepa	Indoles ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Michoacán	<i>Rhizobium</i> _FCC4	24.99±2.91
	<i>Pseudomonas</i> _FCC22	9.42±0.81
Estado de México	<i>Rhizobium</i> _FCP9	20.30±3.45
	<i>Rhizobium</i> _FCP6	18.17±1.80
	<i>Advenella</i> _SCP4	17.42±2.25
	<i>Phyllobacterium</i> _SCP19	14.53±2.60
	<i>Burkholderia</i> _SCP16	14.08±0.38
Guanajuato	<i>Pseudomonas</i> _FCV16	8.35±0.72
	<i>Rhizobium</i> _FCV12	5.14±0.52

Prueba Tukey-Kramer HSD $\alpha= 0.05$. $n=5$. Media±D.E.

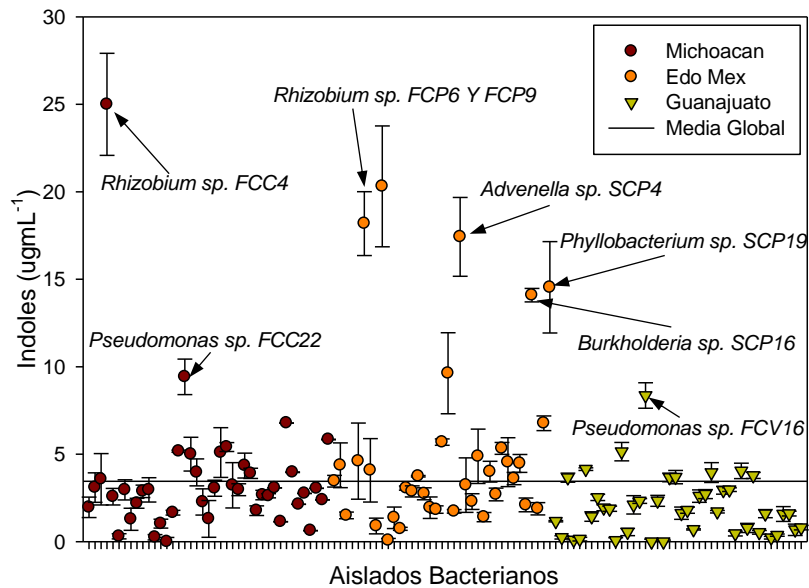


Figura 9. Producción de indoles por aislados bacterianos con capacidad de fijación de nitrógeno (FBN) y de solubilización de fósforo (SP) en sistemas de producción de maíz de temporal en México.

6.4.2. Solubilización de Fósforo

La solubilización de fósforo por los aislados bacterianos se presenta en la Fig. 10, así como aquellos que fueron subsiguientemente seleccionados (Tabla 10). En general, la capacidad de solubilización de fósforo por los aislados mostró un patrón similar entre los grupos bacterianos provenientes de los sistemas de producción de maíz de temporal en estudio. El género *Burkholderia* presentó la capacidad de solubilización de fósforo en el rango 133-188 mg P mL⁻¹. Asimismo predominó entre los tres sistemas de producción. Dos aislados pertenecientes al género *Enterobacter* obtenidos de Guanajuato presentaron la mayor capacidad de solubilización de fósforo en un rango de 180-270 mg P mL⁻¹. La capacidad de solubilización de fósforo por los aislados de Michoacán fue menor en comparación con los del Estado de México y Guanajuato, así como una menor cantidad de aislados con esta capacidad (Fig. 10; Tabla 10).

Tabla 10. Solubilización de fósforo por aislados bacterianos seleccionados con capacidad de fijación de nitrógeno (FBN) en sistemas de producción de maíz de temporal en México.

Estado	Cepa	Solubilización (mg P mL ⁻¹)
Michoacán	<i>Burkholderia_SCC2</i>	148.40±8.8
	<i>Burkholderia_SCC18</i>	133.20±6.2
Estado de México	<i>Burkholderia_SCP16</i>	187.68±14.4
	<i>Pseudomonas_SCP2</i>	172.95±3.5
	<i>Advenella_SCP4</i>	161.96±12.9
Guanajuato	<i>Enterobacter_SCV17</i>	270.11±7.6
	<i>Enterobacter_SCV15</i>	268.73±11.9
	<i>Acinetobacter_SCV4</i>	180.40±2.7

Prueba Tukey-Kramer HSD $\alpha= 0.05$. $n=5$. Media±D.E.

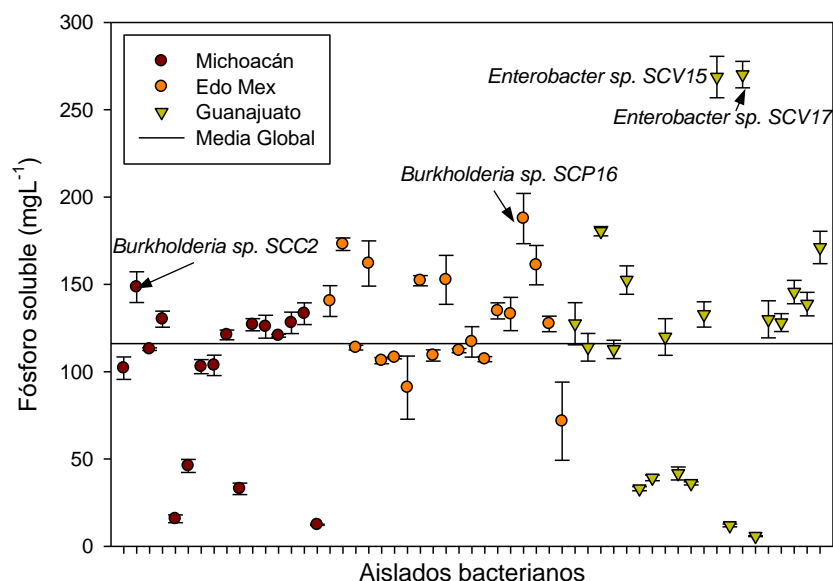


Figura 10. Solubilización de fósforo por aislados bacterianos con capacidad de fijación de nitrógeno (FBN) en sistemas de producción de maíz de temporal en México analizados en este estudio.

6.4.3. Promoción del Crecimiento Vegetal

La capacidad de promover el crecimiento vegetal por los aislados bacterianos obtenidos de los sistemas de producción de maíz de temporal se presentan en la Fig. 11. Con base al diagrama de Venn, para el caso de Michoacán se observó que todos los aislados mostraron capacidad de fijación de nitrógeno, el 65% producción de indoles, y solubilización de fósforo; en términos de combinación de capacidades, el 37% mostró producción indoles y solubilización de fósforo, y el 60% presentaron la capacidad de solubilizar fósforo y fijar nitrógeno, así como de producir indoles y fijar nitrógeno. Y solamente el 24% de los aislados de Michoacán mostraron tener las tres características estudiadas, todas ellas asociadas con la producción de crecimiento (Fig. 11a).

Con relación a los aislados del Estado de México, el 90% de los aislados presentaron capacidad de fijación de nitrógeno, el 89% producción de indoles y el 50% solubilización de fósforo. A su vez, el 50% de los aislados solubilizaron fósforo y produjeron indoles, el 56% solubilizaron fósforo y fijaron nitrógeno, el 64% fijaron nitrógeno y produjeron indoles. El 60% de éstos mostró tener las tres características de promoción de crecimiento cuantificadas (Fig. 11b).

Con respecto a Guanajuato, el 87% mostró la capacidad de fijar nitrógeno y producir indoles y el 73% fue capaz de solubilizar fósforo. Mientras que el 63% presentaron la capacidad de fijar nitrógeno y producir indoles, el mismo porcentaje mostró la capacidad de producir indoles y solubilizar fósforo, y el 50% solubilizar fósforo y fijar nitrógeno. Finalmente, el 44% de los aislados de Guanajuato mostraron tener las tres características de promoción vegetal cuantificadas (Fig. 10c).

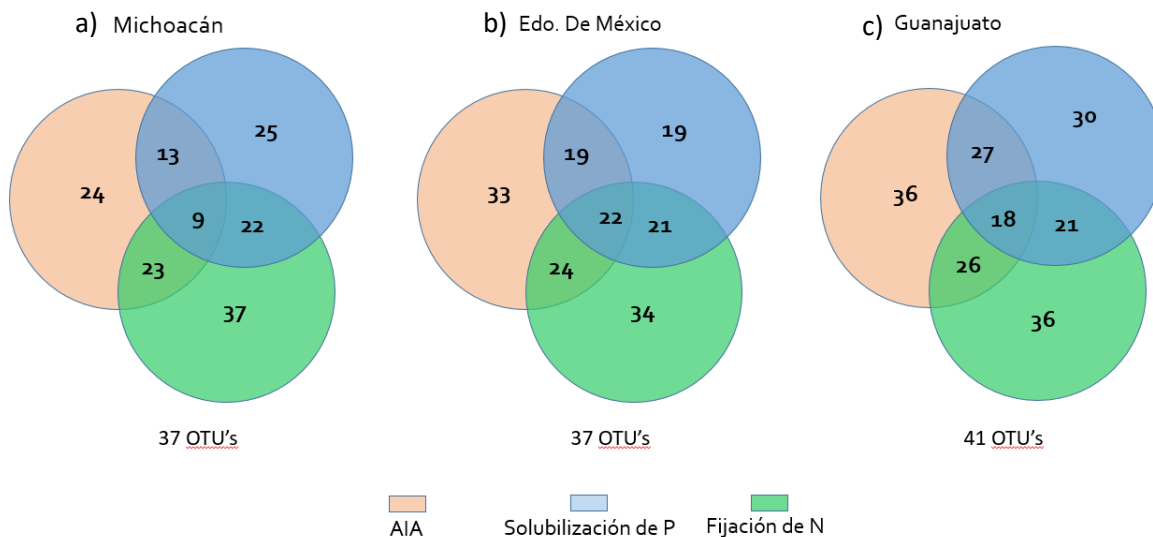


Figura 11. Diagrama de Venn de las actividades asociadas con la promoción del crecimiento vegetal por los aislados bacterianos obtenidos de los sistemas de producción de maíz de temporal analizados en este estudio.

a) Michoacán, b) Estado de México, c) Guanajuato.

6.5. Promoción del Crecimiento Vegetal *in vitro*

6.5.1. Promoción del Crecimiento en *Arabidopsis thaliana*

La producción de biomasa de plantas de *A. thaliana* inoculada con los aislados bacterianos seleccionados (Fig. 12) presentó resultados variables. Los aislados bacterianos con capacidad de promoción del crecimiento del Estado de México fue del 72%, seguido por Guanajuato, con 48% y por Michoacán, con 40%. El género bacteriano *Pseudomonas* spp. que mostró capacidad de promoción del crecimiento, fue común en los tres estados. En el caso de Michoacán los dos aislados con mayor efecto de promoción del crecimiento vegetal fueron ambos del género *Pseudomonas* spp., en el Estado de México fueron *Rhizobium* spp. y *Pseudomonas* spp., mientras que en Guanajuato, los dos aislados con mayor efecto positivo fueron *Pseudomonas* spp., y *Burkholderia* spp (Fig. 12).

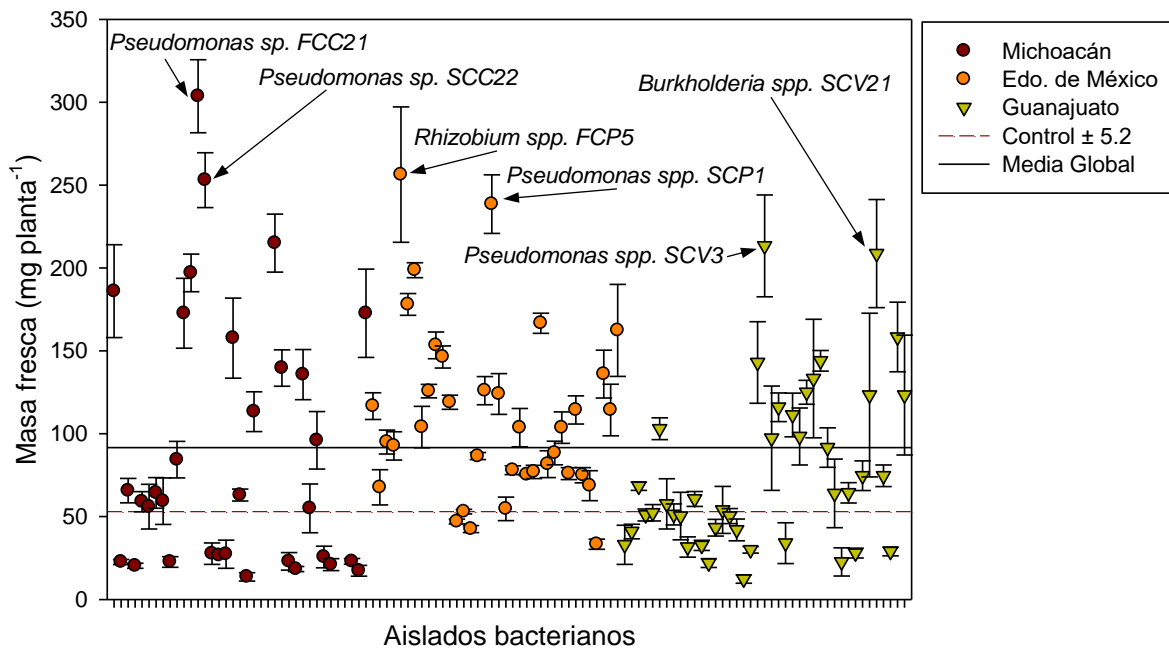
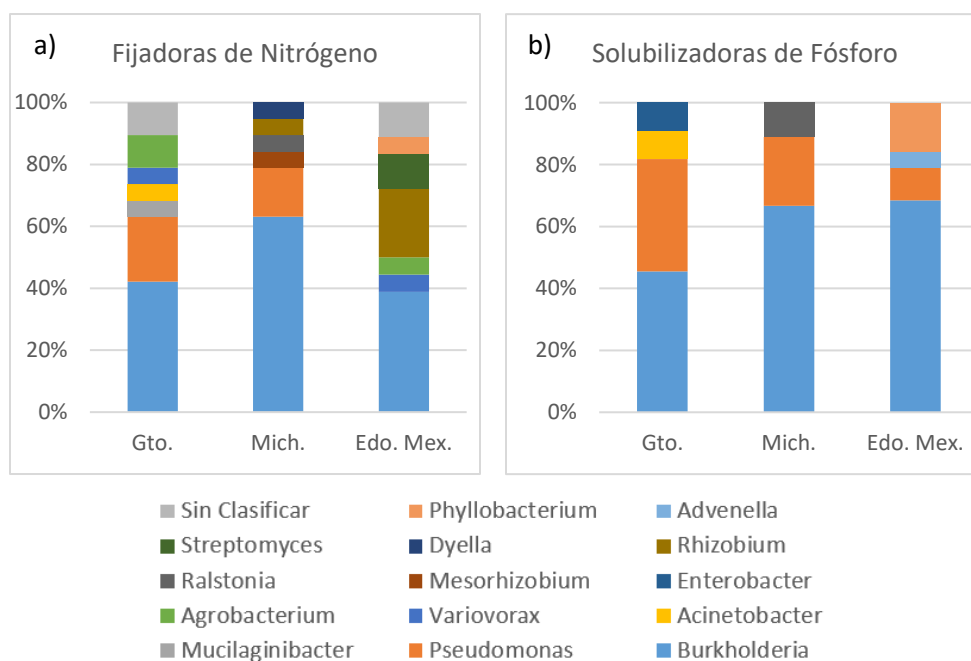


Figura 12. Producción de biomasa fresca en plantas de *A. thaliana* inoculada con aislados bacterianos de sistemas de producción de maíz de temporal de México analizados en este estudio.

6.6. Diversidad de Rizobacterias Cultivables

6.6.1. Abundancia Relativa de las Rizobacterias Cultivables

La abundancia relativa de rizobacterias cultivables de los sistemas de producción de maíz de temporal con las capacidades metabólicas de interés fue variable (Fig. 13). Los géneros bacterianos más abundantes en los tres estados correspondieron a *Burkholderia* y *Pseudomonas*. Asimismo, la mayor diversidad bacteriana correspondió a fijadoras de nitrógeno en comparación con aquellas con capacidad de solubilizar fósforo. Los suelos de Michoacán destacaron por ser aquellos con la mayor diversidad en términos de fijación de nitrógeno con una mayor abundancia del género *Pseudomonas* en comparación con el Estado de México y Guanajuato, en donde la contribución de este grupo de bacterias fue menor (Fig. 13a).



6.7. Diversidad Bacteriana Rizosférica

La diversidad bacteriana rizosférica de los sistemas de producción de maíz de temporal se muestra en la Tabla 11. En general, en términos de especies cuantificadas, la diversidad presentó el orden siguiente: Estado de México > Michoacán > Guanajuato. Mientras que en términos de etapa fenológica del maíz, el orden fue el siguiente: reproductiva > vegetativa > madurez (Fig. 15), destacando con la cantidad mayor de especies cuantificadas el Estado de México (en R2) con 1192 especies (u OTU) mientras que Guanajuato (en M) presentó el menor número de especies cuantificadas (62) (Tabla 11). Resultados similares fueron cuantificados en términos de diversidad a través del índice Shannon (Fig. 16). Ambos factores (sistema x etapa fenológica) explican el 85% de la diversidad estimada en los sistemas de estudio (Fig.17).

Tabla 11. Diversidad bacteriana rizosférica en sistemas de producción de maíz de temporal de México.

Estado	Etapa fenológica		
	Vegetativa (V6)	Reproductiva (R2)	Madurez (M)
Especies (No.)			
Estado de México	287	1192	263
Michoacán	374	466	429
Guanajuato	109	194	62

V6 = 12 días después de la siembra, R2 = 60 días después de la siembra y M = 112 días después de la siembra.

Se observó una alta diversidad en las muestras de Michoacán y el Estado de México, en este caso las etapas fenológicas en que fueron muestreadas no tuvieron un efecto marcado en los OTU observados por número de lecturas realizadas. En el caso de Guanajuato, se observó una baja diversidad Alfa y una baja cantidad de OTU detectados por cada secuencia muestreada. Se observa un efecto de la etapa

fenológica en la cual las plantas fueron muestreadas obteniendo una diversidad creciente de las siguientes etapas: reproductiva>vegetativa>madurez (Fig. 14).

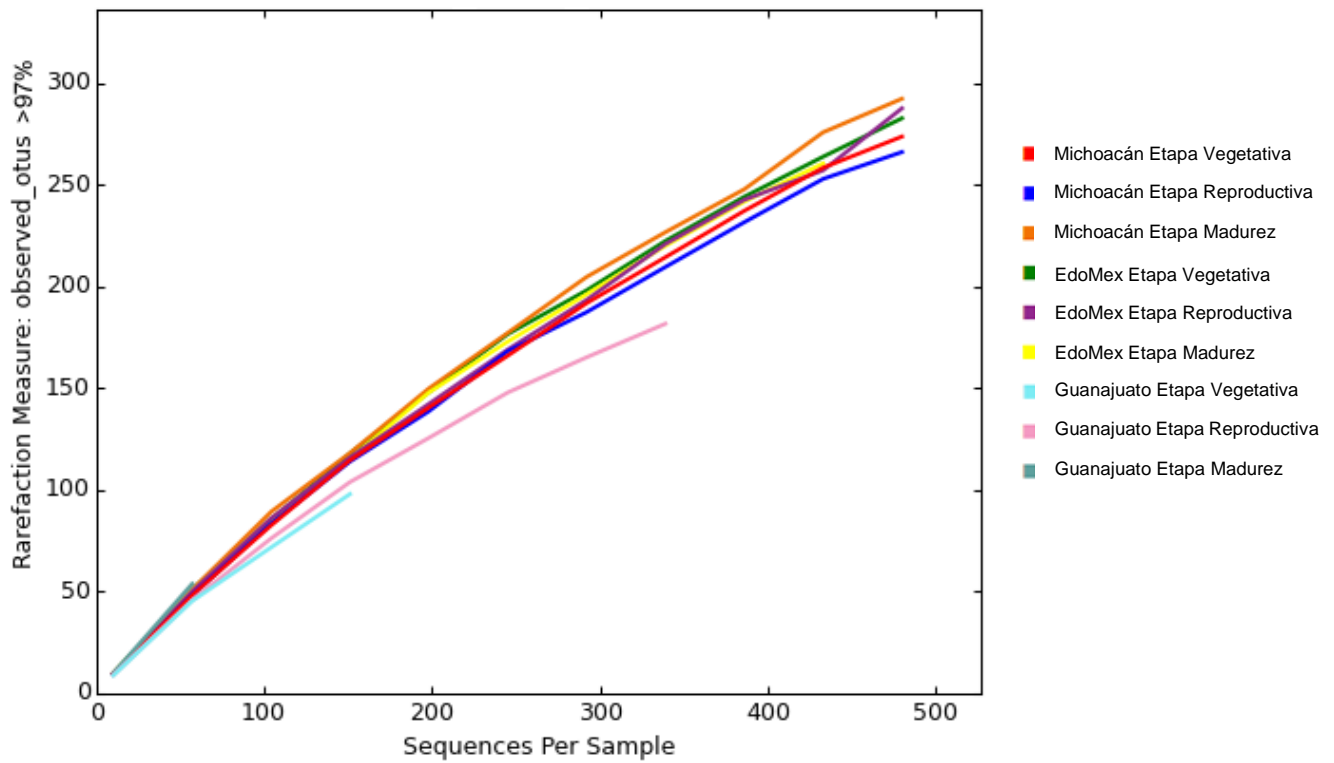


Figura 14. Rarefacción de la diversidad Alfa

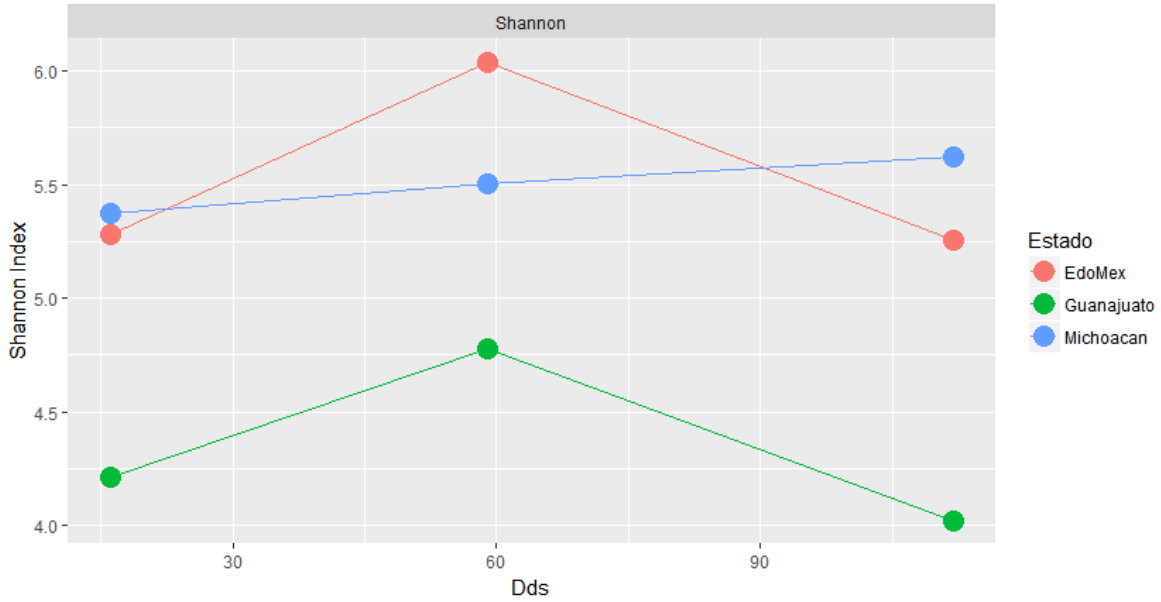


Figura 15. Diversidad bacteriana rizosférica, de acuerdo con el índice de Shannon, en etapas fenológicas de maíz determinada en sistemas de producción de maíz de temporal en México analizados en este estudio. Dds = Días después de la siembra.



Figura 16. Diversidad bacteriana rizosférica, de acuerdo con el índice de Shannon, en sistemas de producción de maíz de temporal de México analizados en este estudio.

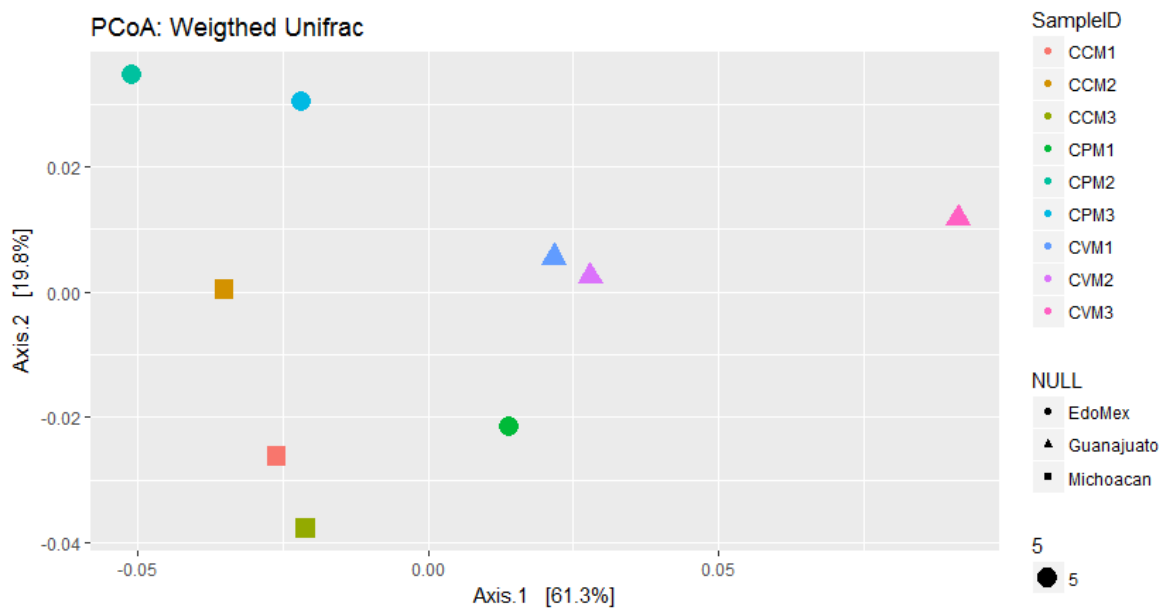


Figura 17. Factores principales (x1 = sistemas, x2 = etapas fenológicas) en la diversidad bacteriana rizosférica en sistemas de producción de maíz de temporal de México.

6.8. Promoción del Crecimiento Vegetal en Condiciones de Invernadero

La producción de biomasa y contenido de clorofila en la planta de maíz inoculada con los aislados bacterianos provenientes de los sistemas de producción de maíz de temporal de México (Tabla 12) fue variable en función del aislado. Con relación al peso fresco total de maíz no se observó diferencia significativa en la afinidad entre el nitrato y el amonio (Tabla 14), destacando los géneros *Burkholderia* spp. SCP18, *Rhizobium* spp. FCP7, y *Acinetobacter* spp. SCV10 que favorecieron una mayor producción biomasa en maíz y una mayor cantidad de clorofila.

Tabla 12. Producción de biomasa contenido de clorofila en la planta de maíz inoculada con los aislados bacterianos provenientes de los sistemas de producción de maíz de temporal de México en condiciones de invernadero.

Aislado Bacteriano	Clorofila (U SPAD)	Peso Fresco Total (g)	Peso Seco Total (g)
<i>Burkholderia_SCP12</i>	27.08 ±1.36	8.09±1.63	0.8766±0.05
<i>Burkholderia_SCP16</i>	32.26±1.68	9.868±1.35	0.794±0.29
<i>Burkholderia_FCV2</i>	32.54±1.49	10.526±1.11	0.8912±0.07
<i>Burkholderia_SCP18</i>	33.1±1.49	10.55±1.86	1.1446±0.22
<i>Burkholderia_SCV21</i>	30.36±1.61	11.058±0.95	1.0114±0.18
<i>Burkholderia_FCC25</i>	28.56±1.62	11.23±1.80	0.9138±0.27
<i>Burkholderia_SCV25</i>	26.8±1.90	10.568±2.29	1.0018±0.32
<i>Burkholderia_SCC4</i>	29±0.93	11.604±1.33	0.9754±0.14
<i>Burkholderia_FCC14</i>	32.86±1.68	10.332±1.23	1.0132±0.15
<i>Ralstonia_SCC6</i>	32±1.89	14.272±2.45	1.2654±0.15
<i>Variovorax_FCV11</i>	30.78±1.34	9.014±1.18	0.781±0.06
<i>Advenella_SCP4</i>	30.32±1.08	10.406±2.28	0.9784±0.22
<i>Dyella_FCC24</i>	29.48±1.65	11.834±1.03	0.9704±0.17
<i>Acinetobacter_SCV10</i>	30.08±0.98	16.276±1.76	1.2978±0.19
<i>Enterobacter_SCV17</i>	30.06±1.51	10.416±1.9	0.8036±0.11
<i>Pseudomonas_SCV3</i>	29.78±1.65	10.692±1.11	0.924±0.05
<i>Pseudomonas_SCV2</i>	25.26±1.31	9.974±1.31	0.7472±0.04
<i>Pseudomonas_SCC10</i>	30.42±1.74	13.084±2.02	1.0498±0.18
<i>Pseudomonas_SCC7</i>	29.54±1.78	11.744±1.46	0.9064±0.11
<i>Pseudomonas_SCV5</i>	29.98±1.09	10.65±2.35	0.8762±0.13
<i>Pseudomonas_SCV8</i>	27.48±0.6	12.25±0.55	1.0676±0.26
<i>Mucilagibacter_FCV6</i>	27.88±1.50	13.004±1.38	0.93±0.06
<i>Ralstonia_SCC19</i>	29.38±1.65	12.19±2.13	0.944±0.19
<i>Mesorhizobium_FCC1</i>	31.14±1.37	15.71±2.02	1.1412±0.24
<i>Rhizobium_FCC4</i>	25±1.71	8.594±1.00	0.8002±0.07
<i>Agrobacterium_FCV14</i>	31.46±2.10	15.328±2.77	1.1894±0.24
<i>Burkholderia_FCC11</i>	26.38±2.08	8.854±0.53	0.844±0.13
<i>Variovorax_FCP1</i>	29.76±2.39	9.87±2.27	0.7416±0.22
<i>Agrobacterium_FCP2</i>	24.96±2.0	9.692±1.35	0.9782±0.21
<i>Streptomyces_FCP4</i>	29±2.18	10.814±1.11	0.855±0.08
<i>Rhizobium_FCP6</i>	25.02±2.09	7.918±1.3	0.7102±0.21
<i>Rhizobium_FCP7</i>	31.74±1.60	11.696±2.38	1.031±0.15
<i>Rhizobium_FCP9</i>	29.36±0.8	10.686±2.68	1.0004±0.10
<i>Bacillus (Control +)</i>	30.5±0.9	14.314±2.54	0.9746±0.20
Control Fertilizado	25.62±4.22	12.618±2.73	1.0332±0.17
Blanco	24.26±1.92	15.015±2.70	1.7578±0.33
Tukey-Kramer	p≤0.05	HSD	3.92

6.9. Absorción de ^{32}P y ^{15}N

Por otro lado, los aislados bacterianos SCC4, FCC24, y SCV10, clasificados dentro de los géneros: *Burkholderia*, *Dyella* y *Acinetobacter* presentaron mayor actividad de promoción del crecimiento vegetal en el cultivo de maíz (Tabla 13). Cualitativamente, se observó una mayor longitud de la raíz primaria, así como de raíces secundarias, lo cual correlacionó con una mayor actividad de absorción de ^{32}P , aunque dicha variable presentó un amplio rango, lo cual se relaciona con la capacidad variable de promoción de crecimiento de los aislados. Similares resultados fueron cuantificados en términos de ^{15}N , los aislados bacterianos *Burkholderia* SCC4, *Dyella* FCC24, y *Acinetobacter* SCV10, favorecieron a una mayor absorción de fertilizante nitrogenado. Asimismo, no se observaron diferencias significativas en la absorción de ^{15}N -nitrato vs ^{15}N -amonio (Tabla 14).

Tabla 13. Absorción de ^{32}P -fertilizante por la planta de maíz inoculada con cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de promoción del crecimiento vegetal aisladas de sistemas de producción de maíz de temporal de México.

Género/Cepa	Biomasa Seca (g MS planta ⁻¹)	P total (mg P planta ⁻¹)	^{32}P -fertilizante ($\mu\text{g } ^{32}\text{P}$ planta ⁻¹)
<i>Acinetobacter_SCV10</i>	0.17 ± 0.02	0.39 ± 0.05	10.62 ± 2.92
<i>Advenella_SCP4</i>	0.13 ± 0.00	0.55 ± 0.04	11.68 ± 2.61
<i>Agrobacterium_FCV14</i>	0.14 ± 0.03	1.16 ± 0.22	0.43 ± 0.06
<i>Agrobacterium_FCP2</i>	0.10 ± 0.03	0.94 ± 0.32	0.95 ± 0.39
<i>Burkholderia_SCP12</i>	0.12 ± 0.02	0.49 ± 0.09	14.17 ± 2.50
<i>Burkholderia_FCV2</i>	0.14 ± 0.02	0.57 ± 0.10	15.98 ± 6.28
<i>Burkholderia_SCP18</i>	0.17 ± 0.03	0.80 ± 0.11	8.24 ± 1.58
<i>Burkholderia_SCP21</i>	0.16 ± 0.02	0.64 ± 0.17	10.07 ± 3.99
<i>Burkholderia_SCV21</i>	0.15 ± 0.02	0.78 ± 0.14	3.41 ± 0.94
<i>Burkholderia_FCC25</i>	0.16 ± 0.02	0.88 ± 0.17	4.22 ± 1.32
<i>Burkholderia_SCV25</i>	0.15 ± 0.02	0.54 ± 0.09	4.80 ± 1.76
<i>Burkholderia_SCC4</i>	0.22 ± 0.04	0.60 ± 0.17	4.42 ± 2.43
<i>Burkholderia_FCC14</i>	0.15 ± 0.02	0.36 ± 0.06	8.43 ± 3.98
<i>Burkholderia_FCC11</i>	0.15 ± 0.02	1.13 ± 0.14	0.66 ± 0.18
<i>Dyella_FCC24</i>	0.20 ± 0.01	0.94 ± 0.08	6.22 ± 1.51
<i>Enterobacter_SCV17</i>	0.12 ± 0.02	0.39 ± 0.15	14.31 ± 6.30
<i>Mesorhizobium_FCC1</i>	0.14 ± 0.02	0.95 ± 0.15	4.40 ± 0.84
<i>Mucilaginibacter_FCV6</i>	0.15 ± 0.01	0.82 ± 0.08	0.89 ± 0.19
<i>Pseudomonas_SCV3</i>	0.11 ± 0.01	0.50 ± 0.03	3.59 ± 1.00
<i>Pseudomonas_SCV2</i>	0.11 ± 0.01	0.61 ± 0.04	0.90 ± 0.21
<i>Pseudomonas_SCC10</i>	0.11 ± 0.01	0.68 ± 0.07	1.02 ± 0.61
<i>Pseudomonas_SCC7</i>	0.11 ± 0.02	0.60 ± 0.09	0.47 ± 0.22
<i>Pseudomonas_SCV5</i>	0.09 ± 0.02	0.50 ± 0.14	1.74 ± 0.64
<i>Ralstonia_SCC6</i>	0.15 ± 0.02	0.52 ± 0.09	13.21 ± 2.04
<i>Ralstonia_SCC19</i>	0.14 ± 0.04	0.64 ± 0.18	1.88 ± 0.88
<i>Rhizobium_FCC4</i>	0.15 ± 0.01	1.00 ± 0.06	0.65 ± 0.16
<i>Rhizobium_FCP6</i>	0.11 ± 0.02	0.14 ± 0.01	6.60 ± 0.98
<i>Rhizobium_FCP7</i>	0.10 ± 0.02	0.15 ± 0.05	3.49 ± 1.40
<i>Streptomyces_FCP4</i>	0.12 ± 0.02	1.02 ± 0.15	0.46 ± 0.09
<i>Variovorax_FCV11</i>	0.09 ± 0.03	0.42 ± 0.15	15.63 ± 8.15
<i>Variovorax_FCP1</i>	0.12 ± 0.02	0.74 ± 0.09	0.54 ± 0.11
Control + (<i>Bacillus</i>)	0.14 ± 0.01	0.23 ± 0.04	2.16 ± 0.76
Control + (Fertilización)	0.13 ± 0.03	0.20 ± 0.06	2.33 ± 1.04
Control – (Blanco)	0.17 ± 0.03	0.26 ± 0.04	68.99 ± 5.71
C.V.	18.01%	12.38%	20.99%
p>f	0.000	0.000	0.000
DMS (5%)	0.03	0.17	2.86

Tabla 14. Absorción de ^{15}N -fertilizante por la planta de maíz inoculada con cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de promoción del crecimiento vegetal aisladas de sistemas de producción de maíz de temporal de México.

Género/Cepa	Biomasa Seca (g MS planta ⁻¹)	N total	Absorción N	
			N- ¹⁵ NO ₃ (mg planta ⁻¹)	N- ¹⁵ NH ₄
<i>Acenitobacter_SCV10</i>	0.17±0.02	12.18±2.17	5.15±0.58	5.80±0.29
<i>Advenella_SCP4</i>	0.13±0.00	10.31±0.60	3.92± 0.34	3.61± 0.12
<i>Agrobacterium_FCV14</i>	0.15±0.02	11.92±1.57	4.51± 0.71	3.44± 0.47
<i>Agrobacterium_FCP2</i>	0.12±0.02	9.67±1.69	4.81± 0.84	4.65± 0.69
<i>Burkholderia_SCP12</i>	0.12±0.02	9.67±1.69	4.81± 0.84	4.65± 0.69
<i>Burkholderia_FCV2</i>	0.14±0.02	10.83±1.76	4.31±0.78	4.51±0.69
<i>Burkholderia_SC18</i>	0.17±0.03	12.31±2.16	4.61±0.74	5.54±0.98
<i>Burkholderia_SCP21</i>	0.16±0.02	11.20±1.53	4.55±0.69	4.71±0.67
<i>Burkholderia_SCV21</i>	0.15±0.02	11.24±1.87	4.31±0.78	4.51±0.69
<i>Burkholderia_FCC25</i>	0.12±0.02	11.34±1.03	4.21±0.29	3.53±0.38
<i>Burkholderia_SCV25</i>	0.15±0.02	10.29±1.23	4.19±0.71	4.03±0.52
<i>Burkholderia_SCC4</i>	0.22±0.04	15.44±2.74	5.29±1.03	4.06±0.83
<i>Burkholderia_FCC14</i>	0.15±0.02	11.38±1.89	4.47±0.86	4.12±1.01
<i>Burkholderia_FCC11</i>	0.12±0.02	9.47±1.32	3.85±0.19	3.07±0.40
<i>Dyella_FCC24</i>	0.20±0.01	15.83±0.85	5.91±0.52	5.11±0.32
<i>Enterobacter_SCV17</i>	0.12±0.02	10.02±1.73	3.95±0.65	3.96±0.87
<i>Mesorhizobium_FCC1</i>	0.15±0.01	11.16±0.98	4.38±0.37	4.02±0.30
<i>Musilaginibacter_FCV6</i>	0.14±0.04	10.80±3.15	3.94±1.07	3.67±1.20
<i>Pseudomonas_SCV3</i>	0.11±0.01	8.52±0.79	3.47±0.31	4.08±0.36
<i>Pseudomonas_SCV2</i>	0.11±0.01	8.52±1.01	3.44±0.48	3.43±0.40
<i>Pseudomonas_SCC10</i>	0.11±0.01	8.38±0.53	2.83±0.18	2.94±0.19
<i>Pseudomonas_SCC7</i>	0.11±0.02	7.64±0.88	3.25±0.31	3.56±0.65
<i>Pseudomonas_SCV5</i>	0.10±0.02	7.17±2.00	2.88±0.91	2.73±0.89
<i>Pseudomonas_SCV8</i>	0.15±0.01	12.14±1.29	5.63±1.65	4.42±0.87
<i>Ralstonia_SCC6</i>	0.15±0.02	10.19±1.88	3.92±0.77	3.88±0.56
<i>Ralstonia_SCC19</i>	0.14±0.02	11.29±2.13	4.81±1.01	4.23±0.71
<i>Rhizobium_FCC4</i>	0.14±0.03	11.49±1.94	4.47±0.71	3.79±0.59
<i>Rhizobium_FCP6</i>	0.10±0.02	8.62±2.10	3.93±0.95	3.39±0.78
<i>Rhizobium_FCP7</i>	0.13±0.02	10.59±2.04	4.01±0.76	4.09±0.71
<i>Rhizobium_FCP9</i>	0.14±0.01	11.27±1.11	4.64±0.39	4.17±0.32
<i>Streptomyces_FCP4</i>	0.11±0.02	9.19±1.51	3.95±0.65	3.23±0.66
<i>Variovorax_FCV1</i>	0.10±0.03	6.93±1.78	2.51±0.58	2.47±0.65
<i>Variovorax_FCP1</i>	0.10±0.03	7.86±1.98	3.16±0.77	2.64±0.68
Control + (Bacillus)	0.13±0.03	10.43±2.19	4.10±0.85	3.70±0.89
Control + (Fertilización)	0.10±0.03	10.26±2.38	3.96±0.94	3.19±0.82
Control – (Blanco)	0.11±0.03	9.00±1.90	0.00	0.00
C. V.	18.01%	17.94%	20.17%	19.54%
p>f	0.000	0.000	0.000	0.000
DMS (5%)	0.03	2.32	1.01	0.91

VII. DISCUSIÓN

En México, los sistemas agroecológicos son diversos, su conformación es influenciada por la geografía, el clima, el suelo y por las prácticas culturales y de manejo arraigadas. A lo largo del tiempo, los sistemas no han sufrido cambios considerables en su manejo, estos sistemas suelen ser muy tradicionales y recurren a las prácticas de sus antecesores con cambios mínimos en el sistema. En México se consiguen bajos rendimientos por diferentes factores que limitan su productividad: el uso inadecuado de agroquímicos en el cultivo, prácticas sin cambios a lo largo de los años y escaso asesoramiento técnico.

Distintas alternativas pueden contribuir a la mejora de la productividad del maíz en México, una de ellas es el uso de biofertilizantes con base a rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV). Las BPCV poseen una gama de mecanismos que benefician al cultivo ayudando a una mejor asimilación de los nutrientes en el suelo o la liberación de sustancias que ayudan a la planta a tener un buen desarrollo vegetal. Sin embargo, es necesario conocer la microbiota presente en los suelos para diseñar una mejor selección y aplicación de estos microorganismos para asegurar el éxito en la inoculación que permita un efecto positivo y así coadyuvar a eficientar el uso de los fertilizantes químicos en la agricultura.

En el presente trabajo se caracterizó la composición bacteriana asociada a la rizósfera de maíz bajo distintos tipos de sistemas de temporal abordando diferentes enfoques: 1) Moleculares, para determinar los cambios en la diversidad bacteriana que son influidos por los distintos sistemas de producción de maíz en México y 2) métodos de cultivo para determinar el papel de las bacterias rizosféricas en dichos sistemas de producción. Los cambios en las comunidades bacterianas son generados por distintos factores que influyen en la composición y permanencia en la rizósfera de maíz. La estructura microbiana varía a unos centímetros de distancia en el suelo, como fue reportado anteriormente por Bakker *et al.*, en 2015, por lo que

es razonable pensar que la estructura bacteriana cambia consistentemente a lo largo de los suelos en México.

En el presente trabajo se caracterizaron los agroecosistemas de tres de los principales estados productores de maíz con distintos niveles de tecnificación y manejo (Tabla 6). Así como el aislamiento y caracterización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal con capacidad de producción de indoles, solubilización fósforo y fijación de nitrógeno. Un total de 14 géneros bacterianos de la rizósfera de maíz de distintos agroecosistemas de temporal contrastantes de México fueron aislados. Los géneros más abundantes en los tres agroecosistemas fueron *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Rhizobium*. Estos géneros ya han sido reportados en la rizósfera de maíz en diferentes sitios (Estrada *et al.*, 2002) (Montañez, Blanco, Barlocco, Beracochea, & Sicardi, 2012; Ormeño-Orrillo *et al.*, 2008; Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006; Gutiérrez-Zamora & Martínez-Romero, 2001). Esto sugiere que los géneros mencionados tienen una gran afinidad por este cultivo y por las características agroecológicas muestreadas.

Las rizobacterias cuentan con características de promoción de crecimiento vegetal como la solubilización de fósforo, la fijación de Nitrógeno, la producción de indoles, entre otras. Estas bacterias pueden servir como inoculantes para mejorar el desarrollo del maíz. La fijación de nitrógeno es una característica muy importante para la disminución de la aplicación de fertilizantes nitrogenados en la agricultura. En el presente estudio se aislaron y caracterizaron 57 rizobacterias con capacidad de fijación de nitrógeno. Los géneros predominantes con esta característica fueron *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Mucilginibacter*, *Acinetobacter*, *Variovorax*, *Rhizobium*, *Dyella*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Streptomyces*, *Phyllobacterium* y *Agrobacterium*, siendo el género *Burkholderia* el más abundante con esta capacidad (Peiffer *et al.*, 2013; Arruda *et al.* 2013). Este género se encuentra en una amplia distribución geográfica en México, es capaz de colonizar en gran cantidad la rizósfera de maíz y cuenta con una notable capacidad de fijar N₂ (Estrada *et al.*,

2002; Estrada-De Los Santos, Bustillos-Cristales, & Caballero-Mellado, 2001; Di Cello *et al.*, 1997).

El género *Rhizobium* con capacidad de producción de índoles está presente en los tres agrosistemas en estudio. La baja capacidad de los aislados provenientes del estado de Guanajuato para producir índoles podría estar relacionado con la alta tasa de fertilización nitrogenada. En este sentido, un efecto negativo en la producción de AIA por altos niveles de N-urea fue reportado por (Othman, 2013). Asimismo, en las muestras de suelo del estado de Guanajuato se encontró una mayor población y aislados bacterianos solubilizadoras de fósforo, posiblemente relacionado con la alta aplicación de fertilizantes fosfatados en comparación con los suelos de Michoacán y el Estado de México. Por otro lado, las plantas podrían estar manteniendo una relación más marcada con estas bacterias para que estas ayuden a solubilizar el fósforo. Este elemento puede ser solubilizado por la liberación de distintas enzimas (e. g., fosfatasas, fitasas y liasas). Dentro de estas se encuentran las fosfatasas ácidas no específicas, las cuales predominan en suelos ácidos, mientras que las fosfatasas alcalinas son más abundantes en suelos neutros y alcalinos. Las plantas liberan comúnmente fosfatasas ácidas pero rara vez producen fosfatasas alcalinas. Esto sugiere que las condiciones de suelos neutros o alcalinos (en el caso de Guanajuato) propician una mayor especificidad de las plantas por microorganismos solubilizadores de fósforo puesto que las fosfatasas de origen microbiano tienen una mayor afinidad por los compuestos de fósforo orgánico que las fosfatasas liberadas por la planta (Sharma *et al.*, 2013). Sin embargo, es necesario realizar una investigación más profunda en este sentido para determinar qué tipo de ácido orgánico es liberando por cada aislado.

El género *Pseudomonas* es de los más reportados por su capacidad para solubilizar fósforo (Sharma *et al.*, 2013). Más de la mitad de los aislados en el presente trabajo tienen la capacidad de solubilizar fósforo, lo cual remarca la importancia que juegan las bacterias solubilizadoras de fósforo en la rizósfera.

La solubilización de fósforo, la producción de indoles y la fijación biológica de nitrógeno son solo algunos de los mecanismos involucrados en la promoción del crecimiento vegetal, aunque también existen otros mecanismos. Entre éstos se pueden mencionar la producción de giberelinas, la transformación de carbón en una fuente más soluble, la producción de antibióticos o la producción de ACC desaminasa para disminuir el estrés en la planta y mejorar su desarrollo. En este sentido, en el presente trabajo se observó que las plantas de *A. thaliana* inoculadas con los aislados bacterianos con propiedades de promoción del crecimiento vegetal presentaron efectos nulo, positivo e incluso negativo. Los aislados *Burkholderia* spp. SCC04, *Rhizobium* spp. FCP7, y *Acinetobacter* spp. SCV10, son candidatos para pruebas más exhaustivas para dilucidar los mecanismos exactos de promoción de crecimiento vegetal

Los análisis de diversidad Alfa y Beta indican que existe una variación entre los sitios muestreados. Las etapas fenológicas del maíz influyen en las comunidades bacterianas asociadas a la raíz, ya que la diversidad de las rizobacterias incrementó con forme a la etapa fenológica de maíz, llegando a su punto más alto en la etapa reproductiva de la planta y decrece (en el caso de Guanajuato y el Edo. de México) en la etapa de senescencia (Fig. 13). Un resultado similar fue reportado por (Baudoin *et. al*, 2002) en donde el cambio en la estructura de la comunidad microbiana fue atribuido a una mayor cantidad de carbón disponible en etapas fenológicas más avanzadas de la planta de maíz. Existe una menor diversidad de rizobacterias en sistemas intensivos, como el caso de Guanajuato (Fig. 16). Considerando que las características edafoclimáticas y el sistema de cultivo intensivo afectan la composición de las comunidades bacterianas asociadas a la raíz, no fue sorprendente que las condiciones de los campos de Michoacán y Estado de México contuvieran una mayor diversidad de rizobacterias. (Shen, 2010).

VIII. CONCLUSIONES

La población bacteriana cultivable con capacidad de fijación de nitrógeno en los sistemas de producción de maíz de temporal fue similar oscilando en el rango 10^6 - 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) g^{-1} suelo, mientras que la población bacteriana cultivable con capacidad de solubilizar fósforo fue mayor en los suelos muestreados en Guanajuato (pH = 7), esto nos sugiere que existe una mayor afinidad de estas bacterias por suelos con pH neutro.

Los aislados bacterianos provenientes de Michoacán presentaron una producción de indoles baja. Grupalmente, los aislados bacterianos del Estado de México presentaron la mayor cantidad de indoles (14 - $20 \mu g mL^{-1}$), destacando los aislados del género *Rhizobium*, seguido de los géneros *Advenella*, *Phyllobacterium* y *Burkholderia*.

Los géneros bacterianos más abundantes en los tres estados correspondieron a *Burkholderia* y *Pseudomonas*. Asimismo, la diversidad bacteriana cultivable mayor correspondió a fijadoras de nitrógeno.

Los géneros *Burkholderia* spp. SCP18, *Rhizobium* spp. FCP7, y *Acinetobacter* spp. SCV10 generaron mayor producción biomasa de maíz en ensayos de invernadero. Lo anterior sugiere que cepas del género *Burkholderia* son candidatos para utilizarse como inoculante para la promoción de crecimiento vegetal en cultivo de maíz.

Una mayor cantidad de aislados bacterianos con capacidad de promoción de crecimiento vegetal fueron encontrados en las muestras estudiadas correspondientes a sistemas de producción tradicional, lo que sugiere un papel importante en la relación planta-microorganismo en estos sistemas.

Las etapas fenológicas del maíz influyeron en las comunidades bacterianas asociadas a la raíz, ya que la diversidad de las rizobacterias incrementó con forma a la etapa fenológica de maíz, llegando a su punto más alto en la etapa reproductiva de la planta y decreciendo en la etapa de senescencia. Además, las características edafoclimáticas y el sistema de cultivo intensivo afectan la composición de las comunidades bacterianas asociadas a la raíz. De manera que las condiciones de los campos analizados en este estudio, de Michoacán y Estado de México contienen una mayor diversidad de rizobacterias.

IX. PERSPECTIVAS

Identificar los ácidos orgánicos que liberan las rizobacterias para solubilizar el Fósforo, así como el tipo de auxinas producidas.

Evaluar en condiciones de campo la capacidad de los aislados: *Burkholderia* spp. SCP18, *Rhizobium* spp. FCP7, y *Acinetobacter* spp. SCV10 para promover el crecimiento vegetal y mejorar el rendimiento en maíz bajo condiciones naturales.

Medir el efecto de la inoculación de los mejores aislados evaluados bajo condiciones de invernadero en etapas fenológicas de maíz más avanzadas.

Estudiar más ampliamente la diversidad de rizobacterias con métodos moleculares más específicos para determinar los géneros más abundantes y sus fluctuaciones ante los cambios fenológicos del maíz.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Agriculture, U. S. D. o. (2016). World Agricultural Production. *WAP 5-16*(May 2016), 28.
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1-20. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Aira, M., Gómez-Brandón, M., Lazcano, C., Bååth, E., & Domínguez, J. (2010). Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(12), 2276-2281. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.08.029>
- Arruda, L., Beneduzi, A., Martins, A., Lisboa, B., Lopes, C., Bertolo, F., . . . Vargas, L. K. (2013). Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. *Applied Soil Ecology*, 63, 15-22. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.09.001>
- Asghar, H., Zahir, Z., Arshad, M., & Khaliq, A. (2002). Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology and Fertility of Soils*, 35(4), 231-237. doi: 10.1007/s00374-002-0462-8
- Bakker, M. G., Chaparro, J. M., Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2015). Impacts of bulk soil microbial community structure on rhizosphere microbiomes of *Zea mays*. *Plant and Soil*, 392(1), 115-126. doi: 10.1007/s11104-015-2446-0
- Baudoin, E., Benizri, E., & Guckert, A. (2003). Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(9), 1183-1192. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00179-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00179-2)
- Benz, B. F. (1997). Diversidad y distribución prehispánica del maíz mexicano. *Arqueología mexicana*, 5(25), 17-23.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*, 17(8), 478-486.
- Biology of Maize. (2011).
- Böhme, L., Langer, U., & Böhme, F. (2005). Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 109(1-2), 141-152. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2005.01.017>
- Bolaños, J., & Edmeades, G. O. (1993). La fenología del maíz.
- Canfield, D. E., Glazer, A. N., & Falkowski, P. G. (2010). The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. *Science*, 330(6001), 192.
- Celis, L., & Gallardo, I. (2008). Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos. *Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá*. 82pp.
- de Bruijn, F. J. (2015). Introduction *Biological Nitrogen Fixation* (pp. 1-4): John Wiley & Sons, Inc.
- de Jesús, M. A., Solorio, C. A. O., & Castorena, M. d. C. G. (2001). Clasificación de los suelos de la Meseta Tarasca, Michoacán. *Terra*, 19(3), 227-239.

- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., . . . Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 5069-5072. doi: 10.1128/AEM.03006-05
- Di Cello, F., Bevivino, A., Chiarini, L., Fani, R., Paffetti, D., Tabacchioni, S., & Dalmastrì, C. (1997). Biodiversity of a Burkholderia cepacia population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4485-4493.
- Doebley, J. F., & Iltis, H. H. (1980). Taxonomy of Zea (Gramineae). I. A Subgeneric Classification with Key to Taxa. *American Journal of Botany*, 67(6), 982-993. doi: 10.2307/2442441
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461. doi: 10.1093/bioinformatics/btq461
- Estrada-De Los Santos, P., Bustillos-Cristales, R. o., & Caballero-Mellado, J. (2001). Burkholderia, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2790-2798.
- Estrada, P., Mavingui, P., Cournoyer, B., Fontaine, F., Balandreau, J., & Caballero-Mellado, J. (2002). A N₂-fixing endophytic Burkholderia sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(4), 285-294. doi: 10.1139/w02-023
- FAO. (2015). World fertilizer trends and outlook to 2018. 66.
- FAOSTAT. (2016). Statistic Division. Retrieved Julio, 2016, from <http://faostat3.fao.org/home/index.html>
- FIRA. (2015). Panorama Agroalimentario.
- Gomes, N. C. M., Heuer, H., Schönfeld, J., Costa, R., Mendonça-Hagler, L., & Smalla, K. (2001). Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (Zea mays) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant and Soil*, 232(1), 167-180. doi: 10.1023/A:1010350406708
- Gregory, P. J. (2006). Roots, rhizosphere and soil: the route to a better understanding of soil science? *European Journal of Soil Science*, 57(1), 2-12. doi: 10.1111/j.1365-2389.2005.00778.x
- Gutiérrez-Zamora, M. L., & Martínez-Romero, E. (2001). Natural endophytic association between Rhizobium etli and maize (Zea mays L.). *Journal of Biotechnology*, 91(2), 117-126. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00332-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00332-7)
- Haffer, P. (2013). Assessment of Fertilizer Use by Crop at the Global Level 2010-2010/11. *International Fertilizer Industry Association*, 9.
- Hanway, J. (1963). Growth stages of corn (Zea mays, L.). *Agronomy Journal*, 55(5), 487-492.
- Hanway, J. J. (1966). How a corn plant develops.
- Hinsinger, P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil*, 237(2), 173-195. doi: 10.1023/a:1013351617532
- Kato Yamakake, T. A., Mapes Sánchez, C., Mera Ovando, L.M., Serratos Hernández, J.A., Bye Boettler, R.A. (2009). Origen y diversificación del maíz.

- Una revisión analítica. *Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México*, 116.
- Khalid, A., Arshad, M., & Zahir, Z. A. (2004). Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 96(3), 473-480. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02161.x
- Kumar, D. J., Aditya Narayan. (2013). Nutritional, medicinal and economical importance of corn: A mini review. *Research Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(7), 1-6.
- Ladha, J. K., Pathak, H., J. Krupnik, T., Six, J., & van Kessel, C. (2005). Efficiency of Fertilizer Nitrogen in Cereal Production: Retrospects and Prospects. *Advances in Agronomy*, 87, 85-156. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2113\(05\)87003-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2113(05)87003-8)
- Li, X., Rui, J., Xiong, J., Li, J., He, Z., Zhou, J., . . . Mackie, R. I. (2014). Functional Potential of Soil Microbial Communities in the Maize Rhizosphere. *PLoS ONE*, 9(11), e112609. doi: 10.1371/journal.pone.0112609
- Luo, P., Han, X., Wang, Y., Han, M., Shi, H., Liu, N., & Bai, H. (2015). Influence of long-term fertilization on soil microbial biomass, dehydrogenase activity, and bacterial and fungal community structure in a brown soil of northeast China. *Annals of Microbiology*, 65(1), 533-542. doi: 10.1007/s13213-014-0889-9
- Marschner, P., Yang, C. H., Lieberei, R., & Crowley, D. E. (2001). Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(11), 1437-1445. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00052-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00052-9)
- Masella, A. P., Bartram, A. K., Truszkowski, J. M., Brown, D. G., & Neufeld, J. D. (2012). PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 31. doi: 10.1186/1471-2105-13-31
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 634-663. doi: 10.1111/1574-6976.12028
- Meyer, R. S., & Purugganan, M. D. (2013). Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification. *Nat Rev Genet*, 14(12), 840-852. doi: 10.1038/nrg3605
- <http://www.nature.com/nrg/journal/v14/n12/abs/nrg3605.html#supplementary-information>
- Mohammadi, K. (2012). Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Resour Environ*, 2(1), 80-85.
- Montañez, A., Abreu, C., Gill, P. R., Hardarson, G., & Sicardi, M. (2009). Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. *Biology and Fertility of Soils*, 45(3), 253-263. doi: 10.1007/s00374-008-0322-2
- Montañez, A., Blanco, A. R., Barlocco, C., Beracochea, M., & Sicardi, M. (2012). Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. *Applied Soil Ecology*, 58, 21-28. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.02.009>

- Mussa, S. A. B., Elferjani, H. S., Haroun, F. A., & Abdelnabi, F. F. (2009). Determination of available nitrate, phosphate and sulfate in soil samples. *International Journal of PharmTech Research*, 1(3), 598-604.
- Navas-Molina, J. A., Peralta-Sánchez, J. M., González, A., McMurdie, P. J., Vázquez-Baeza, Y., Xu, Z., . . . Knight, R. (2013). Advancing our understanding of the human microbiome using QIIME. *Methods in enzymology*, 531, 371-444. doi: 10.1016/B978-0-12-407863-5.00019-8
- Oberson, A., & Frossard, E. (2005). Phosphorus Management for Organic Agriculture. In J. T. Sims & A. N. Sharpley (Eds.), *Phosphorus: Agriculture and the Environment* (pp. 761-779). Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America.
- Ormeño-Orrillo, E., Rosenblueth, M., Luyten, E., Vanderleyden, J., & Martínez-Romero, E. (2008). Mutations in lipopolysaccharide biosynthetic genes impair maize rhizosphere and root colonization of *Rhizobium tropici* CIAT899. *Environmental Microbiology*, 10(5), 1271-1284. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01541.x
- Peiffer, J. A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S. G., Dangl, J. L., . . . Ley, R. E. (2013). Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(16), 6548-6553. doi: 10.1073/pnas.1302837110
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Micro*, 11(11), 789-799. doi: 10.1038/nrmicro3109
- Pruesse, E., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2012). SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics*, 28(14), 1823-1829. doi: 10.1093/bioinformatics/bts252
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., . . . Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590-D596. doi: 10.1093/nar/gks1219
- Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(8), 827-837.
- Rouf Shah, T., Prasad, K., Kumar, P., & Yildiz, F. (2016). Maize—A potential source of human nutrition and health: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1166995. doi: 10.1080/23311932.2016.1166995
- SAGARPA. (2015). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*. Retrieved Agosto, 2015, from <http://www.siap.gob.mx/>
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2, 587. doi: 10.1186/2193-1801-2-587
- Shen, J.-P., Zhang, L.-M., Guo, J.-F., Ray, J. L., & He, J.-Z. (2010). Impact of long-term fertilization practices on the abundance and composition of soil bacterial

- communities in Northeast China. *Applied Soil Ecology*, 46(1), 119-124. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.06.015>
- Sims, J. T., Simard, R. R., & Joern, B. C. (1998). Phosphorus Loss in Agricultural Drainage: Historical Perspective and Current Research. *Journal of Environmental Quality*, 27(2), 277-293. doi: 10.2134/jeq1998.00472425002700020006x
- Smalla, K., Oros-Sichler, M., Milling, A., Heuer, H., Baumgarte, S., Becker, R., . . . Tebbe, C. C. (2007). Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results? *Journal of Microbiological Methods*, 69(3), 470-479. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.014>
- Solano, B. R., Maicas, J. B., & Mañero, F. G. (2008). Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Plant-bacteria interactions: strategies and techniques to promote plant growth*. Wiley, Weinheim, Germany, 41-52.
- Tollenaar, M., & Dwyer, L. M. (1999). Physiology of Maize. In D. L. Smith & C. Hamel (Eds.), *Crop Yield: Physiology and Processes* (pp. 169-204). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Wagner, S. (2012). Biological nitrogen fixation. *Nature Education Knowledge*, 3(10), 15.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261-5267. doi: 10.1128/AEM.00062-07

XI. ANEXOS

XI.1. Análisis estadístico de las UFC's en medio PVK y LGI.

Tabla A1a. UFC's en medio LGI .

Nivel	Media
Guanajuato A	17850833
EdoMex A	9382222
Michoacan A	7620833

Prueba Tukey-Kramer HSD $\alpha=0.05$. n=5

Tabla A1b. UFC's en medio PVK.

Nivel	Media
Guanajuato A	27057937
EdoMex B	1322222
Michoacan B	883333

Prueba Tukey-Kramer HSD $\alpha=0.05$. n=5

XI.2. Análisis estadístico de la producción de indoles

Tabla A2a. Producción de indoles, aislados de Michoacán.

Nivel	Media Indoles ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
Rhizobium_FCC4	A	31.898148
Pseudomonas_FCC22	B	16.507937
Pseudomonas_FCC21	C	12.257937
Burkholderia_FCC23	C	12.084656
Xanthomonadaceae_FCC24	C D	11.046296
Burkholderia_FCC3	C D E	10.469577
Burkholderia_FCC12	C D E F	10.047619
Ralstonia_FCC2	C D E F	9.998677
Burkholderia_FCC8	C D E F	9.866402
Burkholderia_FCC11	C D E F	9.779101
Burkholderia_FCC5	C D E F	9.476190
Burkholderia_FCC25	C D E F	9.355820
Burkholderia_FCC10	C D E F G	9.095238
Phyllobacteriaceae_FCC1	C D E F G H	8.863757
Pseudomonas_FCC19	C D E F G H I	8.743386
Burkholderia_FCC9	D E F G H I	8.185185
Burkholderia_FCC14	D E F G H I J	8.115079
Pseudomonas_SCC12	D E F G H I J	7.994518
FCC13	E F G H I J K	7.335979
FCC7	E F G H I J K L	7.208995
Ralstonia_SCC19	E F G H I J K L	7.052719
FCC17	E F G H I J K L M	6.919312
Burkholderia_SCC2	F G H I J K L M N	6.625470
Burkholderia_SCC5	G H I J K L M N O	5.565947
Burkholderia_SCC13	H I J K L M N O P	5.182349
Ralstonia_SCC6	I J K L M N O P	5.118857
Pseudomonas_SCC3	J K L M N O P	4.436317
Pseudomonas_SCC10	K L M N O P	4.289492
Burkholderia_SCC17	K L M N O P	4.263037
Burkholderia_SCC4	K L M N O P	4.184994
Burkholderia_SCC15	K L M N O P	3.970709
Burkholderia_SCC8	K L M N O P	3.880761
Burkholderia_SCC9	K L M N O P	3.837111
Burkholderia_SCC18	L M N O P Q	3.602984
Burkholderia_SCC14	M N O P Q	3.349015
Pseudomonas_SCC7	N O P Q	2.989227

Nivel	Media Indoles ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Burkholderia_SCC11	O P Q 2.356952
Burkholderia_SCC16	P Q 1.845047
Blanco	Q 0.000000

Prueba Tukey-Kramer HSD $\alpha= 0.05$. n=5

Tabla A2b. Producción de indoles, aislados del EdoMex.

Nivel	Media Indoles ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Rhizobium_FCP9	A 20.30952
Rhizobium_FCP6	A B 18.17989
Advenella_SCP4	A B 17.42328
Phyllobacterium_SCP19	B 14.53836
Burkholderia_SCP16	B 14.08862
Pseudomonas_SCP2	C 9.62698
Burkholderia_SCP18	C D 6.76587
Pseudomonas_SCP1	C D E 5.68651
Burkholderia_SCP11	D E F 5.33069
Phyllobacterium_SCP7	D E F G 4.87698
Rhizobium_FCP5	D E F G H 4.60185
Burkholderia_SCP12	D E F G H 4.54101
Burkholderia_SCP14	D E F G H 4.47090
Rhizobiaceae_FCP2	D E F G H 4.36111
Rhizobium_FCP7	D E F G H I 4.07672
Phyllobacterium_SCP9	D E F G H I 4.00132
Burkholderia_FCP15	D E F G H I 3.73810
Burkholderia_SCP13	D E F G H I 3.60582
Variovorax_FCP1	D E F G H I 3.45503
Burkholderia_SCP5	D E F G H I J 3.23280
Burkholderia_FCP13	D E F G H I J 3.05952
Burkholderia_FCP14	D E F G H I J 2.87169
Burkholderia_FCP16	D E F G H I J 2.73545
Burkholderia_SCP10	D E F G H I J 2.69444
Burkholderia_SCP6	E F G H I J 2.29233
Burkholderia_SCP15	E F G H I J 2.09921
Burkholderia_FCP17	E F G H I J 1.94180
Burkholderia_SCP17	E F G H I J 1.88360
Burkholderia_SCP3	E F G H I J 1.72884
Burkholderia_FCP3	F G H I J 1.49735
Burkholderia_SCP8	F G H I J 1.40212
Burkholderia_FCP11	F G H I J 1.36376
FCP8	G H I J 0.89286
Phyllobacterium_FCP12	H I J 0.73413
FCP10	I J 0.07540
Blanco	I J 0.00000
Streptomyces_FCP4	J 0.00000

Prueba Tukey-Kramer HSD $\alpha= 0.05$. n=5

Tabla A2c. Producción de indoles, aislados de Guanajuato.

Nivel	Media Indoles ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Pseudomonas_FCV16	A 8.354525
Rhizobium_FCV12	B 5.146048
Sphingobacteriaceae_FCV6	C 4.147194
Enterobacteriaceae_SCV15	C 4.043528
Pseudomonas_SCV9	C 3.949026
Enterobacteriaceae_SCV17	C D 3.784078
Pseudomonas_SCV3	C D 3.687858
Pseudomonas_SCV2	C D 3.667812
Pseudomonas_FCV3	C D 3.658076
Pseudomonas_SCV7	C D E 3.602520
Pseudomonas_SCV12	D E F 2.971936
Pseudomonas_SCV11	D E F 2.938144
Pseudomonas_SCV8	E F G 2.717640
Desconocido_FCV8	F G H 2.529782
Desconocido_FCV18	F G H I 2.333906
Pseudomonas_FCV15	F G H I 2.326460
Rhizobium_FCV14	F G H I 2.104238
Acinetobacter_FCV9	G H I J 1.938144
Burkholderia_FCV10	G H I J 1.879725
Pseudomonas_SCV5	H I J 1.798969
Acinetobacter_SCV10	H I J 1.711340
Acinetobacter_SCV4	H I J K 1.624857
Burkholderia_SCV25	I J K L 1.605384
Burkholderia_SCV20	I J K L 1.600229
Burkholderia_SCV23	I J K L M 1.577892
Pseudomonas_FCV7	I J K L M N 1.432990
Burkholderia_FCV1	J K L M N O 1.168385
Burkholderia_SCV16	K L M N O P 0.780069
Burkholderia_SCV6	L M N O P 0.698167
Burkholderia_SCV26	M N O P 0.677549
Burkholderia_FCV13	N O P 0.548683
Burkholderia_SCV19	N O P 0.531501
Burkholderia_SCV14	O P 0.461627
Burkholderia_SCV22	O P 0.372279
Burkholderia_FCV2	P 0.238832
Burkholderia_SCV21	P 0.225086
Burkholderia_FCV5	P 0.145475
Burkholderia_FCV4	P 0.093356
Comamonadaceae_FCV11	P 0.075029
Blanco	P 0.000000
Burkholderia_FCV17	P 0.013173
Burkholderia_FCV19	P 0.072738

Prueba Tukey-Kramer HSD $\alpha= 0.05$. n=5

XI.3. Análisis estadístico de la solubilización de Fósforo

Tabla A3a. Solubilización de Fósforo, aislados de Michoacán.

Nivel		Media Solubilización (mg P mL ⁻¹)
Burkholderia_SCC2	A	148.40692
Burkholderia_SCC18	B	136.53728
Burkholderia_SCC17	B C	131.28093
Burkholderia_SCC5	B C	130.05014
Burkholderia_SCC13	B C	126.89633
Burkholderia_SCC14	B C	125.76419
Burkholderia_SCC11	C D	121.07391
Burkholderia_SCC16	C D	120.58871
Pseudomonas_SCC3	D E	112.90636
Pseudomonas_SCC10	E	103.60666
Ralstonia_SCC19	E	102.87886
Pseudomonas_SCC7	F	46.03914
Pseudomonas_SCC12	G	32.89018
Ralstonia_SCC6	H	15.74640
Burkholderia_SCC9	H	12.33382
Blanco	H	7.30390
M1.5 Control -	H	5.43587

Prueba Tukey-Kramer HSD $\alpha=0.05$. n=5

Tabla A3b. Solubilización de Fósforo, aislados del Estado de México.

Nivel		Media Solubilización (mg P mL ⁻¹)
Burkholderia_SCP16	A	188.75950
Pseudomonas_SCP2	A B	174.04173
Advenella_SCP4	A B C	163.04383
Burkholderia_SCP17	A B C	162.07343
Burkholderia_SCP8	B C D	152.69287
Pseudomonas_SCP1	C D E	141.53324
Burkholderia_SCP14	C D E F	135.87255
Burkholderia_SCP15	D E F G	134.09348
Burkholderia_SCP18	D E F G H	128.43280
Burkholderia_SCP12	E F G H I	118.16270
Burkholderia_SCP3	E F G H I	114.84716
Burkholderia_SCP11	F G H I	113.14896
Phyllobacterium_SCP9	F G H I	110.31862
Burkholderia_SCP6	F G H I	109.18648
Burkholderia_SCP13	G H I	108.21608
Burkholderia_SCP5	G H I	107.40741
Burkholderia_SCP10	H I	105.14313
Phyllobacterium_SCP7	I J	98.14330
Phyllobacterium_SCP19	J	72.23031
Blanco	K	1.08208

Prueba Tukey-Kramer HSD $\alpha=0.05$. n=5

Tabla A3c. Solubilización de Fósforo, aislados de Guanajuato.

Nivel	Media Solubilización (mg P mL⁻¹)
Enterobacteriaceae_SCV17	A 270.11160
Enterobacteriaceae_SCV15	A 268.73686
Acinetobacter_SCV4	B 180.43021
Burkholderia_SCV26	B C 171.13052
Burkholderia_SCV6	C D 152.45027
Burkholderia_SCV23	C D E 145.57658
Burkholderia_SCV25	D E F 138.70290
Burkholderia_SCV20	D E F 135.95342
Pseudomonas_SCV2	D E F 134.12906
Burkholderia_SCV14	D E F 132.79961
Burkholderia_SCV22	D E F 128.10933
Acinetobacter_SCV10	E F 119.86091
Pseudomonas_SCV3	F 113.95763
Pseudomonas_SCV5	F 112.74462
Pseudomonas_SCV11	G 41.72085
Pseudomonas_SCV9	G H 39.14928
Pseudomonas_SCV12	G H 36.03590
Pseudomonas_SCV8	G H I 32.99531
Burkholderia_SCV16	H I 11.92948
Blanco	I 7.30390
Burkholderia_SCV19	I 5.80786

Prueba Tukey-Kramer HSD $\alpha= 0.05$. n=5


```

$ mkdir d_pandaseq_merged_reads

$ pandaseq -f a_raw_reads/JP2MS2SS25_S25_L001_R1_001.fastq -r
a_raw_reads/JP2MS2SS25_S25_L001_R2_001.fastq -p CTCCTACGGGAGGCAGCAG -q
CTTGTGCGGGCCCCGTCAATTC -w d_pandaseq_merged_reads/CCM3.fasta -g
d_pandaseq_merged_reads/CCM3.log -l 30 -L 250 -t 0.90

$ ls d_pandaseq_merged_reads/ | grep '.fasta' | wc -l

### Review that Primers don't be into the files *.fasta [The ^ symbol indicates
that it looks for the Primer at the beginning of each sequence]

$ grep '^CTCCTACGGGAGGCAGCAG' b_pandaseq_merged_reads/*.fasta | wc -l

## Making our mapping_file [At this point it is no longer so important to
complete the fields of barcode and linkerPrimerSequence since we have already
cleaned them previously with pandaseq]

#SampleID      BarcodeSequence      LinkerPrimerSequence      InputFileName      Dds
      MSNM  Clima  Precipitacion      Fertilizacion      pH      Nitrogeno
      Fosforo      Description
CCM3           11.98  26.96      CCM3.fasta  112   2050  Subhumedo   755   110   5.16
CCM2           11.98  26.96      CCM2.fasta  59    2050  Subhumedo   755   110   5.16
CCM1           11.98  26.96      CCM1.fasta  16    2050  Subhumedo   755   110   5.16
CPM3           12.7   5.66      CPM3.fasta  112   2500  Subhumedo   628   150   5.99
CPM2           12.7   5.66      CPM2.fasta  59    2500  Subhumedo   628   150   5.99
CPM1           12.7   5.66      CPM1.fasta  16    2500  Subhumedo   628   150   5.99
CVM3           46.05           CVM3.fasta  112   1700  Seco   573   300   6.97  20.4
CVM2           46.05           CVM2.fasta  59    1700  Seco   573   300   6.97  20.4
CVM1           46.05           CVM1.fasta  16    1700  Seco   573   300   6.97  20.4

### Validate a mapping using QIIME
$ validate_mapping_file.py -m maize_mapping.txt

## Merging assembled reads into data file [-n specify the number to start
enumerating sequence labels with. [default: 0]]

$ add_qiime_labels.py -i d_pandaseq_merged_reads/ -m mapping_maize.txt -c
InputFileName -n 1 -o e_combined_fasta

$ head e_combined_fasta/combined_seqs.fna

```

```

$ count_seqs.py -i e_combined_fasta/combined_seqs.fna

15961 : e_combined_fasta/combined_seqs.fna (Sequence lengths (mean +/- std):
211.8025 +/- 46.4948)
15961 : Total

### We can also take advantage of the power of Mothur by running its module
within the QIIME environment [We will use the summary.seqs command, which gives
us a summary of our sequences]
$ mothur
mothur> summary.seqs(fasta=e_combined_fasta/combined_seqs.fna)

          Start End   NBases Ambigs Polymer      NumSeqs
Minimum:   1   30    30     0     2        1
2.5%-tile: 1   47    47     0     4       400
25%-tile:  1  198   198     0     4      3991
Median:    1  226   226     0     4      7981
75%-tile:  1  245   245     0     5     11971
97.5%-tile: 1  250   250     0     8     15562
Maximum:   1  250   250     0    42     15961
Mean: 1    211.803 211.803  0    4.74644
# of Seqs: 15961

Output File Name:
e_combined_fasta/combined_seqs.fna.summary

mothu> quit()

## Picking Operational Taxonomic Units, OTUs.

$ pick_open_reference_otus.py -i e_combined_fasta/combined_seqs.fna -o
f_pick_open_otus_gg/ -p b_parameters/16S_pickotu_parameters.txt -f

$ head f_pick_open_otus/rep_set.fna

## Identifying the Chimeric sequences into the
f_pynast_aligned/cdhit_rep_seqs_aligned.fasta and we generated a chimeric seqs
list [We will use the ChimeraSlayer method after -m. We need a database aligned
and our repseq aligned to we can use ChimeraSlayer and we will use the
chimera_gg database alignment of template file for chimera.slayer]

$ identify_chimeric_seqs.py -i
f_pick_open_otus_gg/pynast_aligned_seqs/rep_set_aligned.fasta -a
c_dataset/Chimera_Greengenes_database.fasta -m ChimeraSlayer -o
f_pick_open_otus_gg/chimeric_seqs.txt

## Filtering chimeras from files

```

```
filter_fasta.py -f f_pick_open_otus_gg/pynast_aligned_seqs/rep_set_aligned.fasta
-o f_pick_open_otus_gg/pynast_aligned_seqs/rep_set_aligned_chimerafree.fasta -s
f_pick_open_otus_gg/chimeric_seqs.txt --negate
```

```
Q3Div$ count_seqs.py -i
f_pick_open_otus_gg/pynast_aligned_seqs/rep_set_aligned_chimerafree.fasta
```

```
1374 :
f_pick_open_otus_gg/pynast_aligned_seqs/rep_set_aligned_chimerafree.fasta
(Sequence lengths (mean +/- std): 7682.0000 +/- 0.0000)
1374 : Total
```

```
Q3Div$ count_seqs.py -i
f_pick_open_otus_gg/pynast_aligned_seqs/rep_set_aligned.fasta
```

```
1416 : f_pick_open_otus_gg/pynast_aligned_seqs/rep_set_aligned.fasta (Sequence
lengths (mean +/- std): 7682.0000 +/- 0.0000)
1416 : Total
```

```
filter_alignment.py -i
f_pick_open_otus_gg/pynast_aligned_seqs/rep_set_aligned_chimerafree.fasta -o
f_pick_open_otus_gg/
```

```
count_seqs.py -i f_pick_open_otus_gg/rep_set_aligned_chimerafree_pfiltered.fasta
```

```
1374 : f_pick_open_otus_gg/rep_set_aligned_chimerafree_pfiltered.fasta
(Sequence lengths (mean +/- std): 502.0000 +/- 0.0000)
1374 : Total
```

```
## Making new Phylogenetic Tree without Chimeras
```

```
make_phylogeny.py -i
f_pick_open_otus_gg/rep_set_aligned_chimerafree_pfiltered.fasta -o
f_pick_open_otus_gg/rep_set_chimerafree.tre
```

```
## Making new out_table without Chimeras
```

```
make_otu_table.py -i f_pick_open_otus_gg/final_otu_map_mc2.txt -o
f_pick_open_otus_gg/otu_table_rdp_nochimera.biom -t
f_pick_open_otus_gg/rdp_assigned_taxonomy/rep_set_tax_assignments.txt -e
f_pick_open_otus_gg/chimeric_seqs.txt
```

```
### Summarizing Sample OTU count's
```

```
biom summarize-table -i f_pick_open_otus_gg/otu_table_rdp_nochimera.biom -o
f_pick_open_otus_gg/otu_table_rdp_nochimera_stats.txt
```

```
## Alpha diversity analysis
```

```
mkdir g_alphadiversity
```

```
alpha_diversity.py -i f_pickopenotus_outputs/otu_table_maize.biom -m
observed_species,PD_whole_tree,shannon,simpson -o
g_alphadiversity/alpha_diversity.txt -t f_pickopenotus_outputs/rep_set.tre
```

```
more g_alphadiversity/alpha_diversity.txt
```

	observed_species	PD_whole_tree	shannon	simpson
CCM2	466.0 25.4169	8.10870444156	0.992927019737	
CPM2	1192.0 35.87369	8.86740289421	0.994280522103	
CPM1	287.0 17.41295	7.75865464696	0.992844626779	
CCM3	429.0 22.44061	8.2117994569	0.994214972128	
CVM1	109.0 14.42365	6.27183494926	0.975958414555	
CPM3	263.0 18.77619	7.68673957279	0.993223660891	
CCM1	374.0 22.82632	7.88040823106	0.990625647493	
CVM3	62.0 5.17618	5.92318199815	0.983011937557	
CVM2	194.0 16.60647	7.04183366556	0.985089406971	

```
## View taxa composition on otu table biom
```

```
summarize_taxa_through_plots.py -i f_pickopenotus_outputs/otu_table_maize.biom -
m mapping_maize.txt -o h_taxa_summary_nonchimeras/ -f
```

```
## Alpha Rarefaction
```

```
### Parameters
```

```
echo "alpha_diversity:chao1,observed_species,PD_whole_tree,shannon,simpson" >>
b_parameters/alphararefaction_m.txt
```

```
### Generating plots
```

```
alpha_rarefaction.py -i f_pickopenotus_outputs/otu_table_maize.biom -m
mapping_maize.txt -o g_alphadiversity/alpha_output_folder -t
f_pickopenotus_outputs/rep_set.tre -p b_parameters/alphararefaction_m.txt
```

```
### Calculating Alpha Diversity Significance
```

```
compare_alpha_diversity.py -i
g_alphadiversity/alpha_output_folder/alpha_div_collated/PD_whole_tree.txt -o
g_alphadiversity/alpha_diversity_significance/PD_whole_tree -m mapping_maize.txt
-t nonparametric -c Dds
```

```
compare_alpha_diversity.py -i
g_alphadiversity/alpha_output_folder/alpha_div_collated/chao1.txt -o
g_alphadiversity/alpha_diversity_significance/chao1 -m mapping_maize.txt -t
nonparametric -c Dds
```

```
compare_alpha_diversity.py -i
g_alphadiversity/alpha_output_folder/alpha_div_collated/observed_otus.txt -o
g_alphadiversity/alpha_diversity_significance/chao1 -m mapping_maize.txt -t
nonparametric -c Dds
```

```

## Beta Diversity Analysis

### Parameters
echo "beta_diversity:metrics
bray_curtis,euclidean,unweighted_unifrac,weighted_unifrac" >>
b_parameters/Betadiversity_param.txt

beta_diversity.py -i f_pickopenotus_outputs/otu_table_maize.biom -o
i_betadiversity/ -t f_pickopenotus_outputs/rep_set.tre

### Generating plots

beta_diversity_through_plots.py -i f_pickopenotus_outputs/otu_table_maize.biom -
o i_betadiversity/bdiv_plots -m mapping_maize.txt -t
f_pickopenotus_outputs/rep_set.tre -p b_parameters/Beta_param.txt

### Calculating Beta Diversity Significance

compare_categories.py -i i_betadiversity/bdiv_plots/weighted_unifrac_dm.txt -o
i_betadiversity/bdiv_stats_adonis_weighted/ -m mapping_maize.txt -c Dds --method
adonis

### Creating 2D PCoA Beta Diversity Plots

make_2d_plots.py -i i_betadiversity/bdiv_plots/weighted_unifrac_pc.txt -o
i_betadiversity/bdiv_2d_plot -m mapping_maize.txt

////////////////////////////////////

```