



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD DE DEPREDADORES DE BACTERIAS EN LA
RIZOSFERA DEL MAÍZ**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M.C. Violeta Matus Acuña

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Esperanza Martínez Romero
Centro de Ciencias Genómicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Alejandro Sánchez Flores
Instituto de Biotecnología
Dr. Ramón I. Arteaga Garibay
INIFAP

Cuernavaca, Morelos, diciembre, 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

En honor a Santiago Caballero Matus

DEDICATORIA

Sin el apoyo, la confianza y la alegría que me brinda mi familia, **Leonor, Jaime y Ulises**, no podría haber llegado hasta aquí. En cada gran decisión, en cada alegría y tristeza ellos siempre están ahí para mí, y eso me hace caminar segura y acompañada en cada momento. Es un orgullo ser parte de una familia tan bella.

Gracias a mi nueva familia que me ha amado por lo que soy y me ha apoyado en cada momento: **Rosa, Gil, Dey, Paty, Zuri, Ángel, Diana**; y esos pequeños ángeles que llenan de risas mis visitas a Michoacán, **Ireri, Fer, Edgar y Gael**. Es un placer y un deleite cada una de las visitas a el hermoso Uruapan.

La vida sin amigos sería una tristeza, por eso quiero dedicar unas palabras para la gente que ha llenado mi vida de felicidad, alegría y momentos inolvidables. A mis amigas de toda la vida, **Ixchel, Irene y Jazmín** que, aunque lejos, siempre han estado a mi lado con un pañuelo o una cerveza para brindar conmigo mis tristezas y triunfos. Aunque el mundo nos aleje, sé que siempre estaremos juntas.

A mis compañeros de la maestría, aquellos con los que he vivido momentos indescriptibles y que han hecho mi posgrado una de las etapas más bellas de mi vida, **Isra, Paul, Omar y Leydi**. ¡Salud para y por ustedes! A mis inigualables amigos del laboratorio: **Tona, Rafa, Vic, Tabita, Arturo, Yessi, Ame, Julio y Moni**, cada día era fácil levantarme e ir a trabajar porque ahí siempre los encontraba, listos para reírnos con un chiste, hablar sobre el por qué de la vida, o simplemente para ir a comer unos buenos tacos de carnitas con una cerveza. Ustedes me han enseñado que es muy sencillo ser feliz, cuando haces lo que te gusta, tienes buena comida, una buena plática, y una copa de vino.

“Nunca se sabe, hasta el final, si lo que un día cualquiera nos sucede es historia o simple contingencia, si es todo (por trivial que parezca) o es nada (por doloroso que sea)”

Ernesto Sábato.

Y resultó que tu **Gustavo**, lo fuiste todo. Te conocí un día cualquiera, en un momento trivial y jamás imaginé la magnitud de lo que seis años después representarías para mí. No sé si lleguemos a viejitos, lo que sí sé, es que siempre serás el amor de mi vida.

“La materia no se crea ni se destruye” Mijaíl Lomonósov. Solo espero que estés en algún bello lugar, mientras yo aquí solo puedo dedicarte lo poco que tengo, esto es para y por ti **Santiago**. Siempre serás recordado.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la **Dra. Esperanza Martínez** por haberme aceptado en su grupo y guiado durante estos 4 años del doctorado, la pasión y entrega con la que realiza en su trabajo ha sido una gran inspiración para mí.

A mi comité tutorial, el **Dr. Ramón Arteaga Garibay** y el **Dr. Alejandro Sánchez** que además de haber aportado sabios comentarios durante mis seminarios de avances, también participaron técnicamente en este trabajo con la toma de muestras y el proceso de secuenciación masiva. Así mismo, a los miembros del jurado: La **Dra. Rosa María Gutierrez**, el **Dr. Juan Miranda**, el **Dr. Christian Sohlenkamp**, el **Dr. Santiago Castillo** y el **Dr. José Luis Puente**, por el tiempo y aportes realizados al trabajo. Y al doctor **Joseph Dubrosky**, por el tiempo dedicado a corregir y mejorar esta tesis.

A todos los integrantes del Laboratorio de Ecología Genómica: **Marco, Ángeles, Lulú, Otto, Christian, Isabel, Doña Chelis, Don Martín, Pepe, Diana, Jonathan Padilla, y Jhonatan Olea** por su compañía y por hacer del laboratorio un gran lugar para trabajar.

A **Donald Zak** y todo su grupo de trabajo que me acogió en la Universidad de Michigan durante casi un año, por enseñarme el amor por el suelo y sus organismos: **Rima, Karl, Will, Wes, Peter y Sydney**. Ann Arbor siempre será un lugar muy especial para mí.

Finalmente, agradezco al CONACYT por la beca de doctorado otorgada y al programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM) por los recursos económicos que me permitieron realizar dos estancias en la Universidad de Michigan, así como presentar mi proyecto en varios congresos nacionales e internacionales.

El desarrollo del presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Ecología Genómica del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Esperanza Martínez Romero y como parte del programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la misma universidad. El proyecto realizado fue financiado con apoyos del Conacyt (#253116) y PAPIIT-UNAM (#IN207718) otorgados a la Dra. Esperanza Martínez Romero. Violeta Matus Acuña recibió una beca de doctorado por parte del Conacyt (#253771) para la realización del presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUCCIÓN.....	15
1.1 El maíz.....	15
1.2 Función de los microorganismos en la rizosfera	17
1.3 Importancia de los nematodos en la rizosfera	20
1.4 Clasificación de los nematodos con base en su estilo de alimentación.....	21
1.5 El uso de amplicones como herramienta para el estudio de la diversidad de eucariontes	22
1.6 Estudios de diversidad de eucariontes en comunidades complejas	24
2 ANTECEDENTES.....	26
2.1 Análisis metatranscriptómico de suelo rizosférico de tres plantas diferentes	26
2.2 La presencia de predadores bacterianos en la rizosfera provoca cambios en la comunidad microbiana y en el desarrollo de la planta	27
3 JUSTIFICACIÓN.....	30
4 HIPÓTESIS.....	31
5 OBJETIVOS	31

5.1	OBJETIVOS PARTICULARES	31
6	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	32
6.1	Estudio de la diversidad de nematodos en la rizosfera de plantas de maíz provenientes de tres regiones de México	32
6.1.1	Recolección de muestras de suelo rizosférico de maíz.....	32
6.1.2	Amplificación del gen marcador y secuenciación mediante la plataforma de Illumina Miseq.....	33
6.1.3	Análisis bioinformático de las secuencias	36
6.1.4	Análisis estadístico de la diversidad de eucariontes en la rizosfera de Maíz	36
6.2	Aislamiento de nematodos de vida libre de la rizosfera de maíz y estudio de sus interacciones con bacterias rizosféricas y plantas.	37
6.2.1	Aislamiento de nematodos.....	37
6.2.2	Identificación taxonómica de los nematodos aislados.....	38
6.2.3	Ensayos para evaluar la preferencia bacteriana de nematodos aislados de la rizosfera del maíz hacia diferentes bacterias	39
6.2.4	Análisis de las interacciones nematodo-bacteria por microscopía confocal	40
6.2.5	Determinación del efecto de los nematodos sobre el crecimiento de plantas de maíz	41
6.2.6	Análisis de la morfología de la raíz de maíz en presencia de los nematodos.....	43
6.2.7	Estudio de la morfología de la raíz de <i>A. thaliana</i> en presencia de los nematodos y <i>R. phaseoli</i>	43
6.2.8	Aislamiento e identificación de bacterias asociadas a los nematodos.....	44
6.2.9	Estudio de la morfología de la raíz de <i>A. thaliana</i> en presencia de las bacterias aisladas de los nematodos.....	44
7	RESULTADOS	46

7.1	Estudio de la diversidad de nematodos en la rizosfera de plantas de maíz sembradas en campos agrícolas de México.....	46
7.1.1	Resultados de secuenciación masiva.....	46
7.1.2	La región de colección de la muestra no modifica la riqueza de especies, pero sí la composición de nematodos.....	47
7.2	Aislamiento de nematodos de vida libre aislados de la rizosfera de maíz y estudio de su efecto en el desarrollo de las plantas.....	52
7.2.1	<i>Oscheius tipulae</i> y <i>Mesorhabditis</i> sp. son nematodos de vida libre asociados a la rizosfera de maíz.....	52
7.2.2	Los nematodos aislados muestran atracción por cepas de <i>Rhizobium</i>	54
7.2.3	<i>O. tipulae</i> y <i>Mesorhabditis</i> sp. incrementan el crecimiento de plantas de maíz cuando son inoculados con <i>R. phaseoli</i> Ch24-10.....	58
7.2.4	<i>O. tipulae</i> y <i>Mesorhabditis</i> sp. modifican la morfología de la raíz de plantas de maíz 60	
7.2.5	<i>O. tipulae</i> y <i>Mesorhabditis</i> sp. modifican la arquitectura de la raíz de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	63
7.2.6	Aislamiento de bacterias asociadas a los nematodos y estudio de su efecto en el desarrollo de la arquitectura de raíz.....	65
8	DISCUSIÓN.....	69
9	BIBLIOGRAFÍA.....	76
10	ANEXOS.....	92
10.1	ANEXO I.....	92
10.2	ANEXO II.....	94
10.3	ANEXO III.....	97
10.4	ANEXO IV.....	98

10.5 ANEXO V 99

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

Figura 1.- Representación de una sección de raíz.....17

Figura 2.- Diversidad de nematodos pertenecientes a los cuatro grupos tróficos.....25

2. ANTECEDENTES

Figura 3.- Abundancias relativas de grupos taxonómicos en las rizosferas de trigo, avena y chícharo.....27

Figura 4.- Cambios en la abundancia relativa de las especies bacterianas indicadas en la ectorizosfera de plantas de *A. thaliana*.....28

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 5.- Esquema que ejemplifica la estrategia de amplificación.....34

Figura 6.- Aislamiento de nematodos bacteriófagos de muestras de suelo.....38

Figura 7.- Diseño experimental para la determinación de la preferencia de los nematodos hacia diferentes bacterias rizosféricas o sus sobrenadantes.....40

4. RESULTADOS

Figura 8.- Abundancia relativa de OTUs pertenecientes a nematodo.....47

Figura 9.- Diversidad alfa de nematodos para cada una de las tres regiones muestreadas.....48

Figura 10.- Análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de las muestras de suelo rizosférico.....49

Figura 11.- Distribución relativa de las secuencias de nematodos a nivel de orden usando el gen marcador ARNr 18S.....50

Figura 12.- Análisis filogenético de los nematodos aislados de suelo rizosférico de maíz.....54

Figura 13.- Número de nematodos atraídos hacia diferentes bacterias rizosféricas.....	56
Figura 14.- Número de nematodos aislados en los sobrenadantes bacterianos.....	57
Figura 15.- Micrografía de nematodos conteniendo bacterias de <i>R. etli</i> CFN42.....	58
Figura 16.- Altura y peso seco de la parta aérea de plantas de maíz.....	59
Figura 17.- Micrografía de raíces de maíz inoculadas con los nematodos.....	60
Figura 18.- Raíces de plantas de maíz inoculadas con <i>Mesorhabditis</i> sp., <i>O. tipulae</i> y/o <i>R. phaseoli</i> Ch24-10.....	62
Figura 19.- Parte aérea de plantas de maíz inoculadas con <i>Mesorhabditis</i> sp., <i>O. tipulae</i> y <i>R. phaseoli</i> Ch24-10.....	63
Figura 20.- Raíces de <i>A. thaliana</i> con <i>O. tipulae</i> , <i>Mesorhabditis</i> sp. y <i>R. phaseoli</i> Ch24- 10	65
Figura 21.- Raíces de <i>A. thaliana</i> inoculadas con <i>A. pittii</i> y <i>C. elegans</i> N2.....	67
5. CONCLUSIONES	
Figura 22.- Modelo propuesto de nematodos como “caballos de Troya”.....	75

ÍNDICE DE TABLAS

1. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 1.- Características de las muestras de suelo rizosférico de maíz utilizadas en el presente trabajo.....	32
Tabla 2.- Lista de oligonucleótidos empleados para la amplificación y secuenciación...	34
Tabla 3.- Reactivos en la PCR para la amplificación de los fragmentos.....	35
Tabla 4.- Condiciones de amplificación por PCR de los fragmentos.....	35
Tabla 5.- Oligonucleótidos empleados para amplificar y secuenciar el ARNr 18S y el gen de la COI de nematodos.	39
Tabla 6.- Ensayos experimentales para evaluar el efecto de los nematodos y <i>Rhizobium</i> en el crecimiento de plantas de maíz.....	42

2. RESULTADOS

Tabla 7.- Asignación de los órdenes de nematodos a un grupo trófico.....	51
Tabla 8.- Asignación de las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias aisladas de los nematodos <i>O. tipulae</i> y <i>Mesorhabditis</i> sp.....	65

RESUMEN

Aunque el maíz es uno de los cultivos con mayor relevancia comercial en México, su producción ha decrecido debido a factores diversos como el cambio climático, los altos costos de insumos y servicios, la pérdida de fertilidad del suelo y la falta de infraestructura. Por esta razón, la búsqueda de nuevas alternativas para incrementar la producción del maíz resulta esencial. Una de estas alternativas es la utilización de microorganismos promotores del crecimiento; sin embargo, su aplicación comercial sigue siendo limitada debido a su baja persistencia en el suelo. Por lo tanto, para entender los factores que determinan la integración de dichos microorganismos a las comunidades a las cuales son adicionadas, es relevante conocer la biodiversidad de las comunidades preexistentes. En este trabajo se determinó la diversidad de nematodos, organismos eucariontes altamente abundantes en el suelo, en muestras de suelo rizosférico de maíz obtenidas de campos agrícolas de diferentes regiones de México, con el objetivo de evaluar los posibles factores que median su biodiversidad. Encontramos que la población general de nematodos es influenciada por el sitio de muestreo. También observamos una abundancia relativa predominante de los órdenes Tylenchida, Rhabditida y Dorylaimia en las 16 muestras analizadas. Así mismo, se evaluó la preferencia de dos nematodos predadores de bacterias aislados de la rizosfera de maíz, identificados como *Oscheius tipulae* y *Mesorhabditis* sp. por siete bacterias aisladas de la rizosfera, así como su efecto en el desarrollo de plantas de maíz y *Arabidopsis thaliana*. Encontramos que ambos nematodos mostraron atracción alimentaria hacia cepas de *Rhizobium*, una bacteria promotora de crecimiento en plantas. Por otro lado, encontramos que las raíces de plantas de maíz y *A. thaliana* crecidas en presencia de los nematodos ambientales presentaron una longitud de la raíz primaria menor con respecto a las plantas control, mientras que la co-inoculación del nematodo *Mesorhabditis* sp. con *Rhizobium phaseoli* Ch24-10 incrementó el número de raíces laterales en ambas plantas. Aunque no observamos ningún efecto en la morfología de la raíz de plantas de *A. thaliana* tratadas con un nematodo modelo (*Caenorhabditis elegans* N2) alimentado con cepas de *Escherichia coli*, plantas tratadas con el mismo nematodo pero alimentado con *Acinetobacter pittii*, una bacteria aislada de los nematodos de suelo, mostraron un fenotipo similar al observado con *O. tipulae* y *Mesorhabditis* sp. Por lo tanto, los nematodos que se alimentan de bacterias son organismos abundantes en la rizosfera de maíz que podrían actuar como “caballos de Troya” que facilitan la colonización de las raíces por las bacterias que portan en su interior, lo cual a su vez influencia el desarrollo de la planta.

ABSTRACT

Maize is one of the most important cereal crops in Mexico, however its production has decreased due to various factors such as climate change, increasing costs of inputs and services, loss of soil fertility, and lack of infrastructure. For this reason, new technologies and strategies aimed to increase corn production are urgently needed. One of these strategies relies on the use of microorganisms capable of promoting plant growth, however their commercial use is limited due to their low persistence in soils. Therefore, to understand the factors that determine the integration of such microorganisms to the communities to which they are added, it is important to study the biodiversity of the pre-existing communities. In this work, we analyzed the diversity of nematodes, eukaryotic microorganisms highly abundant in soil, in corn rhizosphere from different agricultural fields in Mexico to understand the main factors that shape nematode community in this ecosystem. We found that the main factor influencing nematode diversity was the site of sampling. We observed a great proportion of Tylenchida, Rhabditida and Dorylaimia orders in the 16 samples analyzed. We isolated two bacterial feeding nematodes from corn rhizosphere, identified as *Oscheius tipuale* and *Mesorhabditis* sp., and analyzed their feeding preference towards seven rhizospheric bacteria, as well their role in Maize and *Arabidopsis thaliana* plant and root development. Both nematodes showed feeding preference towards *Rhizobium* strains, a well-known genus of plant growth promoting bacteria. We found that the inoculation of nematodes into corn and *A. thaliana* roots induced shorter primary roots. Additionally, the co-inoculation of *Mesorhabditis* sp. with *R. phaseoli* Ch24-10 increased the number of emerged lateral roots in both plants. Although we did not observe any effect on *A. thaliana* root architecture with inoculation of the nematode *C. elegans* N2 fed on *Escherichia coli*, plants treated with the same nematode but fed on *Acinetobacter pittii*, a bacterium isolated from the soil nematodes, showed shorter primary roots and more emerged lateral roots, a similar phenotype to that found with the environmental nematodes. We conclude that bacterial feeding nematodes are abundant in maize rhizosphere and that they might act as “Trojan horses”, carrying rhizobial bacteria to plant roots and indirectly influencing plant fitness.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 El maíz

El maíz (*Zea mays ssp. mays*) es un pasto gigante domesticado, de origen tropical mexicano, clasificado dentro del género *Zea* perteneciente a la familia Gramineae o Poaceae (Matsuoka *et al.*, 2002), la cual incluye otros importantes cultivos agrícolas como trigo, arroz, avena, sorgo, cebada y caña de azúcar. El maíz es usado principalmente para producir granos y forraje, los cuales constituyen la base para la elaboración de un gran número de alimentos tanto de consumo humano como animal (Ranum *et al.*, 2014).

El maíz muestra un alto crecimiento de su área foliar en comparación con otras plantas debido a la adaptación de su ruta fotosintética. Dicha adaptación, la cual es compartida por otras especies tropicales adaptadas a sobrevivir bajo estrés hídrico, es conocida como el “síndrome C4”. En las plantas C4 las reacciones dependientes de la luz y el ciclo de Calvin están separadas físicamente, lo que les permite reducir el proceso de fotorrespiración (pérdida de carbono en forma de CO₂) mediado por la unión de O₂ en lugar de CO₂ a la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco, enzima que se encarga de catalizar el primer paso de la fijación de CO₂). Como resultado de este mecanismo, las especies C4 pueden producir más materia seca por unidad de agua transpirada en condiciones de calor que la producida por aquellas especies que siguen la ruta fotosintética convencional C3 (Crafts-Brandner y Salvucci, 2002).

El maíz es principalmente una especie de polinización cruzada, característica que ha contribuido a incrementar su variabilidad genética y morfológica, así como su adaptabilidad geográfica. Por ejemplo, las variedades de esta planta (razas) pueden tener un porte que oscila entre los 0.5 y 5 metros al momento de floración, alcanzar la madurez en un rango de 60 a 330 días a partir de la siembra, producir 1 a 4 mazorcas por planta y 10 a 1,800 semillas por mazorca, y alcanzar rendimientos que van desde 0.5 hasta 23.5 toneladas por hectárea (CONABIO, 2018).

Los frutos del maíz pueden carecer de color (blancos), o presentar coloraciones amarillas, rojas, azules, o bien combinaciones de estos colores en patrones moteados o estriados. Su cultivo se encuentra adaptado desde zonas áridas hasta ambientes con elevadas precipitaciones y en altitudes que van desde los 0 hasta los 4,000 metros sobre el nivel del mar (msn) (Perales y Golicher, 2014).

Como se mencionó anteriormente, las variedades del maíz son conocidas como razas, un término que se utiliza para agrupar individuos o poblaciones que comparten características en común de orden morfológico, ecológico, genético y/o de historia de cultivo, las cuales permiten diferenciarlas como grupo (Anderson y Cluter, 1942; Perales y Golicher, 2014; Rocandio-Rodríguez *et al.*, 2014). Las razas se nombran a partir de distintas características fenotípicas de la planta (por ejemplo, “Cónico” por la forma de la mazorca), tipo de grano (“Reventador”, por la capacidad del grano para “estallar” y producir “palomitas de maíz”), lugar o región donde inicialmente fueron colectadas (“Tuxpeño” de Tuxpan Veracruz; “Chalqueño”, del Valle de Chalco), o por el nombre típico con el que son conocidas en las comunidades donde se cultiva (“Zapalote Chico”, en el Istmo de Oaxaca; “Apachito”, en la Sierra Tarahumara) (Rocandio-Rodríguez *et al.*, 2014). Las razas de maíz se agrupan a su vez en grupos o complejos raciales, los cuales se asocian a una distribución geográfica y climática definida, o a una historia evolutiva común (Goodman *et al.*, 2011; Perales y Golicher, 2014). Cerca de 220 razas de maíz han sido descritas en América Latina (Goodman y Bird, 1977), de las cuales 64 (29%) se cultivan o están presentes en México (Anderson y Cluter, 1942; Marschner, 1995a; Sanchez y Goodman, 1992). De estas 64 razas, 59 se consideran nativas de México, mientras que el resto fueron descritas inicialmente en otras regiones de Centroamérica (CONABIO, 2011). La descripción de cada una de las razas de maíz se presenta en el **ANEXO I**.

1.2 Función de los microorganismos en la rizosfera

La rizosfera fue inicialmente descrita en 1904 por Lorenz Hiltner como el área alrededor de la raíz habitada por una población de microorganismos, influenciados por los compuestos químicos exudados por la planta (Hiltner, 1904). Posteriormente, la rizosfera fue dividida morfológicamente en tres regiones definidas a partir de su cercanía con la raíz: la endorizosfera, el rizoplano y la ectorizosfera. La endorizosfera se ubica entre la endodermis y las capas corticales de la planta, y es la zona donde los microbios y cationes ocupan el espacio “libre” (apoplasto) entre las células vegetales (Figura 1). Los microorganismos que colonizan la endorizosfera se denominan endófitos. El rizoplano es la superficie externa de la raíz donde se adhieren la mayor parte de las partículas del suelo y los microorganismos. Está formada por la epidermis, la corteza y la capa de polisacáridos mucilaginosos de la planta. Finalmente, la ectorizosfera representa la parte más externa de la rizosfera y se extiende del rizoplano al suelo (McNear, 2013) (Figura 1).

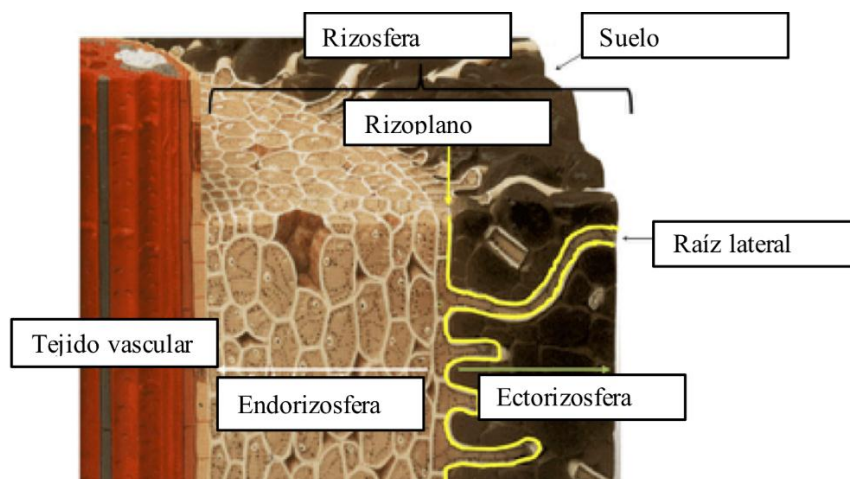


Figura 1. Representación de una sección de raíz donde se muestran las tres regiones en las que se encuentra dividida la rizosfera (McNear, 2013).

Una de las características principales de la rizosfera es el gran número de microorganismos asociados que se alimentan del carbono liberado por la raíz en forma de exudados, los cuales representan del 5 al 21% del carbono total fijado en la fotosíntesis, aunque su proporción varía dependiendo de la cantidad de nutrientes y del tipo de suelo en el que crece la planta (Marschner, 1995b). De manera general los exudados vegetales se dividen en metabolitos primarios como son ácidos orgánicos, carbohidratos y aminoácidos, y en metabolitos secundarios como alcaloides, terpenoides y compuestos fenólicos (Bais *et al.*, 2006; Venturi y Keel, 2016). Aunque la producción y liberación de estos compuestos representa un costo energético alto para la planta, éstos juegan un papel importante en el desarrollo de la misma ya que promueven la simbiosis con bacterias y hongos, poseen actividad antimicrobiana, nematicida y fungicida, y confieren protección contra patógenos y otras plantas invasivas (Bertin *et al.*, 2003).

El papel de las comunidades bacterianas asociadas a la rizosfera en el desarrollo de varios tipos de plantas ha sido estudiado ampliamente (Bonkowski *et al.*, 2000; Costacurta y Vanderleyden, 1995; Mendes *et al.*, 2013; Segura *et al.*, 2009). Por ejemplo, se sabe que diversas especies bacterianas establecen comunicación entre sí en comunidades microbianas complejas, incluyendo el suelo rizosférico, mediante la producción de moléculas de “quorum sensing” como N-acil homoserina lactonas (Nealson *et al.*, 1970; Wei y Zhang, 2006), y compuestos orgánicos volátiles como alquenos, alcoholes, aldehídos y cetonas, los cuales a su vez regulan el desarrollo de las plantas (Ryu *et al.*, 2003). De manera similar, las plantas también liberan moléculas que influyen el comportamiento de las bacterias rizosféricas como los flavonoides, compuestos fenólicos que inducen factores de nodulación (Nod) en algunas bacterias rizobiales llevando a la formación de nódulos en la planta, y por tanto, a la fijación de N₂ atmosférico en la misma (Crespi y Gálvez, 2000; Estévez *et al.*, 2009; Ramachandran *et al.*, 2011). Se han identificado diversas

bacterias rizosféricas de los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Azospirillum* capaces de promover el crecimiento de varias plantas (Barreto *et al.*, 2011; Gopalakrishnan *et al.*, 2015; Piromyou *et al.*, 2011). Los mecanismos bacterianos que promueven el desarrollo vegetal incluyen la estimulación de su sistema inmune a través de MAMPs (del inglés, “microbe-associated molecular patterns”) (Newman *et al.*, 2013), la producción de compuestos antimicrobianos (Riley y Wertz, 2002), así como de fitohormonas como auxinas y citocininas involucradas en procesos de elongación, división celular, diferenciación tisular y dominancia apical (Matiru y Dakora, 2004; Rivera *et al.*, 2018).

En contraste con el estudio de las comunidades bacterianas del suelo y sus interacciones con la planta, el análisis de las comunidades eucariontes en la rizosfera es escaso y se ha enfocado principalmente en los hongos, cuya principal función radica en degradar una gran cantidad de materia orgánica que puede entonces ser utilizada por la planta o sus microorganismos asociados. No obstante, también se han descrito géneros de hongos capaces de promover el crecimiento de plantas como son *Aspergillus* (Yoo *et al.*, 2018), *Trichoderma* (Masunaka *et al.*, 2011), *Penicillium* (Hossain *et al.*, 2007), *Piriforma* (Varma *et al.*, 1999) y *Phoma* (Hamayun *et al.*, 2009), los cuales incrementan la biodisponibilidad de nutrientes para la planta, protegen contra patógenos y/o liberan sustancias fito-estimulantes (Hossain *et al.*, 2017). Así mismo, las plantas pueden establecer relaciones simbióticas con los hongos, conocidas como micorrizas, las cuales incrementan la absorción de nutrientes como fósforo, nitrógeno, potasio y calcio por las plantas, mientras incrementan el área fisiológicamente activa en las raíces y protegen contra otros organismos patógenos (Cosme y Wurst, 2013; Oldroyd, 2013; van Dam y Bouwmeester, 2016). Se estima que el 90% de las plantas terrestres presenta una relación simbiótica con hongos (Humphreys *et al.*, 2010).

1.3 Importancia de los nematodos en la rizosfera

Como se mencionó en el apartado anterior, el estudio de las comunidades eucariontes en la rizosfera se ha enfocado principalmente en los hongos; sin embargo, otros organismos eucariontes como los nematodos, también se encuentran en grandes números en la rizosfera y juegan un papel importante en el establecimiento o la modificación de las comunidades microbianas del suelo y, por tanto, en el desarrollo de la planta.

Los nematodos son eucariontes multicelulares con un ciclo de vida sencillo que puede abarcar de unos pocos días a varios años e incluye cuatro estadios juveniles a partir del huevo hasta el adulto (Barrière y Félix, 2006). Se cree que estos organismos divergieron evolutivamente de otros eucariontes hace 600-1,200 millones de años (Blaxter *et al.*, 1998). A la fecha, se han descrito alrededor de 20,000 especies de nematodos, de los cuales, la mayoría son organismos inoocuos de vida libre, mientras que otros son considerados parásitos de humanos, animales y plantas. Por ejemplo, el nematodo *Meloidogyne spp* y los géneros *Globodera* y *Heterodera* infectan cultivos de papa causando una pérdida anual de aproximadamente \$100 billones de dólares (Ravichandra, 2014). Sin embargo, a pesar de los efectos negativos de estos nematodos en la agricultura, muchas otras especies poseen efectos benéficos en la rizosfera, ya que están involucrados en el reciclaje de los materiales orgánicos del suelo y promueven el crecimiento de varios cultivos como tomate, arroz y cacahuate (Cheng *et al.*, 2011; Djigal *et al.*, 2004; Gebremikael *et al.*, 2016; Irshad *et al.*, 2011; Mao *et al.*, 2006). Así mismo, algunos nematodos son utilizados como agentes de control biológico para combatir insectos plagas de cultivos, como es el caso de los nematodos patógenos de insectos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae (Shapiro-Ilan *et al.*, 2012) . Además, varios nematodos también han sido utilizados como bio-indicadores de la calidad y salud de los suelos, ya que al encontrarse en niveles altos en la cadena alimenticia con respecto a otros microorganismos y a que algunas

especies de nematodos son más estables y no están sujetas a fluctuaciones temporales de nutrientes (porque su ciclo de vida es más largo que el de otros microbios), estos organismos reflejan las propiedades químicas, físicas y biológicas de los recursos alimenticios en el suelo (Neher, 2001).

1.4 Clasificación de los nematodos con base en su estilo de alimentación

Los nematodos se pueden dividir en dos grandes grupos: los colonizadores (c), y los persistentes (p), según su estrategia de vida y su habilidad de colonizar distintos ambientes (Bongers, 1999; Bongers y Ferris, 1999). Una escala arbitraria, calibrada del 1 al 5, es utilizada para su clasificación en donde el valor 1 se asigna a los mejores colonizadores y el valor 5 a los mejores persistentes (Bongers, 1999). Los colonizadores más efectivos son los nematodos que se alimentan de bacterias (valores 1-2), organismos con ciclos de vida cortos, alta producción de huevos, así como movilidad y actividad metabólica elevada. Estos nematodos son capaces de entrar en un ciclo de vida inactivo conocido como ciclo Dauer, sobreviviendo así a condiciones limitadas de recursos y estrés (Bongers y Ferris, 1999). En contraste, los nematodos clasificados en los niveles superiores (3-5) no se alimentan exclusivamente de bacterias, tienen una menor producción de huevos, y son más susceptibles a perturbaciones ambientales (Bongers y Ferris, 1999). Los nematodos que se alimentan de algas, plantas y hongos tienen un valor alto en esta escala.

Dentro de los nematodos que se alimentan de bacterias, los cuales son relevantes para el desarrollo de este trabajo, su alimentación puede ser especializada o no especializada. En las interacciones especializadas el nematodo se alimenta exclusivamente de ciertos géneros o especies particulares de bacterias, mientras que en las no especializadas no existe dicha preferencia alimentaria (Ott *et al.*, 1991). A su vez, las bacterias también pueden ser patógenos

de estos eucariontes y/o tener una relación mutualista con los mismos, influenciando así su desarrollo, mecanismos de defensa, reproducción y/o adquisición de nutrientes (Hansen *et al.*, 2011; Musat *et al.*, 2007; Slatko *et al.*, 2010). Además, debido a que los nematodos presentes en la rizosfera se alimentan principalmente de bacterias, estos organismos también son capaces de modificar las comunidades bacterianas existentes en dicho ecosistema, influenciando de esta forma el desarrollo de las plantas (Asiloglu *et al.*, 2015; Kreuzer *et al.*, 2006). Así mismo, debido a que los nematodos tienen una menor concentración de carbono y nitrógeno en sus células, comparado a las bacterias que consumen (Hoorman, 2011), dichos organismos incorporan a través de su dieta más nitrógeno del que necesitan para sus requerimientos nutricionales, por lo que dicho exceso es liberado en forma de amonio (NH_4^+) que puede ser asimilado por la planta (Kuikman *et al.*, 1991). Sin embargo, aun con estas evidencias poco se sabe de la abundancia de los nematodos en la rizosfera del maíz y de su efecto en el desarrollo de este importante cultivo comercial.

1.5 El uso de amplicones como herramienta para el estudio de la diversidad de eucariontes

Inicialmente, el estudio de la diversidad de eucariontes se realizaba a partir de un enfoque dependiente de cultivo, que comprendía el aislamiento de los organismos y su posterior identificación mediante pruebas bioquímicas. Gracias al desarrollo de la tecnología de secuenciación masiva del ADN, se han desarrollado nuevas estrategias genómicas para el estudio de comunidades complejas, como son: la metagenómica (secuenciación del ADN aislado de comunidades completas); la metatranscriptómica (secuenciación del ARN de dichas comunidades); y la secuenciación de amplicones generados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; por sus siglas en inglés) (Zhou *et al.*, 2015). Esta última se basa en extraer el

ADN total de una comunidad compleja para posteriormente amplificar mediante PCR regiones específicas de genes conservados en todos los organismos presentes, las cuales permiten su identificación muchas veces a nivel de especie. El uso de amplicones de los genes ARNr 16S (para bacterias) y 18S (para eucariontes) acoplados a secuenciación masiva, ha cobrado gran importancia en la ecología microbiana como una de las herramientas mayormente empleadas para el estudio de la diversidad microbiana de ecosistemas complejos como el intestino humano y el suelo (Wu et al., 2015), ya que en comparación con los métodos cultivables tradicionales que involucran procesos largos y requieren una amplia experiencia técnica, su preparación es sencilla y requiere poco tiempo (Murray et al., 2015), además de que permite el estudio de un gran número de muestras simultáneamente (De Filippis et al., 2017).

Una gran cantidad de trabajos han abordado el estudio de grupos particulares de eucariontes, principalmente hongos, protistas y nematodos, en comunidades microbianas complejas mediante el uso de diferentes genes marcadores. Por ejemplo, para estudiar la comunidad de hongos se utiliza generalmente la amplificación de los espacios intergénicos de los genes ribosomales (ITS por sus siglas en inglés), las cuales permiten una mejor identificación de las secuencias de hongos debido a que éstas presentan una mayor variabilidad comparada con la del gen ribosomal 18S, permitiendo así la identificación a nivel de especie en muchos casos (Martin y Rygielwicz, 2005). También se utilizan de forma común las regiones variables 4 y 9 del gen ribosomal 18S para el análisis de hongos, debido a que existe un mayor número de secuencias de dicho gen en las bases de datos, sin embargo, una desventaja de dicho marcador es que está presente en multicopia en el genoma y muestra diferentes niveles de variabilidad dependiendo del organismo (Decelle *et al.*, 2014).

El estudio de las poblaciones de nematodos en muestras de suelo mediante secuenciación masiva es complicado, ya que requiere pasos experimentales previos de enriquecimiento debido

a que estos organismos representan solo el 5-20% del total de eucariontes en suelo (De Mesel et al., 2004; Derycke et al., 2010; Morise et al., 2012)

En resumen, cada uno de los marcadores genéticos utilizados en los análisis de diversidad microbiana de eucariontes presenta limitaciones debido a la insuficiente representación de dichas secuencias en la base de datos, a la amplificación preferencial de ciertas secuencias sobre otras en la comunidad, y a la presencia de organismos que no han sido identificados y/o clasificados previamente. Por lo tanto, el uso de marcadores múltiples y/o de regiones diferentes del mismo marcador, representa la mejor estrategia para el estudio de la diversidad de eucariontes.

1.6 Estudios de diversidad de eucariontes en comunidades complejas

A continuación, se describen algunos estudios que demuestran la utilidad de la estrategia de amplicones en el análisis de las poblaciones de eucariontes en comunidades microbianas complejas. **1)** Mediante el uso del marcador ARNr 18S y e 116S, se estudiaron los cambios en las poblaciones de cianobacterias, así como la abundancia y el efecto de sus predadores (principalmente protistas) en sistemas marinos (Nagarkar *et al.*, 2018). **2)** También mediante análisis por 18S se estudiaron los cambios en la diversidad de eucariontes en suelos agrícolas congelados durante más de treinta años en Holanda, encontrando que las poblaciones de eucariontes presentaban ciertas modificaciones que estaban correlacionadas con cambios en el ambiente (Moon-Van Der Staay *et al.*, 2006). **3)** Utilizando el mismo marcador se observó que el pH, la concentración de carbono y nitrógeno son factores que determinan los patrones de distribución de eucariontes en diferentes muestras de bosque habitados por tres especies diferentes de árboles, encontrando que los *Eucalyptos* tienen una menor cantidad de eucariontes en comparación al pino *Agathis australis* (Zhou *et al.*, 2017). **4)** De manera similar, se estudió el efecto de tres técnicas de cultivo (labranza, no labranza y sistema orgánico) en las comunidades

de nematodos en el suelo, encontrando que algunos órdenes de nematodos como Tylenchide y Cephalobidae muestran una correlación positiva a la cantidad de carbono y nitrógeno orgánico, que se ve incrementada en el sistema orgánico (Treonis *et al.*, 2018). En el mismo estudio se observó que la densidad de predadores omnívoros y nematodos que se alimentan de hongos se reduce en los suelos sin labranza en comparación con los que sí tuvieron dicho tratamiento, mientras que algunos grupos de nematodos parasitarios se incrementaron en el sistema orgánico que correlacionó con un incremento en la cantidad de nematodos que se alimentan de hongos (Figura 2) (Treonis *et al.*, 2018).

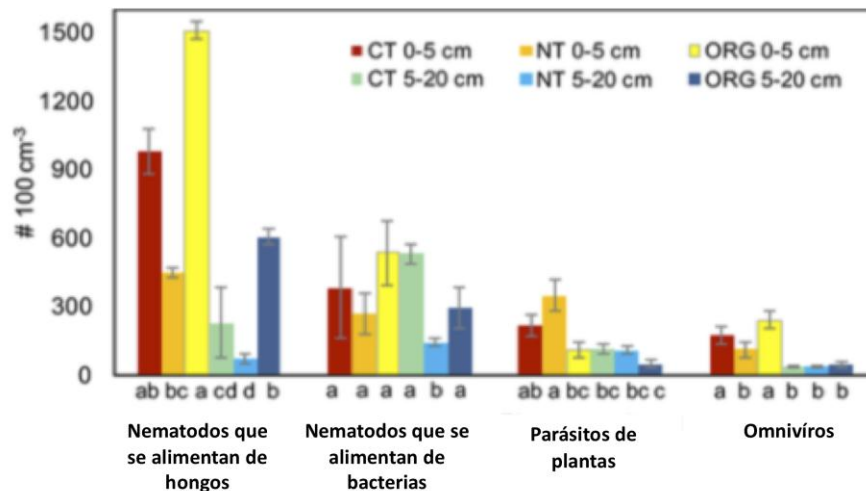


Figura 2. Diversidad de nematodos pertenecientes a los cuatro grupos tróficos indicados en suelo agrícola con tres sistemas de cultivo diferente (CT labranza convencional, NT no labranza, Org, sistema orgánico) (Treonis *et al.*, 2018). cm, centímetros debajo de la superficie del suelo.

2 ANTECEDENTES

2.1 Análisis metatranscriptómico de suelo rizosférico de tres plantas diferentes

Recientemente, utilizando un enfoque metatranscriptómico (usando los genes ribosomales), se analizaron muestras de ARNr extraídas de la rizosfera de plantas de trigo, chícharo y avena, y se estudiaron las diferencias entre las poblaciones de microorganismos (procariontes y eucariontes) a nivel de filo y género, tanto en la rizosfera de cada una de las plantas antes mencionadas, como en el suelo en donde éstas fueron crecidas durante cuatro semanas en un invernadero bajo condiciones idénticas (Turner *et al.*, 2013). Para el caso de los procariontes se observó que a nivel de filo solo el chícharo y la avena tenían una diversidad bacteriana diferente a la del suelo sin planta; sin embargo, a nivel de género la composición de los procariontes fue diferente entre la rizosfera y el suelo en todos los casos (Figura 3B).

Por otro lado, la comunidad de eucariontes en el suelo y la rizosfera del trigo y el chícharo fueron similares a nivel de filo, mientras que la rizosfera de la avena fue diferente. A nivel de género, las comunidades de eucariontes en la rizosfera del trigo y el suelo fueron similares, no así para la avena y el chícharo en donde se observó una mayor proporción de hongos y nematodos en la rizosfera (Figura 3C). En general, las gráficas de rarefacción (que presenta la riqueza de especies para cada muestra) mostraron que la diversidad de eucariontes en la rizosfera era mucho mayor comparado a la del suelo para todas las muestras (Turner *et al.*, 2013). Es importante destacar que en estos ensayos la diversidad de eucariontes varió drásticamente, incluso más que la diversidad bacteriana (Figura 3), sobre todo para el caso de la leguminosa (chícharo) y de la avena, sugiriendo que la comunidad eucariota de la rizosfera podría ser igual o más susceptible a los efectos de la planta mediados seguramente por los exudados vegetales.

En conjunto, estos resultados indican que la comunidad eucarionte de la rizosfera de cada una de los cultivos varía dependiendo de la especie (chícharo, avena, trigo), sugiriendo que la planta influye significativamente en su conformación y/o diversidad.

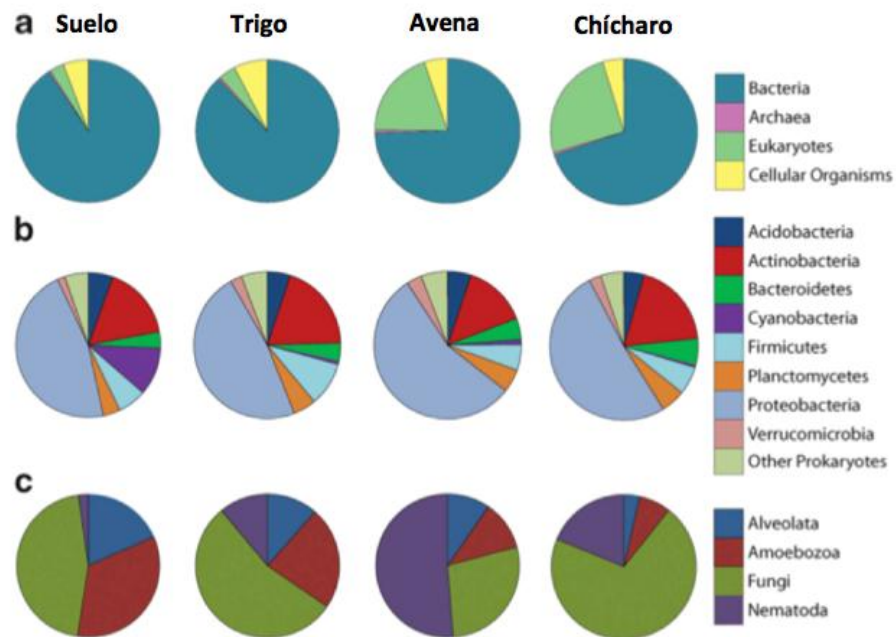


Figura 3. Abundancias relativas de grupos taxonómicos en las rizosferas de trigo, avena y chícharo. **(a)** Todos los taxones a nivel de dominio. **(b)** El filo de los procariontes, un subconjunto de la parte de Bacteria y Archaea de **(a)**. **(c)** Los cuatro grupos de eucariontes principales, parte de los eucariontes de **(a)**. Los valores son promedios de varias réplicas biológicas (n=3 para el trigo y el chícharo; n=4 para el suelo sin planta y la avena) (Turner *et al.*, 2013).

2.2 La presencia de predadores bacterianos en la rizosfera provoca cambios en la comunidad microbiana y en el desarrollo de la planta

Como se mencionó anteriormente, se ha observado que los nematodos ayudan a la incorporación de nitrógeno y fósforo en la planta (Irshad *et al.*, 2011). Así mismo, se sabe que los nematodos que se alimentan de bacterias son capaces de transportar bacterias en su intestino, ayudando a su dispersión y propagación en el suelo y las raíces (Horiuchi *et al.*, 2005). En el

2003, Djigal *et al.* observaron que tres nematodos pertenecientes a la familia Cephalobidae (*Zeldia punctata*, *Acrebeloides nanus* y *Cephalobus pseudoparvus*), aislados de un suelo en Senegal, disminuyeron la masa microbiana, pero aumentaron en un 18% su actividad transcripcional (Djigal *et al.*, 2004). Por otra parte, se observó un incremento del 12% en la producción de biomasa en las plantas de maíz a las que fueron añadidos dichos nematodos. De manera similar, el protozoario *Acanthamoeba castellanii* también modificó las poblaciones bacterianas en la rizosfera de *Arabidopsis thaliana* (Rosenberg *et al.*, 2009). Así mismo, se monitoreó la comunidad bacteriana antes y después de la adición del protozoario utilizando amplicones del gen 16S y se encontró que solo algunas especies habían disminuido su población, como fue el caso de las *Betaproteobacteria* y *Alphaproteobacteria*, otras no modificaron su abundancia, como es el caso de las *Gammaproteobacteria*, o incluso aumentaron su número como las Actinobacterias, mientras que otras se encontraron solo en presencia del protozoario, como los *Planctomycetes* (Figura 4). En conjunto, estos resultados confirman que los predadores bacterianos son capaces de modificar poblaciones bacterianas en comunidades bacterianas complejas como el suelo, influenciando así el desarrollo de la planta.

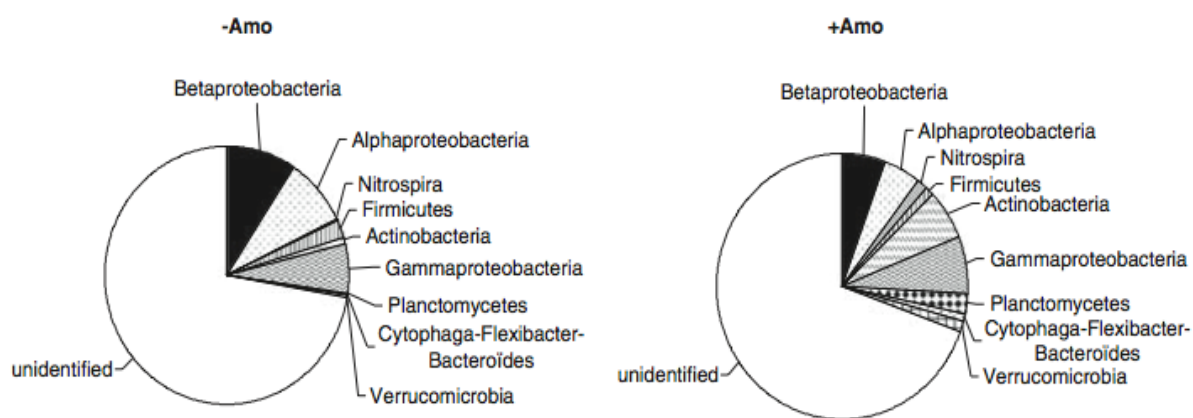


Figura 4. Cambios en la abundancia relativa de las especies bacterianas indicadas en la

ectorizosfera de plantas de *A. thaliana*, después de tres días de tratamiento con (+Amo) o sin (-Amo) amoebae. La abundancia bacteriana fue estimada mediante hibridación fluorescente *in situ* en raíces crecidas en macetas con arena (FISH; por sus siglas en inglés) (Rosenberg *et al.*, 2009).

3 JUSTIFICACIÓN

La rizosfera es un ecosistema complejo en donde co-existen eucariontes y procariontes que llevan a cabo funciones ecológicas de gran relevancia para la planta como la degradación de materia orgánica y el reciclaje de nutrientes. Aunque se conoce con detalle el papel que las bacterias ejercen en la rizosfera de varias plantas, poco se sabe de la diversidad y función biológica de los nematodos en este ecosistema. Por tanto, el estudio de la diversidad de nematodos en la rizosfera del maíz mediante un enfoque metagenómico permitirá identificar los organismos específicos que habitan en este ecosistema, así como analizar los factores que determinan su establecimiento en el suelo rizosférico de este importante cultivo de interés comercial, ecológico y cultural en México.

Por otra parte, el aislamiento de nematodos depredadores de bacterias pertenecientes a dichas comunidades eucariontes, así como el estudio de su interacción con bacterias rizosféricas y su efecto en el desarrollo vegetal, nos permitirá tener un mejor conocimiento de las interacciones depredador-bacteria-planta y, por tanto, un mejor control sobre dichas interacciones para en un futuro poder modificarlas con el objetivo de mejorar la producción del maíz e incluso de otros cultivos.

4 HIPÓTESIS

- La diversidad de la comunidad de nematodos en la rizosfera de maíz de diversos campos agrícolas de México dependerá de factores ambientales, como son el pH, la altitud y el tipo de suelo, pero también de factores inherentes a la planta como su genotipo y/o estado de crecimiento.
- Los nematodos predadores de bacterias modifican a las poblaciones bacterianas y/o la función de las mismas en la rizosfera de maíz y, por lo tanto, influyen en el desarrollo de la planta.

5 OBJETIVOS

Estudiar la diversidad de las poblaciones de nematodos, así como las interacciones depredador-comunidad bacteriana en la rizosfera de cultivos de maíz.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar la diversidad de nematodos en la rizosfera de maíz de diferentes razas y campos agrícolas de México.
- Estudiar la interacción de nematodos aislados de la rizosfera de maíz con bacterias aisladas del suelo.
- Evaluar el efecto de las interacciones nematodo-bacteria en el desarrollo de plantas de maíz.

6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

6.1 Estudio de la diversidad de nematodos en la rizosfera de plantas de maíz provenientes de tres regiones de México

6.1.1 Recolección de muestras de suelo rizosférico de maíz.

Los metadatos de las muestras de suelo rizosférico de maíz utilizadas en este trabajo (Tabla 1) fueron proporcionadas por el Dr. Ramón Arteaga Garibay del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (Inifap, Jalisco). El muestreo se llevó a cabo como se describe a continuación. La colecta se realizó en suelos sin planta (T0) o en plantas de etapas de crecimiento diferentes (R4, durante el llenado de la mazorca; R5 y R6, madurez del grano). La recolección de muestras de suelo se realizó con un nucleador. La muestra de suelo rizosférico fue tomada a 10 cm de distancia de la orilla de la planta y con una profundidad de 30 cm. Se eliminó la capa superior de ~5 cm para desechar la vegetación. En total se tomaron 25 muestras de acuerdo con el protocolo de colecta cinco soles (Hernández Ibáñez *et al.*, 2015).

Tabla 1. Características de las muestras de suelo rizosférico de maíz utilizadas en el presente trabajo.

Nombre	Sitio de muestreo	Latitud (°N)	Longitud (°O)	Altitud (msn)	Estado de crecimiento	Raza de maíz	pH
566_1	Jala, Nayarit	21.096667	-104.426667	1060	T0	“Xala”	7.0
566_3	Jala, Nayarit	21.096667	- 104.426667	1060	R6	“Xala”	7.0
566_4	Tepatitlán, Jalisco	20.873714	-102.788547	1950	T0	“Amarillo Zamorano”	6.7

566_5	Tepatitlán, Jalisco	20.873714	-102.788547	1950	R4	“Amarillo Zamorano	6.7
566_6	Tepatitlán, Jalisco	20.873714	-102.788547	1950	R6	Amarillo “Zamorano”	6.7
566_7	Teopisca	16.524055	-92.474278	1774	R5	“Comiteco”	5.3
566_8	Teopisca	16.5234444	-92.474805	1776	R4	“Comiteco”	5.3
566_9	Teopisca	16.5234444	-92.474805	1767	R6	“Comiteco”	5.3
566_10	Venustiano Carranza, Chiapas	16.3231111	-92.512083	650	J1	“Tuxpeño”	7.0
566_11	Venustiano	16.3231111	-92.512083	637	R4	“Tuxpeño”	7.0
566_12	Tuxtla chico, Chiapas	14.8996675	-92.1695636	221	R6	“Tuxpeño	5.7
566_13	Tuxtla chico, Chiapas	14.8996675	-92.1695636	232	R6	“Tehua”	5.6
566_14	San Antonio, Cacahoatán	15.0017222	-92.166722	514	R6	“Tuxpeño	5.6
566_15	San Antonio, Cacahoatán	14.9922222	- 92.17666666	489	R6	“Tuxpeño	5.8
566_16	San Antonio, Cacahoatán	15.0142222	- 92.12258333	580	R6	“Tuxpeño	6

6.1.2 Amplificación del gen marcador y secuenciación mediante la plataforma de Illumina Miseq

Para analizar la diversidad de nematodos, amplificamos la regiones variables 6, 7, 8 y 9 del gen ARNr 18 (Figura 5), con los oligonucleótidos: Nem/NF1-18Srb2 (Tabla 2).

Tabla 2. Lista de oligonucleótidos empleados para la amplificación y secuenciación por Illumina de los fragmentos V6 a V9 del gen marcador ARNr 18S. En rojo, secuencias adaptadoras para la plataforma MiSeq.

Oligonucleótidos para amplificar secuencias de nematodos	
Nem 5'-GGGGAAGTATGGTTGCAA-3'	Producto de 500 pb
18Srb2Miseq 5'-TACAAAGGGCAGGGACGTAAT-3'	
NF1Miseq 5'- TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGACAGGGT GGTGCATGGCCGTTCTTAGTT-3'	Producto de 450 pb
18Srb2Miseq 5'- GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACAGTAC AAAGGGCAGGGACGTAAT-3'	

La amplificación se realizó de acuerdo con la metodología reportada por Sapotka *et al.*, 2015. El protocolo consiste en dos reacciones de PCR cambiando el oligonucleótido directo. La primera reacción utiliza el oligonucleótido Nem y la segunda, el oligonucleótido directo NF1 (Figura 5). La preparación de las mezclas de PCR y las condiciones de amplificación se presentan en las Tablas 3 y 4, respectivamente.

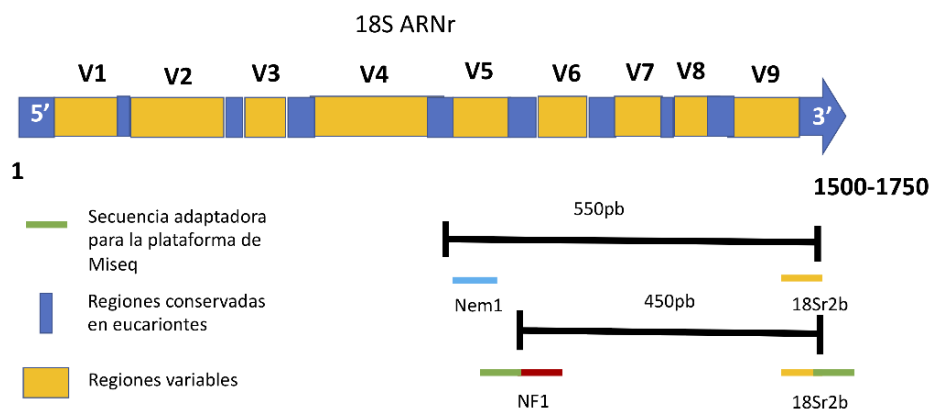


Figura 5. Esquema que ilustra la estrategia de amplificación de las regiones V6 a V9 del gen ARN 18S a partir de ADN aislado de la rizosfera de maíz.

Tabla 3. Reactivos en la PCR para la amplificación de los fragmentos indicados en la Figura 5.

Nem-18SRb2 (Primera PCR)		NF1-18SRb2 (Segunda PCR)	
Buffer 10X	2.5 µL	Buffer 10X	2.5 µl
MgCl ₂ (20 mM)	0.75 µL	MgCl ₂ (20 mM)	0.75 µL
dNTPs 10mM c/ uno	0.5 µL	dNTP's 10mM c/ uno	0.5 µL
Oligonucleótido directo (10 pmol c/uno)	1 µL	Oligonucleótido directo (10 pmol c/uno)	1 µL
Oligonucleótido reverso (10 pmol c/uno)	1 µL	Oligonucleótido reverso (10 pmol c/uno)	1 µL
ADN de suelo rizosférico (templado) apróx. 200 ng	1 µL	ADN (de primera reacción diluido 1/10)	1 µL
Enzima <i>Pfu</i>	0.5 µL	Enzima Pfu	0.5 µL
H ₂ O	16.25 µL	H ₂ O	16.25 µL

Tabla 4. Condiciones de amplificación por PCR de los fragmentos indicados en la Figura 5.

Nem-18Srb2 (Primera PCR)	NF1-18Srb2 (Segunda PCR)
94°C 5min	94°C 5min
35 ciclos de 95°C 45 seg 55°C 45 seg 72°C 1 min	30 ciclos de 95°C 45 seg 60°C 45 seg 72°C 1 min
72°C 10 min	72°C 10 min

6.1.3 Análisis bioinformático de las secuencias

Todas las secuencias fueron procesadas usando la paquetería de QIIME2 (versión qiime2-2018.4) siguiendo el protocolo sugerido previamente (<https://qiime2.org/>) (Caporaso *et al.*, 2010). Los archivos en formato Fastq fueron procesados utilizando el comando dada2 denoise-paired para filtrar por calidad las secuencias y eliminar quimeras. Para el análisis taxonómico se utilizaron las abundancias relativas, usando el comando qiime q2-feature-classifier con la base de datos SILVA SEED v128 (archivo de referencia provisto en <https://qiime2.org/>). Se asignó la identidad taxonómica usando un clasificador Bayesiano (Wang *et al.*, 2007) con un bootstrap del 90% usando la base de datos del gen ribosomal 18S. Todas las secuencias se agruparon en unidades taxonómicas funcionales (OTUs, por sus siglas en inglés), utilizando un 99% de similitud. Los comandos utilizados se presentan en el **ANEXO II**.

6.1.4 Análisis estadístico de la diversidad de eucariontes en la rizosfera de Maíz

Después de la asignación de OTUs, se estimó la diversidad alfa utilizando los estimadores no paramétricos de la riqueza de especies, Shannon y Simpson (Shannon, 1948). La normalidad de los datos se evaluó usando la prueba Shapiro-Wilk. Las diferencias significativas entre los sitios de muestreo, la etapa de crecimiento del maíz o el genotipo de la planta, fueron evaluadas mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) seguido por una prueba post hoc HSD de Tukey, usando la paquetería de VEGAN (Oksanen, 2015) en el software R (versión 3.4.9; R core team 2014). El índice de disimilitud de Bray-Curtis fue calculado con base en la abundancia de OTUs obtenidos y analizados vía PERMANOVA (999 permutaciones) (Anderson y Walsh, 2013) usando la función ADONIS y la paquetería VEGAN en R. El promedio de la abundancia relativa de los órdenes individuales fue establecido para cada ubicación y posteriormente se determinó si existían diferencias significativas vía ANOVA. Esto permitió evaluar si los cambios observados

en la comunidad de nematodos con respecto a la ubicación en donde fue tomada la muestra correlacionaban con cambios en las afiliaciones taxonómicas.

6.2 Aislamiento de nematodos de vida libre de la rizosfera de maíz y estudio de sus interacciones con bacterias rizosféricas y plantas.

6.2.1 Aislamiento de nematodos

Los nematodos utilizados en este trabajo fueron aislados de la rizosfera de plantas de maíz provenientes de campos agrícolas de la Ciudad de México y Guanajuato. El aislamiento de los nematodos se realizó de acuerdo con el protocolo reportado por Barrière y Félix en el 2006, que consiste en colocar una muestra de raíces con suelo rizosférico (1g) en los bordes de una caja de Petri con medio sólido NGM (del inglés “Nematode Growth Medium”; 17g/L Agar BD Difco™ New Jersey USA, 2.9g/L NaCl, 2.5g/L Peptona BD Difco™ New Jersey USA, 0.001M CaCl₂, 5mg/L Colesterol, 1 mM MgSO₄ y 25 mM KH₂PO₄ pH6) conteniendo un inóculo de *Escherichia coli* DH5α en el centro de la misma (Figura 6). Las cajas de Petri se incubaron a temperatura ambiente hasta que los nematodos alcanzaron el cultivo bacteriano. Una vez ahí, nematodos individuales fueron colectados observándolos en un estereomicroscopio y colocados en una nueva caja Petri con cultivo bacteriano fresco para su propagación. Los nematodos aislados se mantuvieron a 20°C en medio NMG, alimentados con *E. coli* DH5α.

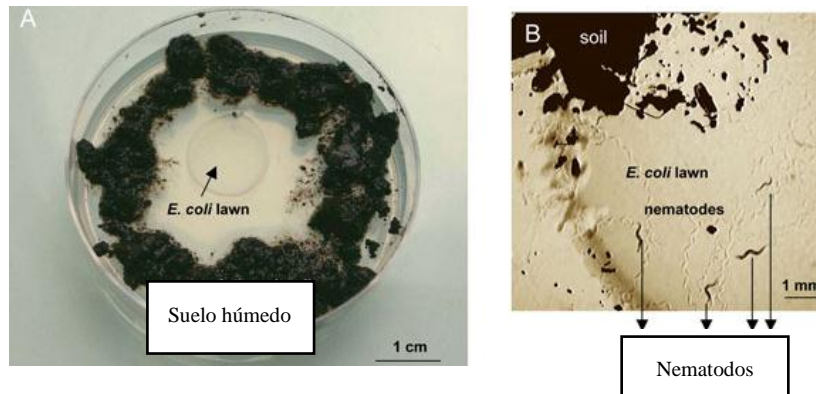


Figura 6. Aislamiento de nematodos bacterívoros de muestras de suelo. **A)** Caja de Petri con medio NGM donde se creció un cultivo bacteriano (*E. coli*) en el centro y se colocó alrededor la muestra de suelo rizosférico. **B)** Un acercamiento del centro de la caja de Petri (cultivo bacteriano) con los nematodos atraídos, las flechas indican donde se observan los nematodos (Barrière y Félix, 2006).

6.2.2 Identificación taxonómica de los nematodos aislados.

Para el aislamiento del ADN, se tomaron nematodos individuales de las cajas en donde se cultivaron y se colocaron en un tubo de 1.5 ml con 20 μ l de NaOH 0.25M. Los tubos se incubaron toda la noche a temperatura ambiente, al día siguiente se calentaron a 95°C por 3 min y en seguida se agregaron 4 μ L de HCl 1M, 10 μ L de Tris-HCl 0.5M (pH 8) y 5 μ L de Triton X-100. Las muestras se calentaron nuevamente a 95°C por 3 min y posteriormente se incubaron a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente, la mezcla se pasó por una columna QIAprep Spin column (QIAGEN) para obtener ADN puro. El ADN purificado se utilizó entonces como templado para amplificar el gen ARNr 18S (1.6 kb) usando *Taq* ADN polimerasa y las parejas de oligonucleótidos F43-18Sr2b (Tabla 5) que amplifican el gen completo del 18S. También se amplificó un fragmento del gen COI usando los oligonucleótidos COI_jb3-F y COI_jb5R (Tabla 5). Las condiciones de PCR fueron: 95°C por 5 min; 30 ciclos a 95°C por 30 seg, 55°C por 1 min 30 seg, 72°C por 2 min; y un ciclo a 72 por 10 min. Los productos obtenidos se purificaron por columna y se secuenciaron por el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Las secuencias

obtenidas se compararon con la base de datos del NCBI y una base de datos específica para nematodos <http://xyala.cap.ed.ac.uk/downloads/959nematodegenomes/blast/blast.php>.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para amplificar y secuenciar el ARNr 18S y el gen de la COI de nematodos.

F43 5'-ATTAAGCCATGCATGTC-3'
18Sr2b 5'-TACAAAGGGCAGGGACGTAAT-3'
COI_jb3-F 5'-GATTTTTTGGTCAYCCGGARGT—3'
COI_jb5R 5'-GYAACTACATAATAAGTRTCRTG-3'

6.2.3 Ensayos para evaluar la preferencia de nematodos aislados de la rizosfera del maíz por diferentes bacterias

Las bacterias utilizadas en estos ensayos fueron *Bacillus subtilis* sp. CGE2031 (este estudio), *E. coli* DH5a (Taylor *et al.*, 1993), *E. coli* OP50 (Brenner, 1974), *Methylobacterium extorquens* Am1 (Peel y Quayle, 1961), *Rhizobium etli* CFN42 (Quinto *et al.*, 1985), *R. etli* CFN42 DsRed (Torres Tejerizo *et al.*, 2015), *R. phaseoli* Ch24-10 (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2004), *R. tropici* CIAT 899 (Martínez-Romero *et al.*, 1991), *Streptomyces* spp. (este estudio), y *Acinetobacter pittii* (este estudio). Todas las bacterias se crecieron a 30°C en medio PY (del inglés “peptone yeast médium”, BD Difco™ New Jersey USA) con gentamicina (30 mg/ml) o espectinomocina (30 mg/ml) cuando se requirió.

Para los ensayos de preferencia, las cepas bacterianas se crecieron en tubos de ensayo hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 medida a 600 nm, posteriormente se tomaron 50 µL del cultivo bacteriano y se colocaron en los bordes de una caja de Petri conteniendo medio NGM.

Una vez sembradas en las cajas, las bacterias se incubaron por 24 h a temperatura ambiente. Una vez crecidas las bacterias, se colocaron 100 nematodos, previamente lavados y resuspendidos en agua estéril, en el centro de las cajas Petri. Después de una hora, se contó el número de nematodos en cada uno de los inóculos bacterianos utilizando un estereoscopio (Figura 7).

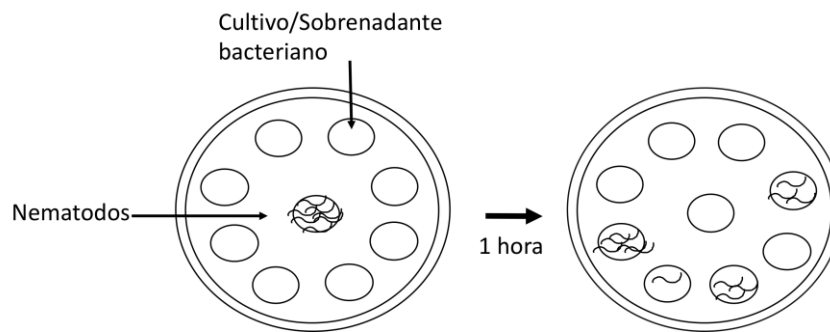


Figura 7. Diseño experimental para la determinación de la preferencia de los nematodos hacia diferentes bacterias rizosféricas o sus sobrenadantes.

Para los ensayos de atracción de nematodos con sobrenadantes bacterianos, las bacterias indicadas anteriormente se crecieron durante 48 h a 28°C en tubos de ensayo con 5 ml de medio PY con agitación. Posteriormente, 1 ml del cultivo bacteriano se filtró utilizando una membrana de 0.2 μm para eliminar las bacterias y 50 μl del filtrado se colocaron en el borde de las cajas Petri, como se indica en la Figura 7.

6.2.4 Análisis de las interacciones nematodo-bacteria por microscopía confocal

Los nematodos adultos se colocaron en cajas de Petri con medio NGM previamente inoculadas con la cepa reportera *R. etli* CFN42 DsRed, o *R. etli* CFN42 (como control negativo), y se incubaron a 25°C por siete días. Los nematodos fueron recuperados y transferidos a nuevas cajas Petri conteniendo un cultivo bacteriano fresco. Este proceso se realizó durante un mes. Después de este periodo, los nematodos se recuperaron de las cajas, se fijaron con etanol en

portaobjetos. Para la toma de imágenes se utilizó un microscopio confocal invertido de escaneo con láser LSM-510 META (Carl Zeiss, Göttingen, Alemania) equipado con un objetivo de inmersión 100X de contraste de fases (N.A. 13: Plan Neofluar, Carl Zeiss) en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada ubicado en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Para examinar la expresión de DsRed se usó un láser de He1/Ne1 Exc/Em 543/ nm. Este microscopio es equipado con un fotomultiplicador que permitió capturar imágenes tanto de fluorescencia como de contraste de fases. Para la obtención de imágenes y series de tiempo se utilizó el software LSM-510 versión 3.2 (Carl Zeiss) y se evaluaron con el LSM-510 Image Examiner versión 3.2. Las imágenes obtenidas fueron convertidas a formato TIFF (Tagged Image File Format).

6.2.5 Determinación del efecto de los nematodos sobre el crecimiento de plantas de maíz

Para evaluar el efecto de los nematodos sobre el crecimiento de plantas de Maíz, en presencia o ausencia de *Rhizobium*, se diseñó el siguiente experimento. Semillas de maíz criollo del estado de Hidalgo se esterilizaron colocándolas un minuto en etanol al 70%; posteriormente, se lavaron durante un minuto con agua estéril, después se incubaron con cloro al 20% por 20 minutos, se lavaron 5 veces con agua estéril, una vez con tiosulfato de sodio al 2%, y finalmente con agua estéril. Las semillas estériles se germinaron durante 48 h en agar Fahræus (0.1 g CaCl₂, 0.12 g MgSO₄.7H₂O, 0.1 g KH₂PO₄, 0.15 g Na₂HPO₄, 0.005 g de citrato de hierro, trazas de Mn, Cu, Zn, B, Mo, y 0.7% agar por litro de agua) (Fahraeus, 1957), en un cuarto con temperatura controlada (20°C, ciclos de 16 h/luz/oscuridad). Una vez germinadas las semillas se colocaron en matraces de vidrio de 250 ml con vermiculita estéril. A cada planta se le adicionaron 30 nematodos adultos por gramo de vermiculita (~2000-3000 individuos).

Los inóculos de las bacterias se crecieron en medio PY suplementadas con 0.7 ml de una solución de CaCl₂ 1 M hasta alcanzar una densidad óptica de aproximadamente 0.6 medida a 600 nm. Posteriormente, el inóculo bacteriano se lavó dos veces con PBS 1X (pH 7.0) con centrifugaciones a 5,000 rpm por 5 minutos. Cuando se indica, a cada matraz se le adicionó ~10⁶ bacterias por gramo de vermiculita. Los diferentes tratamientos utilizados en estos ensayos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Ensayos experimentales para evaluar el efecto de los nematodos y *Rhizobium* en el crecimiento de plantas de maíz.

No.	Bacteria (10 ⁶ por g de vermiculita)	Nematodo (30 por g de vermiculita)	No. de matraces
1	-	-	10
2	<i>R. phaseoli</i>	-	10
3	-	<i>Mesorhabditis</i> sp.	10
4	<i>R. phaseoli</i>	<i>Mesorhabditis</i> sp.	10

No.	Bacteria (10 ⁶ por g de vermiculita)	Nematodo (30 por g de vermiculita)	No. de matraces
1	-	-	10
2	<i>R. phaseoli</i>	-	10
3	-	<i>Oscheius</i> <i>tipulae</i>	10
4	<i>R. phaseoli</i>	<i>Oscheius</i> <i>tipulae</i>	10

Las plantas tratadas como se muestra arriba se crecieron durante 30 días. Posteriormente, se determinó la altura de la planta y el peso seco de la parte aérea. Para corroborar la presencia de los nematodos en las raíces, se colocó la raíz de cada una de las plantas tratadas con nematodos en cajas de NGM y se incubaron durante 4 días a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las cajas Petri se observaron al estereoscopio.

6.2.6 Análisis de la morfología de la raíz de maíz en presencia de los nematodos

Para evaluar el efecto de los nematodos en el desarrollo de la raíz de plantas de maíz, se germinaron semillas criollo de Hidalgo en matraces de vidrio Erlenmeyer con 200 ml de agar semi-sólido Fahræus durante una semana. Las plantas fueron inoculadas como se describió en el apartado anterior (Tabla 6). Después de 7 días las plantas se colectaron y se determinó el largo y el peso seco de la raíz, así como la altura y el peso seco de la parte aérea, como se describió previamente (Piromyou *et al.*, 2011).

6.2.7 Estudio de la morfología de la raíz de *A. thaliana* en presencia de los nematodos y *R. phaseoli*

Para validar y/o comparar los resultados obtenidos en maíz, también se realizaron ensayos en *A. thaliana*. Para esto, semillas del ecotipo Col-0 fueron esterilizadas con hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) por 5 minutos, y posteriormente se embebieron en agua destilada estéril por 2 días a 4°C. Las plantas se crecieron verticalmente en placas con medio MS (Murashige Skoog, Sigma Aldrich, San Luis Misuri, EUA) 0.2 X pH 5.7 (L477, Phyto Technology Laboratories, Lenexa, KS, U.S), suplementado con 1% de sacarosa, vitaminas (0.5 mgL⁻¹ piridoxina, 0.5 mgL⁻¹ ácido nicotínico) y 0.8% agar. Todas las plantas fueron crecidas a 21°C con un ciclo 16/8 h luz/oscuridad y una intensidad de luz de 105 µmol fotones m²s⁻¹. Las plantas se inocularon 4 días después del tiempo de germinación (definido como el momento cuando la raíz primaria fue visible bajo un estereoscopio). Los nematodos y/o bacterias fueron colocados en la parte inferior de las cajas Petri (mismos tratamientos que en Tabla 6). Luego de 7 días, la raíz primaria y el número de raíces laterales se cuantificaron usando imágenes escaneadas con el software ImageJ (Schneider *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2018).

6.2.8 Asilamiento e identificación de bacterias asociadas a los nematodos

Con el objetivo de aislar bacterias asociadas a los nematodos, éstos fueron cultivados en cajas Petri con NGM por tres días, o hasta que alcanzaron la fase adulta, y posteriormente se lavaron cinco veces con agua estéril. Para lisar los nematodos, 50 gusanos adultos se suspendieron en agua estéril con perlas de zirconio y se centrifugaron por 5 minutos a 5,000 rpm. Posteriormente, se realizaron diluciones seriales a partir de este lisado y 500 µl de cada una de las diluciones se plaquearon en medio NGM para obtener colonias aisladas. Se colectaron 10 colonias con morfología diferente, se crecieron en NGM y se usaron para extraer ADN mediante el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN Hilden Alemania). El ADN purificado se usó como templado para amplificar el gen ARNr 16S. Los oligonucleótidos utilizados fueron: fd1 '5'-CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3', y rd1 5'-CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GCC-3'. La PCR se realizó usando *Taq* ADN polimerasa (ThermoFisher Scientific) bajo las siguientes condiciones de reacción: 95°C por 5 min; 30 ciclos a 95°C por 30 s, 55°C por 1 min 30 s, 72°C por 2 min; y un ciclo a 72 por 10 min.

6.2.9 Estudio de la morfología de la raíz de *A. thaliana* en presencia de las bacterias aisladas de los nematodos

Para poder distinguir si el efecto observado en los cambios de la raíz era debido a la presencia del nematodo o las bacterias asociadas a ellos, germinamos e inoculamos semillas de *A. thaliana* como se realizó en el apartado 6.2.7. Éstas fueron inoculadas con una bacteria aislada de los nematodos compartida entre *O. tipulae* y *Mesorhabditis* sp. y/o el gusano *C. elegans* N2, provisto por el Dr. Juan Miranda de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Este nematodo es

mantenido en cultivos monoxénicos con *E. coli* OP50. El largo de la raíz primaria y número de raíces laterales se cuantificó a los 7 días después de la inoculación como en el apartado 6.2.7.

7 RESULTADOS

7.1 Estudio de la diversidad de nematodos en la rizosfera de plantas de maíz sembradas en campos agrícolas de México

7.1.1 Resultados de secuenciación masiva

El estudio de las comunidades de nematodos en muestras complejas como el suelo requiere pasos experimentales de enriquecimiento. En este proyecto utilizamos una metodología de amplificación basada en dos reacciones de PCR (reportada recientemente por Sapkota *et al.*, 2015), la cual permite el enriquecimiento de secuencias de DNA de nematodos sin pasos experimentales previos. Utilizando esta tecnología obtuvimos 4,736,284 de secuencias en total a partir de los amplicones obtenidos de las 16 muestras de rizosfera de maíz mostradas en la Tabla 1, de las cuales 1,744,259 pasaron los filtros de calidad después de eliminar quimeras y descartar secuencias repetidas. Cada una de estas secuencias fueron agrupadas en 573 OTUs usando un porcentaje de similitud del 97%. A pesar de contar con un número relativamente bajo de OTUs, la mayoría (~70%) de los mismos fueron asignados taxonómicamente a nematodos (Figura 8). Dicho porcentaje fue similar al reportado en un trabajo relacionado en el se hizo uso de los mismos oligonucleótidos con muestras de ADN aislado de campos agrícolas de trigo (Sapkota y Nicolaisen, 2015).

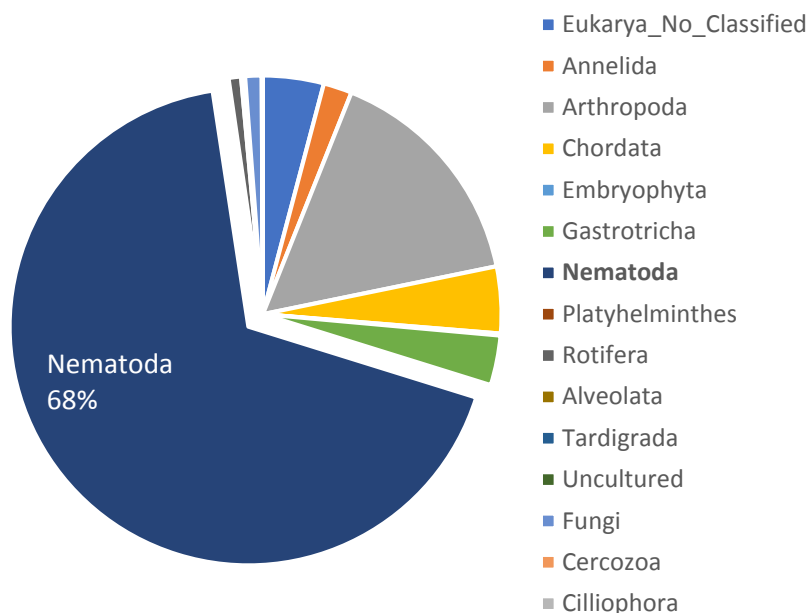


Figura 8. Abundancia relativa de OTUs pertenecientes a nematodos (Nematoda) y otros filos de eucariontes (indicados a la derecha), mediante al análisis de secuencias del ARNr 18S amplificadas a partir del ADN aislado de las 16 muestras de rizosfera de maíz mostradas en la Tabla 1.

7.1.2 La región de colección de la muestra no modifica la riqueza de especies, pero sí la composición de nematodos.

La riqueza de especies (diversidad alfa) estimada a partir de los índices de Shannon y Simpson, determinada para la comunidad de nematodos en función del número total de OTUs y en las regiones muestreadas (Figura 9A), reveló que no existen diferencias significativas en la riqueza total de especies entre las diferentes regiones (Figura 9B y C).

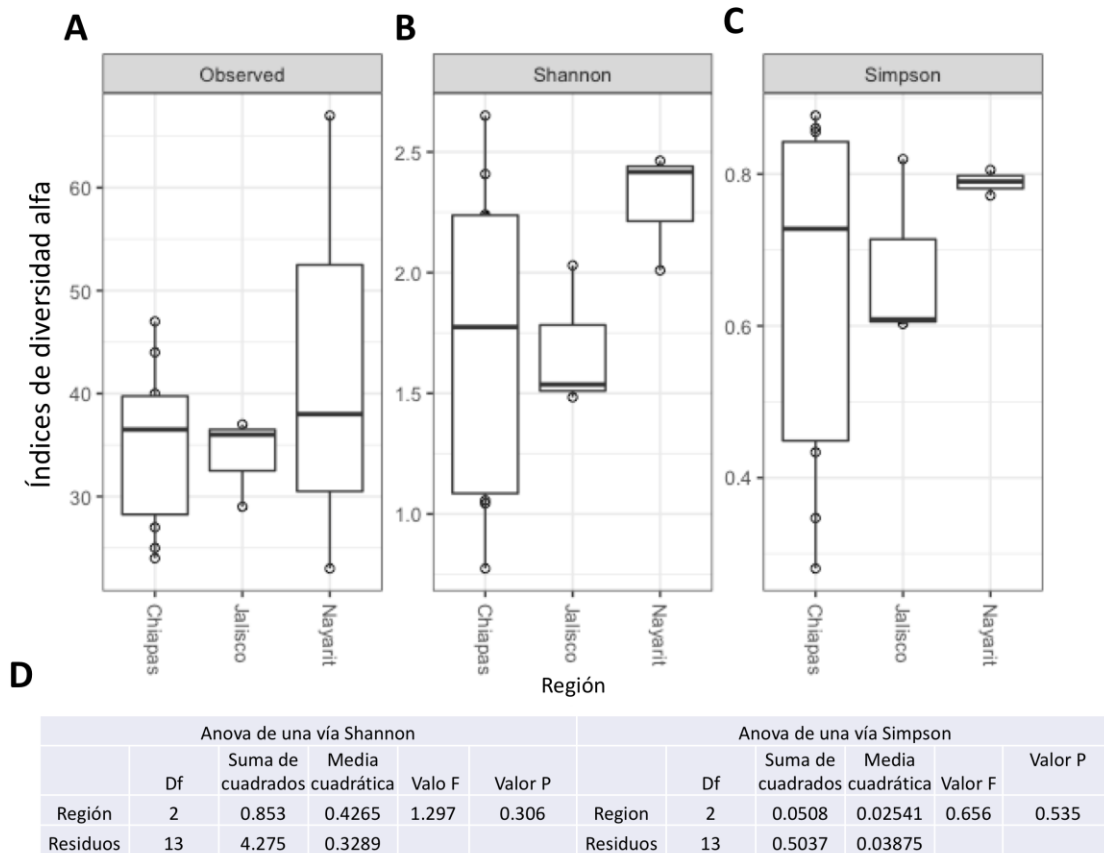
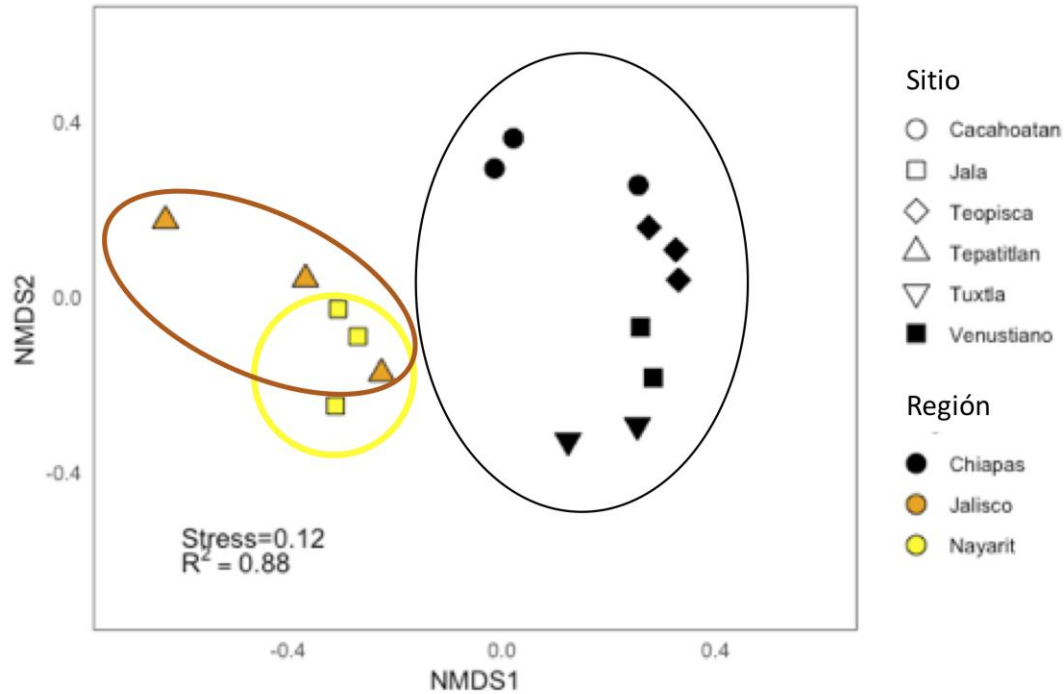


Figura 9. Diversidad alfa de nematodos para cada una de las tres regiones muestreadas. Número de especies (OTUs) observados (A), estimaciones de riqueza Shannon (B) y Simpson (C) para cada región. Tabla de resultados del análisis ANOVA para calcular las diferencias significativas entre los valores de riqueza calculados (D). En las gráficas se muestran los promedios y errores estándar de las muestras.

Sin embargo, al analizar la diversidad beta para determinar la diferencia en composición de especies entre estas localidades, sí se encontraron diferencias en la composición de la comunidad de nematodos debido al origen geográfico de las muestras (Pseudo-F=1.1; $P < 0.01$; Figura 10). En el análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS por sus siglas en inglés), calculado a partir de una matriz de disimilitud Bray-Curtis utilizando los datos de abundancia de los OTUs para la comunidad de nematodos, observamos que las muestras se agrupan significativamente dependiendo de la región en donde fue tomada la muestra (Figura 10).



Permanova de la matriz de disimilitud a partir de los OTUs de Nematodos.
Número de permutaciones: 999

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F.Model	R2	Pr(>F)
Sitio	5	2.913	0.58261	1.3898	0.40999	0.001***
Residuos	10	4.192	0.4192	0.59001		
Total	15	7.1051	1			

Figura 10. Análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de las muestras de suelo rizosférico. NMDS calculado a partir del índice de disimilitud Bray-Curtis para la comunidad de nematodos presentes en la rizosfera de maíz utilizando las abundancias de OTUs. En la Figura cada punto representa una muestra individual. En la Tabla se muestra el resultado del análisis de varianza multivariado no paramétrico (PERMANOVA) basado en distancias de Bray-Curtis usando el factor región.

Posteriormente, con el objetivo de evaluar el cambio de poblaciones específicas de nematodos entre las diferentes muestras, se analizó la distribución de estos organismos a nivel de orden. De manera general, se encontró que los órdenes más abundantes fueron: Tylenchida, Dorylaimia, Enoplia y Rhabditida, los cuales estuvieron presentes en la mayoría de las muestras, aunque con una abundancia relativa diferente entre las mismas (Figura 11). En el caso específico

de la región de Nayarit (Sitio Jala), observamos una distribución similar entre las tres muestras colectadas, siendo los órdenes Enoplia, Tylenchida y Rhabditida los más abundantes en todas ellas. Por otro lado, las muestras de Jalisco (Sitio Tepatitlán) presentaron una mayor dispersión en la abundancia relativa de los diferentes órdenes, siendo el orden Enoplia el más abundante en la muestra sin planta (T0), el cual disminuyó drásticamente después del crecimiento de la planta (R6) y correlacionó con un incremento del orden Dorylaimia. Para las muestras de Chiapas (sitios Teopisca, Venustiano, Tuxtla y Cacahoatán), observamos que, en general, el orden más abundante es Enoplia, a excepción de las muestras de Teopisca en donde existe una abundancia mayor del orden Tylenchida, y Cacahoatán que también mostró una abundancia elevada del orden Rhabditida.

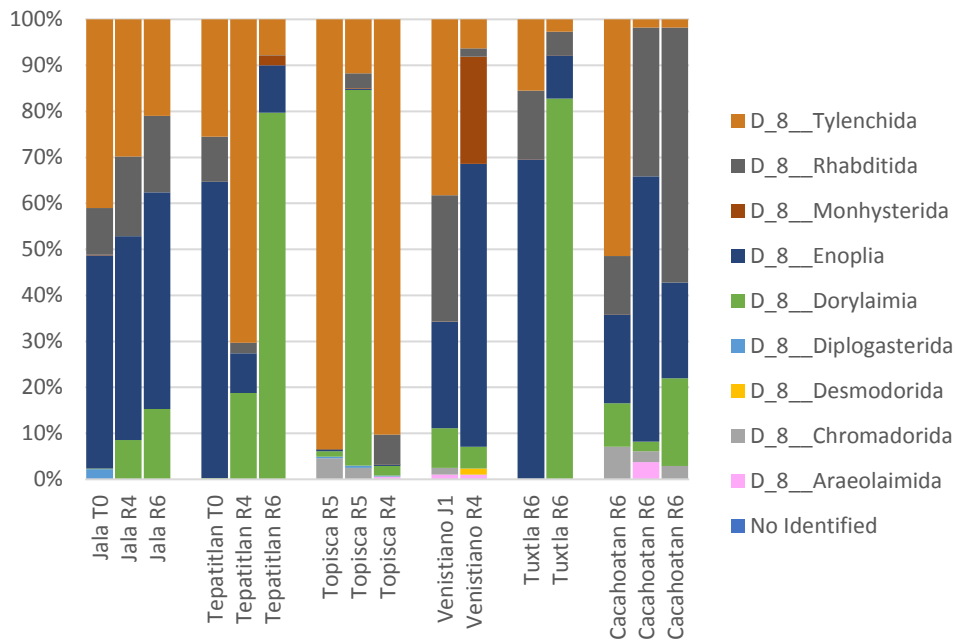


Figura 11. Distribución relativa de las secuencias de nematodos a nivel de orden usando el gen marcador ARNr 18S. Debajo del gráfico se muestra el nombre del sitio donde se tomó la muestra y a la derecha los órdenes identificados.

Finalmente, con la finalidad de realizar una clasificación funcional de los nematodos identificados en las muestras de rizosfera, se realizó una búsqueda en la literatura para asignar los grupos tróficos correspondientes a cada uno de los órdenes encontrados. Observamos que los órdenes ubicuos en todas las muestras, Dorylaimia, Tylenchida y Rhabditida, se caracterizan por ser omnívoros, herbívoros y bacteriófagos, respectivamente (Tabla 7), lo cual sugiere la presencia de una amplia gama de fuentes alimentarias para estos organismos, que suele ser reflejo de un suelo “sano”.

Tabla 7. Asignación de los órdenes de nematodos a un grupo trófico.

Orden	Jala Abund Relat. (%)	Tepatitlán Abund Relat. (%)	Teopisca Abund Relat. (%)	Venustiano Abund Relat. (%)	Tuxtla Abund Relat. (%)	Cacahoatán Abund Relat. (%)	Grupo trófico
Araeolaimida	0.0	0.0	0.2	1.0	0.0	1.2	Predador de bacterias
Chromadorida	0.0	0.0	2.4	0.8	0.0	4.1	Predador de bacterias y algas
Desmodorida	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	Predador de algas
Diplogasterida	0.7	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	Predador de bacterias
Dorylaimia	8.0	32.9	28.3	6.7	41.4	10.2	Omnívoro
Enoplia	45.9	27.8	0.3	42.3	39.4	32.5	Omnívoro
Monhysterida	0.1	0.7	0.0	11.6	0.0	0.0	Predador de bacterias y algas
Rhabditida	14.7	4.1	3.2	14.6	10.0	33.5	Predador de bacterias y parásito de insectos
Tylenchida	30.6	34.5	65.2	22.3	9.1	18.3	Predador de hongos, plantas y parásito de insectos

Conclusiones del apartado 7.1:

- * La amplificación del ARNr 18S, usando la estrategia de dos PCR consecutivas reportada por Saptoka *et al.*, 2015, permitió la amplificación de secuencias en su mayoría específicas de nematodos, sin la necesidad del enriquecimiento de la muestra.
- * No se encontraron diferencias en la riqueza total de OTUs en las diferentes regiones, pero sí en la composición de las comunidades de nematodos, la cual fue más similar entre muestras tomadas en una misma región, sugiriendo que factores asociados a los sitios, como tipo de suelo, humedad, temperatura, pH etc., influyen en el desarrollo y establecimiento de estos organismos.
- * Se encontraron varios órdenes ubicuos de nematodos en todas las muestras analizadas, mientras que otros fueron específicos del sitio, lo cual indica que las poblaciones de estos organismos responden a características particulares de los campos correspondientes.
- * Obtuvimos una gran proporción de nematodos omnívoros, bacteriófagos y herbívoros, lo cual es un indicativo de una buena “calidad” de los suelos muestreados.

7.2 Aislamiento de nematodos de vida libre aislados de la rizosfera de maíz y estudio de su efecto en el desarrollo de las plantas

7.2.1 *Oscheius tipulae* y *Mesorhabditis* sp. son nematodos de vida libre asociados a la rizosfera de maíz

Considerando que se observó una abundancia significativa de nematodos que se alimentan de bacterias en las muestras de rizosfera de maíz analizadas (Tabla 7), se decidió aislar nematodos bacteriófagos del suelo rizosférico del maíz con el objetivo posterior de estudiar el papel de dichos organismos en el desarrollo de la planta, así como su interacción con bacterias del suelo. Los

nematodos se aislaron a partir de las siguientes muestras: suelo boscoso tratado con materia orgánica que se utilizó para sembrar plantas de maíz criollo en el laboratorio; y suelo rizosférico de maíz de un campo agrícola de Guanajuato.

Siguiendo la metodología descrita en materiales y métodos, se aislaron dos nematodos de morfologías diferentes y se identificaron mediante los marcadores genéticos ARNr 18S y COI. El análisis de la secuencia del gen ARNr 18S permitió identificar a los nematodos como *Oscheius tipulae* y *Mesorhabditis* sp (ambos del orden Rhabditida). De manera similar, usando el gen de la COI y una base de datos de secuencias específicas de nematodos, encontramos que el nematodo previamente identificado como *O. tipulae* en el análisis del 18S presentó un 98% de identidad con un fragmento del genoma de un aislado perteneciente a la misma especie (*O. tipulae*, contig 9003) (ANEXO III), confirmando así la identidad de este organismo. En contraste, la secuencia del COI del nematodo previamente identificado como *Mesorhabditis* sp. no alineó en dicha base de datos, posiblemente debido a la baja cantidad de secuencias disponibles para el COI con respecto a las del 18S. Ambos nematodos pertenecen a la familia Rhabditidae y son cercanos filogenéticamente al organismo modelo *Caenorhabditis elegans* (Figura 12). Este taxón comprende una gran diversidad de nematodos y está dividido en dos grandes clados: “Pleiorhabditis” que incluye el género *Mesorhabditis* y “Eurhabditis”, que incluye tanto a *O. tipulae* como a *C. elegans* (Figura 12).

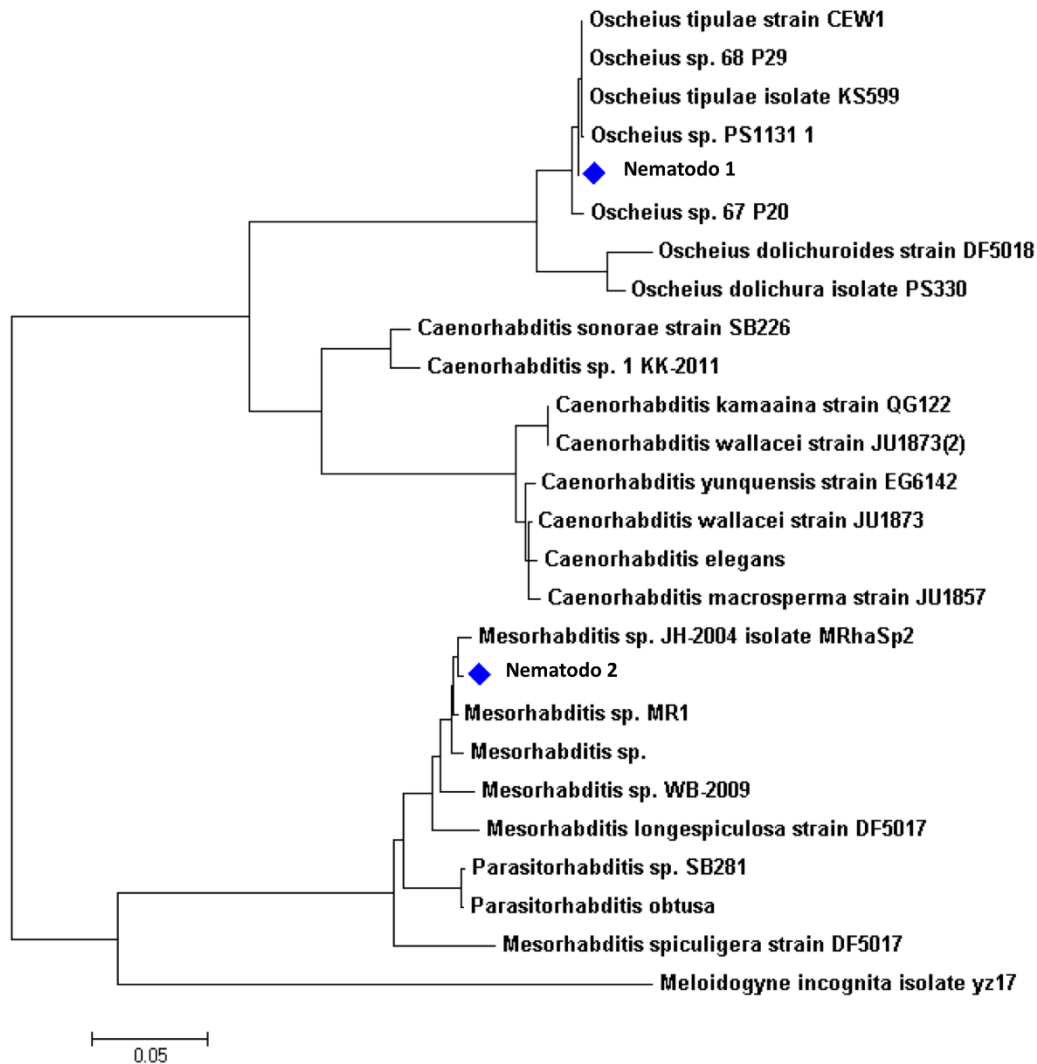


Figura 12. Análisis filogenético de los nematodos aislados de suelo rizosférico de maíz. El árbol filogenético se construyó usando 1500 nucleótidos del gen ARNr 18S. La historia evolutiva fue inferida mediante el método de máxima verosimilitud usando el modelo Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993). Las secuencias correspondientes al nematodo 1 (*O. tipulae*) y nematodo 2 (*Mesorhabditis* sp.) aislados de rizosfera de maíz se indican con rombos azules.

7.2.2 Los nematodos aislados muestran atracción por cepas de *Rhizobium*

Considerando que el sistema olfatorio de los nematodos que se alimentan de bacterias está altamente desarrollado, y que son capaces de identificar y seleccionar entre diversas fuentes de alimento (Choi *et al.*, 2015; Colbert y Bargmann, 1995; Salinas *et al.*, 2007), decidimos evaluar

las preferencias alimentarias de los nematodos aislados. Para esto, se utilizaron las siguientes cepas bacterianas previamente aisladas del suelo, las cuales además son capaces de promover el crecimiento de plantas de maíz en condiciones de laboratorio: *B. subtilis*, *E. coli*, *M. extorquens*, *R. etli* CFN42, *R. tropici* CIAT899, *R. phaseoli* Ch24-10 y *Streptomyces* spp. (Beneduzi *et al.*, 2012; Gutiérrez-Zamora y Martínez-Romero, 2001; Madhaiyan *et al.*, 2006; Rosenblueth y Martínez-Romero, 2004). La cepa de laboratorio *E. coli* DH5 α se utilizó como control en estos ensayos.

En los ensayos de atracción, encontramos que *O. tipulae* mostró una preferencia alta por bacterias del género *Rhizobium* (*R. phaseoli* Ch24-10, *R. etli* CFN42 y *R. tropici* CIAT899), así como por *E. coli* DH5 α (Figura 13A), y una menor preferencia por *M. extorquens*, *B. subtilis* y *Streptomyces* spp. En contraste, y a diferencia de *O. tipulae*, *Mesorhabditis* sp. presentó un patrón de preferencia más específico, ya que este nematodo fue mayormente atraído por las bacterias *E. coli* DH5 α y *R. tropici* CIAT899 (Figura 13B). Estos datos sugieren que *Rhizobium* podría ser una fuente de alimento común para ambas especies de nematodos en el suelo rizosférico.

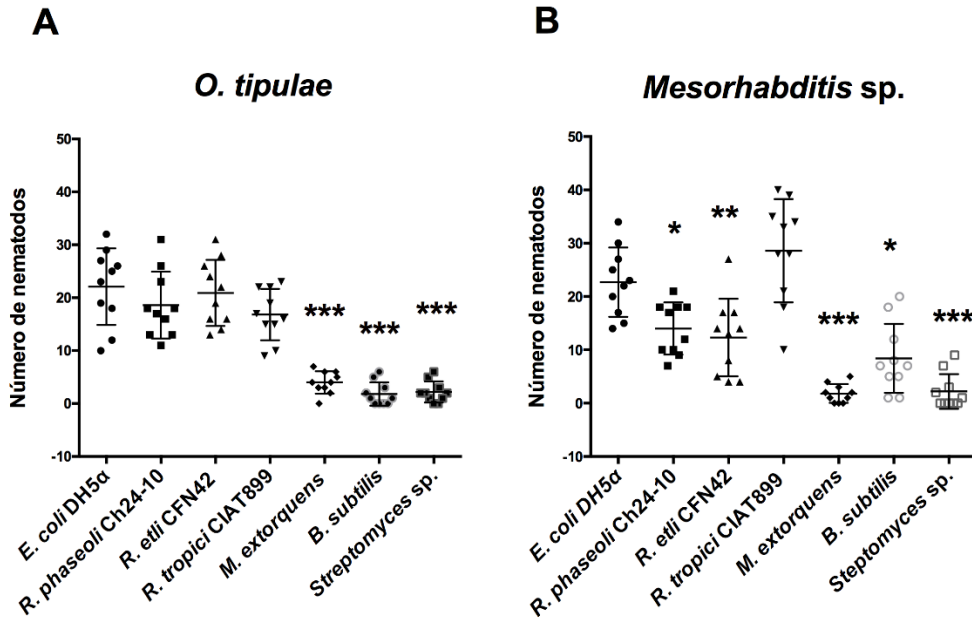


Figura 13. Número de nematodos atraídos hacia diferentes bacterias rizoféricas que indica la preferencia *in vitro* de los nematodos *O. tipulae* (A) y *Mesorhabditis sp.* (B) por cada bacteria. Se muestran los promedios y errores estándar del número de nematodos en cada inóculo bacteriano. * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.005$), *** ($P < 0.001$) (Prueba Pos Hoc Dunnet's $P \leq 0.05$) con respecto a *E. coli* DH5α. Resultado representativo de al menos tres ensayos independientes.

Para determinar si la atracción de los nematodos *O. tipulae* y *Mesorhabditis sp.* hacia las bacterias mostradas en la Figura 13 se debe a la secreción de metabolitos bacterianos, se probó el efecto atrayente de los sobrenadantes producidos por las bacterias crecidas en cultivo. Encontramos un patrón de migración similar al observado con los inóculos bacterianos completos, aunque con menores niveles generales de atracción (Figura 14A y B), lo que indica que los compuestos secretados por las bacterias son responsables, al menos en parte, de los patrones de atracción observados.

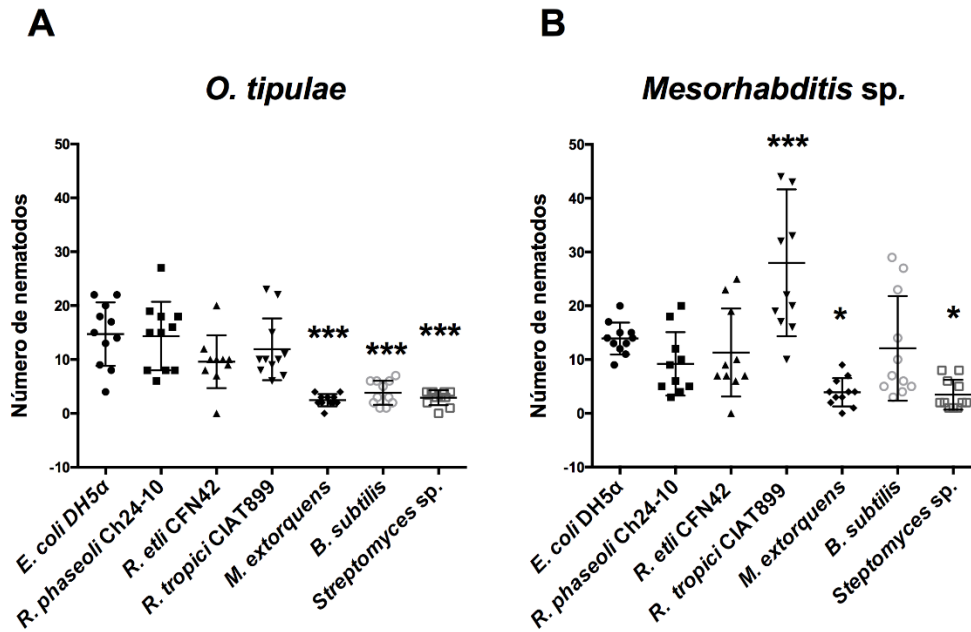


Figura 14. Número de nematodos aislados en los sobrenadantes bacterianos que indica la preferencia de los nematodos *O. tipulae* (A) y *Mesorhabditis sp.* (B) hacia estos. Se muestran los promedios y errores estándar del número de nematodos contados en cada inóculo bacteriano. * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.005$), *** ($P < 0.001$) (Prueba Pos Hoc Dunnet's $P \leq 0.05$) con respecto a *E. coli* DH5 α . Resultado representativo de al menos tres ensayos independientes.

Los experimentos de atracción mostrados anteriormente sugieren que *Rhizobium* es una fuente de alimento tanto para *O. tipulae* como para *Mesorhabditis sp.* Para confirmar esta observación, se alimentaron ambos nematodos con una cepa reportera de *R. etli* CFN42 que expresa constitutivamente la proteína fluorescente DsRed (Torres Tejerizo *et al.*, 2015) y posteriormente se analizaron los nematodos mediante microscopía confocal. Se detectó la señal fluorescente de la bacteria marcada a lo largo de la faringe y el intestino de los nematodos (Figura 15), confirmando así que los nematodos se alimentan de *Rhizobium*. Sin embargo, dado que la actividad DsRed requiere de células viables, estos resultados también indican que la bacteria no es consumida en su totalidad. Por lo tanto, considerando que *Rhizobium* tiene un papel importante en el desarrollo de plantas, principalmente de leguminosas, el consumo por nematodos podría

ayudar a su distribución y/o influenciar su función promotora de crecimiento en el suelo rizosférico.

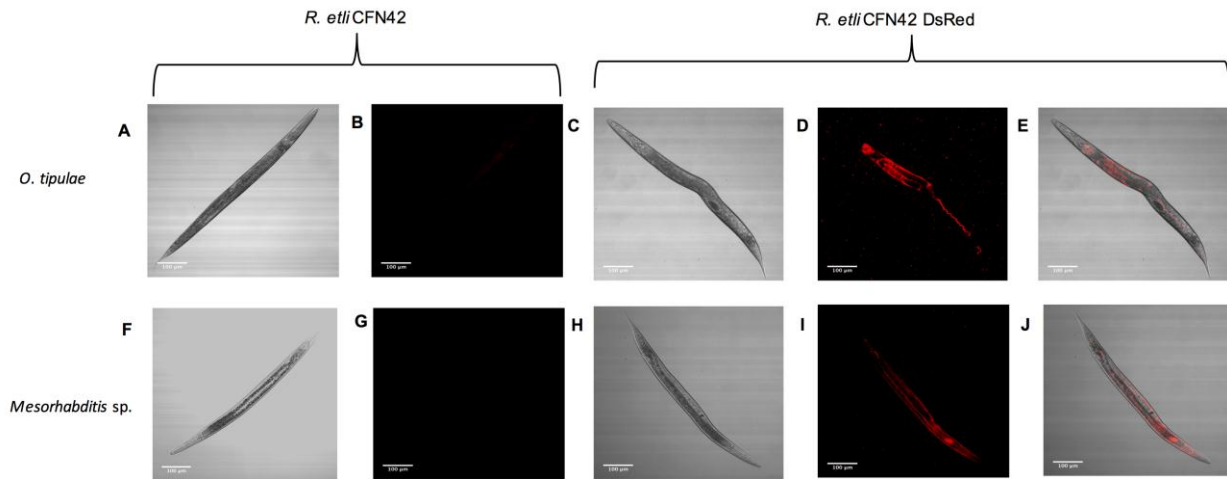


Figura 15. Micrografía de nematodos conteniendo bacterias de *R. etli* CFN42 en *O. tipulae* (A-E) y *Mesorhabditis* sp. (F-J). Los nematodos fueron alimentados con *R. etli* CFN42 DsRed o *R. etli* CFN42 (control negativo) durante un mes cada 7 días y visualizados en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 meta. (A), (F), (C) y (H), campo claro; (B), (G), (D) y (I), imágenes de fluorescencia; (E) y (J), sobre posición de campo claro y fluorescencia. Imagen representativa de 2 experimentos independientes, en cada experimento se observaron al menos dos nematodos de cada especie.

7.2.3 *O. tipulae* y *Mesorhabditis* sp. incrementan el crecimiento de plantas de maíz cuando son inoculados con *R. phaseoli* Ch24-10

Considerando que los nematodos utilizados en este trabajo se aislaron de suelo rizosférico de maíz, y que éstos además se alimentan de *Rhizobium*, decidimos evaluar el efecto de los nematodos y la bacteria sobre el desarrollo de plantas de maíz. Para esto se crecieron semillas de maíz criollo con o sin los nematodos y *R. phaseoli*, y se determinó la longitud y el peso seco de la parte aérea del maíz como parámetros de crecimiento. Se observó que la inoculación única de cada uno de los nematodos no incrementó los parámetros de crecimiento (altura y peso seco de la parte aérea) de las plantas de maíz (Figura 16 A-D); sin embargo, sí se encontró un incremento

en ambos parámetros cuando se inoculó cada uno de los nematodos en presencia de *R. phaseoli* Ch24-10 (Figura 1 A-D). Dicho crecimiento fue mayor al observado sólo con la inoculación de *R. phaseoli* Ch24-10, una bacteria previamente descrita como promotora del crecimiento de maíz (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2004). Estos resultados sugieren una actividad sinérgica entre estos microorganismos en la promoción del crecimiento del maíz.

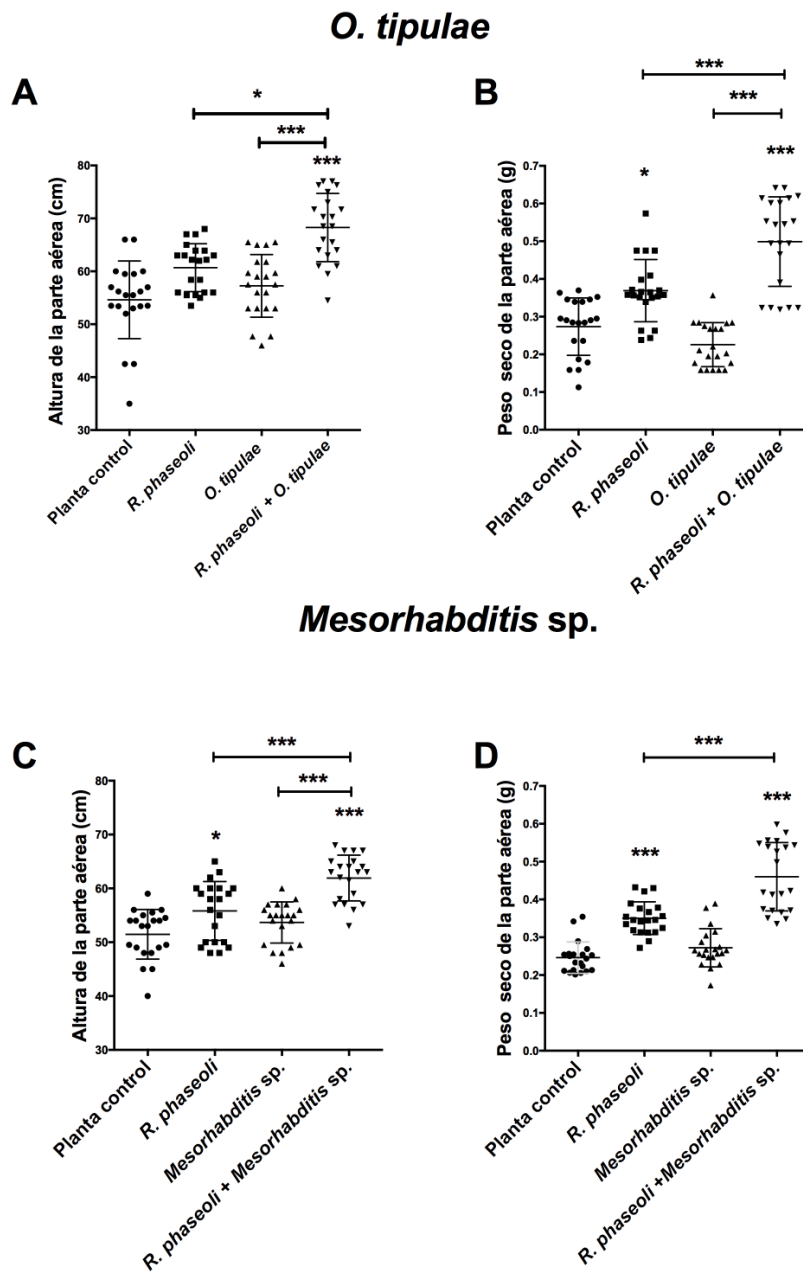


Figura 16. Altura y peso seco de la parte aérea de plantas de maíz que muestran el efecto de la inoculación de *O. tipulae*, *Mesorhabditis* sp. y/o *R. phaseoli* Ch24-10. Altura (A y C) y peso seco (B y D). Promedios y desviaciones de tres experimentos independientes. *($P < 0.05$), **($P < 0.005$), *** ($P < 0.001$) (Prueba Pos Hoc Dunn's o Tukey $P \leq 0.05$). Los asteriscos sencillos representan comparaciones con respecto al control, mientras que las comparaciones entre otros tratamientos se indican con líneas y asteriscos.

Posteriormente, para corroborar la presencia en las raíces de los nematodos inoculados en las plantas de maíz, los nematodos fueron observados con un estereoscopio al final del experimento descrito en la Figura 16. En todos los matraces inoculados con nematodos, se encontró la presencia de éstos en las raíces de las plantas correspondientes. La Figura 17 muestra imágenes representativas de estos análisis.

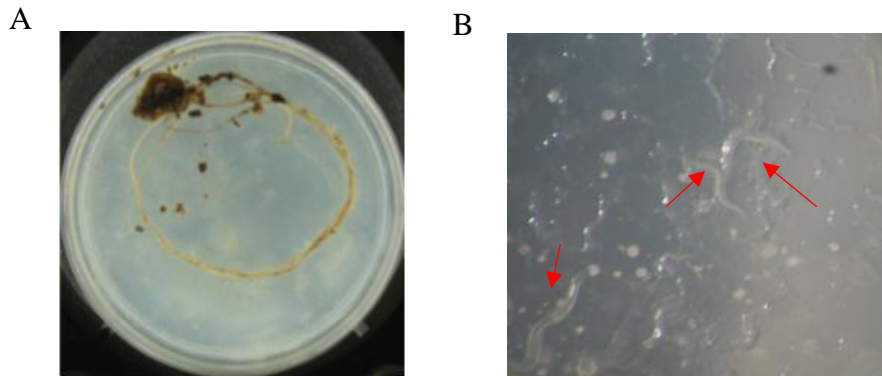


Figura 17. Micrografía de raíces de maíz inoculadas con los nematodos. A) Raíces colectadas de una planta de maíz tratada con nematodos. B) Nematodos observados al estereoscopio con una amplificación de 40X. Imágenes representativas de los tratamientos mostrados en la Figura 16. Las flechas indican dónde se observan los nematodos.

7.2.4 *O. tipulae* y *Mesorhabditis* sp. modifican la morfología de la raíz de plantas de maíz

Se ha descrito previamente que los nematodos pueden influenciar el metabolismo de las bacterias debido a la depredación y que pueden ocasionar un aumento en los niveles de ciertos metabolitos como las auxinas (Jiang *et al.*, 2012), lo que conlleva a un aumento en el crecimiento

de la planta y/o cambios en la morfología de la raíz. Por lo tanto, decidimos corroborar si los nematodos y/o bacterias aisladas de suelo eran capaces de modificar la morfología de la raíz de plantas de maíz. Encontramos que la inoculación con *O. tipulae* limitó el crecimiento de la raíz primaria en comparación con las plantas control, independientemente de la presencia de *R. phaseoli* (Figura 18A); mientras que para el caso de *Mesorhabditis* sp., que también limitó el crecimiento de la raíz primaria, la co-inoculación con *R. phaseoli* sí restableció la longitud de la raíz primaria a los niveles observados en las raíces inoculadas sólo con la bacteria (Figura 18A).

De manera similar, mientras que el peso seco de las raíces de *O. tipulae* no presentó diferencias significativas con respecto al control, y el tratamiento con *O. tipulae* más *R. phaseoli* mostró valores similares a los observados en las plantas tratadas sólo con la bacteria (Figura 18B), las plantas tratadas con *Mesorhabditis* sp. sí mostraron un incremento en el peso seco de la raíz. Dicho incremento fue favorecido con la adición de *R. phaseoli*, mostrando valores mayores en comparación al control y las plantas tratadas con *R. phaseoli* solamente. Por otra parte, observamos un aumento en el número de raíces laterales y longitud de las mismas en las plantas inoculadas con las mezclas nematodos-bacteria, siendo más pronunciada en los tratamientos con *Mesorhabditis* sp. (Figura 18C). Estos resultados indican que los nematodos tienen un efecto diferencial en el desarrollo de la arquitectura de la raíz en presencia de *Rhizobium*.

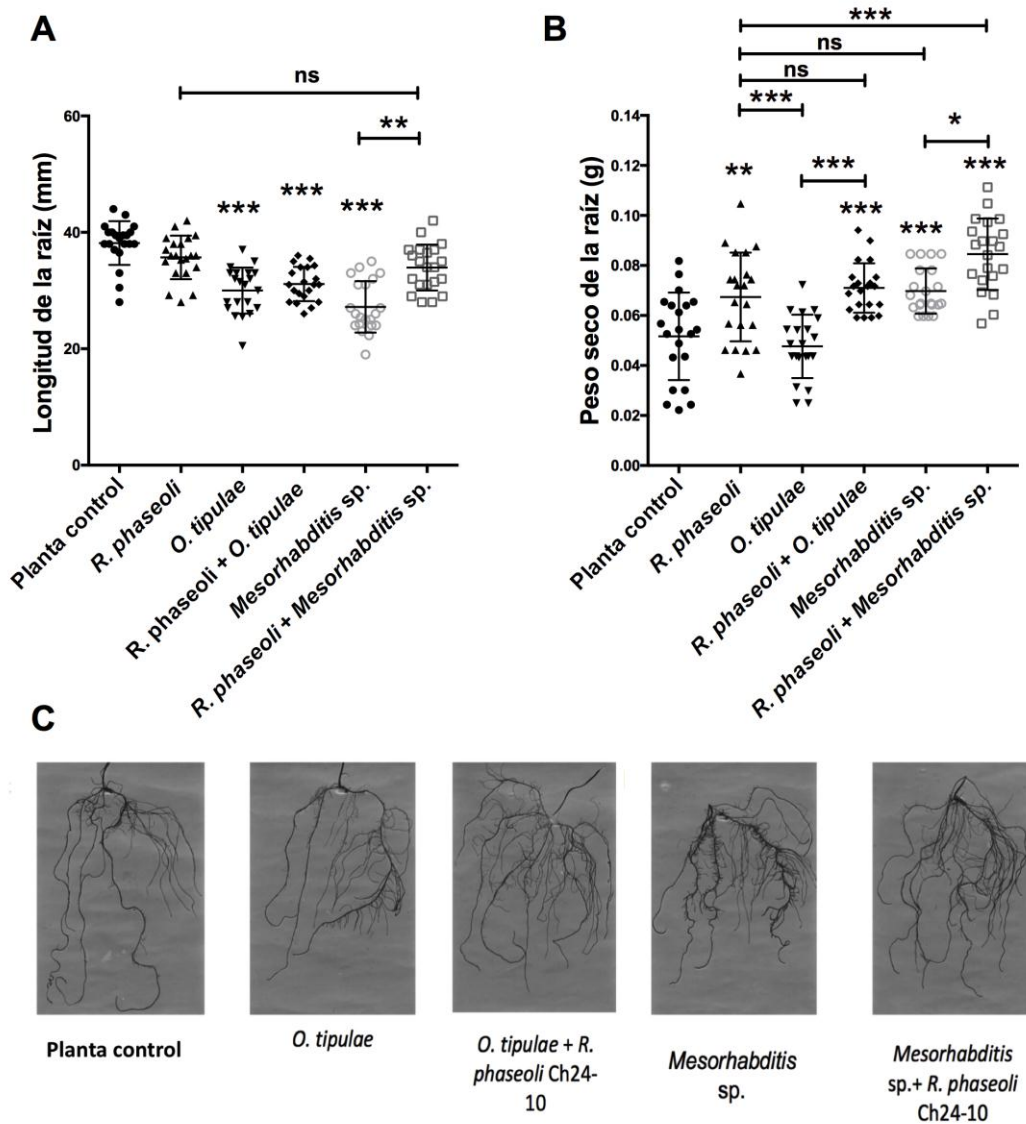


Figura 18. Raíces de plantas de maíz inoculadas con *Mesorhabditis* sp., *O. tipulae* y/o *R. phaseoli* Ch24-10. Longitud (A), peso seco. (B) Imágenes representativas de la raíz en cada uno de los tratamientos. Promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. *($P < 0.05$), **($P < 0.005$), *** ($P < 0.001$) (Prueba Pos Hoc Dunn's o Tukey $P \leq 0.05$), los asteriscos sencillos representan comparaciones con respecto al control, mientras que las comparaciones entre los tratamientos se indican con líneas y asteriscos.

Por otro lado, durante esta etapa temprana del crecimiento de la planta (7 días después la germinación), la longitud (altura) y el peso seco de la parte aérea de las plantas inoculadas con *O. tipulae*, *Mesorhabditis* sp. y/o *R. phaseoli*, no presentaron diferencias significativas con respecto a las plantas control (Figura 19A y B).

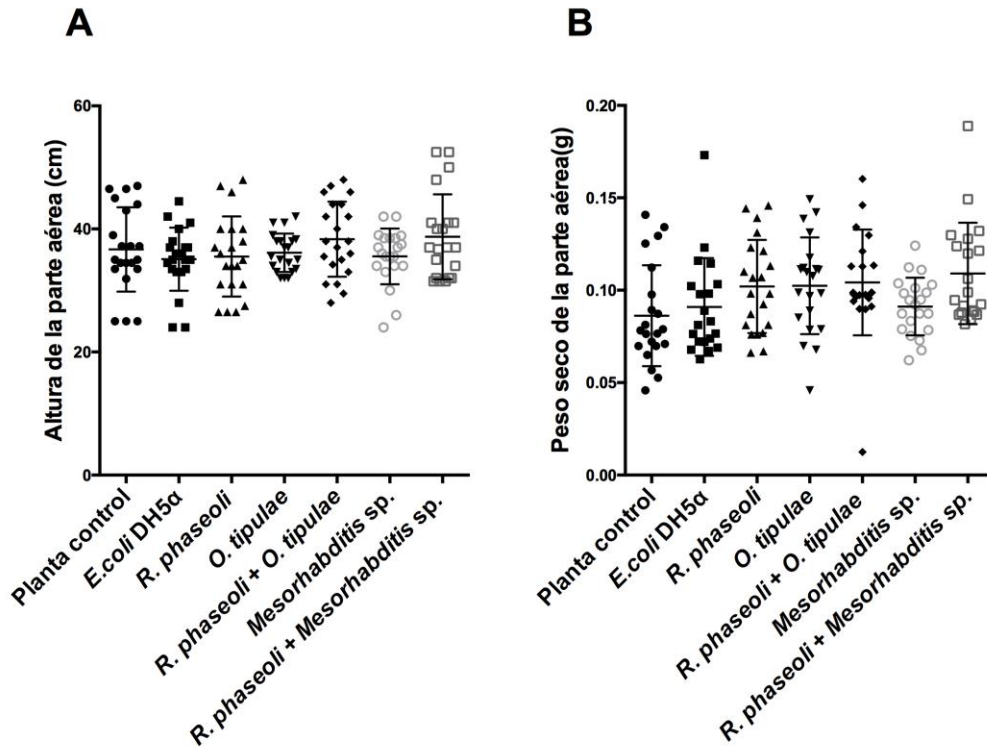


Figura 19. Parte aérea de plantas de maíz inoculadas con *Mesorhabditis* sp., *O. tipulae* y *R. phaseoli* Ch24-10. Altura (A) y peso seco (B) 7 días después del tratamiento. Promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (Prueba Pos Hoc Dunn's $P \leq 0.05$).

7.2.5 *O. tipulae* y *Mesorhabditis* sp. modifican la arquitectura de la raíz de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Considerando que las plantas de maíz criollo presentan una gran heterogeneidad genética, lo cual podría explicar la alta variación observada en los ensayos con maíz (Figuras 16-18),

decidimos evaluar el efecto de los nematodos en la planta modelo *A. thaliana*. Para esto inoculamos plantas de *A. thaliana* con los nematodos aislados en presencia o ausencia de *Rhizobium* y, 7 días después, determinamos la longitud de la raíz primaria 7 días después de la inoculación. Encontramos que los nematodos modificaron la arquitectura de la raíz de *A. thaliana* de manera similar a lo previamente observado con las plantas de maíz (menor longitud de la raíz primaria e incremento en el número de raíces laterales emergidas). La longitud de la raíz primaria fue un 50% menor cuando se inoculó *O. tipulae* en comparación con la planta control y un 37% menor cuando se inoculó *Mesorhabditis* sp. (Figura 20A). De manera similar, aunque encontramos un aumento ligero en el número de raíces laterales emergidas en los tratamientos nematodo-bacteria, en comparación con los tratamientos con *Rhizobium*, esta diferencia no fue significativa (Figura 20B). La Figura 20C muestra imágenes representativas de plantas con los diferentes tratamientos.

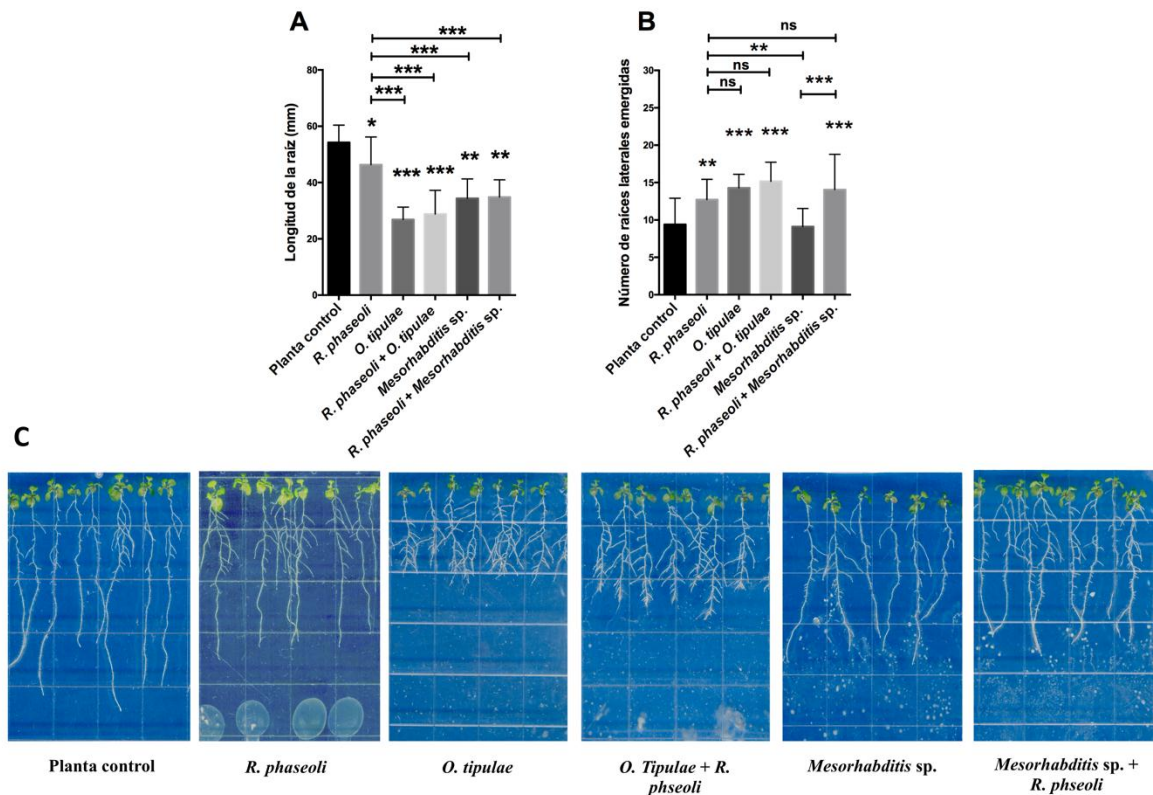


Figura 20. Raíces de *A. thaliana* con *O. tipulae*, *Mesorhabditis* sp. y *R. phaseoli* Ch24-10. Longitud de la raíz (A), número de raíces laterales emergidas (B) e imágenes representativas de cada uno de los tratamientos (C). Promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas con respecto al control se indican con los asteriscos *($P < 0.05$), **($P < 0.005$), *** ($P < 0.001$) (Prueba Pos Hoc Tukey ≤ 0.05). Los asteriscos sencillos representan comparaciones con respecto al control, mientras que las comparaciones entre los tratamientos se indican con líneas y asteriscos.

7.2.6 Aislamiento de bacterias asociadas a los nematodos y estudio de su efecto en el desarrollo de la arquitectura de raíz

Los nematodos, al igual que muchos organismos más complejos, tienen una microbiota compleja (Berg *et al.*, 2016), la cual podría ejercer un efecto sobre sus papeles funcionales en diversos ecosistemas, incluyendo la rizosfera. Por esta razón, y para evaluar el papel de los comensales de nematodos en el desarrollo de plantas, aislamos bacterias de la microbiota de estos organismos. De cada nematodo, se aislaron 10 colonias bacterianas con morfología diferente y se identificaron usando el marcador genético ARNr 16s. En la Tabla 8 se presentan solo aquellos aislados bacterianos que pudieron ser identificados a nivel de especie. Se encontraron dos aislados bacterianos comunes para ambos nematodos, los cuales fueron identificados como *Stenotrophomonas maltophilia* cepa KUGK130 y *A. pittii* cepa HUMV-6483.

Tabla 8. Asignación de las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias aisladas de los nematodos *O. tipulae* y *Mesorhabditis* sp.

Aislado	Nematodo de origen	Identificación en la base de datos del NCBI	% de identidad	Número de aislados
Ost2	<i>O. tipulae</i>	<i>Pseudomonas alkylphenolia</i> cepa KL28	99	1
Ost5	<i>O. tipulae</i>	<i>Ochrobactrum pituitosum</i> cepa CCUG 50899	99	1

Ost6	<i>O. tipulae</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> cepa KUGK130	99	1
Ost8	<i>O. tipulae</i>	<i>Acinetobacter pittii</i> cepa HUMV-6483	99	2
Mes1	<i>Mesorhabditis</i> sp.	<i>Acinetobacter pittii</i> cepa HUMV-6483	99	2
Mes2	<i>Mesorhabditis</i> sp.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> cepa R551	99	5
Mes10	<i>Mesorhabditis</i> sp.	<i>Achromobacter insolitus</i> cepa DSM 23807	99	1

Posteriormente, probamos el efecto de uno de los aislados en común de ambos nematodos, *A. pittii*, en el desarrollo de las raíces de *A. thaliana*. Encontramos que la longitud de la raíz primaria y el número de raíces laterales no se modificó con respecto al control por la inoculación de la bacteria (Figura 20); sin embargo, cuando la bacteria se inoculó en presencia del nematodo de laboratorio *C. elegans* N2, usado para excluir el efecto de la microbiota natural de los nematodos ambientales, se observó una longitud menor de las raíces de *A. thaliana* (Figura 21A) y un mayor número de raíces laterales emergidas (Figura 21B), fenotipo similar al observado con los nematodos ambientales. No se observaron cambios en los parámetros analizados con la inoculación del nematodo *C. elegans* N2 por sí solo (Figura 21). La Figura 21C muestra imágenes representativas de las plantas con los diferentes tratamientos.

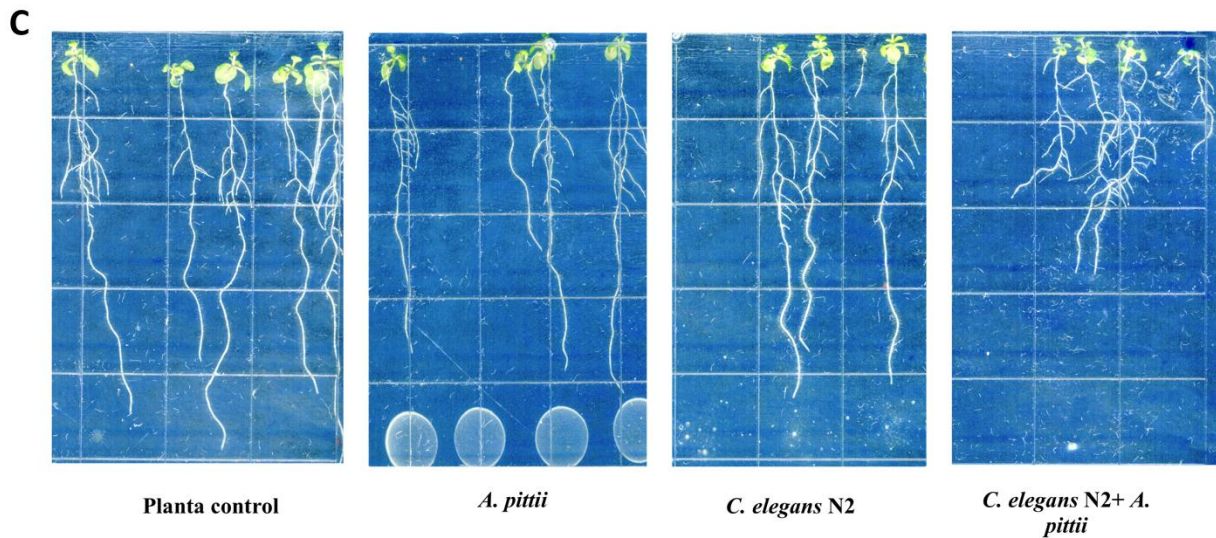
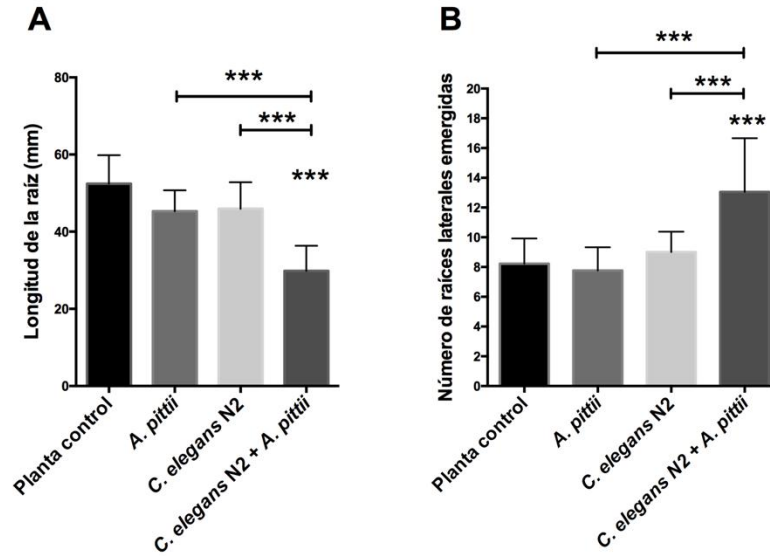


Figura 21. Raíces de *A. thaliana* inoculadas con *A. pittii* y *C. elegans* N2. Longitud de la raíz primaria (A), número de raíces laterales emergidas (B) e imágenes representativas de cada uno de los tratamientos (C). Promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas con respecto al control se indican con * ($P < 0.001$) o *** ($P < 0.001$) (Prueba Pos Hoc Tukey < 0.05). Los asteriscos sencillos representan las comparaciones con respecto al control, mientras que las comparaciones entre otros tratamientos se indican con líneas y asteriscos.

Conclusiones del apartado 7.2

- * Aislamos dos nematodos de vida libre de la rizosfera de plantas de maíz, identificados como *O. tipulae* y *Mesorhabditis* sp., los cuales en presencia de *R. phaseoli* incrementan la altura y el peso seco de plantas de maíz criollo. Dicho incremento es mayor al observado con la inoculación de *R. phaseoli*, indicando la existencia de un efecto sinérgicos.
- * Ambos nematodos mostraron una preferencia alimentaria mayor hacia cepas de *Rhizobium* con respecto a otras bacterias aisladas del suelo.
- * Los nematodos aislados afectan el desarrollo de la raíz primaria de las plantas de maíz, limitando el crecimiento de la raíz primaria y aumentando el número de raíces laterales. Para el caso del nematodo *Mesorhabditis* sp. este efecto negativo se ve compensado con la inoculación de la bacteria *R. phaseoli*.
- * Los nematodos también limitaron el crecimiento de la raíz primaria de *A. thaliana.*, pero *R. phaseoli* presentó también un efecto sinérgico cuando fue inoculada con el nematodo *Mesorhabditis* sp.
- * Una bacteria aislada de los nematodos, identificada como *A. pittii* cepa HUMV-6483, es capaz de detener el crecimiento de la raíz primaria y aumentar la densidad de raíces laterales emergidas sólo en presencia del nematodo *C. elegans* N2, el cual no afecta el desarrollo de las plantas.

8 DISCUSIÓN

Las plantas liberan una parte del carbono producido durante la fotosíntesis en forma de exudados, los cuales son utilizados por los microorganismos del suelo (bacterias, hongos, nematodos y protozoarios), que a su vez mineralizan la materia orgánica afectando así la diversidad y composición de las comunidades vegetales en el suelo al condicionar la tasa de renovación de nutrientes en el mismo (Jones *et al.*, 2009). Aunque se ha estudiado con detalle el papel de las comunidades bacterianas asociadas a la rizosfera (la parte más cercana a la raíz y con mayor biodisponibilidad de carbono) (García-Salamanca *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2013), poco se conoce sobre la distribución y el papel de los nematodos de vida libre en este ecosistema. Por lo tanto, en este trabajo decidimos evaluar la diversidad de nematodos en muestras de rizosfera de maíz que es un importante cultivo de interés comercial, ecológico y cultural en México, esto con la finalidad de conocer mejor la diversidad de dichos organismos y los posibles factores que influyen su establecimiento, así como su interacción con la planta y otros organismos en la rizosfera. Analizamos la diversidad de nematodos en 16 muestras de suelos agrícolas provenientes de 6 sitios de muestreo en 3 regiones diferentes de México (Chiapas, Jalisco y Nayarit). Para esto, utilizamos un enfoque genómico que no requiere del aislamiento o enriquecimiento previo de estos organismos (Sapkota y Nicolaisen, 2015), lo que nos permitió obtener 530 OTUs que fueron asignados a 9 órdenes de nematodos diferentes. Este número de OTUs fue similar al reportado en un trabajo previo realizado con los mismos oligonucleótidos, en donde se obtuvieron 541 OTUs de 22 muestras de suelo provenientes de campos agrícolas en Dinamarca (Sapkota y Nicolaisen, 2015). En ambos casos, la cantidad de OTUs fue significativamente menor a la reportada para suelos agrícolas de trigo, en donde se observó un promedio de ~3,000 OTUs totales provenientes de 48 muestras de campos agrícolas de trigo (Treonis *et al.*, 2018). En este último trabajo se utilizó una estrategia de amplificación diferente

(usando solo una pareja de oligonucleótidos), lo cual tal vez dio como resultado una proporción menor de nematodos (30% del total de secuencias) pero una diversidad mayor de eucariontes (Treonis *et al.*, 2018), sugiriendo un posible sesgo metodológico. A pesar de estas diferencias, en los tres estudios los órdenes de nematodos más abundantes fueron Tylenchida, Rhabditida, Enoplida y Dorylaimia, indicando que este tipo de organismos son abundantes en suelos agrícolas.

Por otro lado, a pesar de que uno de los órdenes más abundantes de nematodos encontrados en nuestras muestras, Tylenchida, contiene una gran cantidad de organismos parásitos de plantas, no observamos signos de infección por nematodos fitopatógenos en las plantas de maíz provenientes de estos sitios. La ausencia de signos de infección y/o daño a la planta, podría deberse a dos causas: que la base de datos de nematodos está enriquecida con nematodos patógenos de plantas y animales debido a la importancia ecológica y sanitaria que éstos representan, haciendo que exista un sesgo en la proporción de ciertos nematodos en la comunidad estudiada de dichos sitios y/o que los nematodos que se alimentan de raíces (incluyendo patógenos de plantas) estimulan la producción de exudados de la raíz (Gebremikael *et al.*, 2016), que a su vez favorecen el crecimiento bacteriano y, por ende, la fuente de alimento de los nematodos que se alimentan de bacterias. Los beneficios otorgados por la diversidad de organismos a la planta compensarían el daño en la raíz producido por los nematodos patógenos.

En este estudio, observamos que la riqueza de especies (diversidad alfa) fue similar en las tres regiones, sin embargo, su abundancia (diversidad beta) varió dependiendo de la región en la que se recolectó la muestra, indicando así que el establecimiento, diversidad y/o recambio poblacional de estos organismos están sujetos a factores comunes que se comparten en una misma región. Es importante notar que no se observaron diferencias debido a la etapa de crecimiento de la planta. No obstante, se sabe que la producción de exudados de maíz es mayor durante las etapas vegetativas (antes de la producción del grano) (Gransee y Wittenmayer, 2000; Jones *et al.*, 2009),

mientras que todas nuestras muestras fueron tomadas en etapas reproductivas (una vez que el grano se ha formado). Entonces, la influencia de los exudados vegetales en la comunidad microbiana en esta etapa podría ser menor y, por tanto, también el efecto de la planta en la comunidad de nematodos.

Se ha observado que los factores más importantes que determinan la comunidad de nematodos son la cantidad de materia orgánica, el pH, y la humedad (Hole *et al.*, 2005; Treonis *et al.*, 2018), pero la influencia de estos factores no fue analizada por no contarse con dichos datos para todas las muestras. De manera similar, aunque no encontramos diferencias en la diversidad de nematodos en las muestras de suelo con o sin planta, es importante mencionar que solo se contó con dos muestras de suelo control (sin planta o T0), por lo que se requieren más réplicas para poder determinar el papel de la planta en el establecimiento y modificación de las comunidades de nematodos.

En este trabajo también aislamos dos especies de nematodos bacterívoros de la rizosfera de maíz pertenecientes a la familia Rhabditidae: *O. tipulae* y *Mesorhabditis* sp. Ambos nematodos mostraron una marcada preferencia alimentaria por cepas de *Rhizobium* con respecto a otras bacterias rizosféricas Gram-positivas, sugiriendo que *Rhizobium* podría ser una fuente común de alimento de ambos nematodos en este ecosistema. No obstante, el hecho de que *Mesorhabditis* sp. mostró una mayor preferencia por *R. tropici* CIAT 899 sobre otras cepas de *Rhizobium*, sugiere que estos nematodos poseen preferencias alimentarias sutiles o que las bacterias producen compuestos atractivos que favorecen que sean ingeridas por las posibles ventajas que le ofrece el nematodo como nicho favorable o vehículo que la acerca a la planta. A pesar de que se ha reportado previamente que los nematodos tienen una preferencia por bacterias Gram-negativas, como es el caso del nematodo *Cephalobus brevicauda* y *C. elegans* (Salinas *et al.*, 2007; Yu *et*

al., 2015), éste es el primer estudio en donde se encontró atracción de nematodos de vida libre hacía una bacteria promotora del crecimiento en plantas (*R. phaseoli* Ch24-10).

Varios estudios han demostrado que la depredación bacteriana por nematodos modifica las comunidades bacterianas, influenciando la actividad y/o desarrollo de las mismas (Bonkowski *et al.*, 2000; Irshad *et al.*, 2011; Jousset *et al.*, 2009). De forma similar, encontramos que la actividad promotora de crecimiento de la bacteria *R. phaseoli* Ch24-10 aumentó en presencia de los nematodos, especialmente con el nematodo *Mesorhabditis* sp. Este resultado correlacionó con un estudio previo en donde *Mesorhabditis* sp. incrementó el crecimiento de plantas de cacahuate en presencia de *B. megaterium*, en comparación con otro nematodo aislado del suelo, *Cephalobus* sp. (Xu *et al.*, 2015). A su vez, *Cephalobus* sp. indujo un mayor incremento en la respiración basal y producción de ácido 3-indol acético en la rizosfera de arroz en presencia de *Burkholderia* sp., en comparación con el nematodo modelo cultivado en laboratorio *C. elegans* (Cheng *et al.*, 2011). Estos resultados destacan los efectos diferenciales en la respuesta de las bacterias a la depredación y por lo tanto el desarrollo de las plantas en donde habitan.

Previamente, se ha descrito que la presencia de nematodos bacterívoros conlleva a un incremento en la producción de auxinas bacterianas (ácido 3-indol acético; IAA) (Fu *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2012), lo que a su vez induce la expresión de diversos genes en la planta involucrados en la elongación de las células, dando lugar a raíces primarias más largas y con un mayor número de raíces laterales (Guilfoyle, 2007). En contraste, en este trabajo observamos que plantas de *Z. mays* y *A. thaliana* tratadas con *O. tipulae* o *Mesorhabditis* sp. mostraron una longitud de la raíz primaria significativamente menor con respecto al control (planta sin tratamiento), indicando que los nematodos bacterívoros poseen efectos diferenciales en el desarrollo de la raíz.

Recientemente, se ha observado que varias cepas de *Rhizobium* son capaces de colonizar la raíz de *A. thaliana*, produciendo raíces más cortas y aumentando el número de raíces laterales

en una forma dependiente de auxinas; sin embargo, en estos trabajos no se evaluaron interacciones nematodo-bacteria (Zhao *et al.*, 2018). Así mismo, se ha reportado que altos niveles de auxinas inhiben la elongación de la raíz primaria, aunado a un incremento en el número de raíces laterales y pelos radicales en *A. thaliana* en presencia de *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 (Asari *et al.*, 2017). Aunque en este trabajo, encontramos que el peso seco de la raíz y el número de raíces laterales de *Z. mays* se incrementó principalmente en los tratamientos nematodo-*R. phaseoli*, y que una línea reportera DR5:Gus de *A. thaliana* (que responde a auxinas) mostró un incremento en la respuesta a auxinas bacterianas en la punta de la raíz, en todos los tratamientos (ANEXO IV), no logramos determinar si los fenotipos observados son dependientes o no de estas hormonas, lo cual deberá ser evaluado en proyectos posteriores.

En este trabajo también encontramos que algunas bacterias que forman parte de la microbiota de los nematodos pueden influenciar el desarrollo de las plantas cuando son transferidas a un nematodo inocuo como *C. elegans*, lo cual sugiere que la interacción nematodo-bacteria condiciona el efecto de los nematodos en las plantas. Lo anterior explica, al menos en parte, la diversidad de fenotipos reportados en plantas para diferentes nematodos ambientales (Djigal *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2015). También apoyando esta idea, se ha reportado que varios nematodos poseen una relación mutualista con las bacterias de las que se alimentan, lo cual influye su actividad y/o estilo de vida. Por ejemplo, los nematodos patógenos de insectos *Heterorhabditis* sp. y *Steinernema* sp. han desarrollado relaciones simbióticas con las bacterias del género *Photorhabdus* y *Xenorhabdus*, respectivamente (Lacey y Georgis, 2012; Lacey *et al.*, 2015; Torres-Barragan *et al.*, 2011). Estos nematodos infectan insectos y liberan dichas bacterias en el hospedero, en donde se multiplican y producen la muerte del insecto el cual sirve como fuente de alimento del nematodo durante el proceso de descomposición. De una forma similar, se ha observado que el ciclo de vida de los nematodos se ve afectado por el tipo de bacterias que

consumen, siendo las bacterias de alta tasa de reproducción y respiración como *E. coli* y *Pseudomonas fluorescens* las fuentes de alimento preferidas (Yu *et al.*, 2015). La ingesta de estas bacterias aumenta la fertilidad de los nematodos, pero reduce su tiempo de vida. En contraste, las bacterias de lento crecimiento y menos preferidas como *Bacillus megaterium* o *B. amyloliquefaciens* aumentan el tiempo de vida del nematodo, pero a la vez limitan su fertilidad (Yu *et al.*, 2015). Se ha visto también que cambios en la microbiota de los nematodos puede acortar su ciclo de vida (Clark y Walker, 2018) y modificar procesos metabólicos como el envejecimiento (Pang y Curran, 2008; Verma *et al.*, 2018). En conjunto, estos trabajos demuestran la importancia de las interacciones nematodo-bacteria en el desarrollo y propagación de ambos organismos.

En resumen, nuestros resultados muestran un nuevo papel de las bacterias (presas bacterianas y microbiota) asociadas a los nematodos de vida libre en la modulación la morfología de la raíz y el crecimiento de las plantas. Con base en los resultados de este estudio, proponemos un modelo en el que los nematodos sirven como “caballos de Troya” acarreado bacterias rizosféricas hacía las raíces de las plantas (Figura 22). Una vez ahí las bacterias son capaces de colonizar y multiplicarse, incrementando la fuente de alimentos de los nematodos e influenciando indirectamente el desarrollo de la planta. Es importante destacar que estos efectos dependen del tipo de planta, así como del nematodo y sus bacterias asociadas, enfatizando un mecanismo complejo de al menos cuatro partes (nematodo, bacteria, planta y ambiente). Análisis posteriores, utilizando diferentes cultivos y bajo condiciones agrícolas diferentes podrían ayudar a entender mejor estas interacciones, así como a reconocer sus impactos ecológicos y en la producción agrícola.

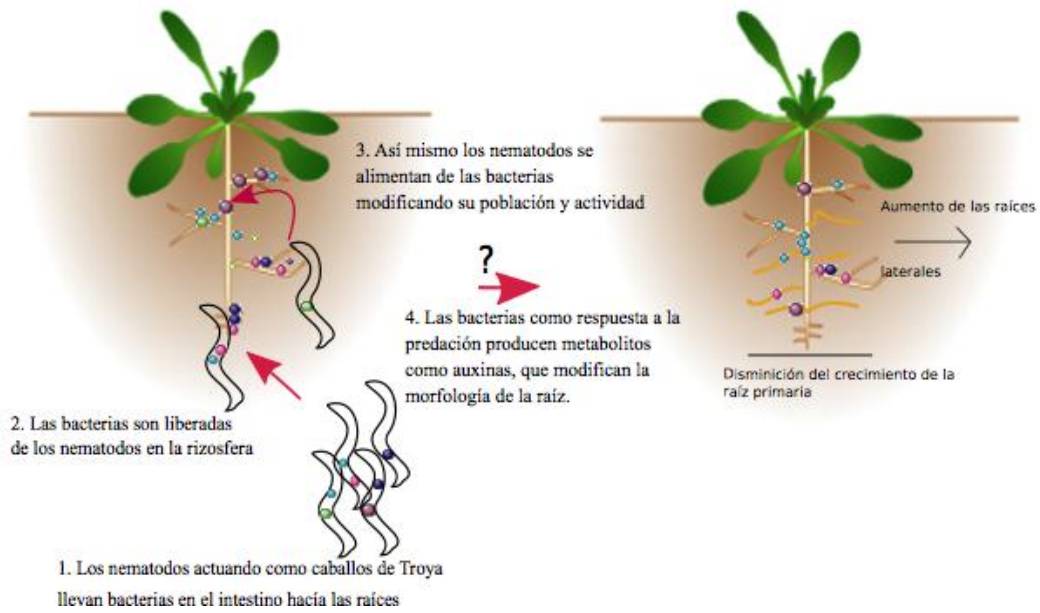


Figura 22. Modelo propuesto de nematodos como “caballos de Troya”.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, E., Cluter, H.C., 1942. Races of Zea Mays : I . Their Recognition and Classification. Ann. Missouri Bot. Gard. 29, 69–88.
- Anderson, M.J., Walsh, D.C.I., 2013. PERMANOVA , ANOSIM , and the Mantel test in the face of heterogeneous dispersions : What null hypothesis are you testing? Ecol. Monogr. 83, 557–574. <https://doi.org/10.1890/12-2010.1>
- Asari, S., Tarkowská, D., Rolčík, J., Novák, O., Palmero, D.V., Bejai, S., Meijer, J., 2017. Analysis of plant growth-promoting properties of *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 using *Arabidopsis thaliana* as host plant. Planta 245, 15–30. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2580-9>
- Asiloglu, R., Honjo, H., Saka, N., Asakawa, S., Murase, J., 2015. Community structure of microeukaryotes in a rice rhizosphere revealed by DNA-based PCR-DGGE. Soil Sci. Plant Nutr. 61, 761–768. <https://doi.org/10.1080/00380768.2015.1049931>
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., O, Jmv., 2006. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms 57, 233–266.
- Barreto, V., Seldin, L., Araujo, F.F. De, 2011. Plant Growth and Health Promoting Bacteria. Microbiol. Monogr. 18, 21–44. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-13612-2>
- Barrière, A., Félix, M.-A., 2006. Isolation of *C. elegans* and related nematodes. WormBook 1–9. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.115.1>
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L.M.P., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. Genet. Mol. Biol. 35, 1044–1051. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600020>
- Berg, M., Stenuit, B., Ho, J., Wang, A., Parke, C., Knight, M., Alvarez-Cohen, L., Shapira, M., 2016. Assembly of the *Caenorhabditis elegans* gut microbiota from diverse soil microbial

- environments. *ISME J.* 10, 1998–2009. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.253>
- Bertin, C., Yang, X., Weston, L.A., 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* 256, 67–83. <https://doi.org/10.1023/A:1026290508166>
- Boenigk, J., Ereshefsky, M., Hoef-Emden, K., Mallet, J., Bass, D., 2012. Concepts in protistology: Species definitions and boundaries. *Eur. J. Protistol.* 48, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2011.11.004>
- Bongers, T., 1999. The maturity index, the evolution of nematode life history traits, adaptive radiation and cp-scaling. *Plant Soil* 212, 13–22. <https://doi.org/10.1023/A:1004571900425>
- Bongers, T., Ferris, H., 1999. Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. *Trends Ecol. Evol.* 14, 224–228. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01583-3](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01583-3)
- Bonkowski, M., Cheng, W., Griffiths, B.S., Alpehi, J., Scheu, S., 2000. Biotic Interactions in the Rhizosphere: Effects on Plant Growth and Herbivore Development. *Eur. J. Soil Biol.* 36, 135–147. [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(00\)01059-1](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(00)01059-1)
- Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94. <https://doi.org/10.1002/cbic.200300625>
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G. a, Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C. a, McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W. a, Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Publ. Gr.* 7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth0510-335>
- Cheng, Y., Jiang, Y., Griffiths, B., Li, D., Hu, F., Li, H., 2011. Stimulatory effects of bacterial-feeding nematodes on plant growth vary with nematode species. *Nematology* 13, 369–372.

<https://doi.org/10.1163/138855410X528253>

Choi, J.I., Yoon, K., Subbammal Kalichamy, S., Yoon, S.-S., Il Lee, J., 2015. A natural odor attraction between lactic acid bacteria and the nematode *Caenorhabditis elegans*. ISME J. 10, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.134>

Clark, R.I., Walker, D.W., 2018. Role of gut microbiota in aging-related health decline: insights from invertebrate models. Cell. Mol. Life Sci. 75, 93–101. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2671-1>

Colbert, H.A., Bargmann, C.I., 1995. Odorant-specific adaptation pathways generate olfactory plasticity in *C. elegans*. Neuron 14, 803–812. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90224-4](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90224-4)

CONABIO, 2018. Razas de maíz de México [WWW Document]. Biodivers. Mex. URL <https://www.biodiversidad.gob.mx/usos/maices/razas2012.html>

Cosme, M., Wurst, S., 2013. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi, rhizobacteria, soil phosphorus and plant cytokinin deficiency change the root morphology, yield and quality of tobacco. Soil Biol. Biochem. 57, 436–443. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.09.024>

Costacurta, A., Vanderleyden, J., 1995. Synthesis of Phytohormones by Plant-Associated Bacteria. Crit. Rev. Microbiol. 21, 1–18.

Crafts-Brandner, S.J., Salvucci, M.E., 2002. Sensitivity of Photosynthesis Heat Stress in a C4 Plant , Maize , to Heat Stress. Plant Physiol. 129, 1773–1780. <https://doi.org/10.1104/pp.002170.or>

Crespi, M., Gálvez, S., 2000. Molecular Mechanisms in Root Nodule Development. J. Plant Growth Regul. 19, 155–166. <https://doi.org/10.1007/s003440000023>

De Filippis, F., Laiola, M., Blaiotta, G., Ercolini, D., 2017. Different amplicon targets for

sequencing-based studies of fungal diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 83.

<https://doi.org/10.1128/AEM.00905-17>

De Mesel, I., Derycke, S., Moens, T., Van Der Gucht, K., Vincx, M., Swings, J., 2004. Top-down impact of bacterivorous nematodes on the bacterial community structure: A microcosm study. *Environ. Microbiol.* 6, 733–744. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00610.x>

Decelle, J., Romac, S., Sasaki, E., Not, F., Mahé, F., 2014. Intracellular diversity of the V4 and V9 regions of the 18S rRNA in marine protists (radiolarians) assessed by high-throughput sequencing. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104297>

Derycke, S., Vanaverbeke, J., Rigaux, A., Backeljau, T., Moens, T., 2010. Exploring the use of cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) for DNA barcoding of free-living marine nematodes. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013716>

Djigal, D., Brauman, A., Diop, T.A., Chotte, J.L., Villenave, C., 2004. Influence of bacterial-feeding nematodes (Cephalobidae) on soil microbial communities during maize growth. *Soil Biol. Biochem.* 36, 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.10.007>

Estévez, J., Soria-Díaz, M.E., De Córdoba, F.F., Morón, B., Manyani, H., Gil, A., Thomas-Oates, J., Van Brussel, A.A.N., Dardanelli, M.S., Sousa, C., Megías, M., 2009. Different and new Nod factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899 following Na⁺ stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 293, 220–231. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01540.x>

Fahraeus, G., 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* 16, 374–381. <https://doi.org/10.1099/00221287-16-2-374>

Fu, S., Ferris, H., Brown, D., Plant, R., 2005. Does the positive feedback effect of nematodes on the biomass and activity of their bacteria prey vary with nematode species and population

size? *Soil Biol. Biochem.* 37, 1979–1987. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.01.018>

García-Salamanca, A., Molina-Henares, M.A., van Dillewijn, P., Solano, J., Pizarro-Tobías, P., Roca, A., Duque, E., Ramos, J.L., 2013. Bacterial diversity in the rhizosphere of maize and the surrounding carbonate-rich bulk soil. *Microb. Biotechnol.* 6, 36–44. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2012.00358.x>

Gebremikael, M.T., Steel, H., Buchan, D., Bert, W., De Neve, S., 2016. Nematodes enhance plant growth and nutrient uptake under C and N-rich conditions. *Sci. Rep.* 6, 32862. <https://doi.org/10.1038/srep32862>

Goodman, A.L., Wu, M., Gordon, J.I., 2011. Identifying microbial fitness determinants by insertion sequencing using genome-wide transposon mutant libraries. *Nat. Protoc.* 6, 1969–1980. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.417>

Goodman, M.M., Bird, R.M., 1977. The Races of Maize IV : Tentative Grouping of 219 Latin American Races. *Econ. Bot.* 31, 204–221.

Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Co-inoculation, H.Á., 2015. Plant growth promoting rhizobia : challenges and opportunities. *3 Biotech* 355–377. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0241-x>

Gransee, A., Wittenmayer, L., 2000. Qualitative and quantitative analysis of water-soluble root exudates in relation to plant species and development. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 163, 381–385. [https://doi.org/10.1002/1522-2624\(200008\)163:4<381::AID-JPLN381>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1522-2624(200008)163:4<381::AID-JPLN381>3.0.CO;2-7)

Guilfoyle, T., 2007. Plant biology: Sticking with auxin. *Nature* 446, 621–622. <https://doi.org/10.1038/446621a>

Gutiérrez-Zamora, M.L., Martínez-Romero, E., 2001. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *J. Biotechnol.* 91, 117–126. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00332-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00332-7)

- Hamayun, M., Khan, S.A., Khan, A.L., Rehman, G., Sohn, E.Y., Shah, A.A., Kim, S.K., Joo, G.J., Lee, I.J., 2009. *Phoma herbarum* as a new gibberellin-producing and plant growth-promoting fungus. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 1244–1249.
<https://doi.org/10.4014/jmb.0901.030>
- Hansen, R.D.E., Trees, A.J., Bah, G.S., Hetzel, U., Martin, C., Bain, O., Tanya, V.N., Makepeace, B.L., 2011. A worm's best friend: recruitment of neutrophils by *Wolbachia* confounds eosinophil degranulation against the filarial nematode *Onchocerca ochengi*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 278, 2293–2302. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2367>
- Hernández Ibáñez, A.M., Arteaga Garibay, R.I., Martínez Peña, M.D., Zaldívar López, H.A., Aragón Cuevas, F., Avendaño Arrazate, C.H., 2015. Guía para toma de muestras de suelo rizosférico para análisis microbiológico. Folleto Técnico No. 1, Tepatitlán de Morelos.
- Hiltner, L., 1904. Ueber neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundung und Brachetle. *Arb. Deut. Landw. Gesell* 98, 59–78.
- Hole, D.G., Perkins, A.J., Wilson, J.D., Alexander, I.H., Grice, P. V., Evans, A.D., 2005. Does organic farming benefit biodiversity? *Biol. Conserv.* 122, 113–130.
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2004.07.018>
- Hoorman, J.J., 2011. The Role of Soil Protozoa and Nematodes. *Ohio State Univ.* 1–5.
- Horiuchi, J.I., Prithiviraj, B., Bais, H.P., Kimball, B.A., Vivanco, J.M., 2005. Soil nematodes mediate positive interactions between legume plants and rhizobium bacteria. *Planta* 222, 848–857. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0025-y>
- Hossain, M., Sultana, F., Kubota, M., Koyama, H., Hyakumachi, M., 2007. The Plant Growth-Promoting Fungus *Penicillium simplicissimum* GP17-2 Induces Resistance in *Arabidopsis thaliana* by Activation of Multiple Defense Signals 48, 1724–1736.

<https://doi.org/10.1093/pcp/pcm144>

Hossain, M.M., Sultana, F., Islam, S., 2017. Plant growth-promoting fungi (PGPF):

Phyostimulation and induced systemic resistance, in: *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives*. pp. 135–191. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6593-4_6

Humphreys, C.P., Franks, P.J., Rees, M., Bidartondo, M.I., Leake, J.R., Beerling, D.J., 2010.

Mutualistic mycorrhiza-like symbiosis in the most ancient group of land plants. *Nat. Commun.* 1, 533–549. <https://doi.org/10.1038/ncomms1105>

Irshad, U., Villenave, C., Brauman, A., Plassard, C., 2011. Grazing by nematodes on

rhizosphere bacteria enhances nitrate and phosphorus availability to *Pinus pinaster* seedlings. *Soil Biol. Biochem.* 43, 2121–2126.

<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.06.015>

Jiang, Y., Wu, Y., Xu, W., Cheng, Y., Chen, J., Xu, L., Hu, F., Li, H., 2012. IAA-producing

bacteria and bacterial-feeding nematodes promote *Arabidopsis thaliana* root growth in natural soil. *Eur. J. Soil Biol.* 52, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2012.05.003>

Jones, D.L., Nguyen, C., Finlay, R.D., 2009. Carbon flow in the rhizosphere: Carbon trading at

the soil-root interface. *Plant Soil.* <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9925-0>

Jousset, A., Rochat, L., Péchy-Tarr, M., Keel, C., Scheu, S., Bonkowski, M., 2009. Predators

promote defence of rhizosphere bacterial populations by selective feeding on non-toxic cheaters. *ISME J.* 3, 666–674. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.26>

Jürgens, K., Pernthaler, J., Schalla, S., Amann, R., 1999. Morphological and Compositional

Changes in a Planktonic Bacterial Community in Response to Enhanced Protozoan Grazing Morphological and Compositional Changes in a Planktonic Bacterial Community in Response to Enhanced Protozoan Grazing. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1241–1250.

Kreuzer, K., Adamczyk, J., Iijima, M., Wagner, M., Scheu, S., Bonkowski, M., 2006. Grazing

of a common species of soil protozoa (*Acanthamoeba castellanii*) affects rhizosphere bacterial community composition and root architecture of rice (*Oryza sativa* L.). *Soil Biol. Biochem.* 38, 1665–1672. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.11.027>

Kuikman, P.J.K., Jansen, A.G., Van Veen, J.A., 1991. 15N-Nitrogen mineralization from bacteria by protozoan grazing at different soil moisture regimes. *Soil Biol. Biochem.* 23, 193–200. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(91\)90134-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90134-6)

Lacey, L. a, Georgis, R., 2012. Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production. *J. Nematol.* 44, 218–25.

Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M.S., 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *J. Invertebr. Pathol.* 132, 1–41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>

Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Sundaram, S.P., Sa, T., 2006. A new insight into foliar applied methanol influencing phylloplane methylotrophic dynamics and growth promotion of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Environ. Exp. Bot.* 57, 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.05.010>

Mao, X., Hu, F., Griffiths, B., Li, H., 2006. Bacterial-feeding nematodes enhance root growth of tomato seedlings. *Soil Biol. Biochem.* 38, 1615–1622. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.12.002>

Marschner, H., 1995a. 12 - Diagnosis of Deficiency and Toxicity of Mineral Nutrients BT - Mineral Nutrition of Higher Plants (Second Edition). Academic Press, London, pp. 461–479. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-012473542-2/50014-6>

Marschner, H., 1995b. 15 - The Soil-Root Interface (Rhizosphere) in Relation to Mineral Nutrition BT - Mineral Nutrition of Higher Plants (Second Edition). Academic Press, London, pp. 537–595. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-012473542-2/50017->

- Martin, K.J., Rygiewicz, P.T., 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiol.* 5.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-28>
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F.M., Franco, a a, Graham, P., Pardo, M. a, 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 417–426. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-3-417>
- Masunaka, A., Hyakumachi, M., Takenaka, S., 2011. Plant Growth-Promoting Fungus, *Trichoderma koningi* Suppresses Isoflavonoid Phytoalexin Vestitol Production for Colonization on/in the Roots of *Lotus japonicus*. *Microbes Environ.* 26, 128–134.
<https://doi.org/10.1264/jsme2.ME10176>
- Matiru, V.N., Dakora, F.D., 2004. Minireview. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African J. Biotechnol.* 3, 1–7.
- Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M.M., Sanchez G., J., Buckler, E., Doebley, J., 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 6080–6084. <https://doi.org/10.1073/pnas.052125199>
- McNear, D.H., 2013. The Rhizosphere- Roots, Soil and Everything in Between [WWW Document]. *Nat. Educ. Knowl.* URL
<https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-rhizosphere-roots-soil-and-67500617>
- Mendes, R., Garbeva, P., Raaijmakers, J.M., 2013. The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>

- Moon-Van Der Staay, S.Y., Tzeneva, V.A., Van Der Staay, G.W.M., De Vos, W.M., Smidt, H., Hackstein, J.H.P., 2006. Eukaryotic diversity in historical soil samples. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57, 420–428. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00130.x>
- Morise, H., Miyazaki, E., Yoshimitsu, S., Eki, T., 2012. Profiling Nematode Communities in Unmanaged Flowerbed and Agricultural Field Soils in Japan by DNA Barcode Sequencing. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051785>
- Murray, D.C., Coghlan, M.L., Bunce, M., 2015. From Benchtop to Desktop: Important Considerations when Designing Amplicon Sequencing Workflows. *PLoS One* 10, e0124671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124671>
- Musat, N., Giere, O., Gieseke, A., Thiermann, F., Amann, R., Dubilier, N., 2007. Molecular and morphological characterization of the association between bacterial endosymbionts and the marine nematode *Astomonema* sp. from the Bahamas: Brief report. *Environ. Microbiol.* 9, 1345–1353. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01232.x>
- Nagarkar, M., Countway, P.D., du Yoo, Y., Daniels, E., Poulton, N.J., Palenik, B., 2018. Temporal dynamics of eukaryotic microbial diversity at a coastal Pacific site. *ISME J.* 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0172-3>
- Nealson, K.H., Platt, T., Hastings, J.W., 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* 104, 313–322.
- Neher, D., 2001. Role of nematodes in soil health and their use as indicators. *J. Nematol.* 33, 161–168.
- Newman, M.-A., Sundelin, T., Nielsen, J.T., Erbs, G., 2013. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Front. Plant Sci.* 4, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00139>
- Oksanen, J., 2015. Multivariate analysis of ecological communities in R: vegan tutorial. *R Doc.*

43. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(88\)90124-3](https://doi.org/10.1016/0169-5347(88)90124-3)

Oldroyd, G.E.D., 2013. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 252–263.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro2990>

Ott, J.A., Novak, R., Schiemer, F., Hentsch, U., Nebelsick, M., 1991. Tackling the sulfide gradient: A novel strategy involving maine nematodes and chemautotrophic ectosymbionts. *P.S.Z.N.1 Mar. Ecol.* 12, 261–279.

Pang, S., Curran, S.P., 2008. Adaptive capacity to bacterial diet modulates aging in *C. elegans*. *Cell metab* 6, 2166–2171. <https://doi.org/10.1021/nl061786n>. Core-Shell

Peel, D., Quayle, J.R., 1961. Microbial growth on C1 compounds. 1. Isolation and characterization of *Pseudomonas* AM 1. *Biochem. J.* 81, 465–9.

Perales, H., Golicher, D., 2014. Mapping the diversity of maize races in Mexico. *PLoS One* 9, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114657>

Piromyou, P., Buranabanyat, B., Tantasawat, P., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Teaumroong, N., 2011. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. *Eur. J. Soil Biol.* 47, 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.004>

Quinto, C., De La Vega, H., Flores, M., Leemans, J., Cevallos, M. a, Pardo, M. a, Azpiroz, R., De Lourdes Girard, M., Calva, E., Palacios, R., 1985. Nitrogenase reductase: A functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 1170–1174. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.4.1170>

Ramachandran, V.K., East, A.K., Karunakaran, R., Downie, J.A., Poole, P.S., 2011. Adaptation of *Rhizobium leguminosarum* to pea, alfalfa and sugar beet rhizospheres investigated by comparative transcriptomics. *Genome Biol.* 12, R106. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12->

10-r106

- Ranum, P., Peña-Rosas, J.P., Garcia-Casal, M.N., 2014. Global maize production, utilization, and consumption. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1312, 105–112.
<https://doi.org/10.1111/nyas.12396>
- Ravichandra, N.G., 2014. Horticultural nematology. *Hortic. Nematol.* 1–412.
<https://doi.org/10.1007/978-81-322-1841-8>
- Riley, M.A., Wertz, J.E., 2002. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 117–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024>
- Rivera, D., Mora, V., Lopez, G., Rosas, S., Spaepen, S., Vanderleyden, J., Cassan, F., 2018. New insights into indole-3-acetic acid metabolism in *Azospirillum brasilense* 1–12.
<https://doi.org/10.1111/jam.14080>
- Rocandio-Rodríguez, M., Santacruz-Varela, A., Córdova-Téllez, L., López-Sánchez, H., Castillo-González, F., Lobato-Ortiz, R., Jesús García-Zavala, J., Ortega-Paczka, R., 2014. Caracterización morfológica y agronomica de siete razas de maíz de los valles altos de México. *Rev. Fitotec. Mex.* 37, 351–361.
- Rosenberg, K., Bertaux, J., Krome, K., Hartmann, A., Scheu, S., Bonkowski, M., 2009. Soil amoebae rapidly change bacterial community composition in the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. *ISME J.* 3, 675–684. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.11>
- Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E., 2004. *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. *Arch. Microbiol.* 181, 337–344.
<https://doi.org/10.1007/s00203-004-0661-9>
- Ryu, C.-M., Farag, M.A., Hu, C.-H., Reddy, M.S., Wei, H.-X., Paré, P.W., Kloepper, J.W., 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 4927–4932.

- Salinas, K.A., Edenborn, S.L., Sexstone, A.J., Kotcon, J.B., 2007. Bacterial preferences of the bacterivorous soil nematode *Cephalobus brevicauda* (Cephalobidae): Effect of bacterial type and size. *Pedobiologia (Jena)*. 51, 55–64.
<https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2006.12.003>
- Sanchez, J., Goodman, M.M., 1992. Relationships among the mexican races of Maize. *Econ. Bot.* 46, 72–85.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sapkota, R., Nicolaisen, M., 2015. High-throughput sequencing of nematode communities from total soil DNA extractions. *BMC Ecol.* 15, 3. <https://doi.org/10.1186/s12898-014-0034-4>
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Segura, A., Rodríguez-Conde, S., Ramos, C., Ramos, J.L., 2009. Bacterial responses and interactions with plants during rhizoremediation. *Microb. Biotechnol.* 2, 452–464.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00113.x>
- Shannon, C.E., 1948. A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech. J.* 27, 379–423. <https://doi.org/10.1145/584091.584093>
- Shapiro-Ilan, D.I., Richou, H., Dolinski, C., 2012. Entomopathogenic Nematode Production and Application Technology. *J. Nematol.* 44, 206–217.
- Slatko, B.E., Taylor, M.J., Foster, J.M., 2010. The *Wolbachia* endosymbiont as an anti-filarial nematode target. *Symbiosis* 51, 55–65. <https://doi.org/10.1007/s13199-010-0067-1>
- Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>

- Taylor, R.G., Walker, D.C., McInnes, R.R., 1993. *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA 21, 1677–1678.
- Torres-Barragan, A., Suazo, A., Buhler, W.G., Cardoza, Y.J., 2011. Studies on the entomopathogenicity and bacterial associates of the nematode *Oscheius carolinensis*. Biol. Control 59, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.05.020>
- Torres Tejerizo, G., Banuelos, L.A., Cervantes, L., Gaytan, P., Pistorio, M., Romero, D., Brom, S., 2015. Development of molecular tools to monitor conjugative transfer in rhizobia. J. Microbiol. Methods 117, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.08.005>
- Treonis, A.M., Unangst, S.K., Kepler, R.M., Buyer, J.S., Cavigelli, M.A., Mirsky, S.B., Maul, J.E., 2018. Characterization of soil nematode communities in three cropping systems through morphological and DNA metabarcoding approaches. Sci. Rep. 8, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20366-5>
- Turner, T.R., Ramakrishnan, K., Walshaw, J., Heavens, D., Alston, M., Swarbreck, D., Osbourn, A., Grant, A., Poole, P.S., 2013. Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. ISME J. 7, 2248–58. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.119>
- van Dam, N.M., Bouwmeester, H.J., 2016. Metabolomics in the Rhizosphere: Tapping into Belowground Chemical Communication. Trends Plant Sci. 21, 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.008>
- Varma, A., Verma, S., Sudha, Sahay, N., Bütchorn, B., Franken, P., 1999. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. Appl. Environ. Microbiol. 65, 2741–2744. [https://doi.org/0099-2240/99/\\$04.00?0](https://doi.org/0099-2240/99/$04.00?0)
- Venturi, V., Keel, C., 2016. Signaling in the Rhizosphere. Trends Plant Sci. 21, 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.005>

- Verma, S., Jagtap, U., Goyala, A., Mukhopadhyay, A., 2018. A novel gene-diet pair modulates *C. elegans* aging. *PLoS Genet.* 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007608>
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Wei, H.L., Zhang, L.Q., 2006. Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 89, 267–280. <https://doi.org/10.1007/s10482-005-9028-8>
- Wu, S., Xiong, J., Yu, Y.Y., 2015. Taxonomic resolutions based on 18S rRNA Genes: A case study of subclass Copepoda. *PLoS One* 10, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131498>
- Xu, L., Xu, W., Jiang, Y., Hu, F., Li, H., 2015. Effects of interactions of auxin-producing bacteria and bacterial-feeding nematodes on regulation of peanut growths. *PLoS One* 10, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124361>
- Yoo, S., Jeong, D., Yeon, H., Song, J., Kyung, M., 2018. *Aspergillus terreus* JF27 Promotes the Growth of Tomato Plants and Induces Resistance against *Pseudomonas syringae* pv . tomato. *Mycobiology* 46, 147–153. <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1475370>
- Yu, L., Yan, X., Ye, C., Zhao, H., Chen, X., Hu, F., Li, H., 2015. Bacterial respiration and growth rates affect the feeding preferences, brood size and lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 10, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134401>
- Zhao, C.Z., Huang, J., Gyaneshwar, P., Zhao, D., 2018. *Rhizobium* sp. IRBG74 alters *Arabidopsis* root development by affecting auxin signaling. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02556>
- Zhou, J., He, Z., Yang, Y., Deng, Y., Tringe, S.G., Alvarez-Cohen, L., 2015. High-throughput

metagenomic technologies for complex microbial community analysis: open and closed formats. *MBio* 6, e02288–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02288-14>. Copyright

Zhou, X., Guo, Z., Chen, C., Jia, Z., 2017. Soil microbial community structure and diversity are largely influenced by soil pH and nutrient quality in 78-year-old tree plantations. *Biogeosciences* 14, 2101–2111. <https://doi.org/10.5194/bg-14-2101-2017>

10 ANEXOS

10.1 ANEXO I

Las razas de maíz en México se han agrupado con base en características morfológicas, de adaptación y/o genéticas. Los siete grupos o complejos raciales definidos son:

1. Grupo Cónico

Este grupo incluye razas de maíz cuya característica resaltante es la forma cónica o piramidal de sus mazorcas. Las razas del grupo Cónico se distribuyen predominantemente en las regiones con elevaciones de más de 2,000 m sobre el nivel del mar y en su mayoría son endémicas de los valles altos y sierras del centro del país como el Valle de México, el Valle de Toluca, la Sierra Norte de Puebla, la Meseta Purépecha en Michoacán y la Mixteca Alta en Oaxaca. Ejemplos: Arrocillo, Mixteco, Palomero Toluqueño (CONABIO 2011).

2. Grupo Sierra de Chihuahua

Se cultivan en las tierras altas del estado de Chihuahua, en pequeños valles a altitudes de 2,000 a 2,600 msn, y se extienden hacia el norte de Durango, este de Sonora y norte de Sinaloa. Ejemplos: Cristalino de Chihuahua, "Gordo azul", "Apachito" y complejo serrano de Jalisco (CONABIO 2011).

3. Grupo Ocho Hileras

Este grupo incluye razas cultivadas en elevaciones bajas e intermedias, desde los Valles Centrales de Oaxaca, el occidente y las planicies y cañadas del noroeste de México. Ejemplos: Jala, Amarillo Zamorano, "Bofo" y Bolita (CONABIO, 2018).

4. Grupo Chapalote

Este grupo se ha reportado predominantemente en elevaciones de 100 a 500 msn de altitud en la planicie costera del Pacífico de Nayarit a Sonora, y en el pie de monte y escarpa de la Sierra Madre Occidental, donde se han obtenido muestras hasta cerca de los 2,000 msn de altitud.

Ejemplos: Chapalote, Reventador, “Dulcillo del Noroeste” y Elotero de Sinaloa (CONABIO, 2018).

5. Grupo Tropicales Precoces

Se cultivan principalmente en terrenos del trópico seco y regiones semiáridas del país, generalmente en zonas bajas e intermedias (100-1300 msn). Adaptados a regímenes limitados de lluvia, lo que les ha conferido un ciclo de maduración corta o temprana con gran adaptabilidad y baja sensibilidad al foto-período. Ejemplos Nal-Tel, Zapalote chico, “Ratón” (CONABIO, 2018)..

6. Grupo Dentados tropicales

Este grupo incluye razas agrícolas muy importantes del sur de México, distribuidas principalmente en regiones intermedias y de baja altitud. Las razas de este grupo y sus derivados son probablemente las más usadas en los programas de mejoramiento genético, públicos y privados en el ámbito mundial. Ejemplos: Tuxpeño, Vandefío, Pepitilla (CONABIO, 2018).

7. Grupo de maduración tardía.

Se distribuye en las tierras bajas de la península de Yucatán, así como en zonas de ladera y cañadas en los sistemas montañosos de la Sierra Madre de Chiapas, incluyendo la Depresión Central, la Sierra Madre del Sur y la porción sur de la Sierra Madre Oriental. El rango amplio de adaptación de este grupo ha facilitado que se cultiven desde el nivel del mar en la península de Yucatán, hasta las tierras altas de ladera con condición húmeda y nubosa de las sierras del sureste y centro-oriente del país. En esta última condición ambiental, algunas razas del grupo han desarrollado características especiales como raíces adventicias extensas que facilitan su anclaje. Ejemplos: Olotón, Tehua, Comiteco, Olotillo (CONABIO, 2018).

10.2 ANEXO II

```
#Iniciar qiime2
source activate qiime2-2018.8
#Importar secuencias a qiime
qiime tools import \
  --type 'SampleData[PairedEndSequencesWithQuality]' \
  --input-path NFmanifest.txt \
  --output-path paired-end-demux.qza \
  --source-format PairedEndFastqManifestPhred33

#Vizualisar la calidad y cantidad de los datos
nohup qiime demux summarize \
  --i-data paired-end-demux.qza \
  --o-visualization demux.qzv &

#Filtrar secuencias y quimeras
nohup qiime dada2 denoise-paired \
  --i-demultiplexed-seqs paired-end-demux.qza \
  --p-trim-left-f 0 \
  --p-trim-left-r 0 \
  --p-trunc-len-f 290 \
  --p-trunc-len-r 260 \
  --p-n-threads 12 \
  --o-representative-sequences rep-seqs.qza \
  --o-table table.qza \
  --o-denoising-stats stats-dada2.qza &

#Filogenía
qiime phylogeny align-to-tree-mafft-fasttree \
  --i-sequences rep-seqs.qza \
  --o-alignment aligned-rep-seqs.qza \
  --o-masked-alignment masked-aligned-rep-seqs.qza \
  --o-tree unrooted-tree.qza \
  --o-rooted-tree rooted-tree.qza

#Asignar Taxonomía
qiime tools import \
  --type 'FeatureData[Sequence]' \
  --input-path
/space21/PEG/violeta/NFSamples/analisis/SILVA_128_QIIME_release/rep_set/rep_set_18S_o
nly/97/97_otus_18S.fasta \
  --output-path 97_18S_otus.qza

qiime tools import \
  --type 'FeatureData[Taxonomy]' \
  --input-format HeaderlessTSVTaxonomyFormat \
```

```
--input-path
/space21/PEG/violeta/NFSamples/analisis/SILVA_128_QIIME_release/taxonomy/18S_only/99
/majority_taxonomy_all_levels.txt \
--output-path ref-taxonomy.qza
```

```
qiime feature-classifier extract-reads \
--i-sequences 97_18S_otus.qza \
--p-f-primer CAGCAGCCGCGGTAATTCC \
--p-r-primer TCCAAGAATTTACCTC \
--p-trunc-len 350 \
--o-reads ref-seqs.qza
```

```
qiime feature-classifier fit-classifier-naive-bayes \
--i-reference-reads ref-seqs.qza \
--i-reference-taxonomy ref-taxonomy.qza \
--o-classifier classifier.qza
```

#Barplotqiime

```
qiime feature-classifier classify-sklearn \
--i-classifier classifier.qza \
--i-reads rep-seqs.qza \
--o-classification taxonomy.qza
```

```
qiime taxa barplot \
--i-table unfiltered-table.qza \
--i-taxonomy taxonomy.qza \
--m-metadata-file Tlaya-metadata.txt \
--o-visualization unfilter-taxa-bar-plots.qzv
```

#Renombrar tabla para filtrar secuencias de nematodos
mv table.qza unfiltered-table.qza

#Seleccionar solo secuencias de nematodos

```
qiime taxa filter-table \
--i-table unfiltered-Eukarya.qza \
--i-taxonomy taxonomy.qza \
--p-include
"D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Holozoa;D_3__Metazoa_D_4__Nematoda" \
--o-filtered-table Nematoda.qza
```

```
qiime feature-table summarize \
--i-table Nematoda.qza \
--o-visualization Nematoda.qzv \
--m-sample-metadata-file Tlaya-metadata.txt
```

#Exportar archivos a R


```
qiime tools export --input-path table.qza --output-path phyloseq
biom convert -i phyloseq/feature-table.biom -o phyloseq/otu_table.txt --to-tsv
qiime tools export --input-path Nematode.qza --output-path phyloseq
biom convert -i phyloseq/feature-table.biom -o phyloseq/otu_table.txt --to-tsv
qiime tools export --input-path taxonomy.qza --output-path phyloseq
qiime tools export --input-path unrooted-tree.qza --output-path phyloseq
```

10.3 ANEXO III.

>contig 9003

Length = 5050

Score = 583 bits (294), Expect = e-166
Identities = 312/318 (98%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 35  tggtaaaatagaagtatttgggtccttaagatagtttatgctattttaagaattggttt 94
          |||
Sbjct: 4147 tggtaaaaagaagtatttgggtccttaggtatagtttatgctattttaagaattggttt 4206

Query: 95  agtaggttggtgtagtttgagctcatcatatgtatactggttggtatagatttggattctcg 154
          |||
Sbjct: 4207 agtgggttggtgtagtttgagctcatcatatgtatactggttggtatagatttagattctcg 4266

Query: 155  tgcttattttacagcagctactatagtaattgctgtacactactgggtgtaaagtttttag 214
          |||
Sbjct: 4267 tgcttattttacagcagctactatggtaattgccgtacactactgggtgtaaagtttttag 4326

Query: 215  atgattagcaactctatttgggtataaaaaatagatatttcaacctacattattgtgagtott 274
          |||
Sbjct: 4327 atgattagcaactctatttgggtataaaaaatagatatttcaacctacattattgtgagtott 4386

Query: 275  aggttttatctttttattcacttttaggtgggttaactgggtgtattttatcaaattctag 334
          |||
Sbjct: 4387 aggttttatctttttattcacttttaggtgggttaactgggtgtattttatcaaattctag 4446

Query: 335  tttagatattattcttca 352
          |||
Sbjct: 4447 tttagatattattcttca 4464
```

10.4 ANEXO IV

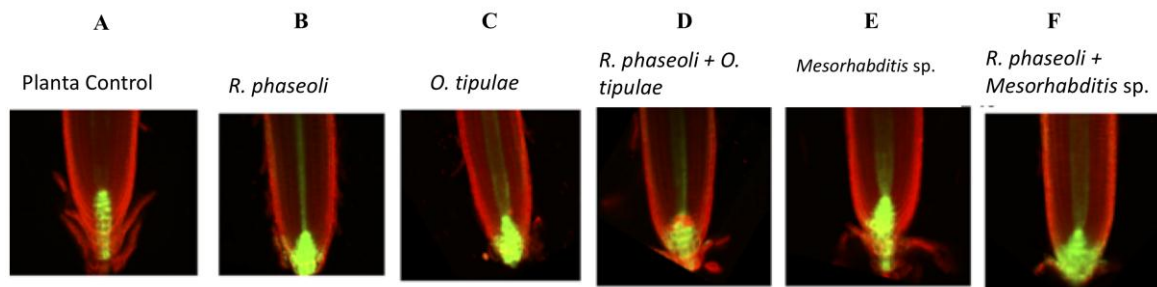


Figura Suplementaria. Fotografía fluorescente de la raíz primaria de *A. thaliana* DR5:Gus inoculadas con *R. phaseoli* Ch24-10 y los nematodos (*O. tipulae* y *Mesorhabditis* sp.).



Contents lists available at ScienceDirect

Applied Soil Ecology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apsoil

Bacterial preys and commensals condition the effects of bacteriovorous nematodes on *Zea mays* and *Arabidopsis thaliana*

Violeta Matus-Acuña^a, Gustavo Caballero-Flores^b, Blanca J. Reyes-Hernandez^{a,c}, Esperanza Martínez-Romero^{a,*}

^a Program of Ecological Genomics, Center for Genome Sciences, National Autonomous University of Mexico, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^b Department of Pathology and Rogel Cancer Center, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI, USA

^c Centre for Organismal Studies, Heidelberg University, Heidelberg, Germany



ARTICLE INFO

Keywords:

Rhizosphere
O. tipulae
Mesorhabditis sp.
Rhizobium phaseoli Ch24-10
 Grazing
 Root morphology

ABSTRACT

In this study, we analyzed the nematode-bacteria-plant interaction by using bacteriovorous nematodes isolated from maize rhizosphere and plant growth promoting rhizobacteria to evaluate their effect on plant growth and root development of maize and *Arabidopsis thaliana*. Two bacterial feeding nematodes, identified as *Oscheius tipulae* and *Mesorhabditis* sp., displayed distinct attraction patterns for seven rhizosphere bacteria with a strong bias towards *Rhizobium* strains. We tested the effect of these two nematodes on both plant growth and root morphology using native *Zea mays* and found that the co-inoculation of *Rhizobium phaseoli* Ch24-10, a plant growth promoter, and maize rhizosphere nematodes, increased dry weight of corn plants compared to plants treated only with bacteria or the nematode. Additionally, we found that the nematodes reduced the weight and length of the primary root and increased the number of emerging lateral roots. We further analyzed the effect of nematodes and bacteria using the model plant *A. thaliana* and observed similar effects on roots as those found in native corn. Nematodes reduced the primary root growth and increased the number of emerging lateral roots. The model nematode *Caenorhabditis elegans* N2 alone had no effect on *A. thaliana* plants, it became capable of affecting root morphology when fed with *Acinetobacter pittii*, which was originally isolated from the maize rhizosphere nematodes. Our results suggest a synergistic effect of nematodes and their associated bacteria both in plant development and root morphology, highlighting the importance of nematode-bacteria interactions in shaping plant growth and root morphology. A model of nematodes as Trojan horses carrying bacteria is proposed.

1. Introduction

Nematodes are one of the most abundant and ubiquitous multicellular organisms on Earth, inhabiting a broad range of habitats such as freshwater, marine and terrestrial environments among others (Ladygina et al., 2009). These worms are particularly abundant in soil, exhibiting densities ranging from 1 to 10 million ind. m⁻², thereby representing a significant fraction of the microbial biomass in this ecosystem (Blanc et al., 2006). Consistent with their ability to inhabit a broad range of environments, nematodes also exhibit different lifestyles, such as free-living or parasitic organisms of animals and plants, and types of feeding, since some feed on bacteria, fungi, algae, protozoa or even other nematodes (Kiontke and Fitch, 2013). Among these, bacterial-feeders are the main population of nematodes in the soil, representing 20–50% of total nematode classes isolated from mixed

deciduous forest samples (Patra et al., 1987).

Nematodes can sense dozens of odors through several olfactory sensory neurons (Bargmann et al., 1993), showing attraction, aversion and/or memory for many of these odors (Colbert and Bargmann, 1995), which allows them to identify potential prey and avoid pathogens during bacterial grazing (Choi et al., 2015; Pradel et al., 2007). As an indirect result, bacterial grazing by nematodes modifies soil microbial communities, which in turn can also influence plant development as has been previously reported for tomato, peanut, and rice (Eller and Frenzel, 2001; Jiang et al., 2012). Additionally, in *Arabidopsis thaliana*, a model system used to study plant-microbe interactions because of its short life cycle (Jiang et al., 2012), bacterial feeding nematodes also modify root morphology in an auxin dependent way (Mao et al., 2007).

It has been proposed that the effect of nematodes on plant development may depend on nematode associated bacteria (Mao et al., 2006;

* Corresponding author.

E-mail address: emartine@ccg.unam.mx (E. Martínez-Romero).

<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.08.012>

Received 3 May 2018; Received in revised form 22 August 2018; Accepted 23 August 2018

Available online 05 September 2018

0929-1393/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Xu et al., 2015), and various species of rhizobia, such as *Rhizobium* sp., have been found to be part of the microbiota of these worms (Baquiran et al., 2013; Berg et al., 2016; Niu et al., 2016). *Rhizobium* spp. is a well-known plant growth-promoting bacterium that forms nitrogen-fixing nodules on legume roots. However, in addition to its symbiotic interaction with legumes, *Rhizobium* sp. has also been reported as a plant growth promoter in other non-nodulating crops, such as maize (Celador-Lera et al., 2017; Rosenblueth and Martínez-Romero, 2004).

Maize (*Zea mays*) is one of the most important cereal crops for human consumption and animal feed worldwide, both as silage and as crop residue (Godfray et al., 2010). In addition, maize is also processed into a variety of food and industrial products, including starch, sweeteners, oil, beverages, glue, industrial alcohol, and fuel ethanol (Ranum et al., 2014). Mexico is considered the site of origin of maize-based agriculture and the center of its genetic diversity (Perales and Golicher, 2014), making it an ideal place to study the effect of soil nematodes on native maize growth. Most of the crop lands in Mexico are managed by small-scale farmers and their yields depend heavily on soil fertility, and abiotic environmental conditions such as seasonal rains, temperature, soil pH, among others. Although various studies have addressed the diversity of bacterial communities in corn rhizosphere, and its role in promoting plant growth (Jurgens and Gude, 1994; Lin et al., 1983; Peiffer et al., 2013; Pereira et al., 2011; Piromyou et al., 2011; Rosenberg et al., 2009), the role of nematode-bacteria interactions in shaping the bacterial community in *Z. mays* rhizosphere, as well as their influence during maize development, have been scarcely studied.

In this study, we hypothesize that nematodes isolated from rhizospheric corn soils will show a strong feeding preference towards *Rhizobium* strains that may represent an abundant food source in the rhizosphere, which in turn might influence bacterial fitness, and thus, the plant growth promoting capabilities of these bacteria. On the other hand, considering that environmental nematodes carry a vast and diverse microbiota (adult worms contain ~10,000 bacterial cells, Berg et al., 2016), which in this case may also derive from maize rhizosphere, we hypothesize that bacteria carried by these nematodes may also play a role in plant development. Finally, considering the genetic homogeneity of *A. thaliana* compared to native corn, as well as its wide use as a model in root development analysis, we also used *A. thaliana* to further characterize the effects of nematodes and their associated bacteria in root morphology. Our findings reveal a novel synergistic effect in which co-inoculation of environmental nematodes and rhizobial strains increases plant growth in maize and modifies root morphology in both native corn and the plant model *A. thaliana*. Also, we showed that *Acinetobacter pittii*, a bacterium isolated from the nematodes, is capable of modifying root morphology, emphasizing the importance of nematode and their associated bacteria in plant development. A model of nematodes as Trojan horses carrying bacteria is proposed.

2. Materials and methods

2.1. Isolation and identification of nematodes

Nematodes used in this study were isolated from corn rhizosphere of

young plants (vegetative stage V4) in a small agricultural field in Mexico City, and of senescent corn plants (reproductive stage R6) from an industrial cornfield in Guanajuato, Mexico. Nematodes were isolated following the protocol previously described by Barrière and Félix (2006). Briefly, a small portion (1 g) of soil was placed on the edge of nematode growth media (NGM) plates containing an *Escherichia coli* DH5 α culture in the middle. The NGM medium is composed of 14 g Bacto-Agar (BD Difco™ New Jersey, USA), 2.9 g NaCl, 2.5 g Bacto-Peptone (BD Difco™ New Jersey, USA), 5 μ g/ml cholesterol, 1 mM MgSO $_4$, 25 mM KH $_2$ PO $_4$ (pH 6) and 1 mM CaCl $_2$ per liter of water. Plates were incubated at room temperature until the nematodes reached the bacteria in the middle of the plate. Individual nematodes were collected, categorized by morphology using a stereomicroscope (Olympus, Tokyo, Japan), and serially transferred to new NGM plates for culturing purposes. Nematodes were maintained at 20 °C on NGM fed with *E. coli* DH5 α until use.

To identify the isolated nematodes, DNA was purified from worms using the DNaesy Blood and Tissue Kit (Qiagen Germantown, USA), and 18S rRNA genes were PCR amplified and sequenced using the primers described in Table 1, and Phusion High Fidelity DNA polymerase (ThermoFisher Scientific MA, USA). The following PCR conditions were used: 95 °C for 5 min, 30 cycles at 95 °C for 30 s, 60 °C for 1 min 30 s, 72 °C for 2 min, and one final cycle at 72 °C for 10 min. The resulting PCR products were purified, sequenced and compared against GenBank database using NCBI BLAST.

2.2. Bacteria

The bacterial strains used in this study were: *Bacillus subtilis* sp. CGE2031 (this study), *E. coli* DH5 α (Taylor et al., 1993), *E. coli* OP50 (Brenner, 1974), *Metylobacterium extorquens* Am1 (Peel and Quayle, 1961), *Rhizobium etli* CFN42 (Quinto et al., 1985), *R. etli* CFN42 DsRed (Torres Tejerizo et al., 2015), *Rhizobium phaseoli* Ch24-10 (Rosenblueth and Martínez-Romero, 2004), *Rhizobium tropici* CIAT 899 (Martínez-Romero et al., 1991), *Streptomyces* sp. (this study), and *A. pittii* (this study). All bacterial strains were grown at 30 °C in peptone yeast medium (PY) with gentamicin (30 mg/ml) or spectinomycin (30 mg/ml) when required. The PY medium is composed of 5 g Bacto-Peptone (BD Difco™ New Jersey, USA), 3 g Bacto-Yeast extract (BD Difco™ New Jersey, USA), and 700 mM CaCl $_2$, per liter of water (Encarnación et al., 1995).

2.3. Bacterial attraction assay

In order to test the bacterial feeding preferences of the isolated nematodes to different bacterial strains, we carried out bacterial attraction assays in vitro. For this, bacteria were grown in 50 ml of liquid PY medium at 30 °C until cultures reached an optical density of 0.6 at 600 nm. 50 μ l (μ l) of each culture were separately placed on the edge of an NGM plate and incubated overnight at 25 °C. Then, 100 adult nematodes were placed in the middle of the plate, and after one hour, the number of worms on each bacterial lawn was determined (Supplementary 1). We used *E. coli* DH5 α , the nematode food source

Table 1
Oligonucleotide sequences for primers used in this study.

Name	Sequence	Amplified region	Reference
F43	5'- ATTAAGCCATGCATGTC-3'	527 bp of 18S rRNA	Hadziavdic et al. (2014)
R570	5'-GGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3'		
F566	5'-CAGCAGCCGGTAATTCC-3'		
R1200	5'-CCCGTGTGAGTCAAATTAAGC-3'	634 bp of 18S rRNA	
NemF	5'-GGGGAAGTATGGTTGCAA-3'		
18Sr2b	5'-TACAAGGGCAGGACGTAAT-3'		
fD1	5'-CGAATTCTGCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	1500 bp of 16S rRNA	Weisburg et al. (1991)
rD1	5'-CCCGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3'		

after isolation, as a positive control in these assays.

For supernatant attraction assays, bacteria were grown as described above, cultures were centrifuged at 8000 rpm for 10 min, and the supernatants were collected and filtered using Millex® syringe filter units (pore size 0.22 µm). 50 µl of each supernatant were placed on NGM plates and preference assays were performed following the same procedure as for bacterial lawn attraction assays.

2.4. Confocal microscopy

To evaluate consumption of bacteria by nematodes, adult worms were placed on NGM plates and fed on the reporter strain *R. etli* CFN42 DsRed or *R. etli* CFN42 (as a control) during seven days at room temperature. After this period, the nematodes were recovered from the plates, fixed with ethanol 70% (Jones and Gwynn, 1991) and visualized in a Zeiss LSM 510 Meta Confocal Microscope. The images were captured using phase contrast at 20X magnification and analyzed using the software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

2.5. Corn growth conditions

Native (“criollo de Hidalgo”) maize seeds were sterilized with 70% ethanol and 20% bleach, as described in Rosenblueth and Martínez-Romero (2004). Sterilized seeds were then germinated in semi-solid Fahræus agar (7 g Bacto-Agar (BD Difco™ New Jersey, USA), 0.1 g CaCl₂, 0.12 g MgSO₄·7H₂O, 0.1 g KH₂PO₄, 0.15 g Na₂HPO₄, 0.005 g Fe-citrate, and traces of Mn, Cu, Zn, B and Mo per liter of water) (Fahræus, 1957) during 48 h in a climate-controlled room (20 °C 16/8 h light/dark photoperiod). Seeds were then transplanted in flasks containing sterile vermiculite and Fahræus solution (0.1 g CaCl₂, 0.12 g MgSO₄·7H₂O, 0.1 g KH₂PO₄, 0.15 g Na₂HPO₄, 0.005 g Fe-citrate, and traces of Mn, Cu, Zn, B and Mo per liter of water) for corn development assays, or semi-solid Fahræus agar for root morphology analyses. Plants were incubated in a climate-controlled room during three days before inoculation with nematodes and/or bacterial strains.

2.6. *Z. mays* development assays

To evaluate the influence of nematode-bacteria interactions in corn development, plants were inoculated with nematodes and/or bacteria as follows: bacterial cultures grown in PY medium (OD₆₀₀ = 0.6) were centrifuged at 5000g/5 min, washed twice with sterile phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 and suspended in the same buffer ~10⁶ colony-forming units (CFU) per gram of vermiculite were used for inoculation. For nematode inoculations, worms were cultured in NGM Petri dishes containing an *E. coli* OP50 lawn during two days at 25 °C, centrifuged at 1000g/1 min, washed six times with sterile water, and ~30 adult nematodes per gram of dry vermiculite were used for inoculation. The different treatments included: 1) control plants (without bacteria or nematodes); 2) plants inoculated with *R. phaseoli* Ch24-10; 3) plants inoculated with soil-isolated nematodes; and 4) plants co-inoculated with both bacteria and the corresponding nematode. After 28 days, plants were harvested and foliage was separated from the root. Height and dry weight of the foliage was measured as previously described (Piromy et al., 2011).

2.7. Root morphology analysis in *Z. mays* and *A. thaliana*

To evaluate the effect of the bacterial-feeding nematodes on root development in corn plants, germinated sterile seeds were grown in flasks containing 200 ml of semi-solid Fahræus agar in a climate-controlled room during one week. Then, bacterial suspensions (10⁷ CFU) and/or nematodes (~3000 adult worms) were used for inoculation as described above. One week after, plants were harvested and root portions were collected to determine total root length and dry weight as previously described (Piromy et al., 2011).

For root morphology analyses in the plant model *A. thaliana*, Col-0 ecotype seeds were dry sterilized during 2 h in contact with vapors of 50 ml of commercial hypochlorite and 1.5 ml of HCl, and then imbibed in sterile distilled water during two days at 4 °C. Then, plants were grown in Petri dishes (oriented vertically) with 0.2x Murashige and Skoog (MS) medium (Phyto Technology Laboratories, Lenexa), supplemented with 1% sucrose, vitamins (0.5 mg L⁻¹ pyridoxine, 0.5 mg L⁻¹ nicotinic acid) and 0.8% agar. Plants were maintained at 21 °C, 16/8 h light/dark photoperiod until germination (determined when the primary root was first visible under a stereo microscope). Four days after germination, plants were inoculated with nematodes (~1000 adult worms) and/or bacteria (10⁶ CFU) at four centimeters from the root tip. Primary root length and emerged lateral roots for the same plant treatments as previously described were determined from scanned images using the ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

2.8. Estimating the effect of nematode-isolated bacteria in root size

To isolate nematode-associated bacteria, soil nematodes were grown in sterile NGM medium for three days (until they reached the adult phase) and then washed six times with sterile water. Then, ~50 adult worms were mechanically lysed by vortexing in 1 ml of sterile water with 0.5 g of zirconium beads, and serial dilutions from this suspension were plated in agar NGM to obtain isolated colonies. As control, colonies were also isolated from the model nematode *C. elegans* N2 that was maintained under laboratory conditions with routine bleach sterilization in monoxenic cultures with *E. coli* OP50. Then, we selected ten morphologically different colonies per nematode for identification by 16S rRNA sequence analysis using the universal primers fD1 and rD1 (Table 1) (Weisburg et al., 1991) and Phusion High Fidelity DNA polymerase (ThermoFisher Scientific MA, USA). The following PCR conditions were used: 95 °C for 5 min, 30 cycles at 95 °C for 30 s, 55 °C for 1 min 30 s, 72 °C for 2 min, and one cycle at 72 °C for 10 min.

To evaluate the effect of the isolated bacteria in root morphology, we inoculated *A. thaliana* plants with 10⁶ CFU of *A. pittii*, a bacterial isolate that was commonly recovered from both nematodes, and/or ~1000 *C. elegans* worms (to avoid the effect of other commensal bacteria present in the environmental nematodes). After seven days, primary root length and emerged lateral roots were determined as described in 2.7.

2.9. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software version 5.0 (GraphPad Software Inc.). To test if the data show a Gaussian distribution we performed D'Agostino-Person, Shapiro-Wilk and/or Kolmogorov-Smirnov tests. Statistical analysis were then performed using one-way ANOVA (for parametric samples) or Kruskal-Wallis test (for non-parametric samples), followed by Tukey's HSD test (parametric) or Dunn's test (non-parametric) as post hoc tests. Dunnett's post hoc test was used for parametric samples if comparing a control vs various treatments.

3. Results

3.1. Attraction assays of isolated nematodes towards rhizospheric bacteria

We isolated two different nematodes from corn rhizosphere, which were identified as *O. tipulae* (from young plants, V4) and *Mesorhabditis* sp. (from senescent plants, R6). Phylogenetic analysis based on 18S rRNA sequences revealed that these nematodes are closely related to *C. elegans* and belong to the family *Rhabditidae* (Supplementary 2). We found that both nematodes are preferentially attracted *in vitro* to *Rhizobium* strains over other rhizospheric bacteria such as *M. extorquens*, *B. subtilis* and *Streptomyces* sp. (Fig. 1A–B). However, whereas *O. tipulae*

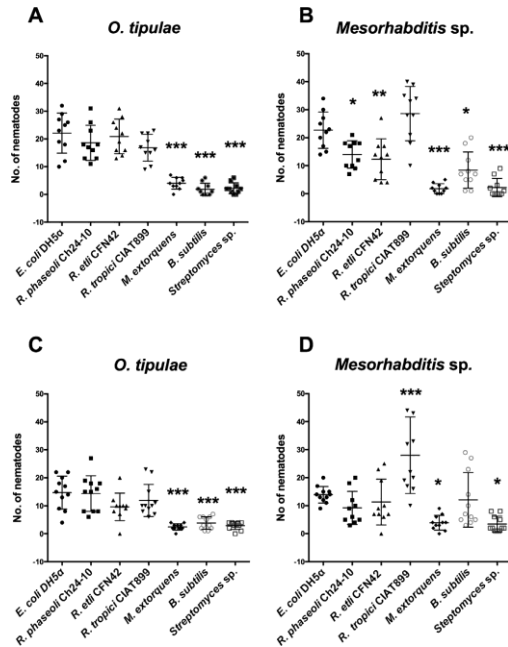


Fig. 1. Attraction of nematodes *O. tipulae* and *Mesorhabditis* sp. to different rhizobacteria (A and B, respectively) and their supernatants (C and D, respectively). Statistically significant differences with respect to *E. coli* DH5α are indicated by * ($P < 0.01$) or *** ($P < 0.001$) (Dunnett's post hoc test $P \leq 0.05$). Representative results of three independent experiments are shown.

displayed similar attraction patterns for the three rhizobia strains used (Fig. 1A), *Mesorhabditis* sp. had a strong preference for *R. tropici* CIAT 899 (Fig. 1B). As expected, both nematodes showed a high preference for *E. coli* DH5α (their food source after isolation). We also evaluated the attraction of both nematodes towards bacterial supernatants, and even though nematode migration towards supernatants was generally lower compared to whole bacterial cultures, a similar pattern of preference was observed for both nematodes (Fig. 1C and D). Interestingly, the response of *Mesorhabditis* sp. towards *R. tropici* CIAT 899 supernatant was as strong as that previously observed for the bacterial lawn (Fig. 1D).

Fluorescence microscopy experiments confirmed that *Rhizobium* is a food source for *O. tipulae* and *Mesorhabditis* sp. since the reporter strain *R. etli* CFN42 DsRed was detected in the pharynx and along the intestine of both nematodes previously fed with the fluorescent bacterium, while worms fed with *R. etli* CFN42 wild type (negative control) did not show any signal (Supplementary 3).

3.2. Shoot biomass of corn plants inoculated with nematodes and *Rhizobium*

Based on the nematode preference towards *Rhizobium* strains, we decided to test the effect of nematode-*Rhizobium* interaction on maize development. We found that, although maize plants inoculated with *R. phaseoli* Ch24-10 showed higher shoot height and dry weight compared to control (untreated) plants, a significant further increase in these parameters was obtained with co-inoculations of *O. tipulae* or *Mesorhabditis* sp. plus *R. phaseoli* Ch24-10 compared to control plants (Fig. 2A–D). In contrast, we did not observe significant changes in growth of corn inoculated only with nematodes compared to control

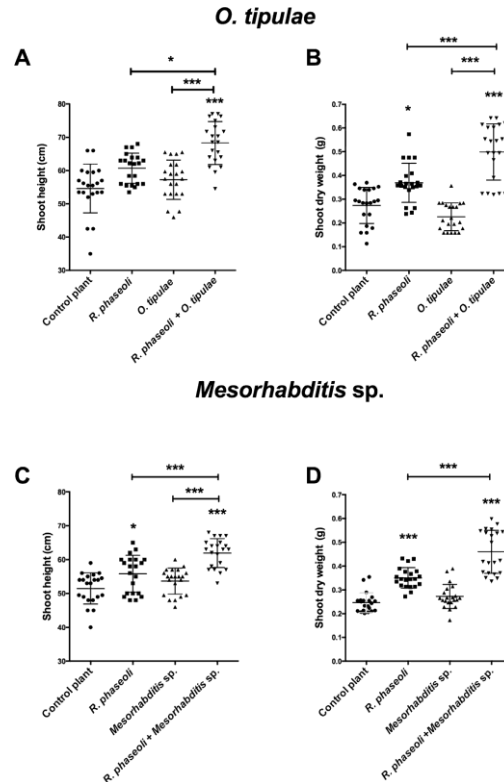


Fig. 2. Effect of nematodes and *R. phaseoli* Ch24-10 on corn shoot height (A and C) and shoot dry weight (D and B). Results of three independent experiments with seven replicate plants are shown. Statistically significant differences with respect to control plants are indicated by * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) or *** ($P < 0.001$) (Dunnett's or Tukey HSD post hoc test $P \leq 0.05$) single asterisks represent comparisons against control plants, while comparisons among other groups are indicated with lines.

(untreated) plants.

3.3. Length and dry weight of *Z. mays* and *A. thaliana* roots inoculated with nematodes and *Rhizobium*

We also evaluated the effect of nematode-*Rhizobium* interactions on corn root morphology and found that *O. tipulae* treatment led to shorter primary roots compared to untreated plants, independently of the presence of *R. phaseoli* (Fig. 3A). However, in the case of *Mesorhabditis* sp., which also reduced primary roots, addition of *R. phaseoli* restored the root length to the levels observed in *R. phaseoli* Ch24-10 and control treatments (Fig. 3A).

Similarly, whereas *O. tipulae* did not change root dry weight significantly compared to control plants, and co-inoculations of *O. tipulae* and *R. phaseoli* were similar to single *R. phaseoli* treatment (Fig. 3B), plants treated with *Mesorhabditis* sp. showed a higher root dry weight, which was further increased with the addition of *R. phaseoli* compared to untreated plants or *R. phaseoli* single treatments. These results correlated with an increased outgrowth and elongation of lateral roots and total area observed in plants treated with the nematode-*Rhizobium* mixtures compared to single treatments (Supplementary 4A). We did not observe significant differences in shoot biomass and plant height

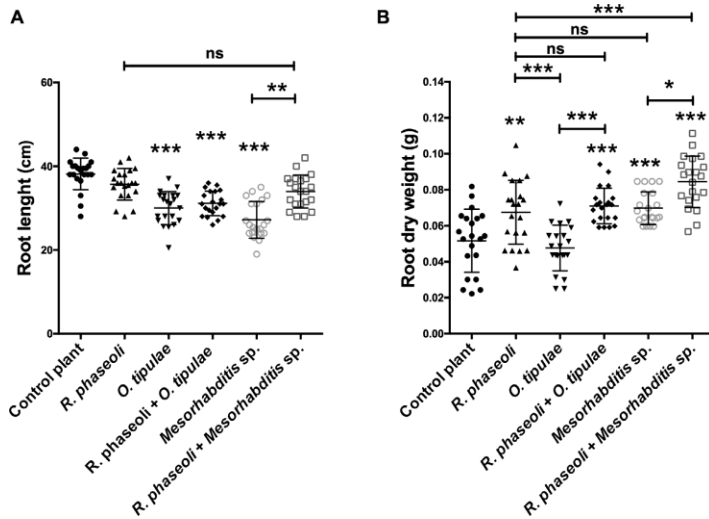


Fig. 3. Effect of *Mesorhabditis* sp., *O. tipulae* and *R. phaseoli* Ch24-10 on corn root length (A) and root dry weight (B). Results of three independent experiments with seven replicate plants are shown. Statistically significant differences are indicated by * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) or *** ($P < 0.001$) (Dunn's or Tukey HSD post hoc test $P \leq 0.05$), single asterisks represent comparisons against control plants, while comparisons among other groups are indicated with lines.

among the different treatments at this early time point sampled (seven days) (Supplementary 4B and C).

We performed similar root morphology analysis in the plant model *A. thaliana*, and we also observed shorter primary roots in plants to which nematodes were added. Plants treated with *O. tipulae* or *Mesorhabditis* sp. were ~50% and ~37% shorter compared to control plants, respectively (Supplementary 5A). Similarly, a slight increase in the number of emerged lateral roots was also observed with co-inoculations of nematode-*Rhizobium* compared to single *Rhizobium* treatments, however, such differences did not reach significance (Supplementary 5B–C).

3.4. Influence of nematode microbiota on *A. thaliana* root morphology

In addition to the role of nematode-*Rhizobium* interactions described above, we also decided to evaluate the effect of nematode-associated (commensal) bacteria on root morphology. We found two bacteria that were commonly isolated from both *O. tipulae* and *Mesorhabditis* sp., which were closely related to *Stenotrophomonas maltophilia* KUGK130 and *A. pittii* (Table 2), whereas as expected, *E. coli* was the only bacterium isolated from *C. elegans* that was regularly fed with this bacterium. Then, we tested the role of one of these bacterial isolates, *A. pittii*, in *Arabidopsis* root morphology. We found that, whereas single inoculations of the bacterium or the nematode *C. elegans* N2 had no effect *Arabidopsis* root morphology (Fig. 4A and B), roots inoculated with *C. elegans* N2 previously fed with *A. pittii* showed a reduction of the primary root length and an increase in emerged lateral roots (Fig. 4B).

Table 2
Assignment 16S rRNA sequences of the isolated bacteria from *O. tipulae* and *Mesorhabditis* sp.

Isolate	Origin	Closest NCBI match	Identity %	Number of isolates
Ost2	<i>O. tipulae</i>	<i>Pseudomonas alkylphenolia</i> strain KL28	99	1
Ost5	<i>O. tipulae</i>	<i>Ochrobactrum pituitosum</i> strain CCUG 50899)	99	1
Ost6	<i>O. tipulae</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain KUGK130	99	1
Ost8	<i>O. tipulae</i>	<i>Acinetobacter pittii</i> strain HUMV-6483	99	2
Mes1	<i>Mesorhabditis</i> sp.	<i>Acinetobacter pittii</i> strain HUMV-6483	99	2
Mes2	<i>Mesorhabditis</i> sp.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551	99	5
Mes10	<i>Mesorhabditis</i> sp.	<i>Achromobacter insolitus</i> strain DSM 23807	99	1

This phenotype was similar to that previously observed for roots of plants treated with the environmental nematodes (Supplementary 5).

4. Discussion

Soil nematodes exhibit diverse dietary habits that mainly depend on food availability in their environment and preference for certain bacterial species over others (Bargmann et al., 1993; Choi et al., 2015; Yu et al., 2015). Here, we found that *O. tipulae* and *Mesorhabditis* sp., two bacterial-feeding nematodes isolated from the rhizosphere of corn, show attraction to *Rhizobium* strains over Gram-positive bacteria, thus suggesting that *Rhizobium* strains are a common food source for these nematodes in this ecosystem. However, the fact that *Mesorhabditis* sp. showed a higher preference for *R. tropici* over other *Rhizobium* strains also suggests that these nematodes may show subtle differences in feeding preferences in rhizospheric soils. Although nematode preference for Gram-negative bacteria has previously been reported for *Cephalobus brevicauda* and *C. elegans* (Salinas et al., 2007; Yu et al., 2015), this is the first study reporting attraction of soil nematodes to the plant growth promoter, *R. phaseoli* Ch24-10.

Various studies have demonstrated that bacterial grazing by nematodes modifies the endogenous microbial community and influences bacterial fitness and activity (Bonkowski et al., 2000; Irshad et al., 2011; Jousset et al., 2009). Accordingly, we found that maize growth promotion by *R. phaseoli* Ch24-10 was increased in the presence of soil-isolated nematodes, and that such phenotype was greater for *Mesorhabditis* sp. This result correlates with a previous study in which

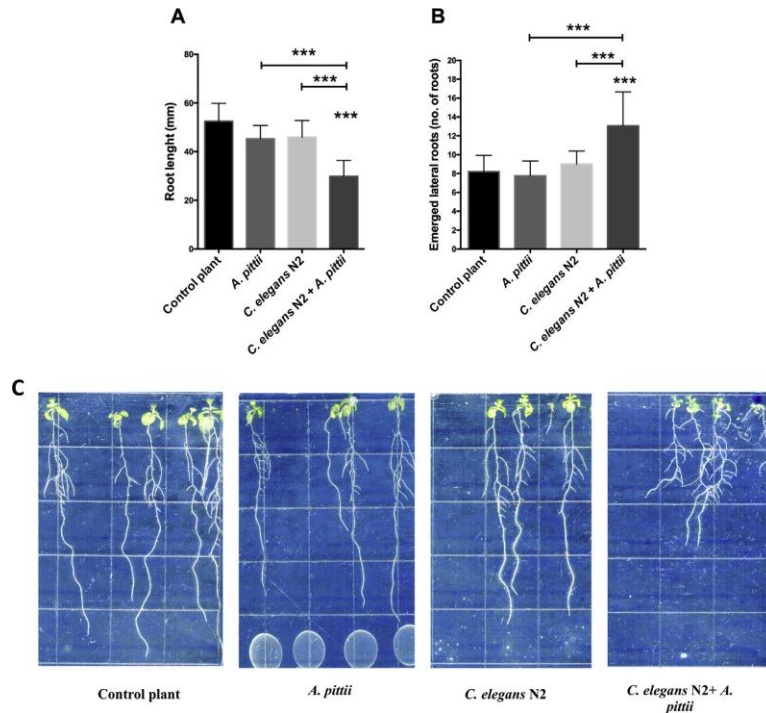


Fig. 4. Effect of *A. pittii* and *C. elegans* N2 on *A. thaliana* root length (A) and lateral emerged roots number (B). Representative images of the different treatments (C). Results of three independent experiments with 10 replicate plants are shown. Statistically significant differences with respect to the control plant are indicated by * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) or *** ($P < 0.001$) (Tukey HSD post hoc test $P \leq 0.05$).

Mesorhabditis sp. also caused a greater increase in plant growth of peanut in the presence of *Bacillus megaterium* compared to another soil-isolated nematode, *Cephalobus* sp. (Xu et al., 2015). *Cephalobus* sp. in turn, showed a higher effect in increasing soil basal respiration and indol 3-acetic acid (IAA) content in rice in the presence of *Burkholderia* sp. compared to the laboratory nematode, *C. elegans* (Cheng et al., 2011). These results highlight the differential effects in plant development among environmental nematodes.

It has been previously shown that bacterial feeding nematodes increase the production of bacterial IAA (Fu et al., 2005; Rosenberg et al., 2009), which in turn induces expression of diverse plant genes involved in cell elongation, leading to enhanced root growth (Guilfoyle, 2007). We also observed changes in root architecture, shorter primary roots in plants treated with nematodes and increased root dry weights in nematode-*R. phaseoli* treatments, both in native corn and *A. thaliana*. A similar phenotype was observed with another rhizobial strain, *Rhizobium* sp. IRGB74, which was able to colonize the roots of *A. thaliana*, thus inhibiting the growth of the main root and enhancing the formation of lateral roots in an auxin-dependent manner, however, the effect of *Rhizobium*-nematode co-inoculations was not evaluated in this work (Zhao et al., 2018). In addition, it has also been reported that high levels of auxins inhibit cell elongation in primary roots, and increase the number of lateral roots and root hairs in *A. thaliana* inoculated with *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 or *Rhizobium* sp. IRGB74 (Asari et al., 2017). Although we observed an enhanced auxin response in the root cap of *Arabidopsis* roots using a DR5:Gus reporter line, both in single and double treatments (Supplementary 6), such increased amount of auxins may explain the phenotype promoted by *R. phaseoli*, but not the differences observed in primary roots with nematode treatments, thus suggesting the presence of a multifactorial and more complex mechanism than previously described.

In this study, we also report that members of the nematode microbiota can also influence plant development when transferred to an innocuous nematode such as *C. elegans*, which indicates that nematode-associated bacteria condition the effects of nematodes, which may explain, at least in part, the diverse phenotypes observed in plants treated with different environmental isolates. Similarly, it has also been reported that some nematodes have a mutualistic relationship with their bacterial preys. For example, the insect-pathogenic nematodes *Heterorhabditis* sp. and *Steinernema* sp. have independently evolved close relationships with bacteria of the genera *Photobacterium* spp. and *Xenorhabdus* spp., respectively (Lacey and Georgis, 2012; Lacey et al., 2015; Torres-Barragan et al., 2011). These nematodes infect insects and release the symbiotic bacteria that multiply quickly and kill the host whereas are consumed again for the nematode as a food source.

Altogether, our results show a novel role of soil nematodes and their associated bacteria, including bacterial preys and commensals, in modulating root morphology and plant growth. We propose a model in which nematodes may act like Trojan horses, carrying rhizobial bacteria to plant roots, where bacteria are then able to colonize and multiply, indirectly increasing nematode food source and influencing plant fitness (Fig. 5). It is worth noting that such effects may depend on the type of nematode and its associated bacteria, as well as plant host, thus emphasizing the complex mechanism of plant growth-promotion by these organisms. This work and further studies may help to fully understand the environmental impact and ecological effects of bacteria and bacteria-feeding nematodes in soil, which in turn may lead to novel approaches to manage nematode populations, or their core microbiota, for agricultural purposes, for example, by developing novel nematode-based biofertilizers to increase the number of plant growth promoting bacteria in rhizosphere and/or improve root colonization by these bacteria.

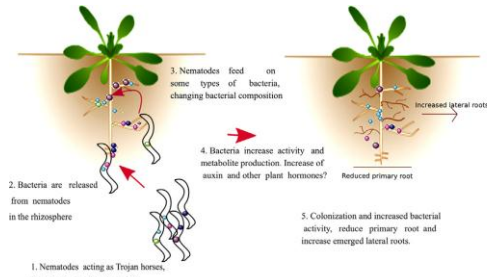


Fig. 5. Proposed model of nematodes as Trojan horses (see the text for further details).

Acknowledgements

Financial support was from “Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología”, Mexico (CONACYT 253116) and PAPIIT-UNAM (IN207718) to EMR. VMA was supported by a PhD scholarship from CONACYT (#253771). GCF was supported by a postdoctoral fellowship from CONACYT (#477392). Authors thank Mónica Rosenblueth and Marco A. Rogel for technical assistance, Juan Miranda for providing nematodes, Roberta Caruso for advice with statistical analyses, and Mónica Rosenblueth, Michael Dunn, Donald Zak, Peter Pellitier, Will Argiroyff and Joseph Pickard for critically reviewing this manuscript. VMA dedicates this paper to the bright memory of Santiago Caballero-Matus.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.08.012>.

References

- Asari, S., Tarkowska, D., Rolčík, J., Novák, O., Palmero, D.V., Bejai, S., Meijer, J., 2017. Analysis of plant growth-promoting properties of *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 using *Arabidopsis thaliana* as host plant. *Planta* 245, 15–30. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2580-9>.
- Baquairan, J.P., Thater, B., Sedky, S., De Ley, P., Crowley, D., Orwin, P.M., 2013. Culture-independent investigation of the microbiome associated with the nematode *Acrobeloides maximus*. *PLoS One* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067425>.
- Bargmann, C.I., Hartwig, E., Horvitz, H.R., 1993. Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell* 74, 515–527. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80053-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80053-4).
- Barrière, A., Félix, M.-A., 2006. Isolation of *C. elegans* and related nematodes. *WormBook* 1–9. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.115.1>.
- Berg, M., Stenuit, B., Ho, J., Wang, A., Parke, C., Knight, M., Alvarez-Cohen, L., Shapira, M., 2016. Assembly of the *Caenorhabditis elegans* gut microbiota from diverse soil microbial environments. *ISME J* 10, 1998–2009. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.253>.
- Blanc, C., Sy, M., Djigal, D., Brauman, A., Normand, P., Villenave, C., 2006. Nutrition on bacteria by bacterial-feeding nematodes and consequences on the structure of soil bacterial community. *Eur. J. Soil Biol.* 42. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2006.06.003>.
- Bonkowski, M., Cheng, W., Griffiths, B.S., Alpehi, J., Scheu, S., 2000. Biotic interactions in the rhizosphere: effects on plant growth and herbivore development. *Eur. J. Soil Biol.* 36, 125–147. [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(00\)01059-1](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(00)01059-1).
- Brenner, S., 1974. *Caenorhabditis elegans*. pp. 71–94.
- Celador-Lera, L., Menéndez, E., Peix, A., Igual, J.M., Velázquez, E., Rivas, R., 2017. *Rhizobium zeae* sp. Nov., isolated from maize (*Zea mays* L.) roots. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 2306–2311. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001944>.
- Cheng, Y., Jiang, Y., Griffiths, B., Li, D., Hu, F., Li, H., 2011. Stimulatory effects of bacterial-feeding nematodes on plant growth vary with nematode species. *Nematology* 13, 369–372. <https://doi.org/10.1163/138855410X528253>.
- Choi, J.I., Yoon, K., Subbammal Kalichamy, S., Yoon, S.-S., Il Lee, J., 2015. A natural odor attraction between lactic acid bacteria and the nematode *Caenorhabditis elegans*. *ISME J* 10, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.134>.
- Colbert, H.A., Bargmann, C.I., 1995. Odorant-specific adaptation pathways generate olfactory plasticity in *C. elegans*. *Neuron* 14, 803–812. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90224-4](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90224-4).

- Eller, G., Frenzel, P., 2001. Changes in activity and community structure of methane oxidizing bacteria over the growth period of rice. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2395–2403. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2395>.
- Encarnación, S., Dunn, M., Willms, K., Mora, J., 1995. Fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* 177, 3058–3066.
- Fahraeus, G., 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* 16, 374–381. <https://doi.org/10.1099/00221287-16-2-374>.
- Fu, S., Ferris, H., Brown, D., Plant, R., 2005. Does the positive feedback effect of nematodes on the biomass and activity of their bacteria prey vary with nematode species and population size? *Soil Biol. Biochem.* 37, 1979–1987. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.01.018>.
- Guilfoyle, T., 2007. Plant biology: sticking with auxin. *Nature* 446, 621–622. <https://doi.org/10.1038/446621a>.
- Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzén, A., Jonassen, I., Thompson, E.M., Troedsson, C., 2014. Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087624>.
- Irshad, U., Villenave, C., Brauman, A., Plassard, C., 2011. Grazing by nematodes on rhizosphere bacteria enhances nitrate and phosphorus availability to *Pinus pinaster* seedlings. *Soil Biol. Biochem.* 43, 2121–2126. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.06.015>.
- Jiang, Y., Wu, Y., Xu, W., Cheng, Y., Chen, J., Xu, L., Hu, F., Li, H., 2012. IAA-producing bacteria and bacterial-feeding nematodes promote *Arabidopsis thaliana* root growth in natural soil. *Eur. J. Soil Biol.* 52, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2012.05.003>.
- Jones, J.T., Gwynn, I.A., 1991. A method for rapid fixation and dehydration of nematode tissue for transmission electron microscopy. *J. Microsc.* 164, 43–51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1991.tb03190.x>.
- Jousset, A., Rochat, L., Péchy-Tarr, M., Keel, C., Scheu, S., Bonkowski, M., 2009. Predators promote defence of rhizosphere bacterial populations by selective feeding on non-toxic cheaters. *ISME J.* 3, 666–674. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.26>.
- Jurgens, K., Gude, H., 1994. The potential importance of grazing-resistant bacteria in planktonic systems. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 112, 169–188. <https://doi.org/10.3354/meps112169>.
- Kiontke, K., Fitch, D.H.A., 2013. Nematodes. *Curr. Biol.* 23, 862–864. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.08.009>.
- Lacey, L.A., Georgis, R., 2012. Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production. *J. Nematol.* 44, 218–225.
- Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.J., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M.S., 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *J. Invertebr. Pathol.* 132, 1–41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>.
- Ladygina, N., Johansson, T., Canbäck, B., Tunlid, A., Hedlund, K., 2009. Diversity of bacteria associated with grassland soil nematodes of different feeding groups: research article. *FEMS Microbiol. Ecol.* 69, 53–61. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00687.x>.
- Lin, W., Okon, Y., Hardy, R.W., 1983. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and sorghum bicolor roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1775–1779.
- Mao, X., Hu, F., Griffiths, B., Li, H., 2006. Bacterial-feeding nematodes enhance root growth of tomato seedlings. *Soil Biol. Biochem.* 38, 1615–1622. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.12.002>.
- Mao, X., Hu, F., Griffiths, B., Chen, X., Liu, M., Li, H., 2007. Do bacterial-feeding nematodes stimulate root proliferation through hormonal effects? *Soil Biol. Biochem.* 39, 1816–1819. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.01.027>.
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F.M., Franco, A.A., Graham, P., Pardo, M.A., 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 417–426. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-3-417>.
- Godfray, H.C., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J.F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S.M., Toulmin, C., 2010. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science* 327, 812–818.
- Niu, Q., Zhang, L., Zhang, K., Huang, X., Hui, F., Kan, Y., Yao, L., 2016. Changes in intestinal microflora of *Caenorhabditis elegans* following *Bacillus nematoicida* B16 infection. *Sci. Rep.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep20178>.
- Patra, D.D., Sachdev, M.S., Subbiah, B. V., 1987. Biology and fertility of soils forms of fertilizer nitrogen residues in soil after intercropping of maize-cowpea 155–161. <https://doi.org/10.1007/BF00336119>.
- Peel, D., Quayle, J.R., 1961. Microbial growth on C1 compounds. 1. Isolation and characterization of *Pseudomonas* AM 1. *Biochem. J.* 81, 465–469.
- Peiffer, J.A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S.G., Dangl, J.L., Buckler, E.S., Ley, R.E., 2013. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 6548–6553. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302837110>.
- Peraltes, H., Golicher, D., 2014. Mapping the diversity of maize races in Mexico. *PLoS One* 9, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114657>.
- Pereira, P., Ibáñez, F., Rosenblueth, M., Etcheverry, M., Martínez-Romero, E., 2011. Analysis of the bacterial diversity associated with the roots of maize (*Zea mays* L.) through culture-dependent and culture-independent methods. *ISRN Ecol.* 2011, 1–10. <https://doi.org/10.5402/2011/938546>.
- Piromyong, P., Buranabanyat, B., Tantasawat, P., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Teamroong, N., 2011. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. *Eur. J. Soil Biol.* 47, 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.004>.
- Pradel, E., Zhang, Y., Pujol, N., Matsuyama, T., Bargmann, C.I., Ewbank, J.J., 2007.

- Detection and avoidance of a natural product from the pathogenic bacterium *Serratia marcescens* by *Caenorhabditis elegans*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104, 2295–2300. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610281104>.
- Quinto, C., De La Vega, H., Flores, M., Leemans, J., Cevallos, M.A., Pardo, M.A., Azpiroz, R., De Lourdes Girard, M., Calva, E., Palacios, R., 1985. Nitrogenase reductase: a functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 1170–1174. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.4.1170>.
- Ranum, P., Peña-Rosas, J.P., Garcia-Casal, M.N., 2014. Global maize production, utilization, and consumption. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1312, 105–112. <https://doi.org/10.1111/nyas.12396>.
- Rosenberg, K., Bertaux, J., Krome, K., Hartmann, A., Scheu, S., Bonkowski, M., 2009. Soil amoebae rapidly change bacterial community composition in the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. ISME J. 3, 675–684. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.11>.
- Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E., 2004. *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. Arch. Microbiol. 181, 337–344. <https://doi.org/10.1007/s00203-004-0661-9>.
- Salinas, K.A., Edenborn, S.L., Sexstone, A.J., Kotcon, J.B., 2007. Bacterial preferences of the bacterivorous soil nematode *Cephalobus brevicauda* (Cephalobidae): effect of bacterial type and size. Pedobiologia (Jena). 51, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2006.12.003>.
- Sapkota, R., Nicolaisen, M., 2015. High-throughput sequencing of nematode communities from total soil DNA extractions. BMC Ecol. 15, 3. <https://doi.org/10.1186/s12898-014-0034-4>.
- Taylor, R.G., Walker, D.C., McInnes, R.R., 1993. *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid. DNA 21, 1677–1678.
- Torres Tejerizo, G., Banuelos, L.A., Cervantes, L., Gaytan, P., Pistorio, M., Romero, D., Brom, S., 2015. Development of molecular tools to monitor conjugative transfer in rhizobia. J. Microbiol. Methods 117, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.08.005>.
- Torres-Barragan, A., Suazo, A., Buhler, W.G., Cardoza, Y.J., 2011. Studies on the entomopathogenicity and bacterial associates of the nematode *Oscheius carolinensis*. Biol. Control 59, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.05.020>.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Biotechnol. 173, 697–703.
- Xu, L., Xu, W., Jiang, Y., Hu, F., Li, H., 2015. Effects of interactions of auxin-producing bacteria and bacterial-feeding nematodes on regulation of peanut growths. PLoS One 10, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124361>.
- Yu, L., Yan, X., Ye, C., Zhao, H., Chen, X., Hu, F., Li, H., 2015. Bacterial respiration and growth rates affect the feeding preferences, brood size and lifespan of *Caenorhabditis elegans*. PLoS One 10, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134401>.
- Zhao, C.Z., Huang, J., Gyaneshwar, P., Zhao, D., 2018. *Rhizobium* sp. IRBG74 alters *Arabidopsis* root development by affecting auxin signaling. Front. Microbiol. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02556>.