



Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del IPN

“Efecto de la asociación micorrízica en maíz (*Zea maíz*) B73 sobre los microorganismos que colonizan la rizosfera”

Tesis que presenta:

Marco Antonio Meraz Mercado

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias con Especialidad en Biotecnología de Plantas

Directores de tesis:

Víctor Olalde Portugal

Octavio Martínez de la Vega

Irapuato, Guanajuato a febrero, 2019

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca con la cual puede realizar mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) Unidad Irapuato por la oportunidad de realizar la maestría en el posgrado de Biotecnología de Plantas.

Al Dr. Víctor Olalde por sus consejos y paciencia para realizar este proyecto y permitirme desarrollarme en el ámbito académico.

Al Dr. Octavio Martínez por su apoyo y orientación en el trabajo, sobre todo con el análisis de los datos.

A mi comité de asesores, al Dr. Ruairidh Sawers por dejarme desarrollar parte de mi trabajo con él, además del apoyo. A la Dra. Gabriela Olmedo por los consejos brindados.

A la M.C. Rosalinda Serrato por la ayuda en el laboratorio, facilitando la implementación de las técnicas.

A Chayito por ser como una hermana en el laboratorio, gracias por dejarme trabajar a tu lado, aprendí mucho de ti. A Horacio por el apoyo siempre que lo necesitaba. Y en general a todo el laboratorio de Bioquímica Ecológica (Isa, Mariju, Fany, Maridoli, Anita) porque siempre hay alguien dispuesto desinteresadamente.

A mi familia por el apoyo incondicional en el camino que tomé.

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de Bioquímica Ecológica del departamento de Bioquímica y Biotecnología del CINVESTAV, bajo la dirección del Dr. Víctor Olalde Portugal y en el Laboratorio de Biología Computacional del Dr. Octavio Martínez de la Vega. Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de estudios de maestría durante el periodo comprendido entre Septiembre del 2016 y Agosto del 2018.

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1 INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Sustentabilidad en la agricultura .....	3
1.2 Interacciones en la rizósfera .....	3
2 ANTECEDENTES .....	6
2.1 Micorriza.....	6
2.2 Bacterias benéficas.....	7
2.3 Análisis de diversidad .....	8
2.5 Maíz y el microbioma .....	9
3 HIPÓTESIS .....	11
4 OBJETIVOS .....	11
4.1 Objetivo general .....	11
4.2 Objetivos particulares.....	11
5 MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
5.1 Cultivo .....	12
5.2 Colonización de la raíz .....	14
5.3 Arquitectura de la raíz .....	15
5.4 Secuenciación.....	17
5.5 Análisis.....	17
5.6 Cuantificación de abundancia microbiana.....	19
6 RESULTADOS .....	25
6.1 Crecimiento de las plantas .....	25
6.2 Colonización de la raíz .....	28
6.3 Arquitectura de la raíz .....	31
6.4 Diversidad .....	33
6.5 Abundancia microbiana.....	37
7 DISCUSIONES.....	39
8 CONCLUSIONES.....	44
9 BIBLIOGRAFÍA .....	46
10 ANEXOS .....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de las interacciones en la rizósfera. ....	5
Figura 2. Posibles interacciones entre los diferentes componentes de la micorrizosfera. ....	7
Figura 3. Esquema del proceso para la tinción de raíces para la observación en microscopio de las estructuras de la asociación micorrízica. ....	15
Figura 4. Esquema del trabajo de secuenciación de las muestras de ADN extraído de rizosfera. ....	17
Figura 5. Fotos de la parte aérea de los tratamientos. ....	26
Figura 6. Desarrollo del área foliar. ....	27
Figura 7. Análisis de componentes principales. ....	28
Figura 8. Estructuras vistas en el microscopio de plantas colonizadas por hongos micorrízicos arbusculares. ....	29
Figura 9. Regresión lineal del área foliar con las variables de colonización. ....	30
Figura 10. Fotos de las raíces introducidas al programa GiaRoots. ....	31
Figura 11. Análisis de componentes principales sobre las 20 variables de arquitectura de raíz. ....	32
Figura 12. Diagrama de rarefacción de las 6 muestras secuenciadas mostrando el número de OTU's observados en diferentes profundidades (número de lecturas). ....	33
Figura 13. Análisis de diversidad. Índices de la diversidad alfa. ....	34
Figura 14. Frecuencias relativas de cada muestra a nivel de filo. ....	35
Figura 15. Frecuencias relativas de cada muestra a nivel de clase. ....	36
Figura 16 Abundancia de colonias. ....	38

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. ml tomados de los medios para preparar un litro de solución nutritiva. ....	13
Tabla 2. Preparación de stocks para la solución nutritiva. ....	14
Tabla 3. Ingredientes para preparar 1 litro de medio NBRIP. ....	20
Tabla 4. Ingredientes para preparar 1 litro de medio B de King. ....	20
Tabla 5. Medio mínimo de sales DF. ....	22
Tabla 6. Elementos traza. ....	23
Tabla 7. Ingredientes del Agar de Czapek DOX. ....	23
Tabla 8. Ingredientes para el medio ATCC 14. ....	24
Tabla 9. Resultados del análisis de propiedades físicas y químicas del sustrato empleado en las macetas. ....	26

## RESUMEN

Las plantas interactúan con microorganismos en el suelo que le puedan beneficiar para su desarrollo. Una de las interacciones más ancestrales la lleva a cabo con los hongos micorrízicos arbusculares, formando la micorrizósfera entre las raíces y las hifas de los hongos. El principal beneficio de la micorriza es un mejor consumo de P del suelo, sin embargo, es necesario conocer los efectos que tiene en el resto del microbioma que coloniza la micorrizósfera. Se llevó a cabo un experimento para ver la respuesta del microbioma a la inoculación de un consorcio comercial de hongos micorrízicos arbusculares (MA) en plantas de maíz (*Zea mays*) B73. Se realizó la secuenciación del gen ribosomal 16S que permite analizar la diversidad y composición de bacterias. Además, se llevó a cabo un conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de algunos grupos bacterianos de interés agronómica. Las plantas inoculadas mostraron un mayor crecimiento y se pudieron diferenciar en su arquitectura de raíz. Las muestras secuenciadas mostraron un alto nivel en la diversidad de unidades taxonómicas operativas (OTUs, por sus siglas en inglés). La asociación micorrízica provoca una disminución en la diversidad medido a través del índice de Shannon. Para la diversidad beta los datos se pudieron agrupar por un análisis de coordenadas principales (PCoA, por sus siglas en inglés). Los tratamientos presentaron diferencias en las UFC de diferentes grupos bacterianos de importancia para la planta. En conclusión, la asociación micorrízica tiene un efecto sobre el microbioma que coloniza a la micorrizosfera en diversidad y funcionalidad, lo que puede estar beneficiando a la planta en una mayor eficiencia para su crecimiento.

## ABSTRACT

Plants interact with microorganisms in soil that are capable of benefiting their development. The association with mycorrhizal fungi (MA) to form mycorrhiza is one of the most ancient plant-microbe interactions, forming a zone called the mycorrhizosphere with roots and hyphae. The major benefit of the association is enhanced P uptake, however, it is interesting to understand the broader effect on the mycorrhizosphere microbiome. B73 (*Zea mays*) plants were grown with or without inoculation with a commercial MA consortium. Analysis of 16S sequence was used to assess the microbiome diversity and composition. Functionality was assayed by counting the colony-forming units (UFC) of different plant growth promoting bacteria (PGPRs). Inoculated plants showed increased growth and differences in root architecture. All samples presented a good representation of operational taxonomy units (OUTs). Inoculated plants showed a decrease in alpha diversity as measured by Shannon index, and shared beta diversity. Mycorrhizal plants varied in CFU associated with different bacterial groups. In conclusion, diversity and functionality of the rhizosphere microbiome was modulated by the mycorrhizal association.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Sustentabilidad en la agricultura

Con el crecimiento de la población mundial, estimada en 9 billones para mitad de siglo, la demanda por alimentos aumenta. La habilidad para producir alimentos se ve comprometida con la creciente competencia por tierra, agua y energía, así como la urgencia por reducir su impacto en el medio ambiente. Esto lleva a que el mundo afronte el gran reto de satisfacer la demanda por comida de una población en crecimiento, asegurándose de hacerlo en formas sustentables ecológica y económicamente (Godfray *et al.*, 2010).

Para cumplir el reto se deben desarrollar estrategias que resuelvan el problema de forma integral. Una de ellas se enfoca en que la agricultura debe considerar la coadaptación entre plantas y microorganismos como un esfuerzo para promover la diversidad microbiana. Esto puede reducir la productividad a corto plazo, pero al largo plazo puede maximizar el rendimiento de los cultivos minimizando el uso de recursos (Chaparro *et al.*, 2012).

Existe evidencia en aumento sobre la importancia de la coadaptación de comunidades planta-microorganismo en la salud de la planta y su productividad en donde se ha visto un enfoque costo-beneficio llevando a interacciones ecológicas muy cercanas. Algunas de las interacciones más estudiadas son las que realizan las plantas con mutualistas simbiotes (hongos micorrízicos y microorganismos fijadores de N) y parásitos (enfermedades) (Lambers *et al.*, 2009).

## 1.2 Interacciones en la rizósfera

Durante el desarrollo de las plantas desde la germinación hasta la producción de semilla y su muerte generan cambios en el entorno de la raíz. Dentro de estos cambios el microbioma del suelo es el que responde de manera más activa, usando

los exudados como sustratos para aumentar la biomasa microbiana y su actividad en lo que se conoce como rizósfera. El término rizósfera fue definido por Lorenz Hiltner (1904) como el sitio del suelo afectado por la raíz se presenta una mayor actividad biológica y química. Esta área puede ser dividida en tres zonas: endorizósfera (tejido de la raíz, incluyendo la endodermis y capas corticales), rizoplano (superficie de la raíz con la epidermis y el mucilago) y ectorizósfera (suelo cercano a la raíz) (Lynch, 1987).

Las raíces secretan exudados de bajo peso molecular como aminoácidos, vitaminas, ácidos orgánicos, azúcares, compuestos fenólicos, aniones, gases y otros metabolitos secundarios, y exudados de alto peso molecular como polisacáridos y proteínas (Badri *et al.*, 2009; Kamilova *et al.*, 2006). Los exudados funcionan como fuente de alimento que atraen microbios benéficos, neutrales y patógenos a través de la raíz (Badri *et al.*, 2009). En respuesta, la composición de los microorganismos es regulada, lo cual causa un reclutamiento de microbios benéficos y una supresión de patógenos y otros microbios no benéficos para prevenir una infección o una comunidad no benéfica (Zhang *et al.*, 2009). En la Figura 1 se muestra un resumen de cómo se pueden dar las interacciones entre la raíz y los microorganismos del suelo.

Las raíces de las plantas llevan a cabo la secreción usando sistemas de transporte activos y pasivos. El transporte de moléculas pequeñas polares y no cargadas es conducida por difusión pasiva directa y es dependiente de la permeabilidad de la membrana, pH citosólico y polaridad de los compuestos exudados (Badri *et al.*, 2009). Metabolitos secundarios, polisacáridos y proteínas son liberados por las células de la raíz usando diferentes proteínas transportadoras de membrana como los transportadores tipo ABC (Sugiyama *et al.*, 2008). La composición de los exudados de la raíz varía con el tipo de cultivar de la planta, especie y etapa de desarrollo y factores ambientales incluyendo el tipo de suelo, pH, temperatura y comunidades microbianas (Uren, 2007).

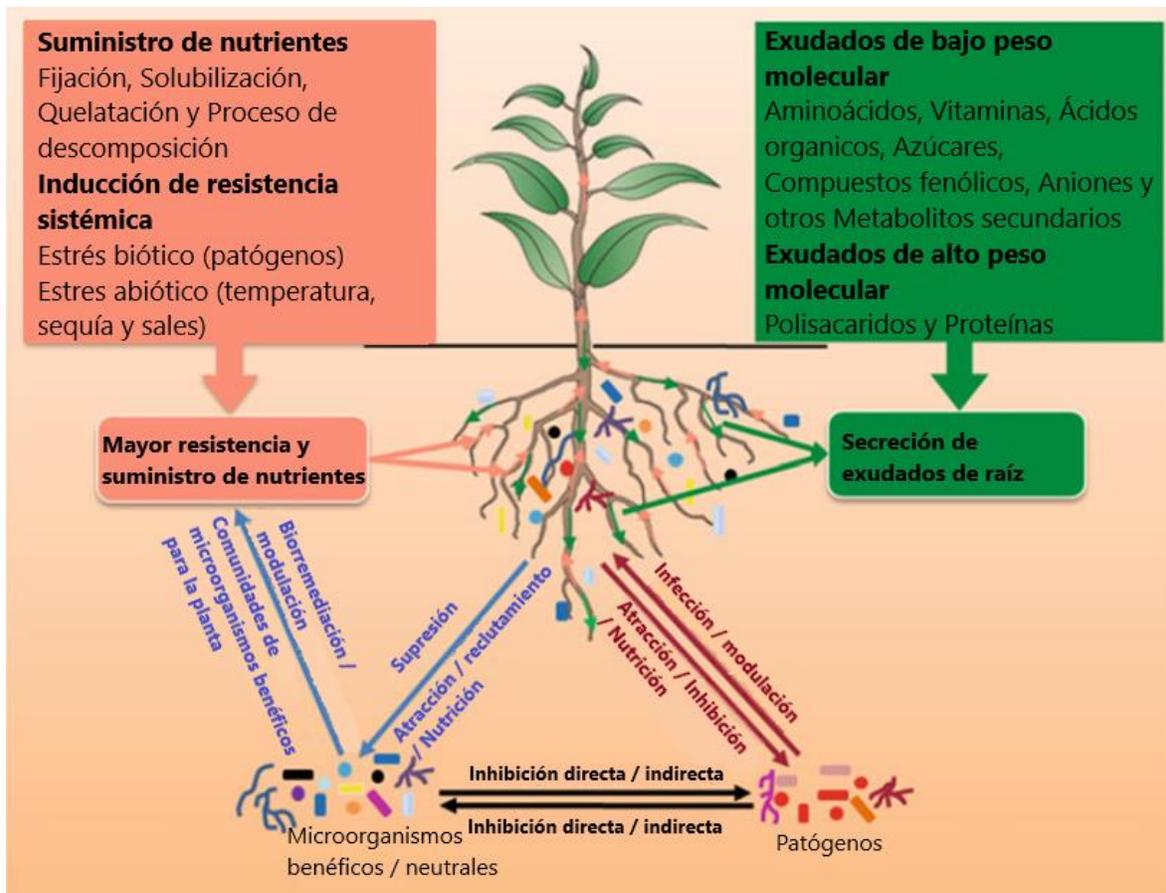


Figura 1. Esquema de las interacciones en la rizósfera. Las plantas interactúan de forma constante con el microbioma del suelo a través de los exudados de la raíz, formando la rizósfera. Las interacciones pueden ser positivas o negativas, en donde la planta busca la formación de una comunidad benéfica para su crecimiento. Modificado de (Yuan *et al.*, 2018).

Con el propósito de evaluar los cambios microbianos en la rizósfera por la asociación micorrízica de forma general, en este estudio se analizó la diversidad y composición bacteriana en la rizósfera de plantas de maíz B73 inoculadas con MA, a través del análisis del gen ribosomal 16 S. Además, se cuantificó la abundancia de diferentes grupos bacterianos con funciones de interés para el crecimiento de la planta.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Micorriza

Micorriza es el término dado a la asociación simbiótica entre raíces de las plantas y hongos del suelo. Se estima que el 74% de las especies de plantas forman micorrizas arbusculares (MA), 9% forman micorrizas de orquídeas, 2% forman ectomicorrizas (EcM) y 1% forman asociaciones micorrízicas ericoides (van der Heijden, & Schlaeppi, 2015). Estas asociaciones juegan un papel fundamental en los ecosistemas terrestres debido a la regulación de los ciclos del carbono y los nutrientes. La micorriza provee nutrientes minerales a la planta para recibir carbohidratos y lípidos a cambio (Rich *et al.*, 2017).

Uno de los cambios en la planta asociados a la micorriza es el incremento en el crecimiento radicular, aumentando la adquisición de nutrientes como N y P, y una mayor resistencia a la sequía (Subramanian, Charest, 1999). En plantas de *Poncirus trifoliata* L. Raf. inoculadas con hongos de MA *Funneliformis mosseae*, *G. versiforme* y *Paraglomus occultum* se vieron incrementadas la longitud total de la raíz, área proyectada total, área de la superficie y volumen, pero un decremento en el diámetro. Este crecimiento en la raíz puede ayudar a mejorar el crecimiento de la planta al tener más agua y nutrientes disponibles (Wu *et al.*, 2011). La producción inducida por micorriza de IAA y el metabolismo de poliamina regulado por micorriza son factores en la asociación micorrízica que optimizan la arquitectura del sistema radicular (longitud total, área proyectada, área de la superficie y volumen de la raíz) (Liu, Wu, 2016; Wu *et al.*, 2012).

Para referirse a la zona que se crea, influenciada por las raíces y los hongos micorrízicos se le denomina micorrizósfera (Figura 2) (Linderman, 2008). Se ha visto una correlación positiva entre cambios inducidos por la micorriza en los patrones cuantitativos y cualitativos de los exudados de la raíz y la microflora de la

micorrizosfera (Bansal & Mukerji, 1994). En la Figura 2 se muestran algunos de los cambios asociados a la presencia de la micorrizósfera en la raíz de la planta.

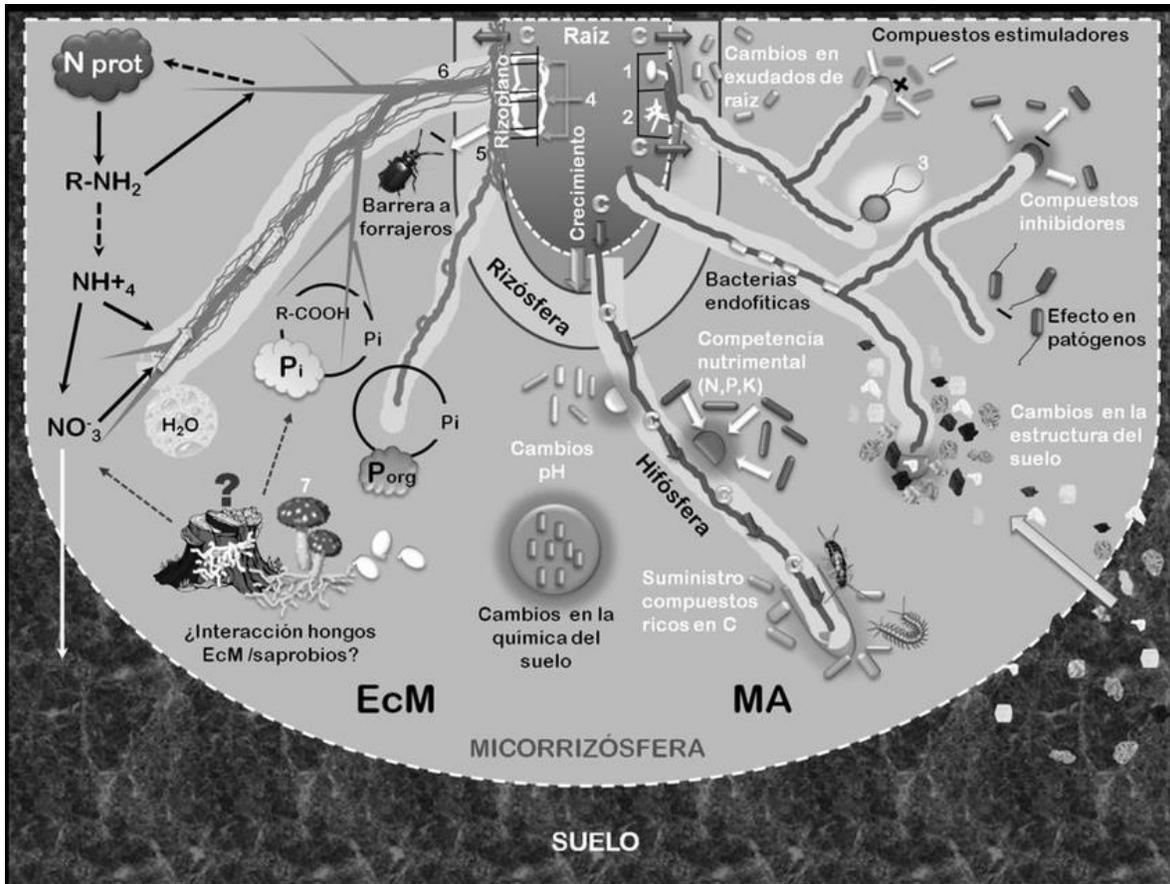


Figura 2. Posibles interacciones entre los diferentes componentes de la micorrizosfera en MA y en EcM. 1: Vesícula; 2: Arbúsculo; 3: Espora de Glomeromycota; 4: Red de Harting; 5: Manto; 6: Rizomorfo; 7: Esporomas de hongos micorrízicos y saprobios (Neri-Luna, Cecilia, Villarreal-Ruíz, 2012).

## 2.2 Bacterias benéficas

Las bacterias de vida libre benéficas para el crecimiento de las plantas son conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) contribuyendo en el desarrollo de sistemas agrícolas sustentables. Generalmente las PGPR funcionan en tres formas diferentes: sintetizando compuestos particulares para las plantas como la síntesis de fitohormonas y vitaminas (Dobbelaere *et al.*, 2003); facilitando el consumo de algunos nutrientes del suelo como es el caso de

bacterias fijadoras de nitrógeno (Çakmakçi *et al.*, 2006); y previniendo o ayudando contra fitopatógenos.

En Trigo, *Azospirillum brasilense* promueve un mayor crecimiento y la mayor acumulación de nitrógeno en sus tejidos (Saubidet *et al.*, 2002). En *Arabidopsis thaliana* inoculada con *A. brasilense* vieron una respuesta a sequia correlacionada con la producción de ABA (Cohen *et al.*, 2015). Un elemento limitante en la producción es el fósforo debido a su baja movilidad y su escasez, existen microorganismos capaces de solubilizar fósforo inorgánico, haciéndolo disponible para las plantas (Mohammadi, 2012). En maíz, se han aislado cepas de *Burkholderia cepacia* con capacidad de solubilizar fósforo, además de mostrar antagonismo contra hongos fitopatógenos (Zhao *et al.*, 2014). *Pseudomonas fluorescens* es el caso de una especie con capacidad de fluorecer por la producción de fluoresceína que pueden ser fácilmente identificadas en medio B de King. En arroz, se ha visto su capacidad de promover el crecimiento de la planta, además de inducir la actividad de polifenol oxidasas y lipoxogenasas que pueden estar involucrado en la resistencia a ataques foliares (Saravanakumar *et al.*, 2008).

### **2.3 Análisis de diversidad**

El microbioma de la rizósfera es un término relativamente nuevo, el cual se refiere a comunidad diversa y dinámica de microorganismos asociados con las raíces de las plantas. Al respecto, análisis metagenómicos han provisto una herramienta para un punto de vista holístico del microbioma de la rizósfera (Gupta *et al.*, 2018). Se ha usado la secuencia la subunidad pequeña ribosomal (16S rARN) como un marcador filogenético para la secuenciación del amplicon de comunidades bacterianas ya que es una región altamente conservada en bacterias y arqueas, pero que dentro de su secuencia también existen 9 regiones hipervariables (V1 – V9), útiles para la identificación de bacterias. Gracias a los avances en las tecnologías de secuenciación se pueden tener cientos de miles de secuencias por muestra para ser procesadas mediante análisis bioinformáticos (Qin *et al.*, 2010). Esto permite

estimar la diversidad bacteriana y la distribución de las especies para comparar muestras con fines ecológicos (Birtel *et al.*, 2015).

Se ha encontrado que diferentes especies de plantas tienen microbiomas únicos. Diferentes estudios han demostrado que entre especies, hábitat y tipo de suelo tienen una gran influencia en la estructura del microbioma asociado a la raíz (Bulgarelli *et al.*, 2012; Lundberg *et al.*, 2012; Peiffer *et al.*, 2013). Basado en la ocurrencia de sus miembros, los microbiomas pueden ser clasificados como microbiomas mínimos o basales. Los microbiomas basales comprenden miembros comunes en dos o más ensamblajes microbianos con un hábitat (Hamady, Knight, 2009). El microbioma mínimo implica el más pequeño pero indispensable funcionalmente subgrupo del total del microbioma (Raaijmakers, 2015). En el microbioma de la rizósfera, no todos los microorganismos son necesarios para completar los servicios ecológicos para la planta. La existencia de redundancia funcional en las comunidades microbianas entre diferentes ambientes es común (Alves-de-Souza *et al.*, 2015; Dopheide, *et al.*, 2015).

Otra forma de analizar la diversidad en suelos ha sido por su potencial catabólico midiendo las respuestas respiratorias a corto plazo del suelo a un rango de compuestos orgánicos simples (Degens *et al.*, 2000). Por ejemplo, Dabire *et al.* (2007) observaron que la uniformidad encontrada en la rizosfera de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) esta correlacionada positivamente con la cantidad de propágulos de hongos micorrízicos inoculados.

## **2.5 Maíz y el microbioma**

El análisis de los microorganismos que se asocian a la raíz ha tomado una gran importancia por su impacto en los sistemas de producción. La planta de maíz tiene la capacidad de obtener un beneficio de MA para tener un mayor crecimiento. Esto lo logra variando el contenido de fósforo dentro de la planta, la abundancia de estructuras fúngicas internas y externas de la raíz, consumo de fósforo facilitado por

la micorriza y la acumulación de transcritos codificantes a transportadores de fosfato de la familia PHT1 entre diferentes genotipos (Sawers *et al.*, 2017). Además, a través de un análisis de ácidos grasos de fosfolípidos, se ha visto que el genotipo del maíz tiene influencia sobre la estructura de las comunidades microbianas que colonizan la rizósfera, sin modificar la biomasa microbiana (Aira *et al.*, 2010).

El desarrollo de tecnologías en la secuenciación masiva del gen 16 S permite un mejor entendimiento en las dinámicas y diversidad de las bacterias que colonizan la raíz. Por ejemplo, el análisis de las comunidades bacterianas asociadas a diferentes variedades de maíz mejoradas, cultivadas bajo condiciones de campo, con diferentes técnicas de manejo y condiciones de suelo mostraron una variación en la riqueza, diversidad y abundancias relativas bacterianas entre la rizósfera y el resto del suelo, así como entre diferentes campos cultivados. También se pudo ver una pequeña proporción de variación heredable en la diversidad total de la rizósfera en las diferentes condiciones de campo, y una mayor variación heredable entre los genotipos, tomando en cuenta todas las condiciones (Peiffer *et al.*, 2013).

El microbioma que coloniza la raíz del maíz se ve influenciado por los microorganismos que están presentes en el suelo que se está cultivando la planta, así como de aquellos que están presentes dentro de la semilla (Johnston-Monje *et al.*, 2016). Al analizar el efecto de diferentes genotipos de maíz y algunas otras Poaceas, se observó que la distancia genética entre comunidades de rizobacterias están correlacionadas con la distancia fenotípica entre las plantas, lo que sugiere que la historia evolutiva de la planta como hospedero, tiene un efecto sobre la composición bacteriana que coloniza la raíz (Bouffaud *et al.*, 2014). En un estudio realizado por Zhu *et al.* (2016), mostraron que la fertilización nitrogenada tiene un efecto sobre los exudados de la raíz y en las comunidades bacterianas en la rizosfera del maíz, aumentando la abundancia relativa de Bacillales, Nitrosomonadales y Rhodocyclales, y disminuyendo Chloroflexales, Gemmatimonadetes y Phycisphaerae.

### **3 HIPÓTESIS**

La asociación micorrízica en maíz B73 propicia una colonización selectiva de comunidades bacterianas benéficas en la micorrizósfera de la planta.

### **4 OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de la asociación micorrízica en maíz B73 sobre la diversidad del microbioma del suelo que coloniza a la micorrizósfera.

#### **4.2 Objetivos particulares**

- ✓ Estimar el comportamiento del desarrollo de maíz B73 en presencia de la asociación micorrízica.
- ✓ Evaluar el efecto de la asociación micorrízica sobre la abundancia de grupos bacterianos cultivables en maíz B73.
- ✓ Determinar la composición de la estructura del microbioma asociado a la micorrizósfera.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Cultivo

El experimento se llevó a cabo en el invernadero 4 del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, perteneciente al CINVESTAV entre los meses de abril y mayo. Se evaluó la variedad de maíz B73 con dos tratamientos; un consorcio comercial de micorrizas arbusculares (Biomic) y el control sin hongos. Las semillas fueron desinfectadas de la superficie en campana de flujo laminar, sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio al %15 (a partir de la marca comercial Cloralex) y enjuagadas con agua destilada estéril. Se almacenaron en frascos de vidrio estériles hasta su uso. El sustrato fue realizado con una mezcla de 65% arena, 35% limo y 20% perlita. La arena fue humedecida con agua destilada y calentada en hornos. El limo se esterilizó en autoclave con una presión de 15 lb por una hora, el proceso se repitió 3 veces, dejando 24 horas de enfriamiento. Se usó perlita de la marca comercial Agrolita. El sustrato fue analizado en el Laboratorio de Análisis de Suelo, Agua y Nutrientes Vegetales de la Universidad Autónoma de Aguascalientes para sus propiedades físico-químicas. Se determinó textura, densidad aparente, pH, porcentaje de materia orgánica, conductividad eléctrica y contenido de nitrógeno, fósforo y potasio. Se preparó un inóculo para recuperar el microbioma del sustrato extrayendo microorganismos de suelo obtenido de una parcela de uso agrícola del CINVESTAV. Se suspendieron 100 g de suelo en 150 ml agua destilada en matraces Erlenmeyer y se pusieron en agitación por una hora. El líquido se pasó por un tamiz con una apertura de 0.038 mm para remover el suelo y las esporas de los hongos micorrízicos, se almacenó en frascos de vidrio esterilizados hasta su aplicación. El experimento se llevó a cabo en tubos de pvc que se usaron como macetas de 1 m de alto y 15 cm de ancho en donde fue vertido el sustrato (para permitir un mayor desarrollo radicular vertical). Antes de la siembra se humedeció el sustrato con agua destilada, se le agregó el inóculo con el microbioma y las esporas del hongo micorrízico a las macetas correspondientes a

6 cm de profundidad. Se sembraron tres semillas por maceta 3 cm debajo de la superficie.

Las plantas se regaron cada dos días con 200 ml de solución Hoagland (Tablas 1 - 2), ajustando el fósforo a 75  $\mu\text{M}$  (solución B) para un mejor desarrollo de la micorriza (Tabla).

Componente	ml/L
Medio A	50 ml
Medio B	0.75 ml
Medio B-Mixer	9.25 ml
Medio C	10 ml
Medio D	1 ml
Medio E	1 ml

Tabla 1. ml tomados de los medios para preparar un litro de solución nutritiva

MEDIO A	20X STOCK ( $\text{gL}^{-1}$ )
$\text{KNO}_3$	10
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.18
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.93
MEDIO B	100X Stock ( $\text{gL}^{-1}$ ) 100mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	13.6
MEDIO B-MIXER	100X Stock ( $\text{gL}^{-1}$ ) 100mM
Kcl	7.4
MEDIO C	0.001 M Stock ( $\text{gL}^{-1}$ )
Fe EDTA	0.3605
MEDIO D	1000X Stock (g/100mL)
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.137

ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.008
MEDIO E	1000X Stock (g/100mL)
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O(BORAX)	0.2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.01

Tabla 2. Preparación de stocks para la solución nutritiva.

Durante el desarrollo de las plantas se evaluó el crecimiento con la medición del área foliar cada 5 días. A los 56 días se cosecharon las plantas, sacando la raíz completa de los tubos. Las raíces fueron sacudidas vigorosamente para retirar el suelo que no pertenece a la rizosfera. Después se tomó muestra de suelo de la rizosfera en bolsas de la marca Ziploc de 16.5cm x 14.9cm y se guardaron en cuarto frío a 4°C hasta su análisis. Posteriormente la raíz fue lavada con agua de la llave para retirar el resto del suelo. Fragmentos aleatorios de toda la raíz fueron cortados de la raíz y guardados en tubos Falcon de 50 ml para la tinción de hongos micorrízicos. La parte aérea fue cortada para evaluar, altura, contenido de clorofila, peso fresco y peso seco. La raíz fue fotografiada y posteriormente evaluada de volumen peso fresco y peso seco.

El análisis estadístico de los datos pertenecientes al desarrollo de las plantas fue realizado con ayuda de R, haciendo un ANOVA.

## 5.2 Colonización de la raíz

A los tubos con las raíces se añadió KOH 10% hasta cubrir las muestras para su decoloración. Se sometieron a un tratamiento de temperatura en autoclave a 10 lb de presión durante 10 min. Se lavó el KOH con agua de la llave. Se agregó azul de tripano hasta cubrir las raíces para teñirlas y se metió a la autoclave a 10 lb de presión durante 10 min. Se enjuagaron con agua de la llave. Las raíces se suspendieron en acetoglicerol para conservarlas. De cada muestra se montaron 15 fragmentos de raíz de 1 cm en portaobjetos para realizar la cuantificación de la

colonización. Se hicieron 3 réplicas técnicas por cada muestra. La cuantificación de la colonización en las raíces fue hecha por el método de Intersección (McGonigle *et al.*, 1990).

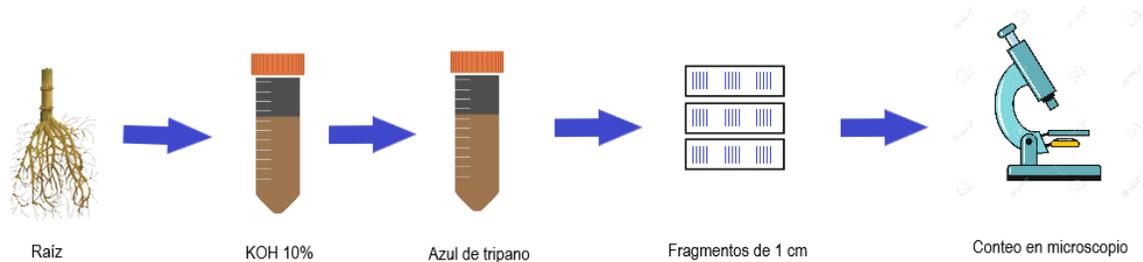


Figura 3. Esquema del proceso para la tinción de raíces para la observación en microscopio de las estructuras de la asociación micorrízica.

### 5.3 Arquitectura de la raíz

Las fotos de las raíces fueron analizadas mediante el programa GiA Roots (<http://giaroots.biology.gatech.edu/>) que es una herramienta para el análisis de redes de raíces. Ayuda a cuantificar la estructura de la arquitectura del sistema radicular de la raíz a través de imágenes. Las características que se obtuvieron son las siguientes:

- Ancho medio de la raíz (Diámetro). Estimación del valor medio del ancho de la raíz computada para todos los píxeles del eje medial de todo el sistema de la raíz.
- Bushiness de la red. Relación del máximo a la mediana del número de raíces.
- Número de componentes conectados. Una integral denotando el número de grupos conectados de redes de píxeles en la imagen después de pre-procesarla.
- Profundidad de la raíz. El número de píxeles en la dirección vertical del píxel más arriba de la red hasta el píxel más debajo de la red.
- Relación de eje elíptica. La relación del eje menor a mayor de la mejor elipse ajustada.

- Distribución del largo de la red. La fracción de la red de píxeles en los 2/3 más debajo de la red definido en base a la profundidad.
- Eje mayor de elipse. La longitud del eje mayor de la elipse mejor ajustada a la red.
- Máximo número de raíces. Después de clasificar el número de raíces que cruzan una línea horizontal de la más pequeña a la más grande, se considera que el número máximo es el valor del percentil 84 (una desviación estándar).
- Ancho de la red. El número de píxeles en la dirección horizontal del píxel de la red más a la izquierda hasta el píxel más a la derecha de la red.
- Mediana del número de raíces. Resultado de barrido de una línea vertical, en la cual el número de raíces que cruzan una línea horizontal fue estimado, y después la media de todos los valores para el extendido de la red fue calculada.
- Eje de elipse menor. La longitud del eje menor de la elipse que mejor se ajusta a la red.
- Área de la red. El número de píxeles de la red en la imagen.
- Área convexa de la red. El área del casco convexo que envuelve a la imagen.
- Perímetro de la red. El número total de píxeles conectados a un píxel de fondo (utilizando un vecindario vecino más cercano a 8).
- Solidez de la red: El área total de la red dividida entre el área convexa de la red.
- Longitud específica de la raíz: La longitud total de la raíz dividida entre el volumen del sistema radicular.
- Área de la superficie de la red: La suma del área de la superficie local en cada píxel del esqueleto de la red.
- Longitud de la raíz: El número total de píxeles en el esqueleto de la red.
- Volumen de la red: La suma del volumen local en cada píxel del esqueleto de la red.
- Relación de ancho a profundidad de red: El valor del ancho dividido por el valor de la profundidad de la red.

## 5.4 Secuenciación

El ADN metagenómico (mADN) de la rizósfera de 3 plantas por tratamiento fue extraído con el kit DNeasy PowerSoil Kit (QUIAGEN, Alemania) siguiendo las indicaciones del instructivo. El mADN se secuenció en la empresa Macrogen para la región V3 – V4 con los oligos Bakt\_341F: CCTACGGGNGGCWGCAG y Bakt\_805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC con un tamaño de lectura de 301 pb, del tipo Paired-end. Las librerías se hicieron con el kit Herculase II Fusin DNA Polymerase Nextera XT Index Kit V2 siguiendo el protocolo 16M Metagenomic Sequencing Library Preparation Part # 15044223 Rev. B para secuenciar en la plataforma de Illumina.

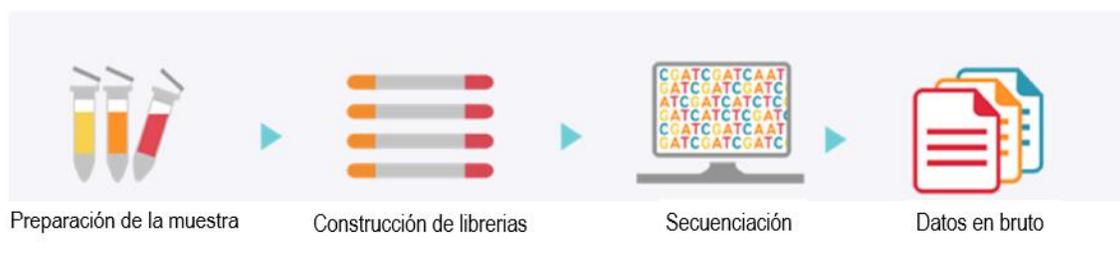


Figura 4. Esquema del trabajo de secuenciación de las muestras de ADN extraído de rizosfera.

## 5.5 Análisis

Las secuencias fueron analizadas con la plataforma Qiime 2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology V 2018.11) que es un proceso de código abierto para el análisis del microbioma a partir de datos de secuenciación.

Para importar los datos, se utilizó el formato Casava 1.8 demultiplexed en donde hay dos archivos para cada muestra, en donde cada uno contiene las lecturas hacia adelante y hacia atrás (forward y reverse) además de los valores de calidad. El nombre de los archivos incluye el identificador de la muestra (id), el índice doble de

identificación, el número de la línea, la dirección de la lectura y el número de conjunto.

Se realizó un control de la calidad de las secuencias y se construyó la tabla de características con la función DADA2 (Callahan *et al.*, 2016). Se indicó el número de lecturas (301) por muestra y se cortaron 20 pb a la izquierda para quitar lecturas de baja calidad. DADA2 detecta y corrige (en donde es posible) los datos de secuencia de amplicon de Illumina. Adicionalmente filtra cualquier secuencia phiX y secuencias quiméricas.

Para ver las métricas de diversidad se formó un árbol con raíces. Se crea un alineamiento de la secuencia usando MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>), en donde cualquier columna de alineamiento que no son informativas filogenéticamente o alineadas de forma ambigua son removidas. El alineamiento filtrado se usó para inferir un árbol filogenético y después se colocaron las raíces en su punto medio (Price *et al.*, 2010).

La asignación de las unidades taxonómicas operativas (OTUs) se realizó usando como marco de referencia la base de datos de Greengenes 13\_8 con un 97 % de similitud. Se generaron curvas de rarefacción alfa con el número de OTUs en una profundidad de 7000 a todas las muestras para poder ver si estaban capturando la mayor diversidad posible por muestra.

Con QIIME 2 se pueden realizar diferentes análisis de diversidad para ver la variedad y heterogeneidad de los organismos. Para la diversidad alfa, que corresponde a la riqueza de especies de una hábitat determinado, se calculó el índice de Shannon que mide la riqueza y la diversidad usando como base el logaritmo natural, contando la abundancia y la riqueza de los OTUs en las muestras (Shannon & Weaver, 1949). Para ver características más específicas de la diversidad alfa, se calculó la diversidad filogenética de Faith que mide la biodiversidad incorporando la diferencia filogenética entre OTUs (Faith, 1992) y la

uniformidad de Pielou que mide la uniformidad relativa de la riqueza de OTUs (Pielou, 1966). Para medir los cambios en la estructura de las comunidades entre los tratamientos dada por la diversidad beta, se utilizó las distancias weighted UniFrac que mide cuantitativamente la disimilitud de las comunidades que incorpora relaciones filogenéticas entre las características (Lozupone *et al.*, 2007).

## 5.6 Cuantificación de abundancia microbiana

Para ver el efecto de la micorriza sobre microorganismos cultivables de importancia para la salud de la planta, se prepararon medios selectivos para la cuantificación de bacterias solubilizadoras de fósforo (NBRIP), *Pseudomonas* fluorescentes (B de King), bacterias productoras de sideróforos (CAS), fijadores de nitrógeno de vida libre (ATCC), bacterias productoras de ACC desaminasa (ACC) y actinomicetos (Czapek) por gramo de suelo seco. Para lo cual, se pusieron 10 g de suelo en frascos de dilución de leche con 90 ml de agua destilada estéril los cuales se colocaron en agitación a 150 rpm durante una hora. De la dilución anterior se tomó una alícuota de un mililitro y se depositó en tubo de ensaye que contenían 9 ml de agua destilada estéril, lo que significó la dilución  $10^{-2}$  de esta dilución se tomó una alícuota de un ml y se depositó en otro tubo de ensaye que contenía 9 ml de agua destilada estéril lo que represento la del  $10^{-3}$  así sucesivamente se realizaron diluciones hasta la  $10^{-4}$ . De las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  se inocularon placas con los diferentes medios de cultivo, utilizando el Spiral Plater de Autoplate Model 4000 Se determinó la humedad del suelo tomando 100 g de sustrato de las muestras secándolas en un horno a 60° C hasta llegar a peso constante para obtener por diferencia de peso el porcentaje de humedad.

### Bacterias solubilizadoras de fósforo

Ingredientes	
Glucosa	10.0g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5.0g

MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	5.0g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.25g
KCl	0.20g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.10g
Agar	15.0g
Agua	1000 ml

Tabla 3. Ingredientes para preparar 1 litro de medio NBRIP.

Los ingredientes, a excepción del agar se diluyeron en 500 ml de agua (Tabla 3). Después de aforar a 1 L se agregó el agar y se esterilizó por 20 minutos a 15 lb. Justo antes de solidificar se agitó para suspender el fósforo inorgánico y posteriormente se vació en placas. Después de incubar las cajas inoculadas se contaron las colonias que presentaron un halo de solubilización (Nautiyal, 1999).

### **Pseudomonas fluorescentes**

Ingredientes	
Proteasa de peptona	20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1.5 g
Glicerol	15 ml
Agar	15 g
Agua	1000 ml

Tabla 4. Ingredientes para preparar 1 litro de medio B de King.

Se mezclaron los ingredientes (Tabla 4), a excepción del agar en 500 ml de agua. Se esterilizó por 20 min a 15 lb de presión y se vaciaron en placa. La lectura se realizó exponiendo las placas a luz UV media de 302 nm en un transiluminador UVP y se contaron las colonias fluorescentes (King et al., 1954).

### **Sideróforos**

Toda la cristalería fue limpiada con HCL 6M para remover cualquier elemento traza, después enjuagada con agua destilada.

A. Colorante azul:

a. Solución 1:

i. Se disolvieron 0.006 g de () CAS en 50 ml de agua destilada.

b. Solución 2:

i. Se disolvieron 0.0027 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  en 10 ml de 10 mM HCl.

c. Solución 3:

i. Se disolvieron 0.073 g de HDTMA en 40 ml de agua destilada.

d. Se mezclaron la solución 1 con 9 ml de la Solución 2. Después se mezcló con la Solución 3. Se esterilizó en autoclave.

B. Solución mezcla:

a. Stock de solución salina de medio mínimo 9 (MM9).

i. Se disolvieron 15 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 g de NaCl, y 50 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en 500 ml de agua destilada

b. Stock de Glucosa 20%.

i. Se disolvieron 20 g de glucosa en 100 ml de agua destilada.

c. Stock de NaOH.

i. Se disolvieron 25 g de NaOH en 150 ml de agua destilada.

d. Solución de Casaminoácidos.

i. Se disolvieron 3 g de Casaminoácidos en 27 ml de agua destilada.

ii. Se extrajeron con 8-hidroxiquinolina al 3% en cloroformo para remover cualquier hierro traza.

iii. Se esterilizó por filtración.

C. Preparación del agar CAS:

a. Se añadieron 100 ml de la solución salina MM9 a 750 ml de agua destilada.

b. Se disolvieron 32.24 g de piperazina-N,N'-bis(2-ácido etanosulfónico) PIPES.

- i. Mientras se añadía el PIPES, el pH se llevó a 6.8.
- c. Se añadieron 15 g de agar bacteriológico.
- d. Se esterilizó en autoclave a 120 lb durante 20 minutos y se dejó enfriar hasta 50°C.
- e. Se añadieron 30 ml de la solución estéril de Casaminoácidos y 10 ml de la solución de glucosa estéril al 20% a la mezcla MM9/PIPES.
- f. Se añadieron lentamente 100 ml del colorante azul a través de la pared del frasco.
- g. Se vació en placa en condiciones asépticas.

Se contaron las colonias con presencia de un halo naranja, que indica la presencia de un quelante que puede tomar Fe del medio.(Louden *et al.* , 2011)

### Bacterias productoras de ACC-desaminasa

Ingredientes	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.0 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
Glucosa	2.0 g
Ácido glucónico	2.0 g
Ácido cítrico	2.0 g
ACC	0.3 g
Agar	20.0 g
Agua	1000 ml

Tabla 5. Medio mínimo de sales DF.

Ingredientes	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10.0 mg
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	11.19 mg

ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	124.6 mg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	78.22 mg
MoO <sub>3</sub>	10.0 mg
Agua	100 ml

Tabla 6. Elementos traza

Los elementos traza se disolvieron en 10 ml de agua destilada (Tabla 6). Se preparó una solución de FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O en 10 ml de agua destilada esterilizada. Las sales DF (Tabla 5), junto con 0.1 ml de la solución de elementos traza y la solución de FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O se disolvieron en 1 L de agua destilada. Se esterilizó por 20 minutos a 15 lb y se vació en placas de forma aséptica. Se contaron todas las colonias que crecieron (Dworkin, Foster, 1958).

### Actinomicetos

Ingredientes	
Sacarosa	30.0 g
NaNO <sub>3</sub>	3.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.2 g
MgSO <sub>4</sub>	0.50 g
KCl	0.50 g
FeSO <sub>4</sub>	0.01 g
Agar	15.0 g
Agua	1000 ml

Tabla 7. Ingredientes del Agar de Czapek DOX

Se disolvieron 50 g del medio comercial Agar de Czapek-DOX (BD Bioxon) en 1 L de agua destilada (Tabla 7). Se esterilizó en autoclave a 15 lb durante 20 minutos. Se vació en placa en campana de flujo laminar. Se contaron todas las colonias que crecieron en el medio.

## Bacterias fijadoras de nitrógeno

Ingredientes	
Sacarosa	20.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
CaSO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.1 g
FeCl <sub>3</sub>	1.0 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	1.0 mg
Agar	15.0 g
Extracto de levadura	0.5 g
Agua	1000 ml

Tabla 8. Ingredientes para el medio ATCC 14

Se agregaron los componentes a agua destilada y se aforó a 1 L (Tabla 8). Se esterilizó en autoclave a 15 lb de presión durante 20 min y se vaciaron en placa en campana de flujo laminar. Se contaron todas las colonias que crecieron en el medio (Atlas, 2004).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Crecimiento de las plantas

El sustrato utilizado para el crecimiento de las plantas fue elaborado para permitir un buen desarrollo radicular y para un fácil manejo en su preparación y en la cosecha de las raíces. Es un sustrato con clase textural franco acrílico arenoso, con una densidad aparente de 1.5. Estas características son de importancia para un buen desarrollo radicular, que sea capaz de penetrar en el sustrato (Jones, 1983). Presenta un pH altamente alcalino (8.5) por lo que nutrientes como el Fósforo, Manganeso, Cobre y Zinc pueden estar poco disponibles para la planta. Además, presentó una baja capacidad de intercambio catiónico ( $8.43 \text{ Cmol (+) Kg}^{-1}$ ), que es su capacidad para retener e intercambiar cationes. Debido al origen de los componentes para el sustrato, este tiene muy poca materia orgánica (0.3%), Nutricionalmente es muy pobre con contenidos bajos de N, P y K, lo que permite un mejor control nutricional para promover un mejor desarrollo de las AM en condiciones de bajo fósforo. Por ello las fertilizaciones se realizaron con cada riego que se dio cada dos días. (Tabla 9).

Indicador	Metodología	Cantidad
Arena	Bouyoucos	70%
Limo	Bouyoucos	6%
Arcilla	Bouyoucos	24%
Porcentaje de saturación	Estimada	21%
Densidad Aparente	Probeta	$1.5 \text{ g/cm}^3$
pH	(1:2 Agua)	8.5
Materia Orgánica	Walkley y Black	0.3 %
Nitrógeno inorgánico total	Micro-Kjeldahl	2.3 mg/Kg

Fósforo disponible	Olsen	4.6 mg/Kg
Potasio intercambiable	Acetato de amonio	133.8 mg/Kg
Capacidad de intercambio catiónico	Estim. (Acidez interc. Y cationes interc.)	8.43 Cmol (+) Kg <sup>-1</sup>

Tabla 9. Resultados del análisis de propiedades físicas y químicas del sustrato empleado en las macetas.

En cuanto al desarrollo de las plantas éste se registró como el crecimiento de las plantas cada 5 días a partir de su emergencia, la cual varió entre los 4 y 6 días después de la siembra. Las plantas inoculadas con el consorcio tuvieron un mejor desarrollo, en el día de la cosecha las plantas con micorriza presentaron mayor área foliar ( $374.47 \text{ cm}^2 \pm 107.96$ ) que las plantas control ( $203.7 \text{ cm}^2 \pm 48.71$ ) (Figura 6). En la Figura 5 se muestran fotografías representativas de la parte aérea de la planta de los dos tratamientos.



Figura 5. Fotos de la parte aérea de los tratamientos a) control y b) consorcio

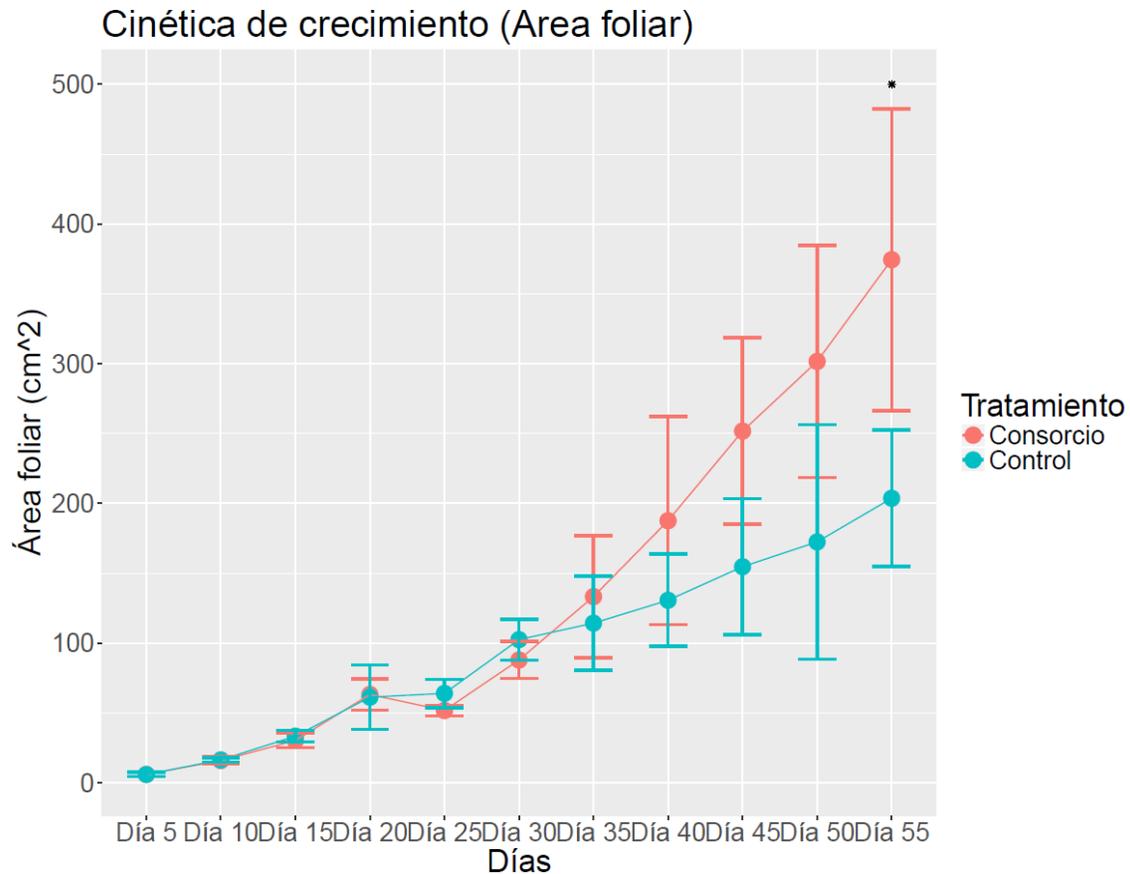


Figura 6. Desarrollo del área foliar. \* Diferencia significativa por ANOVA valor ( $p = 0.0279$ ).

El día de la cosecha se midieron otros parámetros agronómicos (Peso fresco y seco del follaje, volumen de la raíz, largo de la raíz y peso fresco y seco de la raíz) y contenido de clorofila como parámetro fisiológico, con los que se hizo un análisis de componentes principales para determinar el efecto de la micorriza en el crecimiento de la planta. En éste, el componente principal 1 (PC1) explica el 98.35% de la variabilidad entre los datos, mientras que el segundo componente explica (PC2) el 1.38%, juntos explican el 99.73%. La variable que mayor representa la variabilidad entre los datos es el área foliar que se correlaciona con el componente principal 1, dando grupos diferentes entre los tratamientos con y sin micorriza (Figura 7).

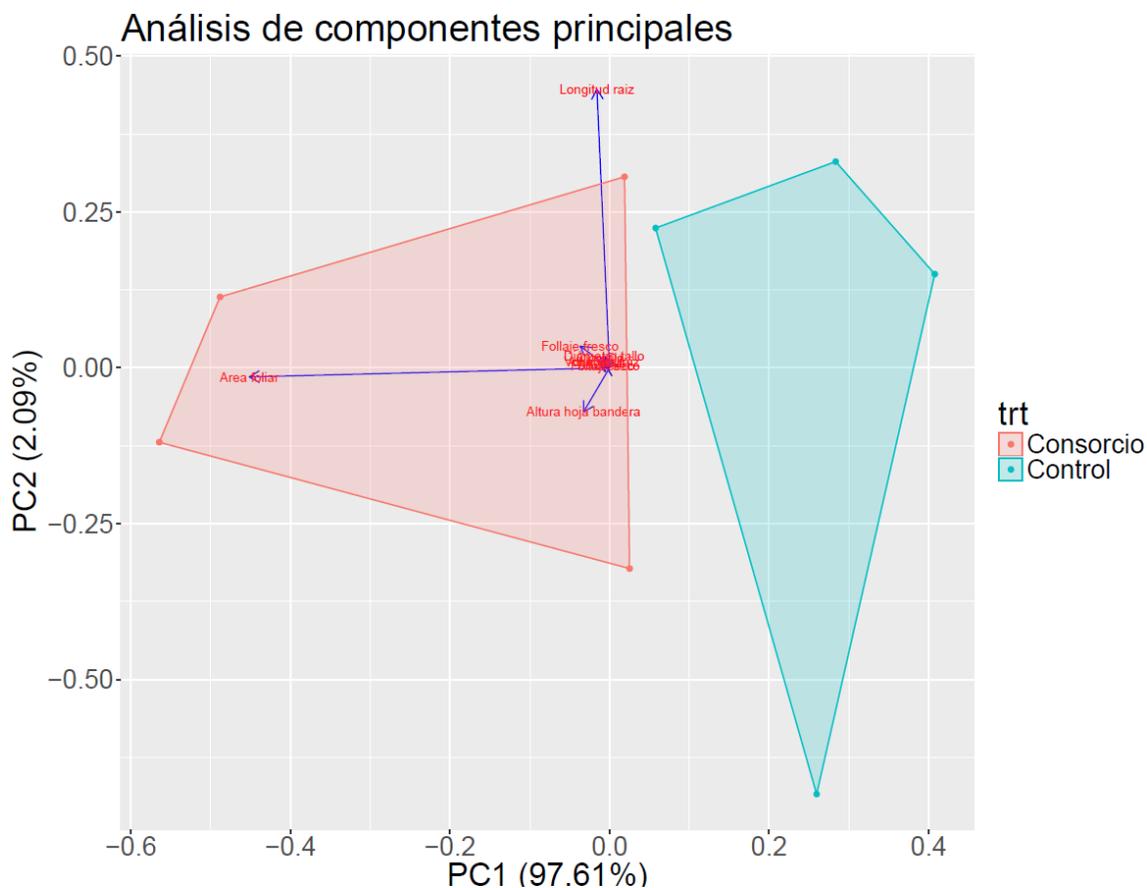


Figura 7. Análisis de componentes principales. Se muestran los datos agrupados por los tratamientos control y consorcio con polígonos convexos. Las flechas azules indican la correlación de las variables y su fuerza (tamaño).

## 6.2 Colonización de la raíz

Para confirmar la presencia de los hongos micorrízicos en las plantas inoculadas con el consorcio y la respectiva ausencia en los controles, se realizó un conteo en microscopio de sus estructuras (hifas, arbuscúlos y vesículas), determinado por la presencia/ausencia de estructuras (Figura 8). En las plantas control no se observó ninguna de las estructuras, mientras que en las plantas con consorcio presentaron hifas (68-88%), vesículas (8-32%) y arbuscúlos (59 – 76%) que son característicos de la simbiosis.

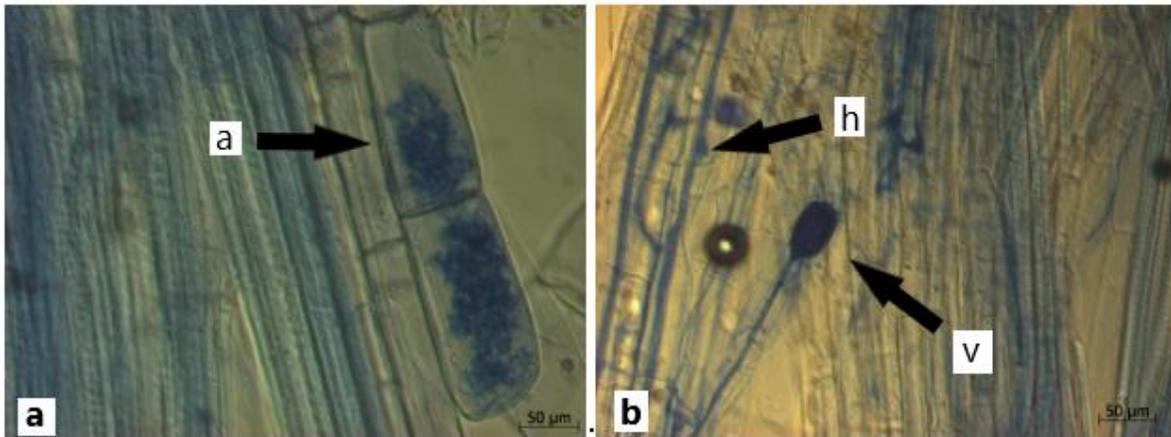


Figura 8. Estructuras vistas en el microscopio de plantas colonizadas por hongos micorrízicos arbusculares. a) a = arbusculos y b) h = hifas v= vesículas.

Para ver el efecto de la presencia de las diferentes estructuras de los hongos micorrízicos sobre el crecimiento de las plantas, se calculó el coeficiente de Pearson para ver su correlación y se realizaron modelos de regresión lineales simples. El porcentaje de presencia de las tres estructuras (Hifas, arbusculos y vesículas) tuvieron una correlación alta (0.78 – 0.83 coeficiente de correlación de Pearson) con el área foliar de las plantas, además de pendientes positivas y significativas realizadas por un modelo lineal (Figura 9 a-c). Por el otro lado, el porcentaje de ausencia de estructuras estuvo correlacionado negativamente (-0.71).

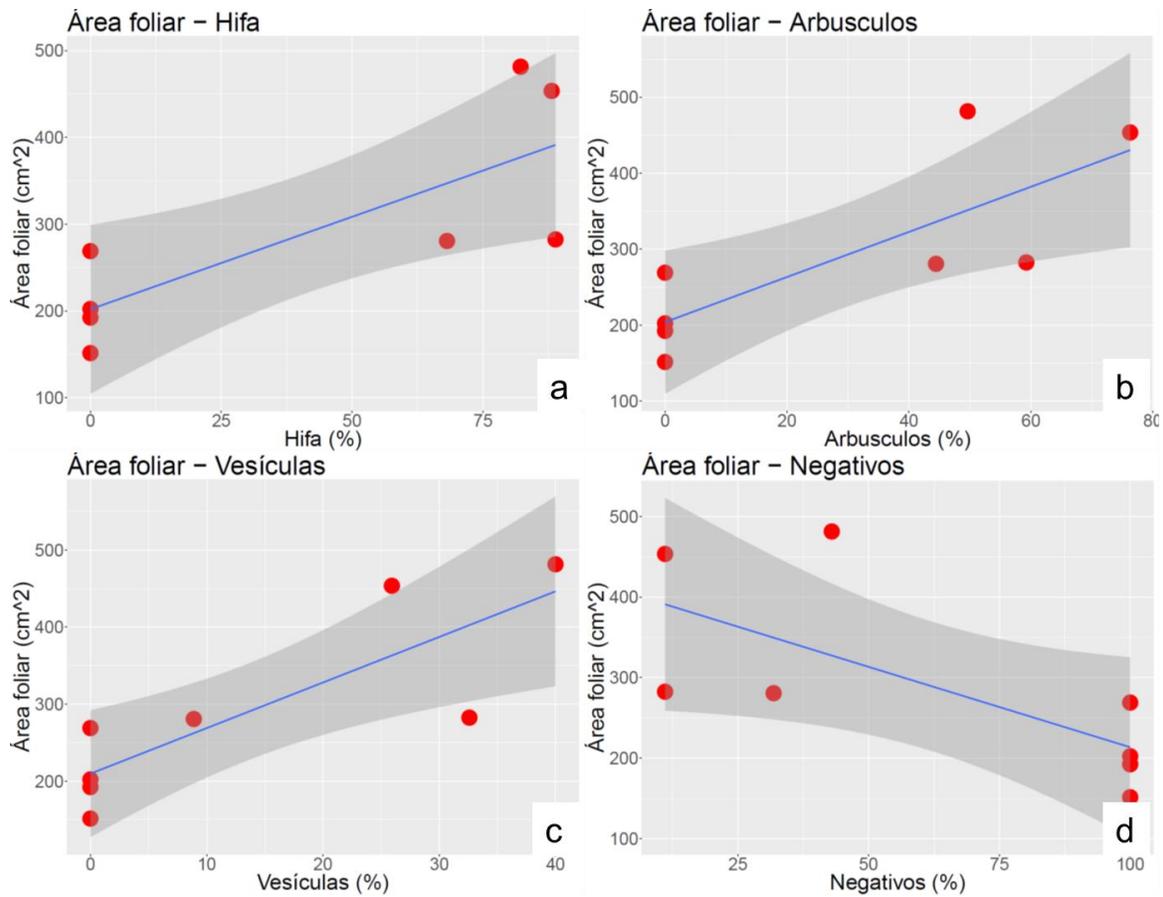


Figura 9. Regresión lineal del área foliar con las variables de colonización. a) Área foliar contra porcentaje de hifas en la raíz (valor  $p = 0.02194$ , pendiente = 158.48, coeficiente de Pearson = 0.7816), b) Área foliar contra porcentaje de arbusculos (valor  $p = 0.0191$ , pendiente = 201.35, coeficiente de Pearson = 0.7921), c) Área foliar – Vesículas (valor  $p = 0.01$ , pendiente = 328.35, coeficiente de Pearson = 0.8343), d) Área foliar – negativos, que se refiere a los puntos en donde no se observó ninguna estructura (valor  $p = 0.0471$ , pendiente = -145.64, coeficiente de Pearson = -0.7130).

### 6.3 Arquitectura de la raíz

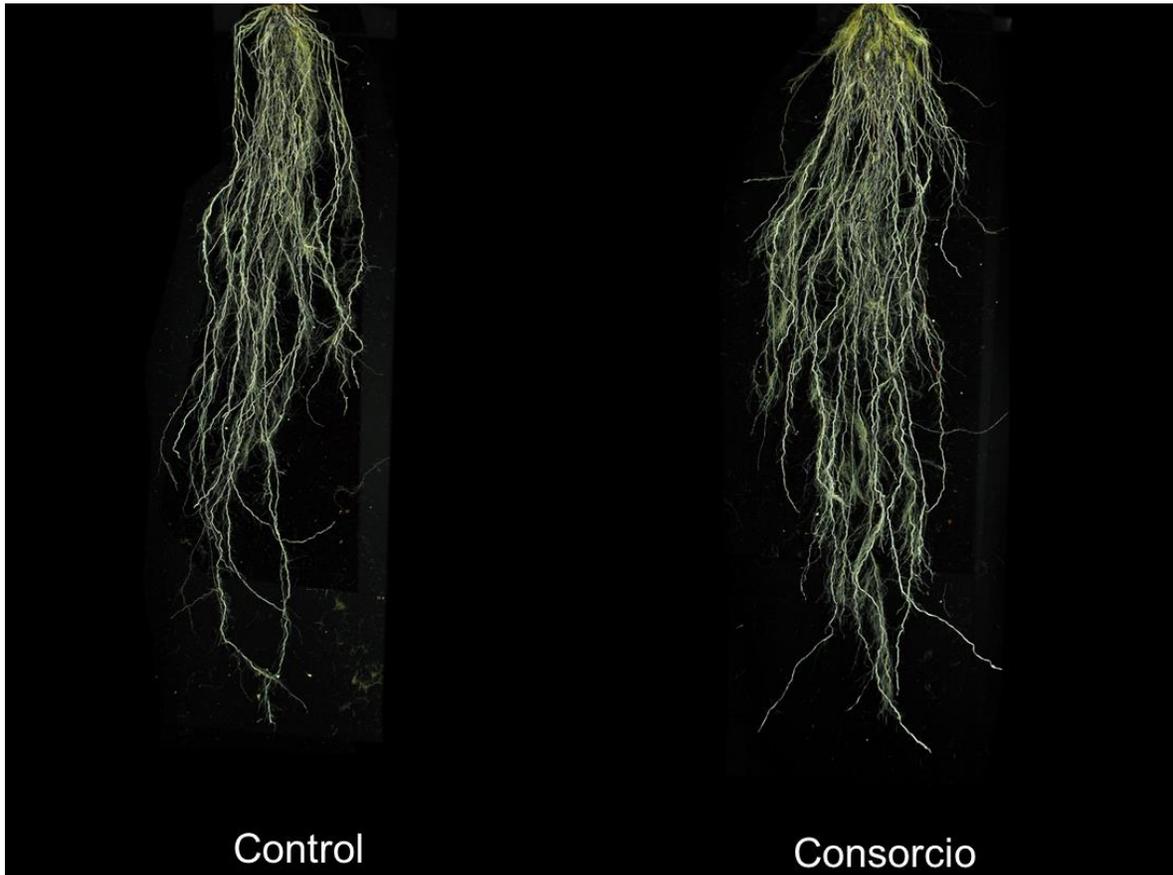


Figura 10. Fotos de las raíces introducidas al programa GiaRoots. Izquierda: plantas control; derecha: plantas micorrizadas.

Para comparar la arquitectura de la raíz se tomaron fotografías de las raíces en fondo negro y se analizaron por el programa GiaRoots (Figura 10). Las 20 variables de arquitectura de la raíz generadas fueron sometidas a un análisis de componentes principales. Los datos se agruparon por tratamiento. El componente principal 1 explicó el 85.57% de la variación entre los datos, mientras que el componente principal 2 el 11.35%, explicando un total de 96.92% de la variación. Las variables que se correlacionaron mejor fueron el área de la superficie, perímetro de la red radicular y área convexa de la red (Figura 11). Al analizar individualmente las variables, no mostraron diferencias significativas.

## Análisis de componentes principales

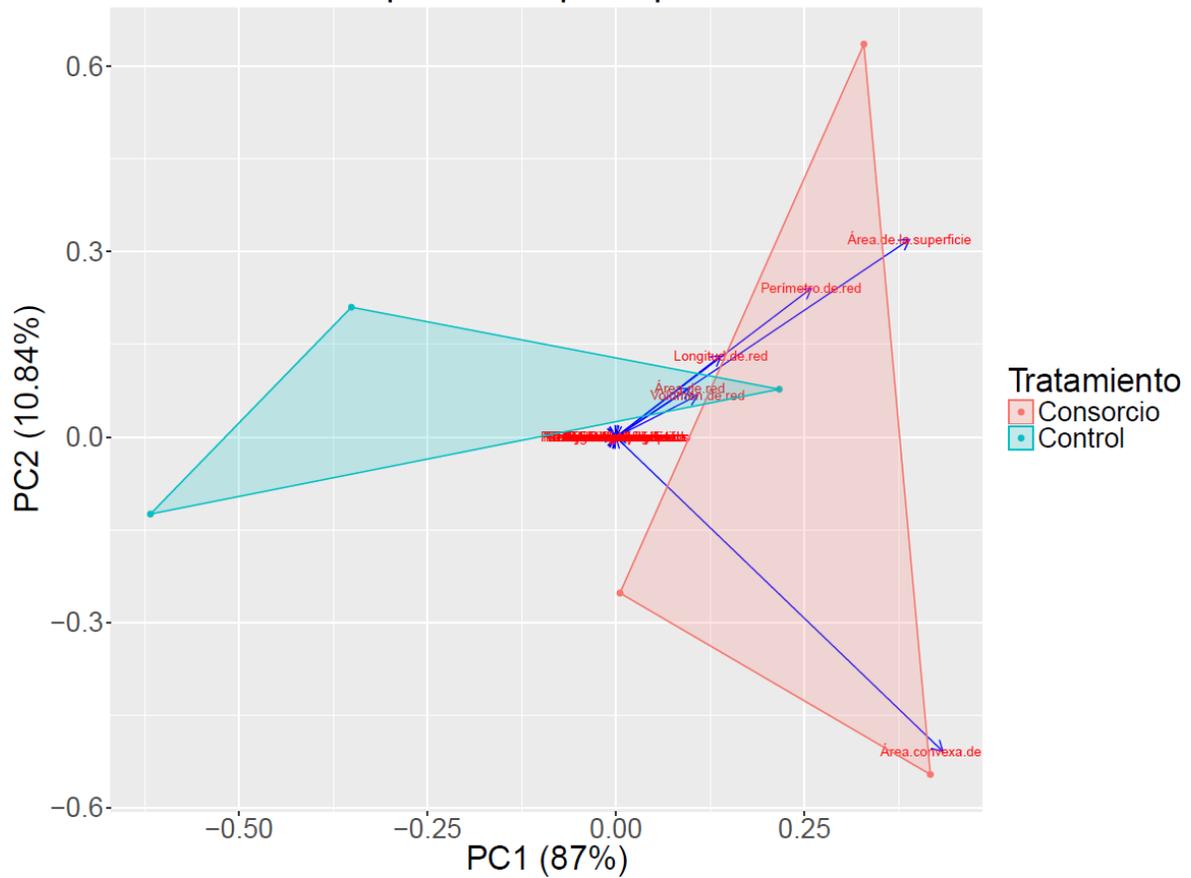


Figura 11. Análisis de componentes principales sobre las 20 variables de arquitectura de raíz. La agrupación se realizó para las plantas consorcio y sin micorriza. Las líneas azules representan vectores de coeficientes de influencia de cada variable.

## 6.4 Diversidad

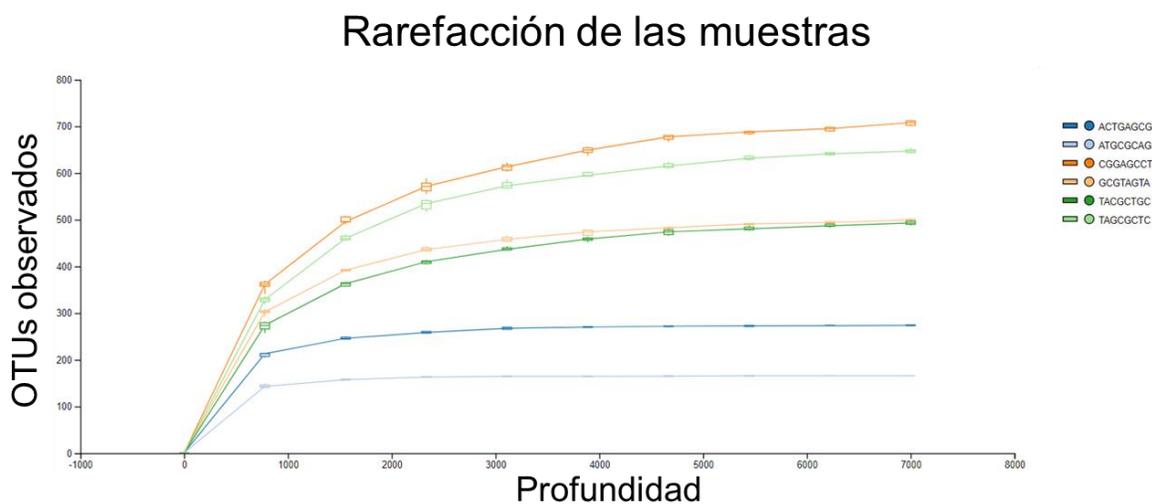


Figura 12. Diagrama de rarefacción de las 6 muestras secuenciadas mostrando el número de OTU's observados en diferentes profundidades (número de lecturas). Las muestras son representadas por la secuencia de identificación.

Como resultado de la secuenciación se obtuvieron 1,267,548 en total de las 6 muestras. Las secuencias ya estaban separadas por muestra gracias al sistema de doble índice de identificación. Después de los filtros de calidad quedaron 130,077 secuencias con las que se pudo hacer el árbol filogenético para el análisis de diversidad. La muestra con menos lecturas fue de 7,029.

Se evaluó la rarefacción de las secuencias (7000 pb) a través del número de OTUs para ver si realmente representan la riqueza que se puede obtener de la muestra. Las gráficas de las muestras llegaron a un punto máxima en la riqueza de OTUs por lo que se puede decir que la riqueza de cada muestra está bien representada (Figura 12). La riqueza de OTUs se refiere al número de OTUs encontrados en cada profundidad. Esto quiere decir que se cuenta con la información suficiente para describir la diversidad que realmente puede representar cada muestra. Por otro lado, si las muestras no hubieran llegado a un punto máximo, esto mostraría que el número de OTUs observados en la muestra no serían los suficientes para explicar la totalidad de su diversidad.

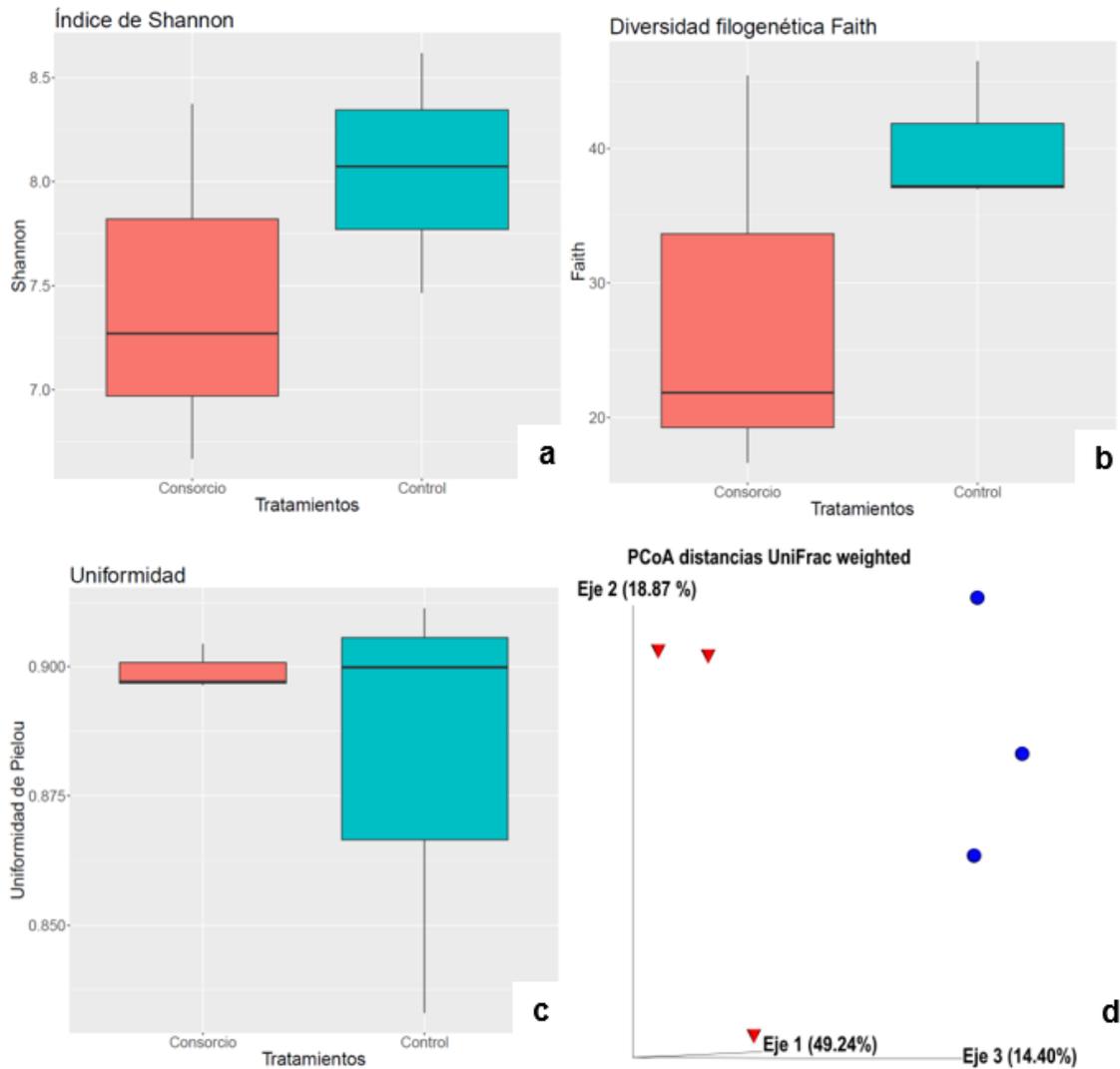


Figura 13. Análisis de diversidad. Índices de la diversidad alfa a) Índice de Shannon b) Diversidad filogenética de Faith y c) uniformidad de Pielou d) Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las distancias por UniFrac Weighted como análisis de la diversidad beta.

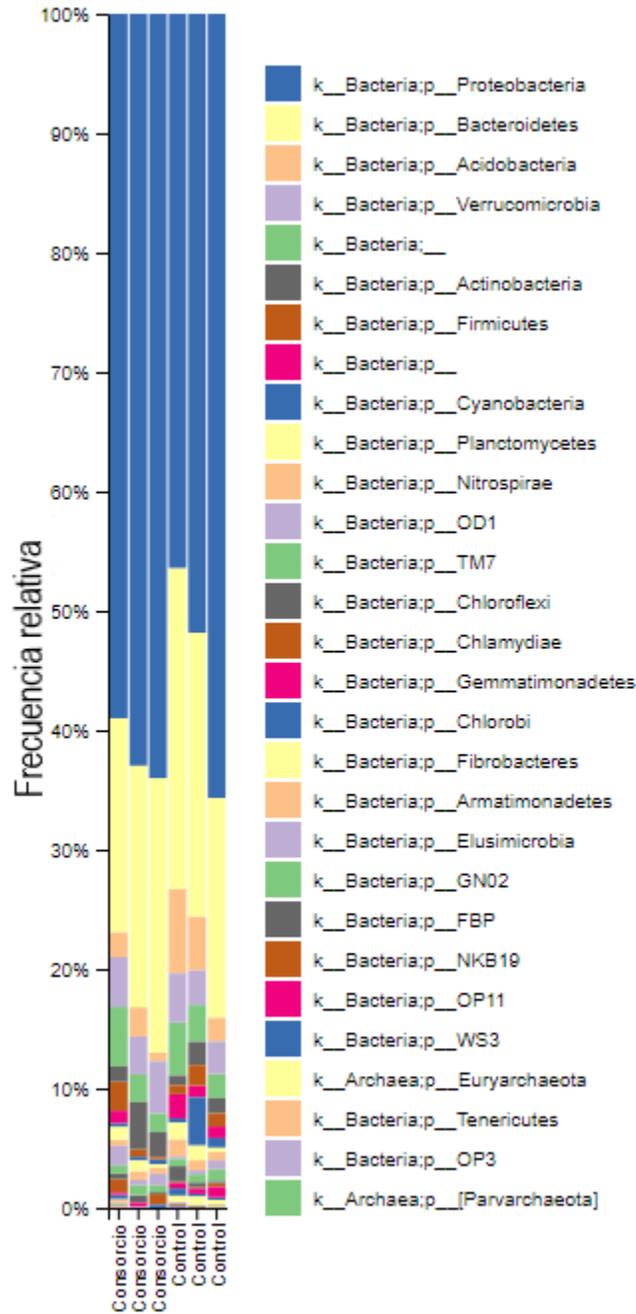


Figura 14. Frecuencias relativas de cada muestra a nivel de filo.

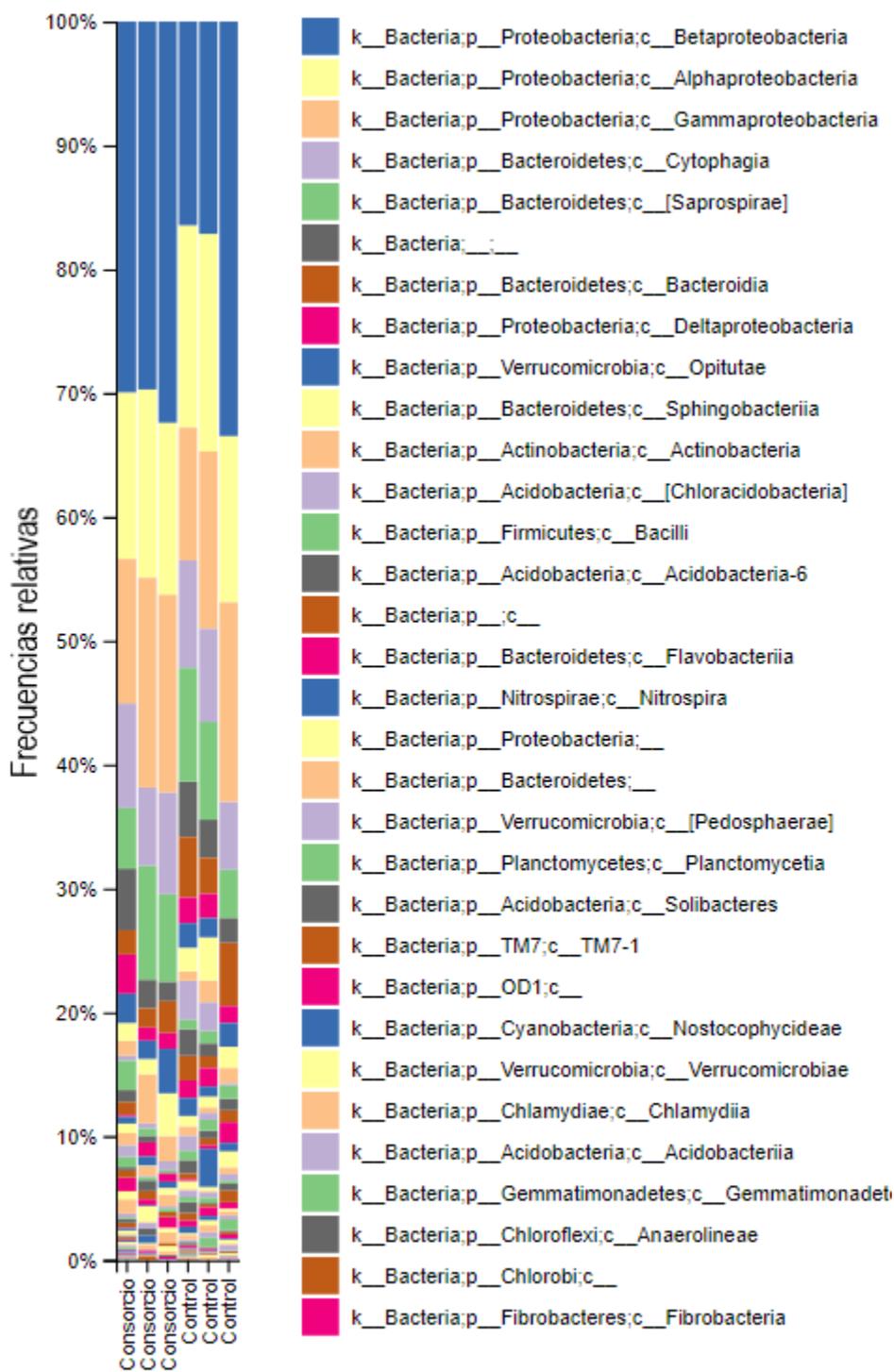


Figura 15. Frecuencias relativas de cada muestra a nivel de clase.

Para la diversidad alfa, se compararon los tratamientos por el índice de Shannon (Kruskal-Wallis, valor de  $p = 0.2752$ ), diversidad filogenética de Faith (Kruskal-Wallis, valor de  $p = 0.2752$ ) y la uniformidad de Pielou (Kruskal-Wallis, valor de  $p = 0.8272$ ) (Figura 13, a-c). Para la diversidad beta se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) de las distancias Unifrac weighted para ver los grupos que se formaron, en donde eje 1 (49.24%), eje 2 (18.87%) y eje 3 (14.40%) representan el 82.51% de la variación entre los datos (Figura 13, d).

Las clases más abundantes en las muestras fueron Betaproteobacteria (26.5%), Alphaproteobacteria (14.9%) y Gammaproteobacteria (14.2%). La prueba de abundancia diferencial (ANCOM) solo dio la clase Fibrobacteria con más abundancia en el control (Figura 14-15).

## 6.5 Abundancia microbiana

Se evaluó parte de la microbiota cultivable para lo cual, se comparó la abundancia de bacterias entre los tratamientos se hicieron medios específicos para bacterias productoras de acc desaminasa (medio ACC), géneros de bacterias fijadoras del nitrógeno como *Azotobacter* (medio ATCC), *Pseudomonas fluorescens* como bacterias promotoras de crecimiento (medio B de King), Actinomicetos como degradadores de materia orgánica (medio Czapek), bacterias productoras de sideróforos (medio CAS) y bacterias solubilizadoras de fósforo (medio NBRIP).

La abundancia bacteriana medida como UFC de la rizosfera de las plantas control presentaron una mayor variación en los datos, siendo mas evidente en el medio ATCC. Solo en el medio B de King se vio una disminución significativa ( $p = 0.0497$ ) de las UFC aisladas de plantas con micorriza (Figura 16 c). Para las gráficas de los medios ATCC y Czapek se pueden ver tendencias de un mayor numero de UFC en plantas inoculadas con el consorcio (Figura 16 b,e), mientras que en el medio NBRIP a disminuir (Figura 16 f). Para el medio ACC no se observan diferencias (Figura 15 a).

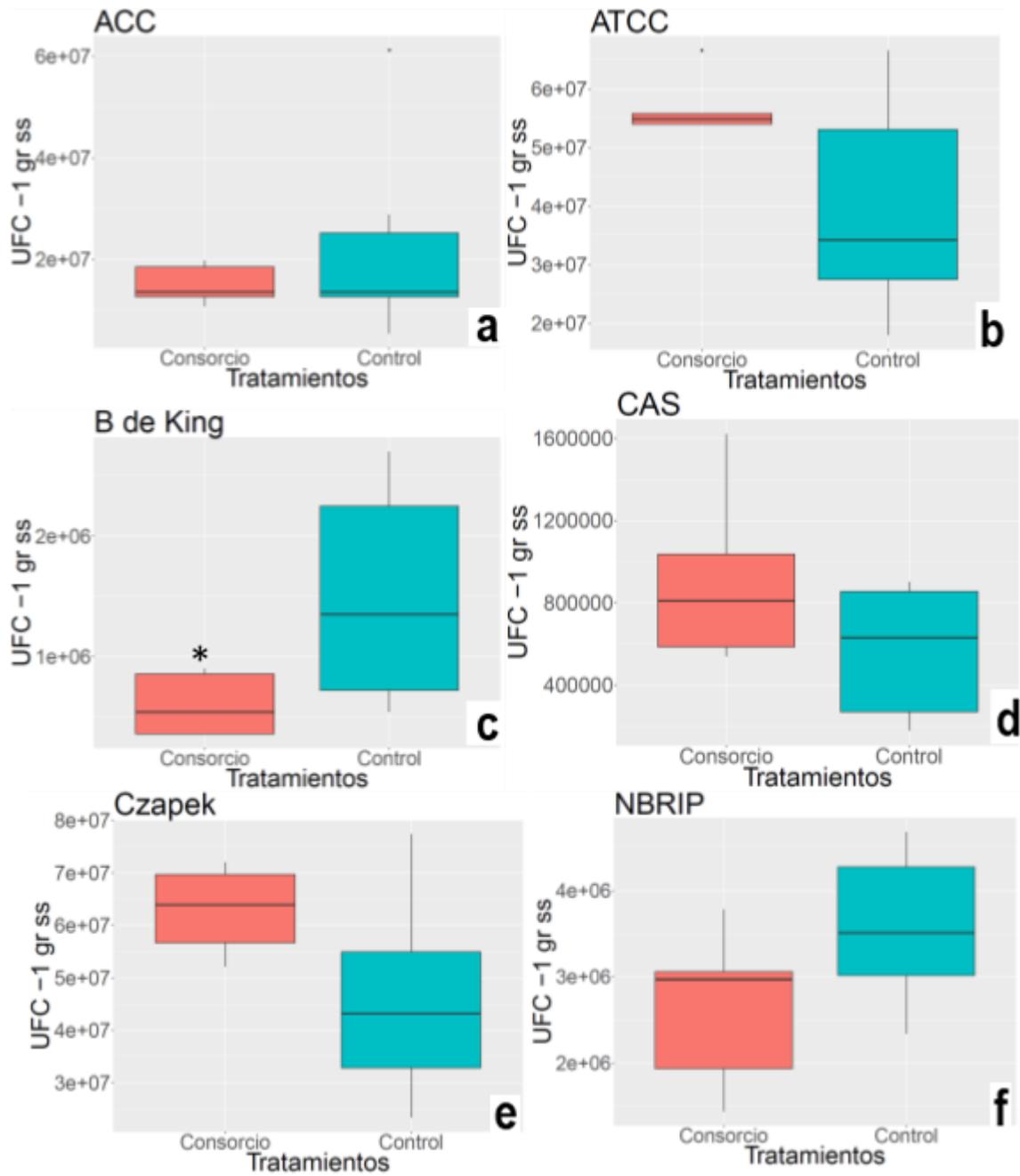


Figura 16 Abundancia de colonias. UFC -1 g ss de los medios específicos. a) ACC, b) ATCC, c) B King, d) Czapek (\* ANOVA,  $p = 0.0497$ ), valor e) CAS f) NBRIP.

## 7 DISCUSIONES

En este estudio se pudo confirmar el efecto positivo de la presencia de la asociación micorrízica de un consorcio comercial de hongos micorrízicos arbusculares sobre el área foliar como un indicador del crecimiento de las plantas de maíz (B73) en condiciones de bajo fósforo (Figura 6). Ya ha sido ampliamente reportado el beneficio de las asociaciones arbusculares para las plantas en donde cabe resaltar su importancia ecológica y agronómica en la toma de nutrientes para la planta hospedera, principalmente el fósforo, además de otros minerales (incluyendo K, S, N, Zn y Cu) y agua, por otra parte, la planta le regresa beneficios de los fotosintatos, como la glucosa (Marschner & Dell, 1994; Smith & Read, 2008). Además, la ausencia de la ácido graso sintasa tipo I (FAS-I) en hongos MA y una inducción en el metabolismo de lípidos de la planta, sugiere un rol importante de los lípidos en la nutrición del hongo.

Sawers *et al.*, (2017) observaron un incremento en el peso seco de la parte aérea de la planta de B73 en presencia de *Funneliformis mosseae*. Sin embargo, existieron otras líneas de 30 evaluadas con mayores incrementos como la Oh43. Esto sugiere que depende de los genotipos de maíz la respuesta y que ésta es muy variable. Por lo que, es indispensable evaluar más genotipos para tener un panorama amplio de la respuesta de maíz a la inoculación con hongos micorrízicos. Por otra parte, en un estudio realizado por Battini *et al.* (2017) vieron que al inocular maíz con *R. irregularis* produce respuestas en el crecimiento de la planta, sin embargo, al inocular con cepas bacterianas aisladas de esporas del mismo hongo, observaron que algunas de ellas pueden incrementar la toma y translocación de P. Con lo anterior, se puede ver que hay indicios de una interacción recíproca entre las bacterias y la micorriza que ayudan a un mejor aprovechamiento de los recursos para estimular el crecimiento de la planta.

Otros efectos de las micorrizas sobre las plantas se pueden observar en la estructura de la raíz. En un análisis de la respuesta de hongos micorrízicos en 5

pastos se demostró un efecto benéfico de la simbiosis con *Glomus* sp. en la adquisición de P. Este efecto estuvo inversamente correlacionado con el largo de los pelos radiculares de la planta hospedera, pero sin correlación con el diámetro radicular, largo de la raíz por planta o la proporción raíz-brote (Schweir *et al.*, 1995). En maíz (línea cv CO6) inoculada con *Scutellospora calospora* y fertilizado con roca fosfórica, la asociación micorrízica propició un cambio en el crecimiento y la arquitectura de la raíz. Aumentó significativamente la longitud total de la raíz, el número de raíces a diferentes niveles y el diámetro de los pelos radiculares (Priyadharsini & Muthukumar, 2017).

En el presente trabajo, uno de los aspectos analizados fue el efecto de la micorriza sobre la arquitectura de la raíz con la ayuda del programa GiaRoots lo que permite el análisis a través de fotografías. En las variables medidas no se encontraron diferencias significativas, sin embargo, las muestras se pudieron agrupar por medio de un análisis de componentes principales, lo que puede estar dado por un cambio en la arquitectura debido a los tratamientos, en donde las variables que tuvieron más influencia sobre la varianza de los datos fueron área convexa de la red, área de la superficie y perímetro de la red (Figura 7). En general, la micorriza puede estar promoviendo una mayor exploración en la raíz que le puede servir a la planta para tener un mejor crecimiento. Sin embargo, se propone un aumento en las repeticiones para bajar la varianza de los datos y ver efectos más claros en las variables medidas para la arquitectura de la raíz para confirmar el efecto.

Los efectos sobre las plantas han sido evidentes, sin embargo, efectos sobre el microbioma parecen ser sugeridos y falta una estrategia que pueda integrar cómo es que los cambios que se propician por la asociación en la rizosfera puedan beneficiar a la planta. Por ejemplo, estudios previos se ha visto que aumentar el número de propágulos inoculados de *R. irregularis* en plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* L) la riqueza catabólica y la uniformidad catabólica como indicadores de la diversidad funcional microbiana, aumentaron en un suelo previamente esterilizado. Esta diversidad funcional microbiana del suelo se midió con los patrones catabólicos

*in situ* a través de la respiración en presencia de 29 sustratos entre los que había aminoácidos, aminas, carbohidratos, amidas y ácidos carboxílicos (Dabire *et al.*, 2007). Sin embargo, es poco lo que se discute sobre como puede estarse beneficiando la planta por los cambios propiciados en la funcionalidad del microbioma, por ello se propone la metagenómica como una herramienta para ver los cambios que propicia la asociación micorrízica sobre los grupos bacterianos que colonizan la raíz, complementando con un análisis funcional del crecimiento de comunidades bacterianas relevantes para el crecimiento de la planta.

Para analizar la diversidad del microbioma se han usado diferentes regiones hipervariables del gen ribosomal pequeño 16 S según la procedencia y el objetivo de la muestra. En el caso del maíz, al secuenciar diferentes regiones, la región V3-V4 tiene un mayor rendimiento en la diversidad capturada en los niveles filogenéticos bacterianos, comparado con otras regiones como la V1-V2, que es específica del dominio bacteriano, en donde se tuvo una en una baja amplificación de miembros del filo Verrumcomicrobia, conocido por ser dominante en el suelo. (Peiffer *et al.*, 2013). En este trabajo se puede descartar los problemas de diversidad dentro de las muestras ya que los datos de rarefacción muestran que la diversidad fue bien capturada en cada muestra usando la región V3 – V4 ribosomal (Figura 11).

En el análisis de diversidad se calculó la diversidad alfa para comparar la diversidad de cada muestra. En el experimento realizado por Dabire (2007), se analizaron los índices de riqueza y uniformidad ya que proporcionan información específica de la diversidad alfa de las muestras en donde se tuvo una mayor uniformidad y riqueza catabólica en presencia de la micorriza. En el presente trabajo, el índice de Shannon y la riqueza de OTUs mostraron una disminución en la diversidad en presencia de la micorriza, lo que puede indicar que con una menor presencia de OTUs, la asociación puede propiciar una mayor riqueza en su capacidad catabólica. En la uniformidad se presentó una mayor variación en los datos del control que la

micorriza, lo que nos puede decir que la planta puede estar regulando la abundancia de los diferentes grupos bacterianos para que sean más uniformes (Figura 12).

Una de las desventajas que presenta el análisis del microbioma es la robustez debido a la gran cantidad de datos que se generan al realizar la secuenciación masiva del gen 16S. Por ejemplo, al realizar un análisis de los grupos que se encuentran con mayor presencia entre los tratamientos en diferentes niveles taxonómicos, solo se encontró un aumento del filo Fibrobacteria en los controles, un filo importante en la degradación de celulosa (Ransom-Jones *et al.*, 2012). Sin embargo, también es de interés ver el comportamiento de niveles taxonómicos más bajos, analizando aquellos grupos que puedan ser de interés agronómico. En la sección de anexos se presentan las frecuencias de los órdenes Bacillales y Pseudomonadaceae como ejemplos, en donde se puede ver una tendencia a cambiar su frecuencia relativa por la presencia de la micorriza. Para beneficiar los análisis taxonómicos y de diversidad se puede plantear un experimento más grande en donde se incluyan más factores que puedan influir en las interacciones planta-hongo micorrízico-bacteria, con lo que se puede aumentar la información de las bacterias presentes bajo diferentes condiciones de interés para la planta.

Para hacer un análisis de cambios funcionales se midió la presencia de diferentes grupos bacterianos en UFC en medios selectivos que pueden ser de relevancia en el crecimiento de la planta. En un estudio realizado con ectomicorrizas con *Uapaca* sp. se compararon las poblaciones de pseudomonas fluorescentes por su capacidad de mejorar el crecimiento de la planta con diferentes estrategias como la producción de lipasas y la solubilización de fosforo en diferentes zonas de la asociación micorrízica y el resto del suelo no influenciado por la planta o el hongo. En la rizósfera, micorrizósfera y la hifósfera (sitio del suelo en donde solo influyen las hifas de los hongos micorrízicos) hubo un mayor número de pseudomonas fluorescentes ( $1.4 - 2.1 \times 10^4$  UFC gr ss) que en el resto del suelo ( $0.3 \times 10^4$  UFC gr ss). Específicamente en la hifosfera se presentó la mayor cantidad de estas bacterias. Además, al comparar su funcionalidad se encontró que en la hifosfera había un cambio en su capacidad para solubilizar ortofosfato tricálcico y para

producir lipasas (Ramanankierana *et al.*, 2006). En este trabajo se agregaron 5 grupos; bacterias fijadoras de nitrógeno (ATCC), productoras de ACC desaminasa (ACC), utilizadoras de fósforo (NBRIP), degradadoras de materia orgánica (Czapek) y productoras de sideróforos (CAS). Se observó una aparente disminución significativa en UFC de pseudomonas fluorescentes en la rizosfera de las plantas micorriza. También se pudo ver una tendencia a aumentar para fijadores de nitrógeno (ATCC) y degradadores (Czapek). Un efecto interesante se encontró en la disminución de colonias de bacterias solubilizadoras de fósforo, de las que se ya ha sido reportado su presencia en la hifósfera (Taktek *et al.*, 2015), sin embargo la asociación podría estar regulando la cantidad de UFC debido a la presencia de una fuente soluble en la solución nutritiva para regar las plantas, mientras que los mecanismos de este grupo sirven para solubilizar fuentes insolubles de fosforo como la roca fosfórica (Rodríguez & Fraga, 1999) (Figura 15). Estos resultados dan un soporte a la estrategia que pueden seguir las plantas con el consorcio para mantener una uniformidad microbiana, regulando la cantidad de colonias que colonizan la rizosfera de diferentes grupos bacterianos. Para comprender la finalidad de esta regulación, se debe evaluar la eficiencia de las bacterias aisladas. Además, La asociación micorrízica puede estar propiciando una regulación en el número de colonias que están colonizando la micorrizósfera, beneficiando a la planta en una mayor eficiencia en la energía a través de los exudados para mantener las poblaciones bacterianas.

La variación de los datos vistos en los controles es poco discutida en la literatura, pero puede significar la regulación de las comunidades bacterianas en la raíz de la asociación micorrízica. Por ejemplo, la variación en los controles en el conteo de la abundancia de colonias (Figura 15) y en la uniformidad de OTUs (Figura 12 c) puede representar la capacidad por la planta para aumentar la biomasa en la rizosfera de manera inespecífica, mientras que la disminución en la variación podría ser por una selección específica por la asociación micorrízica para un mejor aprovechamiento de los exudados. Para responder esta hipótesis se debe comparar los exudados de la raíz, así como la eficiencia de las bacterias presentes en la micorrizósfera.

Como un resumen de este trabajo se puede decir que la planta con la presencia de la asociación micorrízica, puede estar modificando la diversidad y la cantidad de bacterias que colonizan la micorrizosfera como una de las estrategias para tener un mayor beneficio en el crecimiento de la planta. Sin embargo, es necesario llevar a cabo más estudios para describir de una mejor manera en que las interacciones se están llevando a cabo y cuáles son los factores que están involucrados.

Con la información recopilada se propone seguir los estudios para describir de una mejor manera la ecología de las interacciones planta-microorganismo que pueden beneficiar a la planta con un mayor crecimiento con el fin de alcanzar el conocimiento necesario para llevar sistemas de producción con una mayor sustentabilidad en la que se incluya mejorar la biodiversidad de los suelos y la salud de la planta, así como también el beneficio económico a través del tiempo. Esto se puede realizar analizando el crecimiento de las comunidades bajo diferentes tipos de estrés para comprender mejor su respuesta específica en diferentes condiciones, con lo que también pueda beneficiar los análisis de diversidad.

Se propone implementar más estrategias para la identificación previa de los inóculos que puede ser llevada a cabo también a partir del gen ribosomal (Lee et al., 2008). También se puede trabajar con especies con más información publicada como es el caso de *R. irregularis*. Con esto también se podría analizar el efecto que pueda tener la interacción que pueda existir entre diferentes filos de hongos micorrízicos y con la planta para tener un mejor beneficio.

## **8 CONCLUSIONES**

- Al evaluar el efecto de la asociación micorrízica en maíz B73 sobre la diversidad del microbioma del suelo que coloniza la micorriza se encontró que la asociación propicia cambios en la diversidad alfa y beta de las muestras, así como en la abundancia de diferentes grupos bacterianos

- En la estimación del comportamiento del desarrollo de la planta se observó un mayor desarrollo en las plantas inoculadas con el consorcio. También la arquitectura de la raíz también puede verse modificada en lo general, sin embargo, son necesarios más datos para observar diferencias específicas.
- Se presentaron cambios en la abundancia de diferentes grupos bacterianos cultivables con la micorriza que pueden propiciar cambios en la diversidad y estructura microbiana de la micorrizósfera.
- Se determinó que la asociación micorrízica propicia cambios en la diversidad del microbioma de la rizósfera, con una mayor riqueza de OTUs en los controles. Para la diversidad beta se pudieron agrupar los tratamientos en grupos diferentes. El filo Fibrobacteria tuvo una mayor presencia en las plantas control.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

- 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. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2010.08.029>
- Alves-de-Souza, C., Pecqueur, D., Le Floc'h, E., Mas, S., Roques, C., Mostajir, B., & Guillou, L. (2015). Significance of Plankton Community Structure and Nutrient Availability for the Control of Dinoflagellate Blooms by Parasites: A Modeling Approach. *PLOS ONE*, 10(6), e0127623. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127623>
- Atlas, R. M. (2004). *Handbook of microbiological media*. CRC Press.
- Badri, D. V, Quintana, N., Kassis, E. G. El, Kim, H. K., Choi, Y. H., Sugiyama, A., & Vivanco, J. M. (2009). An ABC Transporter Mutation Alters Root Exudation of Phytochemicals That Provoke an Overhaul of Natural Soil Microbiota 1[C][W][OA]. <https://doi.org/10.1104/pp.109.147462>
- Bansal, M., & Mukerji, K. G. (1994). Positive correlation between VAM-induced changes in root exudation and mycorrhizosphere mycoflora. *Mycorrhiza*, 5(1), 39–44. <https://doi.org/10.1007/BF00204018>
- Battini, F., Grønlund, M., Agnolucci, M., Giovannetti, M., & Jakobsen, I. (2017). Facilitation of phosphorus uptake in maize plants by mycorrhizosphere bacteria. *Scientific Reports*, 7(1), 4686. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04959-0>
- Birtel, J., Walser, J.-C., Pichon, S., Bürgmann, H., & Matthews, B. (2015). Estimating Bacterial Diversity for Ecological Studies: Methods, Metrics, and Assumptions. *PLOS ONE*, 10(4), e0125356. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125356>
- Bouffaud, M.-L., Poirier, M.-A., Muller, D., & Moënne-Loccoz, Y. (2014). Root microbiome relates to plant host evolution in maize and other Poaceae. *Environmental Microbiology*, 16(9), 2804–2814. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12442>
- Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppi, K., Ver Loren van Themaat, E., Ahmadinejad, N., Assenza, F., & Schulze-Lefert, P. (2012). Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*, 488(7409), 91–95.

<https://doi.org/10.1038/nature11336>

Çakmakçı, R., Dönmez, F., Aydın, A., & Şahin, F. (2006). Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, *38*(6), 1482–1487. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2005.09.019>

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, *13*(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

Chaparro, J. M., Sheflin, A. M., Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2012). Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biology and Fertility of Soils*, *48*(5), 489–499. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0691-4>

Cohen, A. C., Bottini, R., Pontin, M., Berli, F. J., Moreno, D., Boccanlandro, H., & Piccoli, P. N. (2015). *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. *Physiologia Plantarum*, *153*(1), 79–90. <https://doi.org/10.1111/ppl.12221>

Dabire, A. P., Hien, V., Kisa, M., Bilgo, A., Sangare, K. S., Plenchette, C., & Duponnois, R. (2007). Responses of soil microbial catabolic diversity to arbuscular mycorrhizal inoculation and soil disinfection. *Mycorrhiza*, *17*(6), 537–545. <https://doi.org/10.1007/s00572-007-0126-5>

Degens, B. P., Schipper, L. A., Sparling, G. P., & Vojvodic-Vukovic, M. (2000). Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, *32*(2), 189–196. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00141-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00141-8)

Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., & Okon, Y. (2003). Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *22*(2), 107–149. <https://doi.org/10.1080/713610853>

Dopheide, A., Lear, G., He, Z., Zhou, J., & Lewis, G. D. (2015). Functional Gene Composition, Diversity and Redundancy in Microbial Stream Biofilm Communities. *PLOS ONE*, *10*(4), e0123179. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123179>

Dworkin, M., & Foster, J. W. (1958). Experiments with some microorganisms which

utilize ethane and hydrogen. *Journal of Bacteriology*, 75(5), 592–603. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13538930>

Faith, D. P. (1992). Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation*, 61(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(92\)91201-3](https://doi.org/10.1016/0006-3207(92)91201-3)

Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., & Toulmin, C. (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5967), 812–818. <https://doi.org/10.1126/science.1185383>

Gupta, M. M., Aggarwal, A., & Asha. (2018). From Mycorrhizosphere to Rhizosphere Microbiome: The Paradigm Shift (pp. 487–500). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75910-4\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75910-4_20)

Hamady, M., & Knight, R. (2009). Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Research*, 19(7), 1141–1152. <https://doi.org/10.1101/gr.085464.108>

Hiltner, L. (1904). Über neuer erfahrungen und probleme auf dem gebiet der bodenbakteriologie unter besonderer berücksichtigung der gründung und brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen*, 32:1405–1417.

Johnston-Monje, D., Lundberg, D. S., Lazarovits, G., Reis, V. M., & Raizada, M. N. (2016). Bacterial populations in juvenile maize rhizospheres originate from both seed and soil. *Plant and Soil*, 405(1–2), 337–355. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2826-0>

Jones, C. A. (1983). Effect of Soil Texture on Critical Bulk Densities for Root Growth1. *Soil Science Society of America Journal*, 47(6), 1208. <https://doi.org/10.2136/sssaj1983.03615995004700060029x>

Kamilova, F., Kravchenko, L. V, Shaposhnikov, A. I., Azarova, T., Makarova, N., & Lugtenberg, B. (2006). Organic Acids, Sugars, and L-Tryptophane in Exudates of Vegetables Growing on Stonewool and Their Effects on Activities of Rhizosphere Bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI*, 19(3), 250–256. <https://doi.org/10.1094/MPMI>

King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical*

*Medicine*, 44(2), 301–307. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13184240>

Lambers, H., Mougel, C., Jaillard, B., & Hinsinger, P. (2009). Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant and Soil*, 321(1–2), 83–115. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0042-x>

Lee, J., Lee, S., & Young, J. P. W. (2008). Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 65(2), 339–349. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00531.x>

Linderman, R. G. (n.d.). *The mycorrhizosphere phenomenon*. Retrieved from [http://genesis-soils.com/mycorrhizosphere\\_phenomenon.pdf](http://genesis-soils.com/mycorrhizosphere_phenomenon.pdf)

Liu, C.-Y., & Wu, Q.-S. (2016). Responses of Plant Growth, Root Morphology, Chlorophyll and Indoleacetic Acid to Phosphorus Stress in Trifoliate Orange. *Biotechnology(Faisalabad)*, 16(1), 40–44. <https://doi.org/10.3923/biotech.2017.40.44>

Louden, B. C., Haarmann, D., & Lynne, A. M. (2011). Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 12(1), 51–53. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v12i1.249>

Lozupone, C. A., Hamady, M., Kelley, S. T., & Knight, R. (2007). Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1576–1585. <https://doi.org/10.1128/AEM.01996-06>

Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., ... Dangl, J. L. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, 488(7409), 86–90. <https://doi.org/10.1038/nature11237>

Marschner, H., & Dell, B. (1994). Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*, 159(1), 89–102. <https://doi.org/10.1007/BF00000098>

McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L., & Swan, J. A. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 115(3), 495–501. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x>

Mohammadi, K. (2012). Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms

and Their Role in Crop Production. *Resources and Environment*, 2012(1), 80–85. <https://doi.org/10.5923/j.re.20120201.10>

Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265–270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>

Neri-Luna, C., & Villarreal-Ruíz, L. (2012). Simbiosis micorrícica: un análisis. In L. Huerta Martínez, FM , Castro Félix (Ed.), *Interacciones Ecológicas* (pp. 37–61). Guadalajara. <https://doi.org/0.13140/2.1.3829.5361>

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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302837110>

Pielou, E. C. (1966). The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology*, 13, 131–144. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(66\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0022-5193(66)90013-0)

Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLoS ONE*, 5(3), e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>

Priyadharsini, P., & Muthukumar, T. (2017). Arbuscular mycorrhizal fungus influence maize root growth and architecture in rock phosphate amended tropical soil. *Anales de Biología*, 39, 211–222. <https://doi.org/10.6018/analesbio.39.22>

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., & Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>

Raaijmakers, J. M. (2015). The Minimal Rhizosphere Microbiome. In *Principles of Plant-Microbe Interactions* (pp. 411–417). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3\\_43](https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3_43)

Ramanankierana, N., Rakotoarimanga, N., Thioulouse, J., Kisa, M., Randrianjohany, E., Ramaroson, L., & Duponnois, R. (2006). The Ectomycorrhizosphere Effect Influences Functional Diversity of Soil Microflora. *International Journal of Soil Science*, 1(1), 8–19.

<https://doi.org/10.3923/ijss.2006.8.19>

Ransom-Jones, E., Jones, D. L., McCarthy, A. J., & McDonald, J. E. (2012). The Fibrobacteres: an Important Phylum of Cellulose-Degrading Bacteria. *Microbial Ecology*, 63(2), 267–281. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9998-1>

Rich, M. K., Nouri, E., Courty, P.-E., & Reinhardt, D. (2017). Diet of Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Bread and Butter? *Trends in Plant Science*, 22(8), 652–660. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2017.05.008>

Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4–5), 319–339. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)

Saravanakumar, D., Lavanya, N., Muthumeena, B., Raguchander, T., Suresh, S., & Samiyappan, R. (2008). *Pseudomonas fluorescens* enhances resistance and natural enemy population in rice plants against leaf folder pest. *Journal of Applied Entomology*, 132(6), 469–479. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2008.01278.x>

Saubidet, M. I., Fatta, N., & Barneix, A. J. (2002). The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. *Plant and Soil*, 245(2), 215–222. <https://doi.org/10.1023/A:1020469603941>

Sawers, R. J. H., Svane, S. F., Quan, C., Grønlund, M., Wozniak, B., Gebreselassie, M.-N., & Paszkowski, U. (2017). Phosphorus acquisition efficiency in arbuscular mycorrhizal maize is correlated with the abundance of root-external hyphae and the accumulation of transcripts encoding PHT1 phosphate transporters. *New Phytologist*, 214(2), 632–643. <https://doi.org/10.1111/nph.14403>

Schweiger, P. F., Robson, A. D., & Barrow, N. J. (1995). Root hair length determines beneficial effect of a *Glomus* species on shoot growth of some pasture species. *New Phytologist*, 131(2), 247–254. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1995.tb05726.x>

Shannon, CE, & Weaver, W. (1949). *The mathematical theory of communication*. Urbana, IL: University of Illinois Press (1963).

Smith, S. E., & Read, D. J. (David J. . (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press.

Subramanian, K. S., & Charest, C. (1999). Acquisition of N by external hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus and its impact on physiological responses in maize

under drought-stressed and well-watered conditions. *Mycorrhiza*, 9(2), 69–75. <https://doi.org/10.1007/s005720050002>

Sugiyama, A., Shitan, N., & Yazaki, K. (2008). Signaling from soybean roots to rhizobium: An ATP-binding cassette-type transporter mediates genistein secretion. *Plant Signaling & Behavior*, 3(1), 38–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19704765>

Taktek, S., Trépanier, M., Servin, P. M., St-Arnaud, M., Piché, Y., Fortin, J.-A., & Antoun, H. (2015). Trapping of phosphate solubilizing bacteria on hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198. *Soil Biology and Biochemistry*, 90, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2015.07.016>

Uren, N. (2007). Types, Amounts, and Possible Functions of Compounds Released into the Rhizosphere by Soil-Grown Plants (pp. 1–21). <https://doi.org/10.1201/9781420005585.ch1>

van der Heijden, M. G. A., & Schlaeppli, K. (2015). Root surface as a frontier for plant microbiome research. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(8), 2299–2300. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500709112>

Wu, Q.-S., He, X.-H., Zou, Y.-N., Liu, C.-Y., Xiao, J., & Li, Y. (2012). Arbuscular mycorrhizas alter root system architecture of Citrus tangerine through regulating metabolism of endogenous polyamines. *Plant Growth Regulation*, 68(1), 27–35. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9690-6>

Wu, Q.-S., Zou, Y.-N., He, X.-H., & Luo, P. (2011). Arbuscular mycorrhizal fungi can alter some root characters and physiological status in trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) seedlings. *Plant Growth Regulation*, 65(2), 273–278. <https://doi.org/10.1007/s10725-011-9598-6>

Yuan, J., Raza, W., & Shen, Q. (2018). Root Exudates Dominate the Colonization of Pathogen and Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (pp. 167–180). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75910-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75910-4_6)

Zhang, J., Subramanian, S., Stacey, G., & Yu, O. (2009). Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*. *The Plant Journal*, 57(1), 171–183. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

313X.2008.03676.x

Zhao, K., Penttinen, P., Zhang, X., Ao, X., Liu, M., Yu, X., & Chen, Q. (2014). Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. *Microbiological Research*, *169*(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2013.07.003>

Zhu, S., Vivanco, J. M., & Manter, D. K. (2016). Nitrogen fertilizer rate affects root exudation, the rhizosphere microbiome and nitrogen-use-efficiency of maize. *Applied Soil Ecology*, *107*, 324–333. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2016.07.009>

## 10 ANEXOS

Tabla de la prueba de calidad realizada por Macrogen.

#	Nombre de la muestra	Concentración (ng/ul)	Volumen final (ul)	Cantidad total (ug)
1	81-68	0.575	55	0.032
2	81-25	1.004	69	0.069
3	81-88	0.748	90	0.067
4	81-77	0.840	71	0.060
5	81-36	0.589	69	0.041
6	81-57	0.616	57	0.035

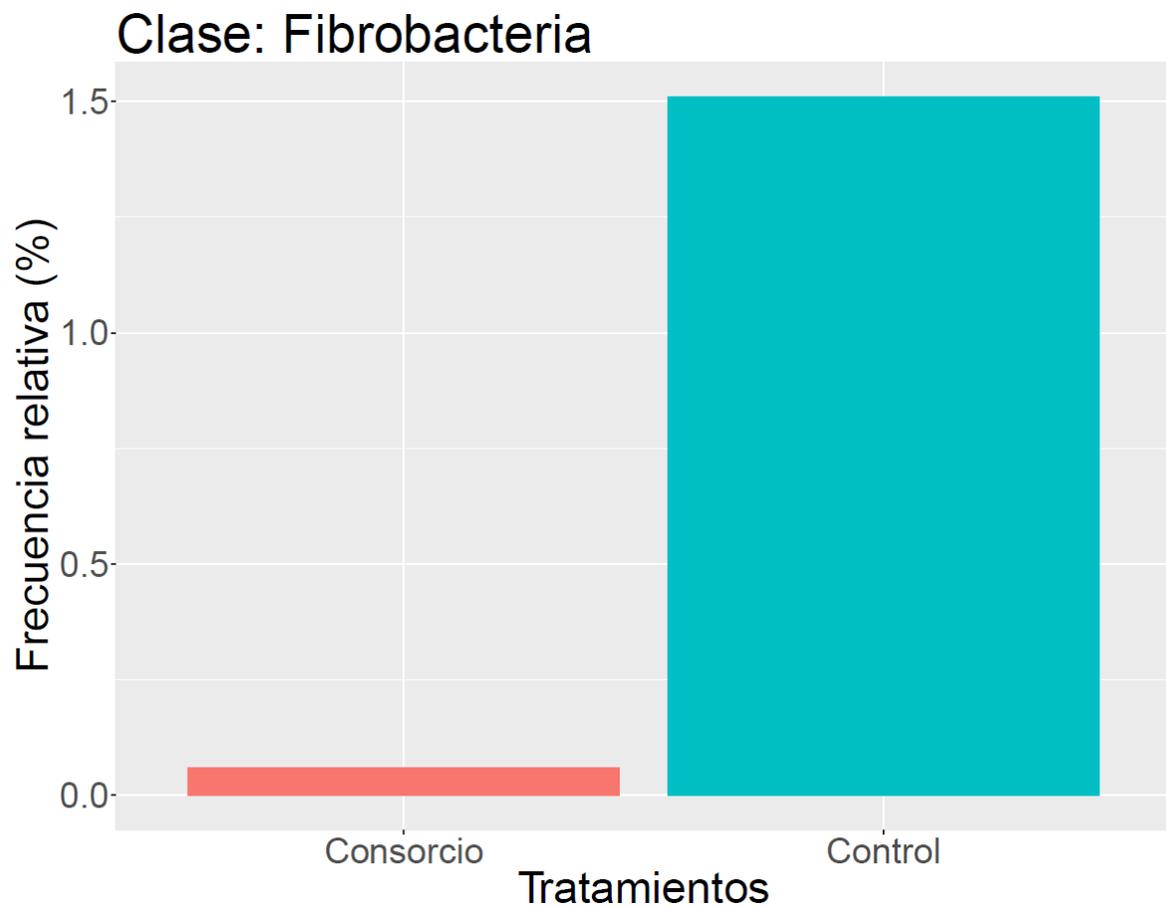
Matadatos de las muestras analizadas en QIIME 2.

id	BarcodeSequence	Tratamiento	Planta	Descripción
8168	GCGTAGTA	Control	B73	Library1
8125	CGGAGCCT	Control	B73	Library1
8188	TACGCTGC	Control	B73	Library1
8177	ATGCGCAG	Consorcio	B73	Library1
8136	TAGCGCTC	Consorcio	B73	Library1
8157	ACTGAGCG	Consorcio	B73	Library1

Resultados del filtrado de las secuencias con DADA2.

id	Entrada	Filtradas	Denoised	Fusionadas	No quiméricas
8125	234674	64135	64135	33339	32348
8136	206028	55367	55367	33225	32076
8157	225838	25693	25693	11175	10519
8168	203215	38362	38362	21540	20683
8177	187350	18872	18872	7318	7029
8188	210443	49863	49863	28939	27422

Promedio de las frecuencias relativas para la clase Fibrobacteria que resulto significativo en el análisis de composición microbiana (ANCOM).



Frecuencias relativas para los órdenes Bacillales y Pseudomonadaceae.

