



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

***Rhizobium phaseoli* Ch24-10 CON UN INÓCULO  
MULTIESPECIE EN LA RAÍZ DE MAÍZ: EFECTOS EN  
PLANTAS Y GENÓMICA FUNCIONAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

**M.B.A. LORENA JACQUELINE GÓMEZ GODÍNEZ**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dra. Esperanza Martínez Romero**  
Centro de Ciencias Genómicas

**COMITÉ TUTOR**

**Dr. Sergio M. Encarnación Guevara**  
Centro de Ciencias Genómicas

**Dr. Jesús Silva Sánchez**  
Instituto de Nacional de Salud Pública

CUERNAVACA, MORELOS SEPTIEMBRE DE 2019



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.

El trabajo de investigación reportado aquí, se realizó en el programa de Ecología Genómica del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM. con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 253116 y el apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN207718.

## **Agradecimientos**

Como casi al final de cualquier etapa nos detenemos un poco, miramos y pensamos en lo que quedó atrás y es inevitable recordar los momentos gratos, dibujar una sonrisa en nuestro rostro y agradecer por todas las personas presentes en esta etapa.

A mis padres y hermanos por apoyarme siempre, por su amor incondicional e infinito, los amo.

Agradezco de manera especial a la Dra. Esperanza, porque desde el momento que llegue a CCG me brindo toda su confianza, permitiéndome entrar a su grupo de trabajo. Gracias por apoyarme en el desarrollo de esta tesis, por sus consejos y tiempo.

A mis compañeros de grupo de trabajo de CCG, Arturo, Víctor, Rafa, Tonalli, Diana, Pepe, Toño, Moni, Pilar, muchas gracias por el tiempo compartido, por el compañerismo y amistad.

A mis amigos y compañeros del Programa de Ecología Genómica, Lulú, Angie, Otto, Isabel, Gibi, Jhony.

Agradezco a la Dra. Selene por el espacio brindado en su laboratorio, así como también su ayuda y enseñanza.

Gracias a los compañeros y amigos del LBC y del CINVESTAV-Irapuato, Shini, Josian, Emi, Jaime, Jordan, Astrid, Paquito, Pablito, Rosario, que hicieron mi estancia muy agradable. Una mención especial para Paco Falcón, que sin su ayuda y amistad no hubiera sido lo mismo.

Gracias al Dr. Jesús Silva y Dr. Sergio Encarnación, que fueron parte de mi comité tutorial gracias por siempre estar al pendiente, gracias por las recomendaciones y consejos que ayudaron a mejorar mi trabajo

Agradezco a los profesores de CCG que me ayudaron, enseñaron y participaron en mi desarrollo académico, MAC, Víctor, Mario, Heladia, Romualdo, Lozano, Ángeles Perez, Alejandro García, Gama, Alfonso.

Agradezco también al jurado de grado, por su revisión a la tesis, comentarios y correcciones, Dr. Adelfo, Dra. Ayari, Dr. Ulises, y Dra. Luisa.

Gracias a mis mejores amigos Magie, Nancy, Gabo y Anel, por su apoyo y amistad incondicional.

A todos los equipos de los que fui parte Triquis, Pangolines, Caos, Barcelona, Zombies, Mambas y Candela, que sin duda hicieron una excelente estancia.

Gracias a la UNAM, al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y al CCG por darme las herramientas, para desarrollarme asistiendo a cursos, congresos y estancias de investigación. Gracias a CONACyT y PAPIIT por financiar el proyecto realizado durante el doctorado.

Son insuficientes las hojas para nombrar a todas las personas con las que he coincidido en esta etapa, disculpen si no encuentran su nombre en el papel, les aseguro que su nombre va bien escrito en mi Corazón. MUCHAS GRACIAS

## ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras.....	¡Error! Marcador no definido.
Abreviaturas.....	6
1. RESUMEN .....	7
2. ABSTRACT .....	8
3. INTRODUCCIÓN.....	9
3.1 Microorganismos en el suelo: Interacciones y efectos en plantas .....	9
3.2 Organismos asociados a raíces del maíz .....	111
3.3 Bacterias promotoras de crecimiento asociadas a maíz.....	122
3.4 Inóculos multiespecie en cultivos de interés agrícola .....	144
3.5 Expresión genómica de microorganismos en raíces de plantas .....	155
4. Planteamiento del problema .....	177
5. Justificación.....	177
6. Hipótesis.....	188
7. Objetivos .....	188
7.1 Objetivo general.....	188
7.2 Objetivos particulares .....	188
8. Estrategia experimental .....	19
8.1 Bacterias del inóculo multiespecie .....	19
8.2. Inhibición de crecimiento entre inóculo multiespecie .....	19
8.3 Pruebas de promoción de crecimiento de maíz .....	200
8.3.1 Desinfección y germinación de semillas de maíz.....	200
8.3.2 Diseño experimental de plantas en cámara de crecimiento .....	200
8.3.3 Medición de fotosíntesis en plantas de maíz.....	200
8.4 Obtención y análisis de transcriptoma en medio PY .....	211
8.4.1 Cultivo en PY del inóculo multiespecie para transcriptoma .....	211
8.4.2 Extracción de ARN.....	21
8.4.3. Obtención de ARN-seq mediante Illumina .....	211
8.4.4. Software para el análisis de ARN-Seq .....	222
8.5 Obtención y análisis de transcriptoma de bacterias crecidas en planta de maíz y medio Fahareus .....	223
8.5.1. Cultivo hidropónico de maíz e inoculación .....	223
8.5.2. Obtención de bacterias adheridas a las raíces de maíz .....	223
9. Resultados y discusión .....	244
9.1. Inhibición de crecimiento entre inóculo multiespecie .....	244
9.2. Medición de biomasa y fotosíntesis en plantas de maíz .....	25
9.3. Análisis de transcriptoma.....	288
9.3.1 Extracción de ARN.....	288
9.3.2 Calidad, limpieza y mapeo de las secuencias obtenidas por ARN-seq .....	28
9.4 Expresión diferencial de <i>R. phaseoli</i> Ch24-10 en el inóculo multiespecie.....	311
9.4.1. Expresión diferencial de <i>R. phaseoli</i> Ch24-10 en PY en comparación con <i>R. phaseoli</i> Ch24-10 comunidad en PY.....	32
9.4.2 Expresión diferencial de <i>R. phaseoli</i> Ch24-10 en planta en comparación con <i>R. phaseoli</i> Ch24-10 comunidad planta.....	35

9.4.3 Expresión diferencial de <i>R. phaseoli</i> Ch24-10 en PY en comparación con <i>R. phaseoli</i> Ch24-10 en planta .....	38
9.5 Expresión diferencial de genes de los integrantes del inóculo multiespecie.....	44
9.5.1 Expresión diferencial de genes de <i>Azospirillum</i> .....	44
9.5.2 Expresión diferencial de genes de <i>Bacillus</i> .....	47
9.5.3 Expresión diferencial de genes de <i>Methylobacterium</i> .....	49
9.5.2 Expresión diferencial de genes de <i>Sinorhizobium</i> .....	51
9.6 Interacción conjunta del IM para favorecer el crecimiento de plantas de maíz .....	51
10. Conclusiones .....	53
11. Perspectivas .....	53
12. Artículo publicado.....	54
10. Bibliografía .....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de maíz en el mundo en el año 2019 (FAOSTAT)	11
Figura 1 - Estructura de la comunidad bacteriana durante el crecimiento de la planta de maíz.	12
Figura 3. Metodología a seguir para obtener las muestras de ARN	22
Figura 4. Flujo de trabajo que se utilizó para analizar los datos obtenidos por ARN-seq	23
Figura 5. Prueba de agar suave con las cinco bacterias del IM.	25
Figura 6. Peso, CO <sub>2</sub> asimilado y plantas de maíz inoculadas con el IM.	27
Figura 7. Geles de agarosa y cuantificación de muestras de ARN con el Bioanalyzer 2100.	28
Figura 8. Reporte de calidades de FastQC.	29
Figura 9. Porcentaje de lecturas después del control de calidad.	30
Figura 10. Mapa de calor con correlaciones de Spearman.	31
Figura 11. Variación entre muestras de <i>R. phaseoli</i> crecido en medio PY con y sin una comunidad bacteriana.	32
Figura 12. Visualización de términos GO de los genes diferencialmente expresados de la comparación entre <i>R. phaseoli</i> crecido individualmente contra <i>R. phaseoli</i> crecido en el IM.	33
Figura 2. Correlación de las muestras de <i>R. phaseoli</i> y <i>R. phaseoli</i> con el IM, crecidos en planta	35
Figura 34. Visualización de términos GO de la comparación entre <i>R. phaseoli</i> cultivada en planta contra <i>R. phaseoli</i> Ch24-10 con comunidad cultivada en planta.	37
Figura 45. MDSplot de las réplicas de <i>R. phaseoli</i> en PY versus <i>R. phaseoli</i> planta	39
Figura 56. Visualización de términos GO al comparar <i>R. phaseoli</i> cultivada en PY contra <i>R. phaseoli</i> Ch24-10 con comunidad cultivada en PY.	40
Figura 67. Muestras de <i>R. phaseoli</i> con comunidad en PY en comparación <i>R. phaseoli</i> con comunidad en planta.	41
Figura 78. Términos GO al comparar <i>R. phaseoli</i> con comunidad en PY contra <i>R. phaseoli</i> Ch24-10 con comunidad cultivada en planta.	42

Figura 19. Genes de <i>Rhizobium</i> diferencialmente expresados en los diferentes tratamientos.	43
Figura 20. Genes sobreexpresados y subexpresados en las diferentes comparaciones	44
Figura 21. Correlación entre las muestras de <i>Azospirillum</i> .	45
Figura 22. Visualización de términos GO de la comparación de <i>Azospirillum</i> crecido en medio PY y crecido en planta.	46
Figura 23. Correlación entre las muestras de <i>Bacillus</i> .	47
Figura 24. Visualización de términos GO de la comparación de <i>Bacillus</i> crecido en medio PY y en planta.	48
Figura 25. Correlación de las muestras de <i>Methylobacterium</i> .	49
Figura 26. Visualización de términos GO de la comparación de <i>Methylobacterium</i> crecido en medio PY y en planta.	50
Figura 27. Esquema de interacción entre plantas y bacterias.	52

## Abreviaturas

ABC: ATP binding cassette (cassette de unión a adenosín trifosfato)  
 ADN: Ácido desoxiribonucleico  
 ARN: Ácido ribonucleico  
 ARNm: Ácido ribonucleico mensajero  
 ARNseq: Secuenciación masiva de ácido ribonucleico  
 DEG: Genes diferencialmente expresados  
 DGGE Denaturing Gradient Gel Electrophoresis  
 GO: Ontología de genes  
 H<sub>2</sub>O: Agua  
 IM: Inóculo Multiespecie  
 NaCl: Cloruro de sodio  
 PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Rizobacterias Promotoras de Crecimiento)  
 PSII: Sistema fotosintético  
 UFC: Unidades Formadoras de Colonia

## 1. RESUMEN

Las raíces de las plantas están habitadas por una gran cantidad de microorganismos, determinada por los químicos liberados por las raíces. Sobre las raíces interactúan una gran cantidad de bacterias. Las bacterias conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) son benéficas para el crecimiento de las plantas al establecer una relación mutualista proveyendo a las plantas de nutrientes esenciales como nitrógeno y fósforo.

En México, el maíz es una de las plantas más producidas y consumidas, y por esta razón a través del tiempo se han buscado estrategias para mejorar su producción. En las plantas de maíz se identificó a *Rhizobium phaseoli* Ch24-10 actuando como una PGPR, favoreciendo el crecimiento del maíz. Además, esta bacteria logró ser excelente competidora al colonizar leguminosas y raíces de gramíneas, en comparación con cepas como *Rhizobium etli* y *Rhizobium leguminosarum*.

En este trabajo, se diseñó un inóculo multiespecie de bacterias PGPR, que incluyó cepas fijadoras de nitrógeno como *Rhizobium phaseoli*, *Sinorhizobium americanum* y *Azospirillum brasilense*, así como otras bacterias promotoras del crecimiento de plantas como *Bacillus subtilis* y *Methylobacterium extorquens*. El objetivo principal de este trabajo fue analizar la expresión génica de *R. phaseoli* Ch24-10 cultivada en presencia de maíz, así como en presencia de un inóculo multiespecie. La comunidad multiespecie favoreció el crecimiento de la parte aérea de las plantas de maíz, en comparación con el efecto observado al inocular cada bacteria individualmente. La reducción de acetileno en las raíces del maíz se registró con el inoculante multiespecie, lo que sugiere que la fijación de nitrógeno ocurrió en estas condiciones. Para analizar las contribuciones de las diferentes bacterias fijadoras de nitrógeno que se inocularon, se realizó un análisis metatranscriptómico. El análisis de expresión diferencial reveló que los transcritos de los genes *nif* provenientes de *Azospirillum* están sobreexpresados, lo que sugiere que esta bacteria fue responsable de la fijación de nitrógeno en el maíz. En *R. phaseoli* Ch24-10, encontramos genes altamente expresados involucrados con la adaptación bacteriana ante el aumento de la osmolaridad, así como también genes que facilitan la adaptación, y colonización en las raíces. En este trabajo analizamos la interacción de una comunidad sintética la cual se puede proponer como una opción para futuras formulaciones de biofertilizantes.

## 2. ABSTRACT

The roots of the plants are inhabited by a large number of microorganisms, which are influenced by the chemicals released by the roots. Within the roots, a large number of bacteria interact with each other. There are microorganisms known as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), which are beneficial to plant growth by colonizing roots and making nutrients like nitrogen and phosphorus available in the soil.

In Mexico, maize is one of the most widely produced and consumed crops, so strategies have been sought over time to improve its production. Within maize plants, we identified *Rhizobium phaseoli* Ch24-10 functions as a PGPR and favors the growth of corn, in addition, this bacterium is an excellent competitor to colonize legumes and roots of grasses, in comparison with strains of *Rhizobium etli* and other species.

In this work, a multispecies inoculum of PGPR bacteria was designed, which included nitrogen-fixing strains such as *Rhizobium phaseoli*, *Sinorhizobium americanum* and *Azospirillum brasilense*, as well as other bacteria that promote plant growth such as *Bacillus subtilis* and *Methylobacterium extorquens*. The main objective of this work was to analyze the gene expression of *R. phaseoli* grown in the presence of maize, as well as in the presence of a multispecies inoculum.

The multi-species community exerted a beneficial effect on the corn plants when inoculated, the effect was highlighted by inoculating each bacterium individually. The reduction of acetylene in the roots of maize is seen with the multispecies inoculum, which suggests that nitrogen fixation occurred under these conditions. To analyze the different nitrogen fixing bacteria that were inoculated, a metatranscriptomic analysis was performed. Differential expression analysis revealed that predominantly *Azospirillum nif* transcripts were overexpressed, suggesting that it was responsible for nitrogen fixation in maize. Within the genes overexpressed in *R. phaseoli* Ch24-10, we found genes involved with bacterial adaptation to hyperosmolarity, as well as genes that facilitate adaptation, and colonization in the roots. In general, we analyzed the interaction of a synthetic community, suggesting it as an option for future formulations of biofertilizers.

### 3. INTRODUCCIÓN

Las raíces de las plantas albergan una gran cantidad de microorganismos e invertebrados [62]. Bacterias y hongos que se encuentran en la raíz pueden tener diversos efectos en el crecimiento, debido a que estos modifican la absorción de nutrientes, la tolerancia al estrés, la resistencia a patógenos. Algunas bacterias además realizan la fijación biológica de nitrógeno. La comunidad en el suelo influye directamente en las características y establecimiento exitoso de las plantas [11,39,54].

Mediante el uso de diferentes técnicas como cultivos en placa, meta perfil y metagenómica, se ha logrado identificar la composición de una comunidad bacteriana en diferentes suelos y cultivos [24,29,45]. Recientemente, mediante el uso de tecnologías de secuenciación masiva se han logrado caracterizar las posibles actividades de bacterias no-cultivables, con esto también es posible encontrar genes que participan en posibles vías biosintéticas de productos microbianos que permiten la convivencia entre los diferentes microorganismos que se encuentran en las raíces y de productos involucrados en el crecimiento de las plantas [83].

#### 3.1 Microorganismos en el suelo: Interacciones y efectos en plantas

Las bacterias del suelo de vida libre que son benéficas para el crecimiento de las plantas, son conocidas como PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, por sus siglas en inglés) [41]. Las PGPRs influyen en el crecimiento de la planta directa o indirectamente. La promoción directa consiste en proveer a la planta de algún compuesto sintetizado por la bacteria, como lo son las fitohormonas. La promoción indirecta de crecimiento se lleva a cabo cuando las PGPRs disminuyen los efectos nocivos de organismos patógenos mediante diversos mecanismos, por ejemplo, la producción de bacterocinas, así como la producción de otros compuestos químicos como la ACC desaminasa, acil-homoserina lactonas (AHL), que generan respuestas bioquímicas y de defensa activando la resistencia sistémica inducida [8] [2,35].

Por otra parte, las fitohormonas son sustancias producidas por los microorganismos en las raíces de la planta y ejercen ciertos beneficios en el crecimiento de la misma. Por ejemplo, el ácido indolacético producido por

*Azospirillum*, favorecen el enraizamiento de las plantas, lo que mejora la absorción de minerales que se encuentran en el suelo, a mayor enraizamiento, más absorción de agua y de nutrientes del suelo. Adicionalmente, *Azospirillum* aumenta la cantidad de exudados totales al aumentar el número de raíces y con esto se aumentan los microorganismos atraídos por la planta [27,73]. Se ha reportado también que la producción de citoquininas por *Bacillus megaterium* aumenta la biomasa en frijol y en *Arabidopsis thaliana* [49].

Asimismo, en las raíces de las plantas, se encuentran bacterias, con la capacidad de solubilizar fosfato y hacerlo disponible para las plantas y con esto mejoran el crecimiento. Entre los géneros bacterianos descritos con esta capacidad, se ha identificado a *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Flavobacterium* y *Erwinia* [68]. *Burkholderia cepacia* presenta actividad de fosfatasa y de solubilización de fosfato, mejorando así el crecimiento de maíz y lechuga [18]. *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, demostró la capacidad de solubilizar fosfato y una mayor competitividad para colonizar raíces de maíz y lechuga, en comparación con otras bacterias del suelo [19].

Los microorganismos en el suelo son capaces de liberar ácidos orgánicos y una gran cantidad de sideróforos en condiciones limitantes de hierro. El hierro es un micronutriente necesario para las plantas, está involucrado en diversas funciones fisiológicas de la planta, así como también en la biosíntesis de clorofila, sin embargo, el hierro en la rizósfera se encuentra en forma no soluble (Fe III), lo que lo hace no disponible para las plantas. Se han descrito diversas estrategias para la adquisición de hierro por las plantas, una de estas estrategias es tomarlo, a partir de pequeñas moléculas quelantes de hierro, estas moléculas son llamadas sideróforos y son producidas por diversas bacterias en el suelo [33,57,71]. Hasta el momento se sabe que los sideróforos bacterianos pueden contribuir indirectamente a la promoción de crecimiento de las plantas [13]. *Pseudomonas putida* tiene la capacidad de producir sideróforos y con estos inhibir el crecimiento de ciertos patógenos fúngicos como *Fusarium oxysporum*, mejorando indirectamente la salud de las plantas [28].

Algunos microorganismos en el suelo pueden sintetizar una gran cantidad de compuestos con actividad antimicrobiana, estos pueden ser derivados del metabolismo secundario [13]. *Pseudomonas fluorescens* produce compuestos

nitrogenados heterocíclicos como la fenazina, que ha demostrado tener una actividad antimicrobiana y de inhibición de fitopatógenos [58]. Dentro del género *Bacillus* se han reportado bacterias productoras de muchos antibióticos como la bacitracina, además también productores de enzimas como las quitinasas, glucanasas y celulasas, capaces de ejercer un efecto antagónico contra fitopatógenos bacterianos y fúngicos [6] [72].

### 3.2 Producción de maíz en el mundo y microorganismos asociados a la raíz del maíz

El maíz (*Zea mays*), es una planta anual de la familia *Poaceae*. Este cereal es un alimento básico que se produce y se consume en todo el mundo. Se estima que la producción mundial de maíz fue de aproximadamente 27,762,481 toneladas en el año 2019 (Figura1) [32].

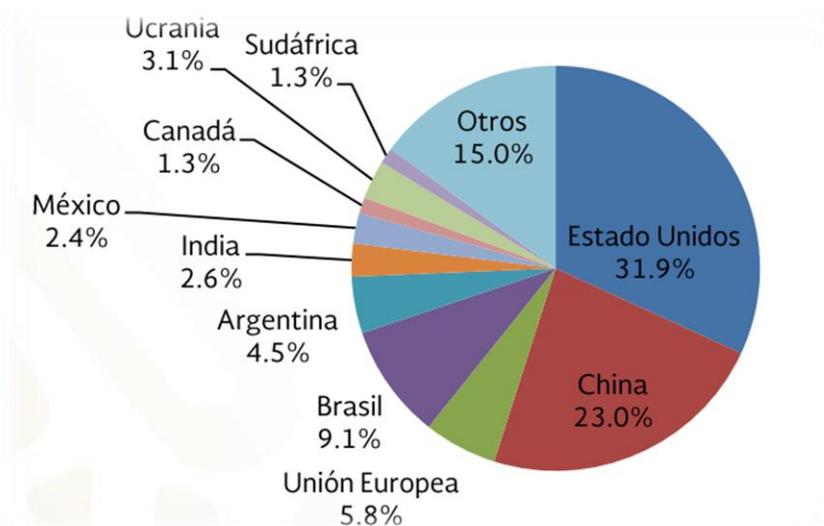


Figura 8. Producción de maíz en el mundo en el año 2019 (FAOSTAT).

Debido a la gran importancia en la producción y en el consumo de maíz, diversos grupos se han enfocado a describir los microorganismos que se encuentran asociados a las raíces de este cultivo, mediante métodos cultivables y no-cultivables. Mediante métodos cultivables, que incluyen ensayos en placas y crecimiento en caldo de cultivo, se ha descrito la presencia de *Azospirillum*, *Bacillus* spp., *Azotobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Arthrobacter* spp., *Listeria* spp., *Agromyces* spp., [16]. Por estos mismos métodos, también se han logrado

identificar bacterias de los géneros pertenecientes a *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Stenotrophomonas* [61] (Figura2).

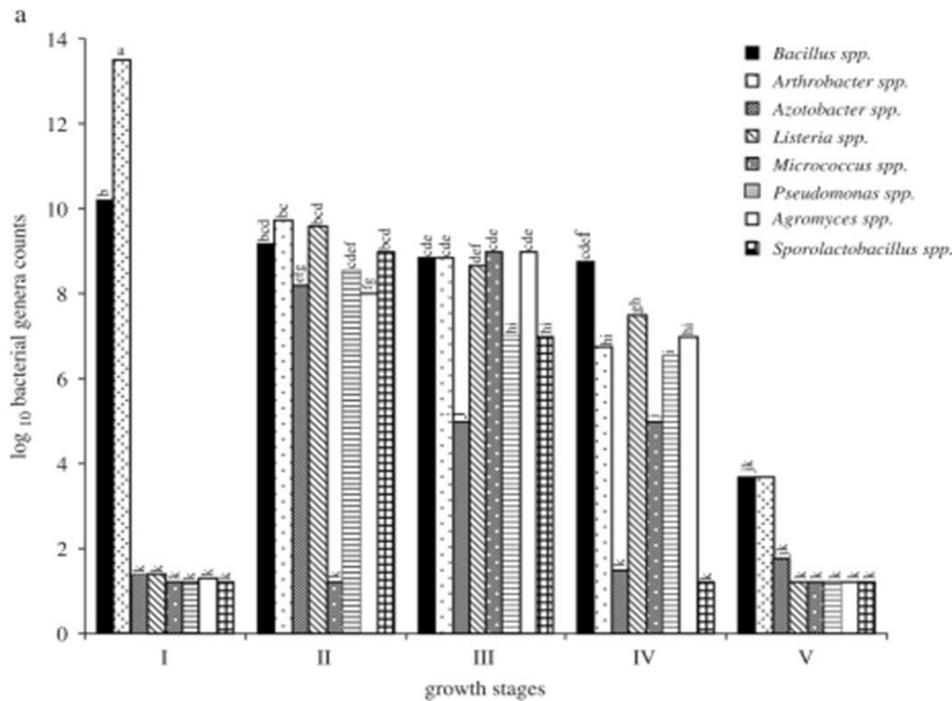


Figura 9 - Estructura de la comunidad bacteriana durante el crecimiento de la planta de maíz. Log<sub>10</sub> de los recuentos de géneros bacterianos identificados en la raíz de maíz mediante métodos cultivables [16].

Otros métodos como DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) y pirosecuenciación se utilizaron para analizar la composición bacteriana en la raíz. Mediante estas técnicas independientes de cultivo se lograron identificar los principales phyla en la raíz del maíz, representados por proteobacterias, bacteroidetes y actinobacterias; así como también diversos géneros como *Flavobacterium*, *Acidobacteria*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Azoarcus*, *Delftia*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, entre otros [47].

### 3.3 Bacterias promotoras de crecimiento asociadas a maíz

Analizando las raíces del maíz se han identificado diversos microorganismos benéficos para el crecimiento de la planta, es por esto que han sido utilizados como inóculos para mejorar su crecimiento.

Las bacterias del género *Azospirillum* son consideradas PGPR, debido a que tienen la capacidad de producir diversas fitohormonas, como auxinas, giberelinas y citocinas, cuya producción trae como consecuencia la estimulación del crecimiento de las plantas [15].

Las plantas de maíz sometidas a estrés hídrico mostraron un 10.05% de aumento en brotes, así como un aumento en la altura de las plantas del 7.01% al ser inoculadas con *Azospirillum lipoferum*, en comparación con plantas no inoculadas, lo que sugiere que *Azospirillum* ayuda a contender este tipo de estrés. Por este motivo, se le utiliza como inoculante para el cultivo del maíz y puede ayudar a la cosecha a soportar la limitada disponibilidad de agua [10]. Se sabe también que la inoculación en plantas de maíz con *A. brasilense* enriquecido con lipoquitooligosacáridos (LCOs, cadenas de ácido graso saturado con diferentes números de átomos de carbono), metabolitos obtenidos de *Rhizobium tropici* CIAT 899, favorece el crecimiento de vástagos de la planta y del mismo modo se mejoró el rendimiento de grano, aumentando hasta 358 kg/ha<sup>-1</sup> en comparación con aquellas plantas que no fueron inoculadas [56].

Otra bacteria presente en maíz es *Methylobacterium extorquens* que al ser inoculado en maíz, favoreció el crecimiento de maíz, así como otros cultivos como trigo, tomate, fresa, tabaco [1]. *Methylobacterium* también ayuda a las plantas a contender condiciones de salinidad. Kim y colaboradores en 2012 co-inocularon *Methylobacterium oryzae* y *Brevibacterium iodinum* en semillas de maíz sometidas a 150 mM de NaCl, incrementando con esto la germinación hasta un 16.7%. Este co-inóculo también favorece el crecimiento de la raíz aumentando hasta un 22.9% la longitud en comparación con plantas no inoculadas [40].

*Bacillus* es otro organismo que ha sido evaluado como inóculo, y se sabe que tiene la capacidad de ayudar a la planta de maíz a contender contra el estrés hídrico. Chen y colaboradores sometieron plantas de maíz a estrés hídrico (NaCl 100mM) durante 20 días, las plantas que fueron inoculadas con *B. amyloliquefaciens* crecieron más que las plantas que no fueron inoculadas con el microorganismo, de la misma manera el contenido de clorofila aumentó [21]. Vardharajula y colaboradores (2011) por su parte, demostraron que *Bacillus* spp.

tiene la capacidad de ayudar a las plantas de maíz a tolerar el estrés hídrico, así como también a aumentar la biomasa, el contenido relativo de agua y el potencial hídrico de la hoja, y las respuestas fisiológicas que pueden ayudar a la planta a aliviar los efectos negativos del estrés por sequía [78].

*Rhizobium phaseoli* Ch24-10 es otra bacteria asociada a maíz, aislado de suelos del estado de Puebla de un cultivo de maíz criollo, y se puede encontrar en el suelo, en la rizósfera y como endófito de maíz, este microorganismo mostró una alta capacidad de competir con otros rizobios aislados de la rizósfera [69].

### 3.4 Inóculos multiespecie en cultivos de interés agrícola

Diversos autores han concluido que los inoculantes mixtos proporcionan una ventaja para las plantas inoculadas con estos, mejorando la absorción de nitrógeno y fósforo, como el principal mecanismo implicado. Es por esto que se han evaluado diversos trabajos en los cuales se co-inoculan dos o más especies bacterianas para evaluar el beneficio de la planta de interés [4].

Al inocular *Azospirillum brasilense* seguido (después de 24 h) de la inoculación con *Rhizobium meliloti* en plantas de *Trifolium alexandrinum* y *Medicago polymorpha*, se observó un aumento en la formación de nódulos hasta en un 25%, en comparación con tratamientos de plantas inoculadas sólo con *Rhizobium*. Esto se puede deber a que *Azospirillum* estimula la formación de un mayor número de células de la epidermis que se diferencian en los pelos radicales infectables por *Rhizobium* [81].

La co-inoculación de *Pseudomonas striata*, *Bacillus polymyxa* y *Azospirillum brasilense*, bajo condiciones de temporal en plantas de sorgo, mostraron que esta co-inoculación favoreció a las plantas, aumentando los rendimientos de grano y materia seca, así como la absorción de nitrógeno y fósforo, en comparación con aquellas plantas que sólo fueron inoculadas con cada especie por separado [4].

Rajendran y colaboradores (2008), también mostraron que la co-inoculación de *Rhizobium* spp. con *Bacillus* sp. incrementa el peso fresco de la planta, el contenido de clorofila y la nodulación hasta un 55 % en plantas de guandul (*Cajanus cajan*). Se cree que este mejoramiento en las plantas que fueron tratadas con el co-inóculo, se debe a que *Bacillus* produce sideróforos, que

pueden ser utilizados por *Rhizobium* spp. volviéndola eficiente en la nodulación [64].

*Azospirillum brasilense* fue co-inoculada con *Brayrhyzobium japonicum* en semillas de maíz y soja, demostrando que la co-inoculación promueve la germinación temprana de semillas, la formación de nódulos, y el desarrollo temprano de las plántulas de maíz y soja, esta co-inoculación además confiere cierta ventaja de crecimiento y adaptación [14].

Mansotra y colaboradores (2015) estudiaron una comunidad bacteriana tripartita, conformada por *Mesorhizobium cicer*, *Pseudomonas* spp. y *Piriformospora indica* en plantas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.). El inóculo ejerció un efecto sinérgico entre las bacterias, favoreciendo la germinación de las semillas hasta un 10%, la ganancia en peso seco hasta de un 31%, el contenido de clorofila y el porcentaje de nodulación se vieron favorecidos hasta en un 35%, recomendando así la utilización de estas bacterias que puedan mejorar en este caso la productividad del garbanzo [53].

Dado los resultados anteriores, los inóculos multiespecie representan una alternativa para su utilización como biofertilizantes, debido a que diferentes bacterias, pueden aportar diversos beneficios para el mejoramiento de plantas de interés agrícola.

### 3.5 Expresión genómica de microorganismos en raíces de plantas

Se sabe poco de los mecanismos que permiten la interacción entre diversas poblaciones de bacterias que co-habitan las raíces de las plantas. Actualmente existen algunos trabajos donde se evalúa la interacción planta-bacteria a nivel genómico.

Se evaluaron los genes que expresa *Pseudomonas aeruginosa* en respuesta a los exudados de raíces de remolacha. Muchos de los genes identificados estaban implicados en interacciones planta-bacteria, quimiotaxis, catabolismo de compuestos aromáticos, generación de energía, y biosíntesis de aminoácidos, esto era de esperarse, debido a que los monosacáridos, aminoácidos, y ácidos orgánicos son los principales constituyentes de exudados de la raíz de las plantas. Los genes identificados mediante estas técnicas, pueden ayudar a dilucidar las interacciones moleculares que son importantes

para el control biológico, la promoción de crecimiento de las plantas, y la patogénesis de la planta [55]. Newman y colaboradores (2016), utilizaron un enfoque basado en ARN-Seq, para evaluar la expresión de genes de bacterias presentes en la rizósfera de maíz tratado con el herbicida glifosato. Este estudio indicó que las bacterias dentro de la rizósfera invierten la mayor parte de su energía en la transcripción (en el metabolismo del ARN) y el metabolismo de hidratos de carbono, también se mostró que las bacterias Gram negativas disminuyen con la aplicación de glifosato, permitiendo sólo el crecimiento de las bacterias tolerantes a glifosato [59].

Ramachandran y colaboradores (2011), evaluaron mediante transcriptómica comparada la adaptación de *Rhizobium leguminosarum* a tres rizósferas diferentes (de chícharo, alfalfa y remolacha azucarera), encontrando que hay ciertos genes que se expresan comúnmente en las tres rizósferas, de las cuales el 66% es de función desconocida. Dentro de los genes comunes, se identificaron aquellos involucrados con la detección del quórum sensing, donde la movilidad bacteriana es importante para la colonización de las raíces. Se indujeron genes involucrados con la síntesis de formato deshidrogenasa, ya que el formato es una fuente de carbono en el crecimiento autotrófico. La enzima formato deshidrogenasa utiliza como cofactor Mo, el cual se cree que es transportado por un transportador tipo ABC, cuyo gen también tuvo sobre expresión en las tres rizosferas. Otros genes sobreexpresados, están relacionados con los sistemas de transporte, esto puede indicar la presencia de estos compuestos en la rizósfera, así como también algunos genes involucrados en la adaptación a condiciones adversas, tales como agentes antimicrobianos producidos por las plantas (por ejemplo, fitoalexinas), las bacterias deben degradar o exportar estos compuestos para adaptarse. Algunos antimicrobianos de las plantas como hidrocarburos halogenados (por ejemplo, dicloroetano) podrían ser catabolizados por RL4047 y RL4267, los cuales pueden catalizar la conversión de dicloroetano a través de ácido cloroacético a glicolato, con una degradación por el ciclo del glioxilato. Al mutar RL4267 en *Rhizobium leguminosarum*, se obtiene una cepa con baja competitividad en la rizósfera del chícharo. En general en este trabajo se muestran algunas repuestas bacterianas en diferentes rizosferas así como también la capacidad de la bacteria de adaptarse y contender bajo diferentes ambientes [65].

Un trabajo directo que precede a esta tesis es el de López-Guerrero y colaboradores (2012), donde analizaron el transcriptoma de *R. phaseoli* Ch24-10 en las raíces de maíz y frijol, identificando 598 genes altamente expresados en común en ambas plantas, y 49 genes exclusivamente expresados en las raíces de maíz. En maíz por ejemplo, se encontraron genes expresados relacionados con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, metabolismo del piruvato, biosíntesis de trehalosa, utilización de lactosa y xilosa, así como también se encontraron genes que participan en la síntesis o transporte de glicina-betaína, este osmolito se acumula en el citoplasma en respuesta a estrés osmótico; dentro de los genes que ayudan a contender contra el estrés oxidativo, se encontró una catalasa, que interviene en la protección de especies reactivas de oxígeno; todos estos genes son indicativos del metabolismo bacteriano sobre el rizoplasma del maíz [50].

#### 4. Planteamiento del problema

Se sabe el efecto que generan algunos de los co-inóculos en plantas de interés agrícola, sin embargo, se desconocen los genes involucrados en la interacción de una comunidad bacteriana que puede beneficiarse entre sí y favorecer también el crecimiento de las plantas.

Nos planteamos las siguientes preguntas:

¿Qué efecto genera un inóculo multiespecie en las plantas de maíz?

¿Cuáles son los genes que expresa *Rhizobium phaseoli*, cuando se encuentra conviviendo con diferentes organismos en las raíces de la planta de maíz?

#### 5. Justificación

Si bien se han estudiado los procesos de nodulación y fijación de nitrógeno por rizobios, se sabe poco de rizobios en su interacción con plantas no leguminosas como el maíz, el cual será el modelo de este estudio.

Actualmente la mayoría de inoculantes microbianos están constituidos por uno o dos microorganismos, sin embargo, no se han probado comunidades compuestas que contengan más de tres organismos, así como tampoco se ha

estudiado la expresión de genes de comunidades interaccionando en plantas de maíz.

El estudio del funcionamiento de ciertos genes que ayuden a entender cómo interactúan los microorganismos en la raíz, nos permitirá hacer mejor uso de ellos, por ejemplo, en la formulación de consorcios microbianos para la producción de biofertilizantes.

## 6. Hipótesis

Existirá un efecto benéfico de crecimiento en las plantas de maíz al ser inoculadas con un consorcio microbiano.

Habrà una expresión diferencial de genes que permitirá la adaptación del inóculo multiespecie, así como genes involucrados en la promoción de crecimiento en plantas.

## 7. Objetivos

### 7.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de un inóculo multiespecie en el crecimiento de maíz y analizar la expresión de genes de *Rhizobium phaseoli* Ch24-10 en un inóculo multiespecie en presencia y ausencia del maíz.

### 7.2 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto que ejerce un inóculo multiespecie en el crecimiento de la planta de maíz.
- Obtener y analizar el transcriptoma de *Rhizobium phaseoli* Ch24-10 al interactuar con inóculo multiespecie en ausencia y presencia del maíz.
- Generar y evaluar mutantes de *Rhizobium phaseoli* Ch24-10 de genes diferencialmente expresados cuando este interactúa con el inóculo multiespecie en presencia de maíz.

## 8. Estrategia experimental

### 8.1 Bacterias del inóculo multiespecie

Para la generación del inóculo multiespecie, utilizado en este trabajo se utilizaron cinco bacterias: **1) *Rhizobium phaseoli* Ch24-10** que se aisló de plantas de maíz de tres meses de edad en Cholula, Puebla [71]. **2) *Azospirillum brasilense* sp.7** aislada de *Digitaria decumbens*, la cual se ha descrito que promueve el crecimiento del maíz, el arroz y el trigo en diferentes ensayos [82], [34]. **3) *Bacillus amyloliquefaciens* CCGE2031**, una bacteria endofítica de *Phaseolus vulgaris* [58] y se ha descrito como promotora de crecimiento en maíz [3]. **4) *Methylobacterium extorquens* AM1**, bacteria epífita foliar muy común y capaz de colonizar diferentes plantas, AM1 es una de las cepas de metilobacterias más estudiadas y fue proporcionada por ME Lidstrom de la Universidad de Washington, EE. UU. [9]. Finalmente, **5) *Sinorhizobium americanum* CFNEI156** de nódulos de Acacia [84], promueve el crecimiento de la planta acacia [22]. Cada cepa se cultivó individualmente en medio PY a 30°C durante la noche.

### 8.2. Inhibición de crecimiento entre inóculo multiespecie

Para verificar que el inóculo multiespecie (IM) elegido pudiera crecer conjuntamente sin inhibición de crecimiento entre las mismas bacterias hicimos pruebas de agar suave. Las cepas se cultivaron en medio PY líquido (Extracto de levadura 3g/L, peptona de caseína 5g/L) en un cultivo toda la noche, posteriormente se ajustó la D.O.<sub>600nm</sub> a 0.1, 100 mL, de esta solución fueron puestos en 5 mL agar blando fundido, y fue vertido en placas estériles, esta mezcla se dejó secar por 10 minutos y posteriormente fue recubierta por una capa fina de agar de 3 mL, esta última capa se dejó secar también y finalmente se tomaron 50 µL de las otras cuatro bacterias y se pusieron en gota sobre el agar solidificado. El experimento se monitoreo ocho días, los tratamientos se hicieron por triplicado y se obtuvo un resultado cualitativo. Para evaluar cuantitativamente el crecimiento del IM, se hicieron ensayos en placa para determinar unidades formadoras de colonia (UFC), tanto de las bacterias crecidas en medio PY, así como de las bacterias crecidas en planta.

### 8.3 Pruebas de promoción de crecimiento de maíz

#### 8.3.1 Desinfección y germinación de semillas de maíz

Las semillas se pusieron en un matraz estéril, se les agregó etanol al 70 % hasta cubrir las, se agitaron por un minuto, se enjuagaron durante un minuto con agua estéril, posteriormente se les agregó una solución de cloro al 30 % y se agitaron durante 20 minutos, se enjuagaron cinco veces durante un minuto con agua estéril, se les agregó una solución de tiosulfato de sodio al 2 % y finalmente se enjuagaron con agua estéril tres veces (un minuto por vez). Una vez desinfectadas las semillas se pusieron en placas de agar al 0.7 % durante 48 horas a 30 °C.

#### 8.3.2 Diseño experimental de plantas en cámara de crecimiento

Una vez germinadas las semillas fueron puestas en matraces Erlenmeyer (una semilla por matraz). Cada semilla fue inoculada con los diferentes tratamientos (a una concentración de  $10^8$  UFC). Los diferentes tratamientos consisten en inóculos de cada una de las bacterias por separado (*Rhizobium phaseoli* Ch24-10, *Azospirillum brasilense* sp.7, *Bacillus subtilis* CCGE2031, *Methylobacterium extorquens* AM1, *Sinorhizobium americanum* CFNE1156), un tratamiento con todas las bacterias y un tratamiento sin inóculo. El diseño experimental se estableció en cámaras de crecimiento (temperatura de 28 °C, 12 horas luz, 12 horas oscuridad). Hubo un total de siete tratamientos con 10 plantas por tratamiento, con tres replicas biológicas y un diseño de bloques completamente al azar. Al día 30 de crecimiento, las plantas fueron medidas y se determinó peso fresco y seco de la parte aérea de la planta. Los datos obtenidos de cada uno de los tratamientos fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias de Tukey ( $p= 0.05$ ).

#### 8.3.3 Medición de fotosíntesis en plantas de maíz

Para evaluar el estatus fisiológico de la planta evaluamos el funcionamiento del sistema fotosintético (PSII), en el cual se mide el intercambio gaseoso de las hojas y la fluorescencia de la clorofila [44]. Esto se realizó con el aparato portátil LI-6400XT. Los datos de  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  obtenidos de los tratamientos fueron

analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias de Tukey ( $p= 0.05$ ).

#### 8.4 Obtención y análisis de transcriptoma en medio PY

##### 8.4.1 Cultivo en PY del inóculo multiespecie para transcriptoma

Se inoculó en 30 mL de medio PY a *Rhizobium phaseoli* Ch24-10, *Azospirillum brasilense* sp7, *Methylobacterium extorquens* AM1, *Bacillus subtilis* CCGE 2031 y *Sinorhizobium americanum* CFNEI 156 así como también se inoculó por separado a *Rhizobium phaseoli* Ch24-10 a una concentración final de bacterias de  $10^8$ , los tratamientos se realizaron por triplicado. Transcurridas 24 horas se agregaron tres mL de ARNlater (Ambion) durante 10 minutos en hielo, posteriormente las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 6000 rpm a 4°C, se obtuvo un pellet de los cultivos, y se procedió a la extracción de ARN (Figura 3).

##### 8.4.2 Extracción de ARN

A partir del pellet obtenido del medio PY, se realizó la extracción de ARN mediante el protocolo de Qiagen [63]. El ARN obtenido se cuantificó mediante Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). La integridad del ARN total se verificó mediante geles de agarosa al 1% y en Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

##### 8.4.3. Obtención de ARN-seq mediante Illumina

Del ARN total obtenido se enviaron 500  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  a secuenciar al servicio de genómica y bioinformática en Texas A&M AgriLife. El ARN ribosomal fue retirado mediante el Ribo-Zero rARN Removal Kit (Bacteria). Las bibliotecas de ARNm se obtuvieron utilizando el kit TruSeq ARN Sample Preparation Kit (Illumina). Las bibliotecas de ARNm se secuenciaron mediante la plataforma Illumina HiSeq 2500 a través del servicio de genómica y bioinformática en Texas A&M AgriLife, en formato pareado y con una longitud de 125 pb (Figura 3).

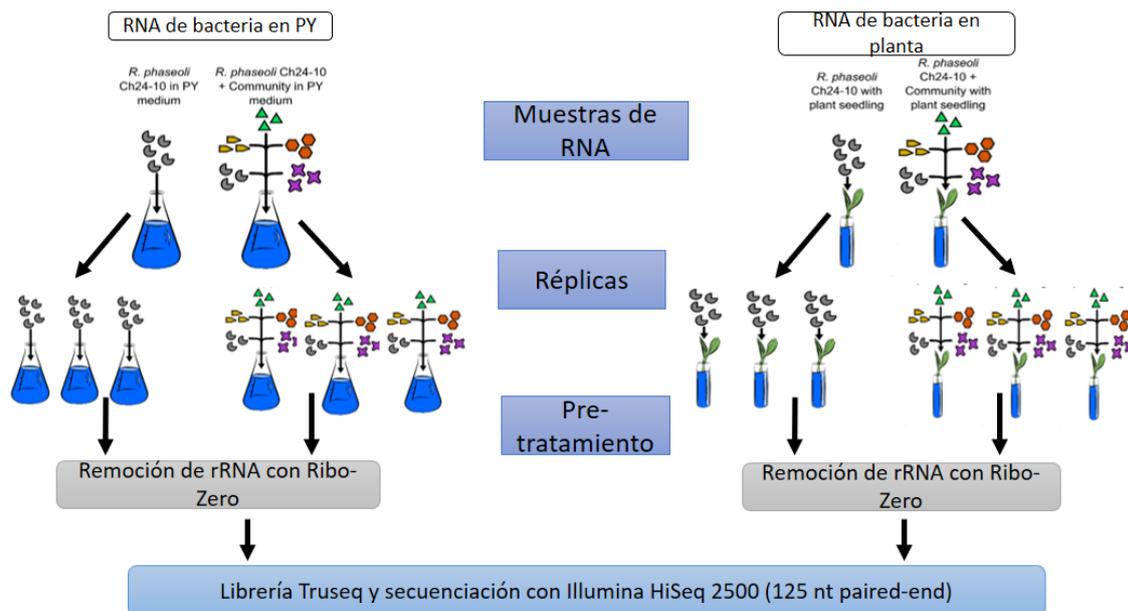


Figura 3. Metodología para obtener las muestras de ARN. A partir de muestras de *R. phaseoli* en PY, se obtuvieron 3 réplicas biológicas y se hicieron extracciones de ARN, las cuales fueron tratadas con Ribo-Zero, para agotar los ARNr, y las librerías fueron obtenidas con Illumina HiSeq 2500. Lo mismo se realizó para cada uno de los diferentes tratamientos.

#### 8.4.4. Software para el análisis de ARN-Seq

La calidad de los datos de secuenciación se evaluó mediante FASTQC (v0.11.2) [7]. Los adaptadores y las secuencias de baja calidad se eliminaron utilizando Trimmomatic (v0.38) [12], con los parámetros ILLUMINACLIP: Adapter.fasta: 2: 30: 7 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:60. Las lecturas de las secuencias pair-end fueron mapeadas contra un genoma concatenado de todos los miembros de la comunidad utilizando Bowtie2 (v2.1.0) [46], usando los siguientes parámetros: sensitive --rdg 1000,1000 --rfg 1000,1000 -k 20. La abundancia de los distintos transcritos se cuantificó utilizando featureCounts del software Subread (v1.6.2) [48], utilizando los siguientes parámetros -T 8 -p -a -t CDS -g ID -o. Los genes que no tenían al menos 1 cpm en al menos una muestra se eliminaron.

El paquete edgeR de Bioconductor (v3.22.3) [66], se usó para probar la expresión génica diferencial, considerando un gen expresado diferencialmente a FDR <0.05. La anotación funcional se realizó con Trinotate (v3.0.1), y el enriquecimiento del término GO se realizó con el paquete topGO R (v2.32.0) [5], utilizando una prueba clásica de Fisher y estableciendo un umbral de enriquecimiento de valor p <0.05 (Figura 4).

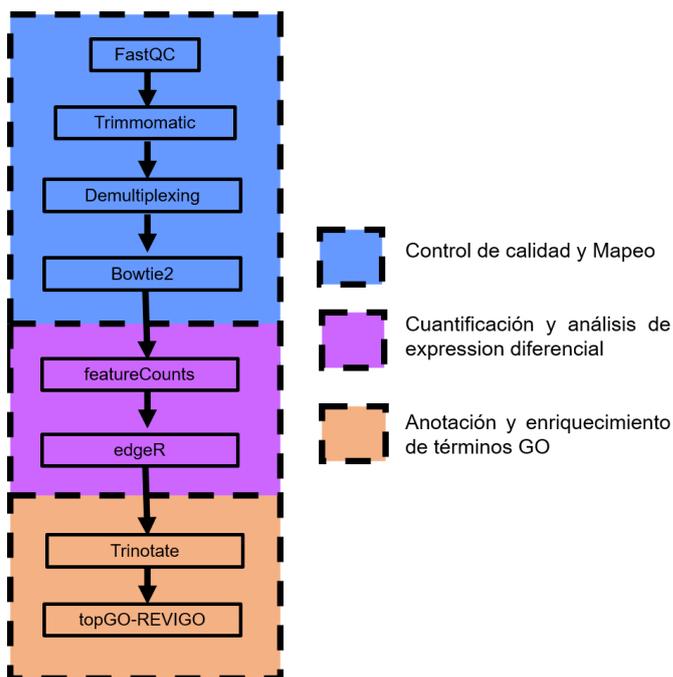


Figura 4. Flujo de trabajo que se utilizó para analizar los datos obtenidos por ARN-seq.

## 8.5 Obtención y análisis de transcriptoma de bacterias crecidas en planta de maíz y medio Fahareus

### 8.5.1 Cultivo hidropónico de maíz e inoculación

Las semillas de maíz fueron desinfectadas y germinadas, como se describe en el apartado 8.3.1, una vez germinadas las semillas, se colocaron en un sistema hidropónico, el cual consiste en tubos de 50 mL, dentro del cual hay un soporte de acero inoxidable, donde se coloca la semilla germinada. Cada semilla fue inoculada con una concentración bacteriana final de  $10^8$  UFC por planta, resuspendidas en medio Fahareus. En total se procesaron 50 plantas por tratamiento. Las plántulas de maíz se mantuvieron por cinco días a 28 °C con ciclos de 12/12 luz/oscuridad.

### 8.5.2 Obtención de bacterias adheridas a las raíces de maíz

Transcurridos cinco días, las raíces de 50 plantas sin síntomas de estrés, se cortaron y se sumergieron en una solución de 100 mL de  $MgSO_4$  (20g/L), más ARNlater (Ambion) 10% y se incubaron en hielo, durante 10 minutos. Para desprender a las bacterias adheridas a las raíces, éstas se sometieron a

sonicación indirecta durante 20 minutos y se agitaron en vórtex por 30 segundos [60], este proceso no afecta la viabilidad celular.

La suspensión resultante se filtró con cuatro membranas superpuestas estériles de Miracloth (Merck Millipore), para eliminar el tejido vegetal que se pudo haber desprendido en el procedimiento, el filtrado se centrifugó a 4°C, a 6000 rpm, durante ocho minutos, para recuperar las células desprendidas de las raíces de cada planta. A partir del pellet celular obtenido se realizó la extracción de ARN, como se describe en el punto 8.4.2. y la construcción de librerías, obtención de secuencias se realizó como se menciona en los puntos 8.4.3 y 8.4.4, respectivamente.

## 9. Resultados y discusión

### 9.1. Inhibición de crecimiento entre IM

Para evaluar si el consorcio microbiano era capaz de crecer conjuntamente, se sembraron todas las bacterias en medio PY sólido, observando que no hay inhibición entre ninguna de las bacterias elegidas (Figura 5). Se sabe que la mayoría de los microorganismos en sus diferentes ambientes enfrentan una batalla constante por los recursos presentes en el medio, y han desarrollado diversas estrategias que incluyen motilidad, producción de sustancias antimicrobinas y comportamiento coordinado que pueden ayudar a la competitividad [37]. Sin embargo, así como se han desarrollado estrategias para competir, también se han desarrollado estrategias para cooperar entre una comunidad y poder crecer conjuntamente, dentro de estas estrategias se encuentra las cooperaciones basadas en la producción de bienes compartidos (públicos). Estos bienes son moléculas como las invertasas, sideróforos, biosurfactantes y son producidas por ciertos individuos y pueden beneficiar a una población [17,79]. Existen también cooperaciones basadas en interacciones metabólicas, llevadas a cabo principalmente entre comunidades microbianas naturales y surgen de los metabolitos de una especie que son utilizados por otras especies como fuentes de energía [17]. En medios de cultivo observamos que las bacterias que integran al IM no se inhiben entre ellas (Figura ).

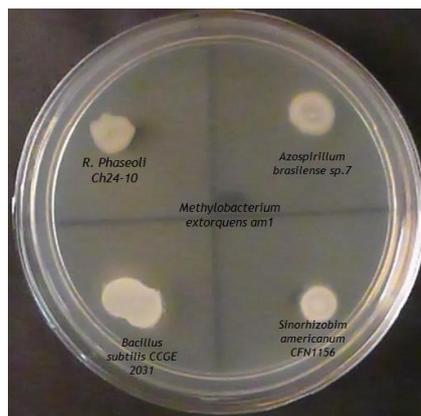


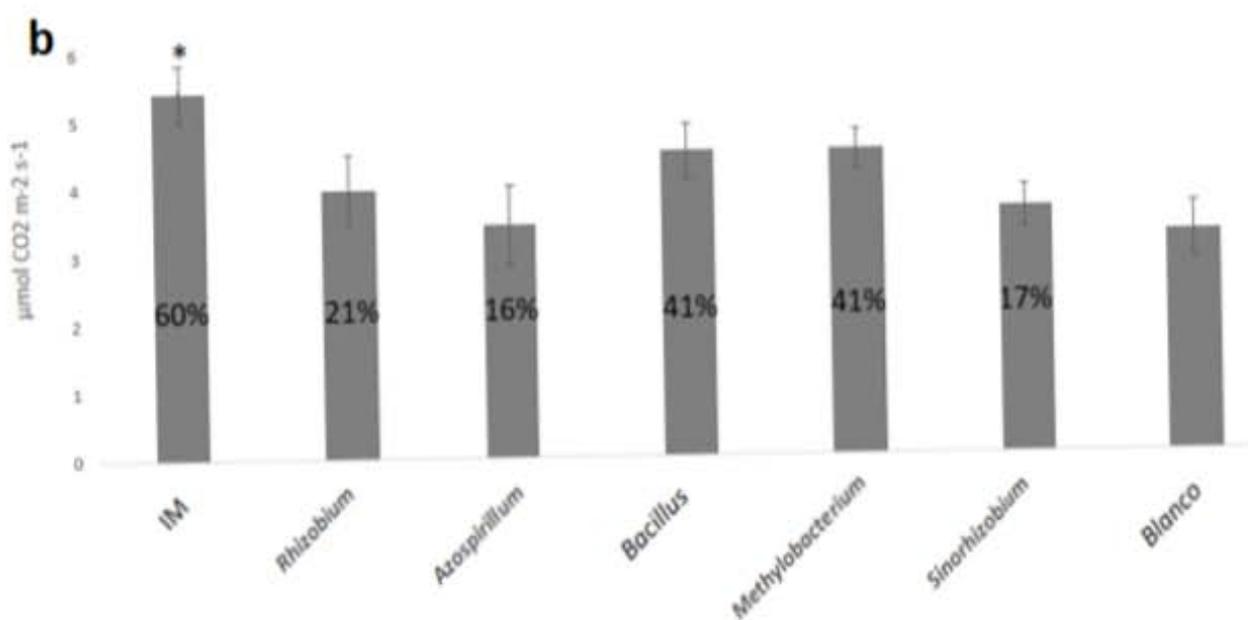
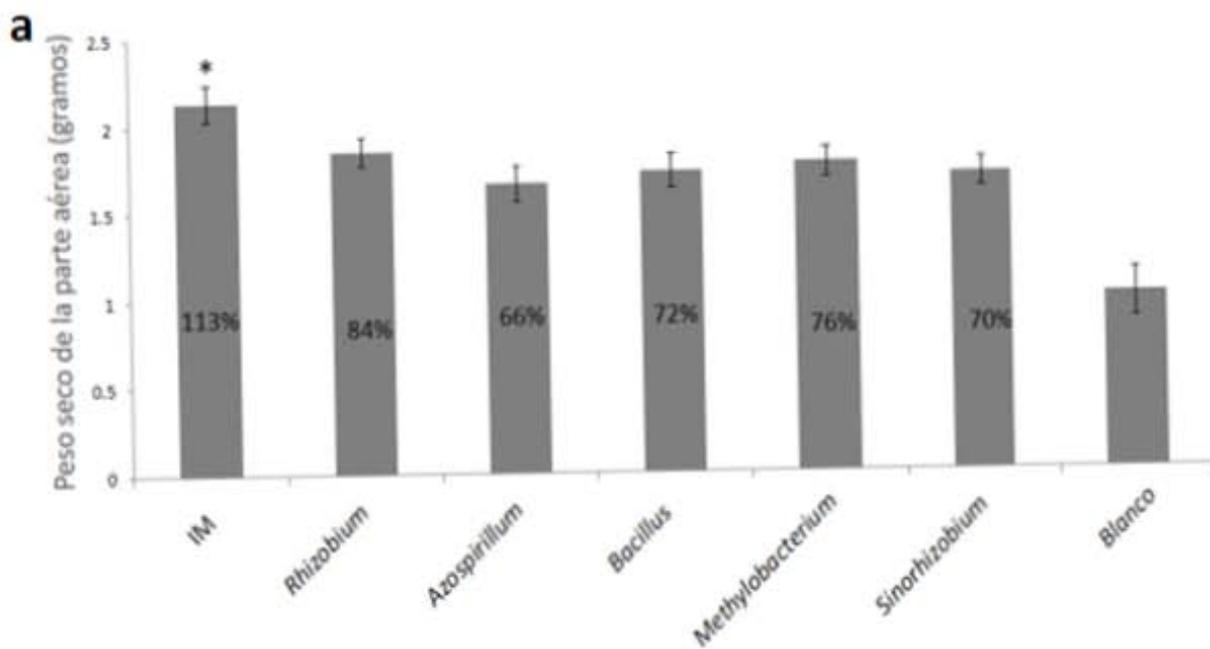
Figura 5. Prueba de agar suave con las cinco bacterias del IM. Como césped, está sembrada *M. extorquens* y alrededor las otras bacterias del inóculo multiespecie. Todas las bacterias fueron puestas como césped y las demás alrededor.

## 9.2. Medición de biomasa y fotosíntesis en plantas de maíz

Para evaluar el efecto que ejercen las bacterias sobre el crecimiento de las plantas, evaluamos la ganancia de biomasa y la fotosíntesis, parámetros importantes para establecer el estatus fisiológico de la planta.

Mediante un análisis de varianza ajustado a  $p < 0.05$ , encontramos que las plantas con el IM son estadísticamente significativas las diferencias en comparación con el control no inoculado y con las plantas inoculadas con una sola bacteria. Cuando las plantas fueron inoculadas con el IM, la biomasa se vio aumentada hasta un 113 %, seguida por las plantas que estaban inoculadas con *Rhizobium* que tuvieron un aumento del 84 %.

Se ha demostrado que diversos microorganismos, considerados como inductores de crecimiento, favorecen el crecimiento de cultivos de interés agrícola. Los resultados obtenidos reafirman experimentos realizados anteriormente con rizobios en no leguminosas, por ejemplo, se ha probado que *Rhizobium phaseoli* biovar *leguminosarum* es capaz de colonizar raíces de maíz y lechuga y son más competitivas para poblar la raíz en comparación con otras bacterias promotoras de crecimiento [19]. Meng (2015) reporta que al inocular *Bradyrhizobium japonicum* con el hongo de la micorriza *Glomus mosseae* en maíz y soja, se aumenta la eficiencia de fijación de nitrógeno y el rendimiento en ambos cultivos. Los resultados obtenidos en este trabajo sugirieron que pudiera haber un sinergismo entre las bacterias inoculadas en maíz, lo cual favorece la ganancia de biomasa en la planta (Figura 6).



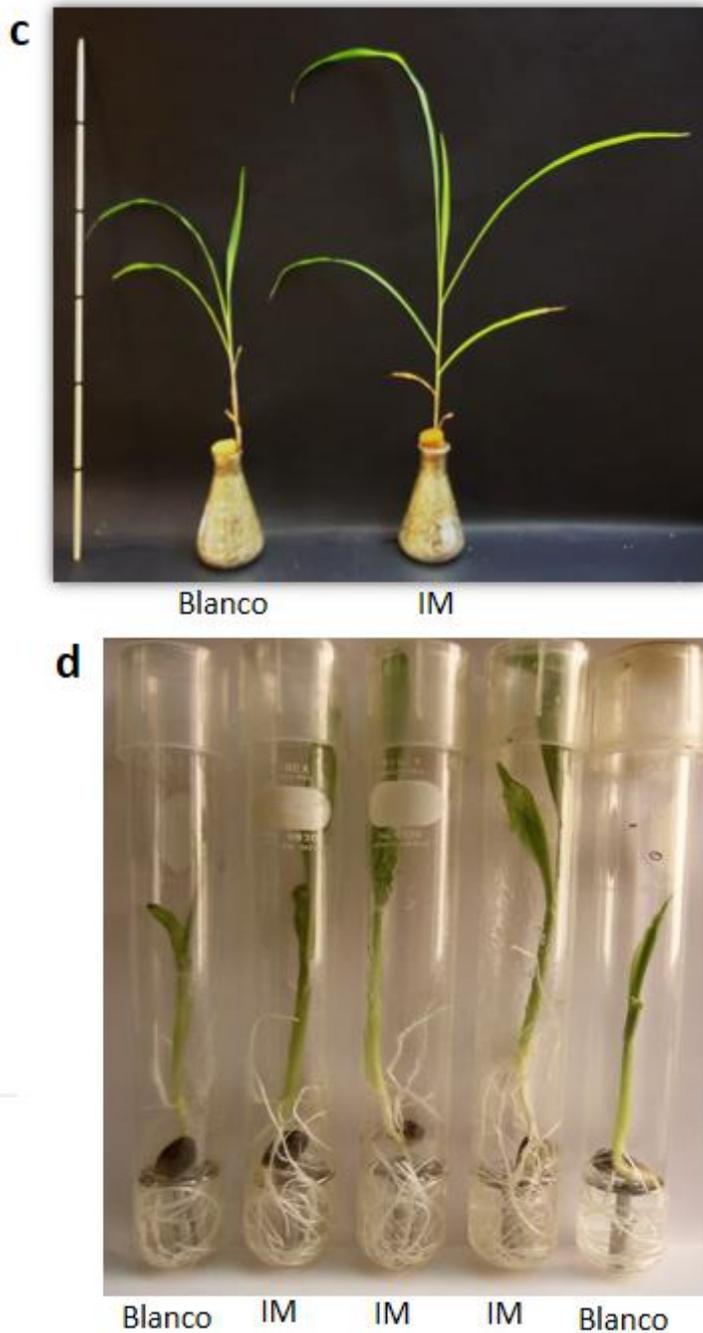


Figura 6. Características fenotípicas de plantas de maíz inoculadas con el IM. (a) Masa aérea de la planta, treinta días después de la inoculación con los diferentes tratamientos; b) CO<sub>2</sub> asimilado por plantas de maíz inoculadas después de treinta días de la colonización; c) Planta no inoculada y una planta colonizada con el IM a los treinta días post inoculación, d) Masa radicular en las plantas colonizadas con IM. Los números dentro de las barras representan el porcentaje de ganancia en comparación con el control. \*representa una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

### 9.3. Análisis de transcriptoma

#### 9.3.1 Extracción de ARN

Se tuvieron concentraciones arriba de 500 ng/μL de ARN, las calidades de ARN fueron óptimas para la secuenciación, teniendo RQN o RIN arriba de siete. En la figura 7 se observan geles con ARN en la cual podemos ver la subunidad ribosomal 23S y 16S, las calidades y concentraciones, así como un espectro representativo para algunas de las muestras de ARN obtenidas con un bioanalyzer que nos permite observar el RIN o RQN.

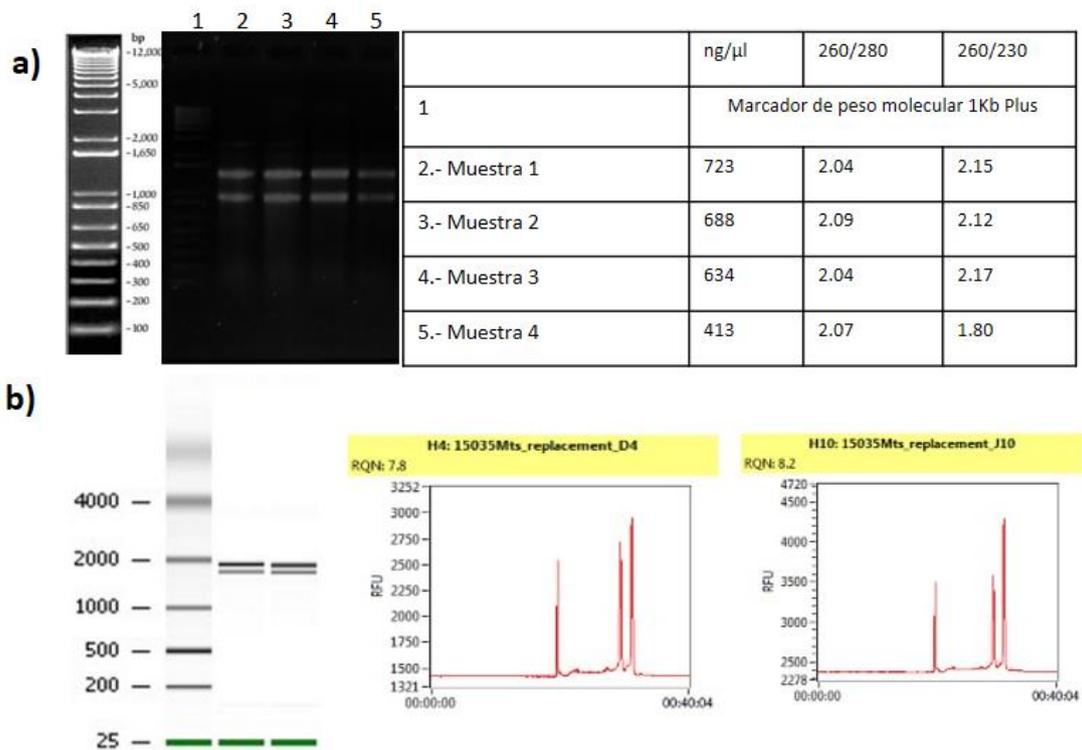


Figura 7. Geles de agarosa y cuantificación de muestras de ARN con el Bioanalyzer 2100. a) Gel de agarosa con muestras de ARN, a un costado se muestra la cantidad y la calidad de las secuencias b) Visualización de la calidad de las secuencias mediante bioanalyzer, se muestran los electrogramas con el RQN.

#### 9.3.2 Calidad, limpieza y mapeo de las secuencias obtenidas por ARN-seq

La calidad de la secuenciación de todas las muestras fue alta, con un rendimiento promedio de 40 millones de lecturas por muestra. Se utilizó la herramienta FastQC para evaluar la calidad de las secuencias. Se obtuvieron secuencias de buena calidad en general, sin adaptadores, ni secuencias duplicadas. En la figura 8 se muestra una imagen representativa de la calidad

de las secuencias por base, el esquema está dividido en tres colores, rojo, amarillo y verde, en este caso, las secuencias caen dentro de la región verde, indicando una calidad buena, en el eje de las Y se muestra la calidad en formato Phred. En la figura 8 podemos ver una imagen representativa de la calidad de secuencias que obtuvimos, donde la mayoría de las secuencias tiene una calidad Phred por arriba de 36, mostrando que son de buena calidad.

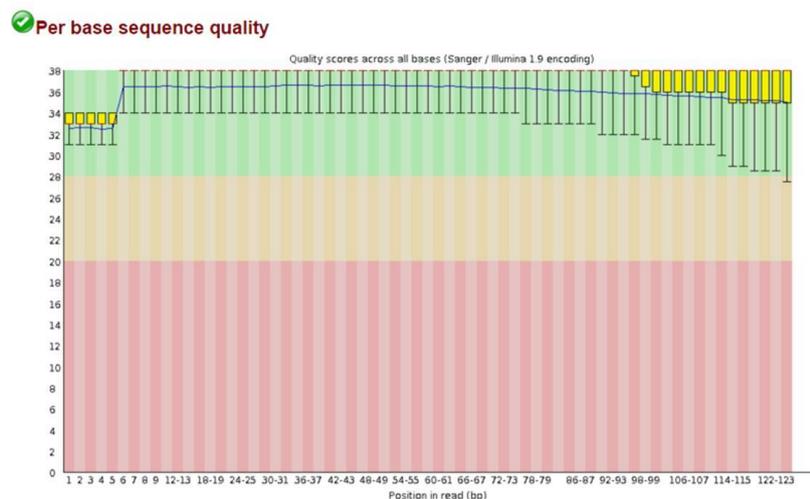


Figura 8. Reporte de calidades de FastQC. En color verde se muestra la región donde las calidades son consideradas como aceptables.

El ARN-Seq generó aproximadamente 40 millones de lecturas en promedio por muestra, las cuales fueron filtradas por calidad y presencia de adaptadores con el programa Trimmomatic. Al finalizar el filtrado, las lecturas remanentes se encuentran aproximadamente arriba del 98 % de lecturas originales, que son representadas por el color azul en la gráfica de barras de la Figura 9.

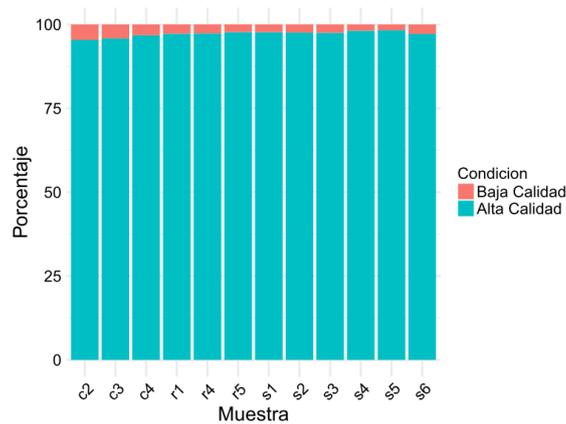


Figura 9. Porcentaje de lecturas después del control de calidad. Las muestras de C2, C3, C4 representan a las réplicas de la comunidad en la planta, R1, R4 y R5, representan a las réplicas de *R. phaseoli* Ch24-10 en planta, s1, s2 y s3 representan a las réplicas de *R. phaseoli* Ch24-10 en PY, y s4, s5 y s6 son las réplicas de comunidad en PY. Las barras representan el 100 % de las secuencias obtenidas de la secuenciación, la parte azul representa el porcentaje de secuencias que se consideraron de alta calidad y son las que ocupamos para posteriores análisis.

Con las lecturas obtenidas (lecturas después de la limpieza), se procedió a realizar un alineamiento contra un genoma concatenado (demultiplexing), el cual contenía los genomas de las cinco bacterias del IM más el genoma del maíz. Se eligió la estrategia de mapeo contra el genoma concatenado para que las lecturas compitieran por el mejor alineamiento y con esto quedarnos con el mejor match. Para alinear las lecturas obtenidas se utilizó el programa Bowtie2, y para realizar la cuantificación de la expresión de cada gen se utilizó el programa featureCounts. Una vez obtenida la matriz de cuentas, se obtuvo el coeficiente de correlación de Spearman, teniendo en promedio correlaciones arriba de 0.90 entre réplicas biológicas, lo que indica que el experimento tiene una alta reproducibilidad (Figura 10).

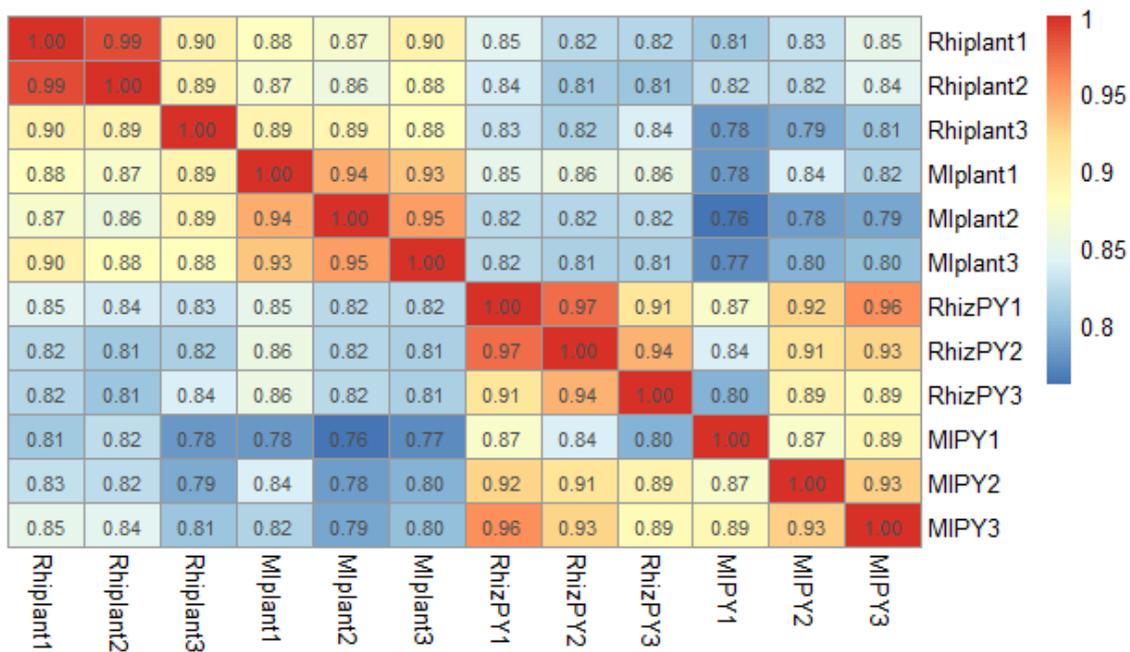


Figura 10. Mapa de calor con correlaciones de Spearman. Mapa de calor que representa las correlaciones entre todas las réplicas obtenidas a partir de los transcriptomas. Entre más cercano sea el valor a 1, mayor es la correlación entre las réplicas.

#### 9.4 Expresión diferencial de *R. phaseoli* Ch24-10 en el IM

La expresión diferencial se refiere a los cambios cuantitativos ocurridos en la expresión de un gen específico o un grupo de ellos, al someter un organismo a una o varias condiciones alteradas con respecto a su condición control o normal. En este trabajo, para evaluar la expresión diferencial, se utilizó el paquete edgeR de Bioconductor. Elegimos este paquete basado en distribución binomial negativa, esta distribución está basada en el teorema de Bayes; en el cual, se repiten los ensayos hasta conseguir un número de casos favorables. Lo que hace el modelo en el caso de las lecturas es moderar el grado de sobre dispersión entre los genes, resumiendo los datos en tablas de conteo, con filas correspondientes a genes (o etiquetas o exones o transcripciones) y columnas correspondientes a muestras, debido a que se sabe que los genes que sean determinados como diferencialmente expresados tienen mayor probabilidad de ser verdaderos positivos [67]. La normalización de los datos se realizó mediante TMM (trimmed mean of M values), que toma como referencia los valores de la media. Consideramos genes expresados diferencialmente cuando la tasa de descubrimiento de falsos positivos (FDR) fuera  $<0.05$ . La anotación funcional se realizó con Trinotate (v3.0.1), y el enriquecimiento del término GO se realizó con

el paquete topGO (v2.32.0), utilizando una prueba clásica de Fisher y estableciendo un umbral de enriquecimiento de valor  $p < 0.05$ .

#### 9.4.1 Expresión diferencial de *R. phaseoli* Ch24-10 en PY en comparación con *R. phaseoli* Ch24-10 +comunidad en PY

Se obtuvieron 349 genes diferencialmente sobreexpresados (Tabla A.1) de la comparación de *R. phaseoli* Ch24-10 en PY versus *R. phaseoli* Ch24-10 + comunidad en PY, y 431 genes subexpresados (Figura 12), (Tabla A.2). Las réplicas tuvieron una alta correlación arriba de 0.90, y mediante un MDSplot (gráfico que permite mediante la reducción de dimensiones, encontrar similitudes o diferencias entre diferentes variables o muestras), se visualizó la similitud entre las muestras (Figura ).

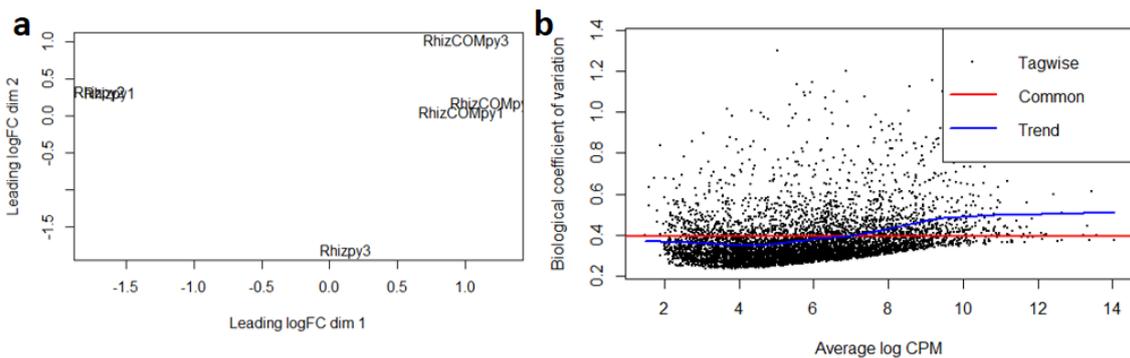


Figura 11. Variación entre muestras de *R. phaseoli* crecido en medio PY con y sin una comunidad bacteriana. a) Gráfico MDS, en la cual podemos ver como las muestras se agrupan. Las réplicas 1 y 2 de *R. phaseoli* crecido en PY se agrupan, no siendo así la réplica 3, mientras que las tres réplicas de *R. phaseoli* crecida con la comunidad se logran agrupar. b) Gráfico de coeficiente de variación, en el cual la mayoría de los genes está por debajo del 0.4, entre menor sea la variación es más probable que un gen esté diferencialmente expresado y no sea una consecuencia del ruido técnico.

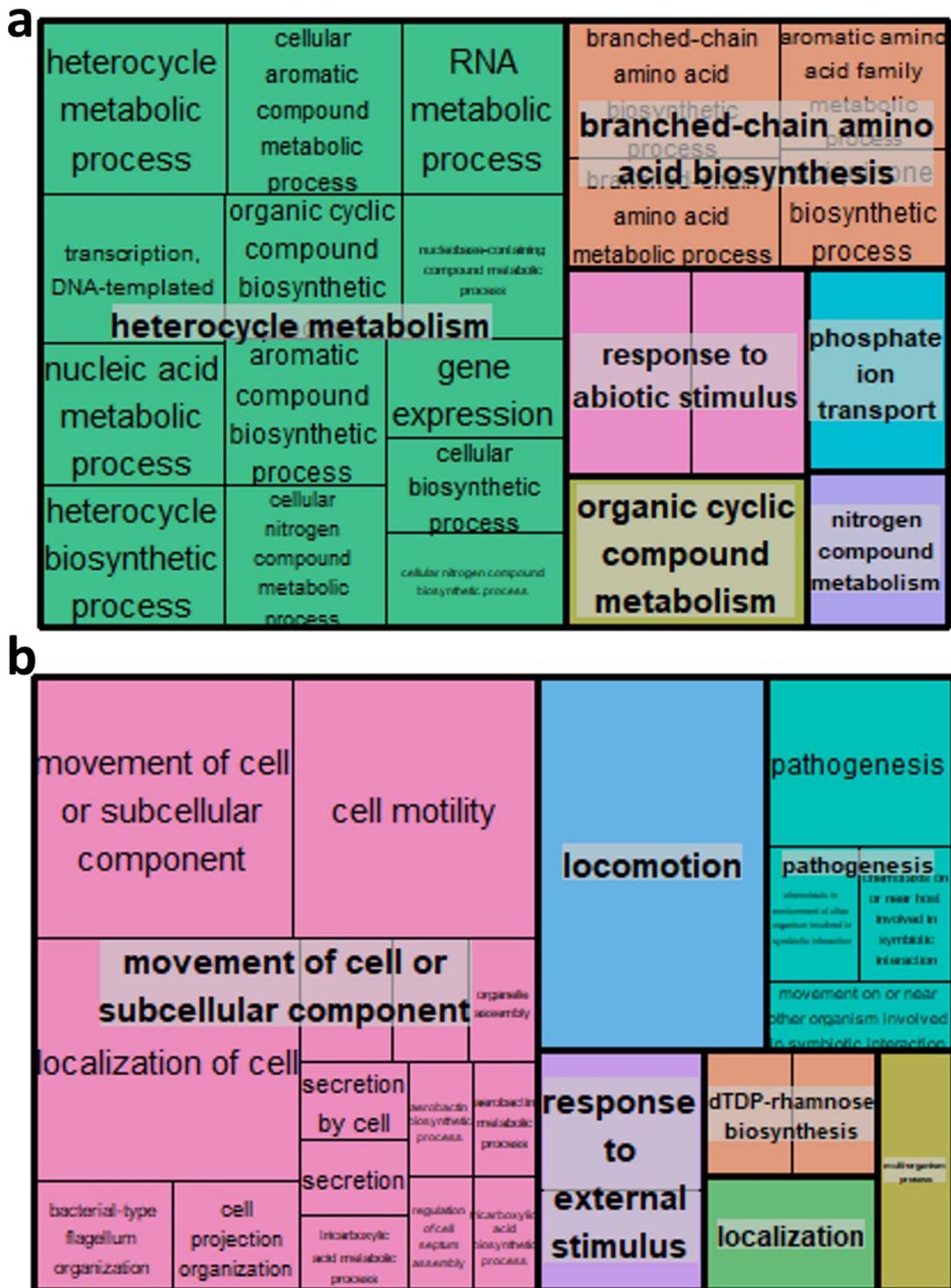


Figura12. Visualización de términos GO de los genes diferencialmente expresados de la comparación entre *R. phaseoli* crecido individualmente contra *R. phaseoli* crecido en el IM. Treemaps (proceso biológico) de los términos GO enriquecidos utilizando REVIGO a) genes sobreexpresados b) genes regulados subexpresados.

Dentro de los genes que se encontraron enriquecidos se encuentran los involucrados con transportadores de aminoácidos tipo ABC, como la proteína transportadora de aminoácidos tipo ABC de unión a ATP, permeasa transportadora de zinc tipo ABC, transportador de magnesio, transportador de cationes. El transporte de moléculas orgánicas e inorgánicas a través de las membranas celulares es vital para todos los organismos vivos [80]. Los transportadores de la super familia tipo ABC (casete de unión ATP), están presentes en todas las formas de vida, la hidrólisis de ATP provee de la energía para el transporte [25,80]. En los genes sobreexpresados en el transcriptoma podemos ver una gran cantidad y variedad de este tipo de transportadores (Tabla A.1), de moléculas orgánicas e inorgánicas, como por ejemplo aminoácidos, vitaminas, metales. para compuestos orgánicos más grandes, incluidos péptidos, moléculas lipídicas y oligonucleótidos. Dentro de los genes subexpresados de *R. phaseoli* Ch24-10 en PY en comparación con *R. phaseoli* Ch24-10 + comunidad en PY, se encuentran algunos genes involucrados con quimiotaxis y ensamble del flagelo como; por ejemplo, la flagelina, la proteína flagelar FlgK, el cuerpo basal flagelar *flgH*, la proteína flagelar FlgE, el cuerpo basal flagelar *fliE*, las proteínas de quimiotaxis CheR CheY y CheW. Se sabe que la quimiotaxis bacteriana requiere de complejos multiproteicos y de los receptores de membrana y de ciertas proteínas esenciales como CheA, CheB, CheR y CheY. Esta familia de proteínas de quimiotaxis (MCP) que aceptan metilo parecen ser elementos importantes en el proceso de quimiotaxis [36], sin embargo, dentro de este tratamiento se encuentran regulados a la baja y se puede deber al movimiento el cual fue sometido el tratamiento, además se ha reportado que el costo energético para llevar a cabo la quimiotaxis o el ensamble de flagelo, es alto y para que se lleve a cabo tiene que ser influenciado por los exudados de la raíz, y en este tratamiento no están expuestas las bacterias a estos exudados [75]. Además, dentro de los genes subexpresados se encuentran algunos involucrados con la proteína de secreción tipo IV VirB3, la ATPasa transferencia de secreción de la familia tipo IV VirB4, la proteína de secreción tipo IV VirB2. La maquinaria secretora de Tipo IV está codificada por los genes *virB1–11*, los rizobios utilizan los sistemas de secreción de proteínas Tipo III y Tipo IV para inyectar proteínas efectoras directamente en las células de la planta huésped, donde modifican las vías de señalización de las plantas.

Se sabe que en *Mesorhizobium loti*, los sistemas de secreción de tipo IV están involucrados en la nodulación, probablemente en esta condición están regulados a la baja, debido a que en este tratamiento se encuentra la comunidad conviviendo en un medio complejo, PY [43].

#### 9.4.2 Expresión diferencial de *R. phaseoli* Ch24-10 en planta en comparación con *R. phaseoli* Ch24-10 + comunidad en planta

Al analizar la comparación de *R. phaseoli* Ch24-10 en planta contra *R. phaseoli* Ch24-10 más comunidad en planta, tenemos correlaciones de Spearman mayores a 0.83 (Figura 13) sin embargo, la muestra de Comu1 no presenta una correlación alta con las otras réplicas biológicas de su misma condición (Com2 y Com3). De manera similar lo mismo sucede con la réplica de las Rhizo3 (Figura 13a), por lo cual decidimos quitar estas dos muestras de nuestro análisis y se realizaron los análisis con las dos réplicas restantes (Figura 13b).

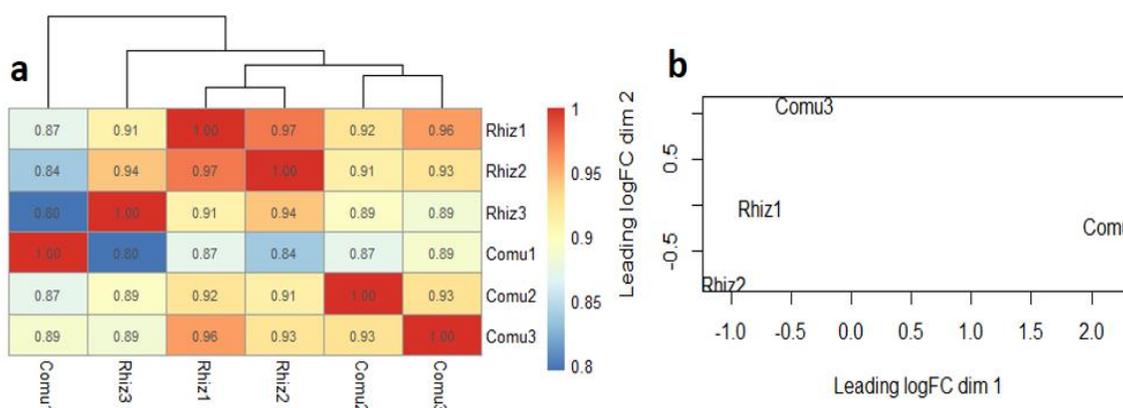


Figura 10. Correlación de las muestras de *R. phaseoli* y *R. phaseoli* con el IM, crecidos en planta. a) Mapa de calor de la correlación (coeficiente de Spearman, de cada una de las muestras). b) MDS plot que muestra el agrupamiento de dos réplicas por tratamiento.

Dentro del análisis de expresión diferencial, encontramos 110 genes sobreexpresados al comparar *R. phaseoli* sola en planta, versus *R. phaseoli* junto con la comunidad, crecidos en planta (Tabla A.3), dentro de los cuales destacan los involucrados en el catabolismo de arginina, como por ejemplo arginina deaminasa y una glicosiltransferasa. Se sabe que la L-arginina es un aminoácido metabólicamente versátil, que sirve como componente para la formación de proteínas y como un precursor de la síntesis de poliamina. La L-

arginina también puede servir como fuente de carbono, nitrógeno y energía a través de una variedad de vías catabólicas en las bacterias [52].

Dentro de los genes sobreexpresados también encontramos a algunos transportadores tipo ABC, como el transportador de azúcar tipo ABC de unión a ATP, transportador de permeasa tipo ABC, D-ribosa tipo ABC de unión a ATP, el péptido transportador tipo ABC.

Asimismo, se encontraron 53 genes subexpresados (Tabla A.4), entre los que destacan algunos involucrados con el metabolismo del nitrógeno; por ejemplo, proteína de fijación de nitrógeno, nitrogenasa, la proteína NifW y la proteína de biosíntesis de cofactor hierro-molibdeno NifN, lo que nos indican que la fijación biológica de nitrógeno no se está llevando cuando *R. phaseoli* está con la comunidad en la planta. En la Figura 114, podemos visualizar los genes mencionados anteriormente agrupados en términos GO y visualizados mediante la herramienta de revigo conocida como treemap.

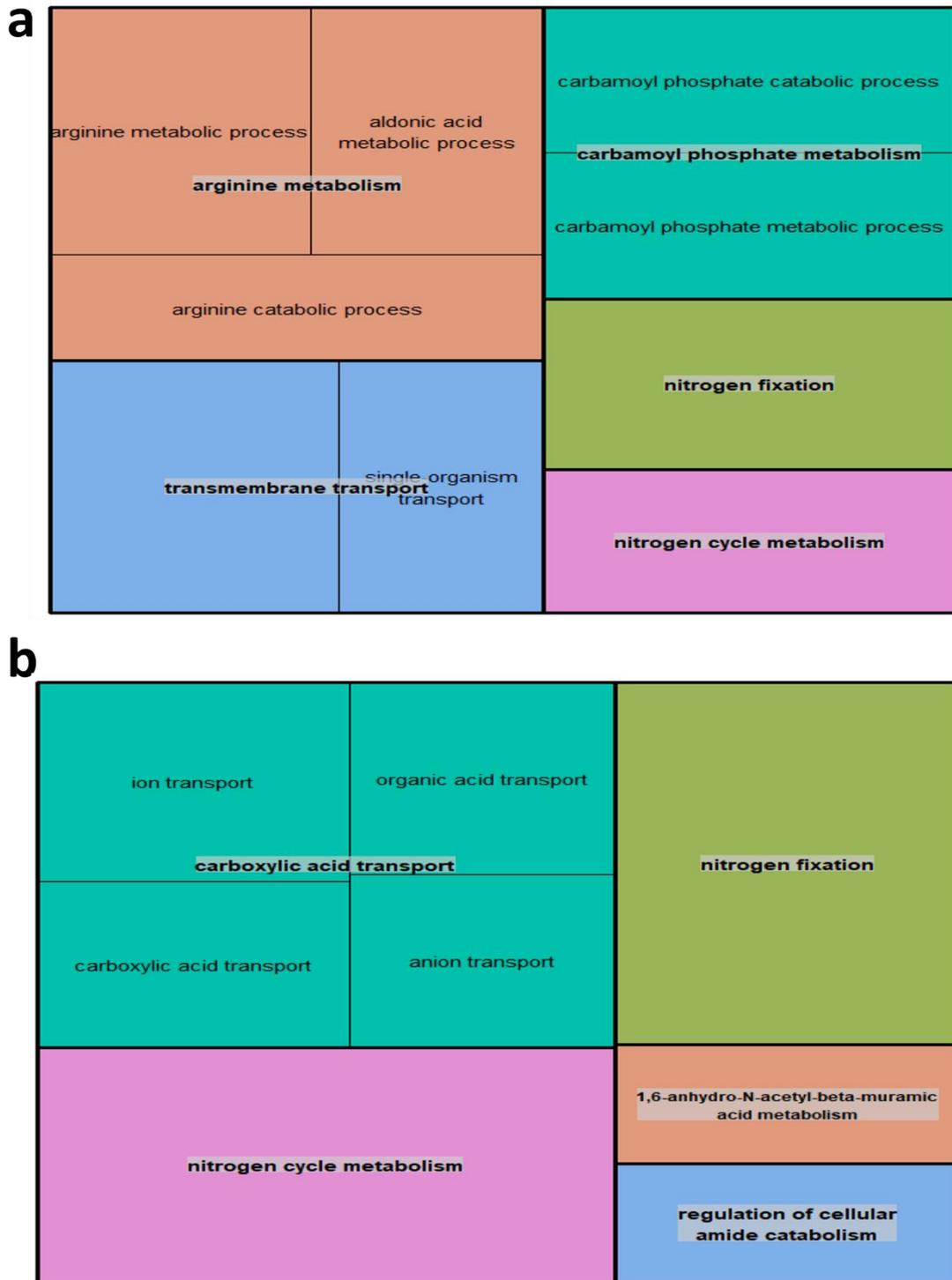


Figura 114. Visualización de términos GO de la comparación entre *R. phaseoli* cultivada en planta contra *R. phaseoli* Ch24-10 con comunidad cultivada en planta. Treemaps de los términos enriquecidos con GO utilizando REVIGO al comparar, utilizando a) genes sobreexpresados b) genes subexpresados.

#### 9.4.3 Expresión diferencial de *R. phaseoli* Ch24-10 en PY en comparación con *R. phaseoli* Ch24-10 en planta

La tercera comparación que se realizó fue con las muestras de *R. phaseoli* Ch24-10 en PY contra *R. phaseoli* Ch24-10 crecido en planta. Las réplicas biológicas de cada una de las muestras tuvieron correlaciones mayores a 0.90 entre ellas (Figura 125).

Se obtuvieron 730 genes diferencialmente sobreexpresados (Tabla A.5), dentro de los cuales llamaron la atención aquellos involucrados con la fijación de nitrógeno como, por ejemplo, la proteína de biosíntesis de cofactor de la nitrogenasa NifB, la proteína de fijación de nitrógeno, la proteína de biosíntesis de cofactor de nitrogenasa hierro-molibdeno NifN y la proteína estabilizadora de la nitrogenasa NifW. Los enfoques moleculares independientes del cultivo han revelado que algunos rizobios que se encuentran en las raíces de cereales expresan los genes de la nitrogenasa [70]. Otros genes que llamaron la atención dentro de los genes sobreexpresados fueron los involucrados con la cadena respiratoria como el citocromo C oxidasa, la chaperona ensambladora de oxidasa, el citocromo oxidasa tipo cbb3, la proteína de ensamble de citocromo oxidasa CcoS, el citocromo oxidasa tipo cbb3 subunidad I, el citocromo oxidasa tipo cbb3 subunidad II y la citocromo oxidasa tipo cbb3 subunidad III. Las bacterias fijadoras de nitrógeno utilizan oxidasas de tipo cbb3 y se sabe que la respiración bacteriana está directamente relacionada con el suministro de ATP, el cual es necesario para proporcionar suficiente energía para que se lleve a cabo la fijación de nitrógeno [51,74,82]. A pesar de encontrar sobreexpresados varios genes involucrados con la fijación de nitrógeno, no detectamos fijación de nitrógeno medida como reducción de acetileno cuando *Rhizobium* se encuentra sólo en la planta de maíz.

Se encontró que 376 genes se están subexpresados (Tabla A.6), dentro de los cuales se encuentran muchos involucrados con la quimiotaxis y locomoción, por ejemplo, proteína de síntesis flagelar, proteína de cuerpo basal flagelar LlgC, flagelina, proteína de cuerpo basal flagelar FliL, proteína de quimiotaxis CheW, proteína de quimiotaxis CheR.

Se ha reportado que las proteínas flagelares, los exopolisacáridos, las adhesinas y los lipopolisacáridos, son las primeras estructuras que entran en

contacto con el huésped y pueden ser necesarias para la unión bacteriana en las superficies de las raíces en tiempos tempranos, sin embargo la obtención del transcriptoma es a tiempos largos (5 días y las bacterias se encuentran ya en contacto con las raíces), por lo que ya no necesitaría flagelos en dicha condición [9]. Otros genes que encontramos son los involucrados con la homeostasis de hierro, como por ejemplo transportador tipo ABC de hierro-sideroforo, proteína transportadora tipo ABC de unión-sustrato. Los enriquecimientos y visualizaciones de estos genes se muestran en la Figura 16 en la figura 16a los genes sobreexpresados y en la 16b los subexpresados.

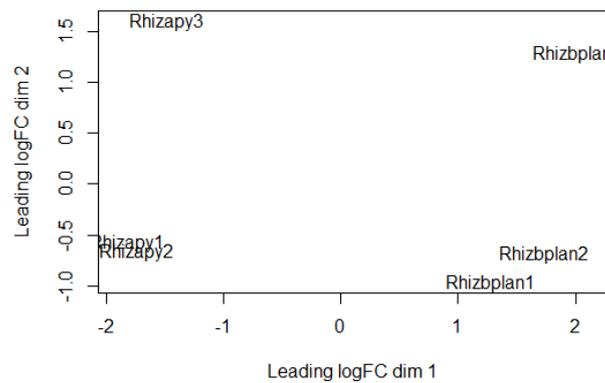


Figura 125. MDSplot de las réplicas de *R. phaseoli* en PY versus *R. phaseoli* planta con el agrupamiento de las muestras. Gráfico de escalamiento multidimensional.

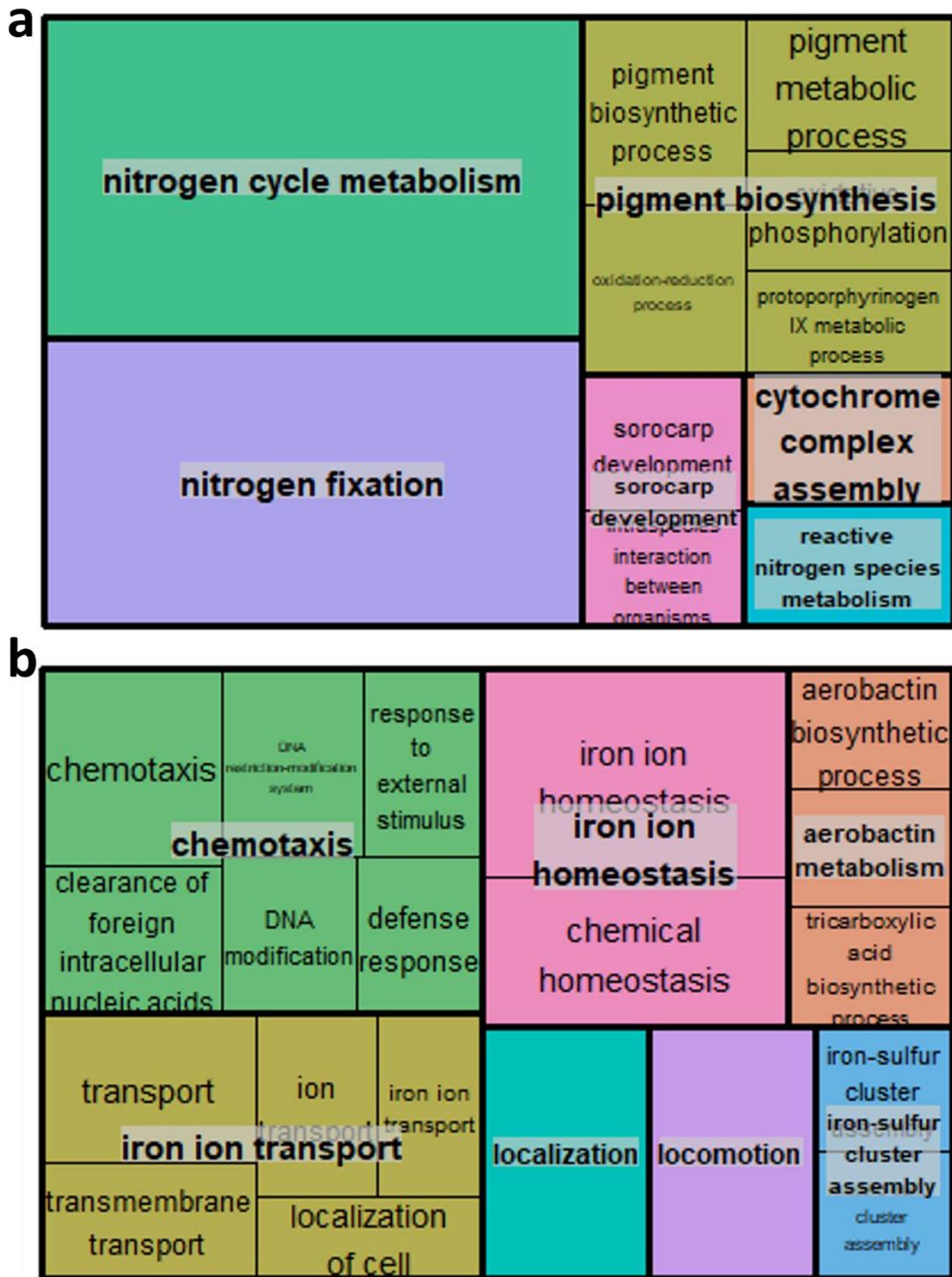


Figura 136. Visualización de términos GO al comparar *R. phaseoli* cultivada en PY contra *R. phaseoli* Ch24-10 con comunidad cultivada en PY. Treemaps de los términos enriquecidos con GO utilizando REVIGO, utilizando a) genes sobreexpresados b) genes sub expresados.

#### 9.4.4 Expresión diferencial de *R. phaseoli* Ch24-10 más comunidad en PY en comparación con *R. phaseoli* Ch24-10 con comunidad en planta

Finalmente, para terminar las comparaciones de *Rhizobium* entre los diferentes tratamientos, se comparó *R. phaseoli* Ch24-10 con comunidad en PY versus *R. phaseoli* Ch24-10 con comunidad en planta. Las muestras se agruparon de acuerdo con su respectivo tratamiento (Figura 147), indicando buena reproducibilidad entre las muestras.

Dentro de esta comparación encontramos 972 genes diferencialmente sobreexpresados (Tabla A.7). A diferencia de las comparaciones anteriores, en el treemap de los enriquecimientos de genes (Figura 158) se observa que hay varios genes involucrados con la interacción entre especies, así como genes involucrados con transportadores tipo ABC, transportador tipo ABC de azúcar de unión a ATP y transportador tipo ABC de nitrato. Algunos genes también están involucrados con el metabolismo de amonio.

Dentro de los genes subexpresados, encontramos 546 (Tabla A.8), de los cuales se observaron enriquecidas algunas vías como las de biosíntesis de vitaminas, metabolismo de coenzimas, probablemente vemos esto debido a que las células ya no necesitan sintetizar sus vitaminas y otras moléculas orgánicas e inorgánicas que toman del medio.

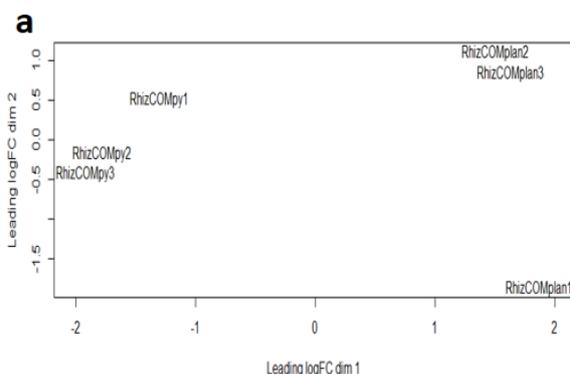


Figura 147. Muestras de *R. phaseoli* con comunidad en PY en comparación *R. phaseoli* con comunidad en planta. a) Gráfico de escalamiento multidimensional, en la cual podemos ver como las muestras se agrupan, las réplicas de *Rhizobium* comunidad PY se agrupan al igual que las réplicas de *Rhizobium* comunidad

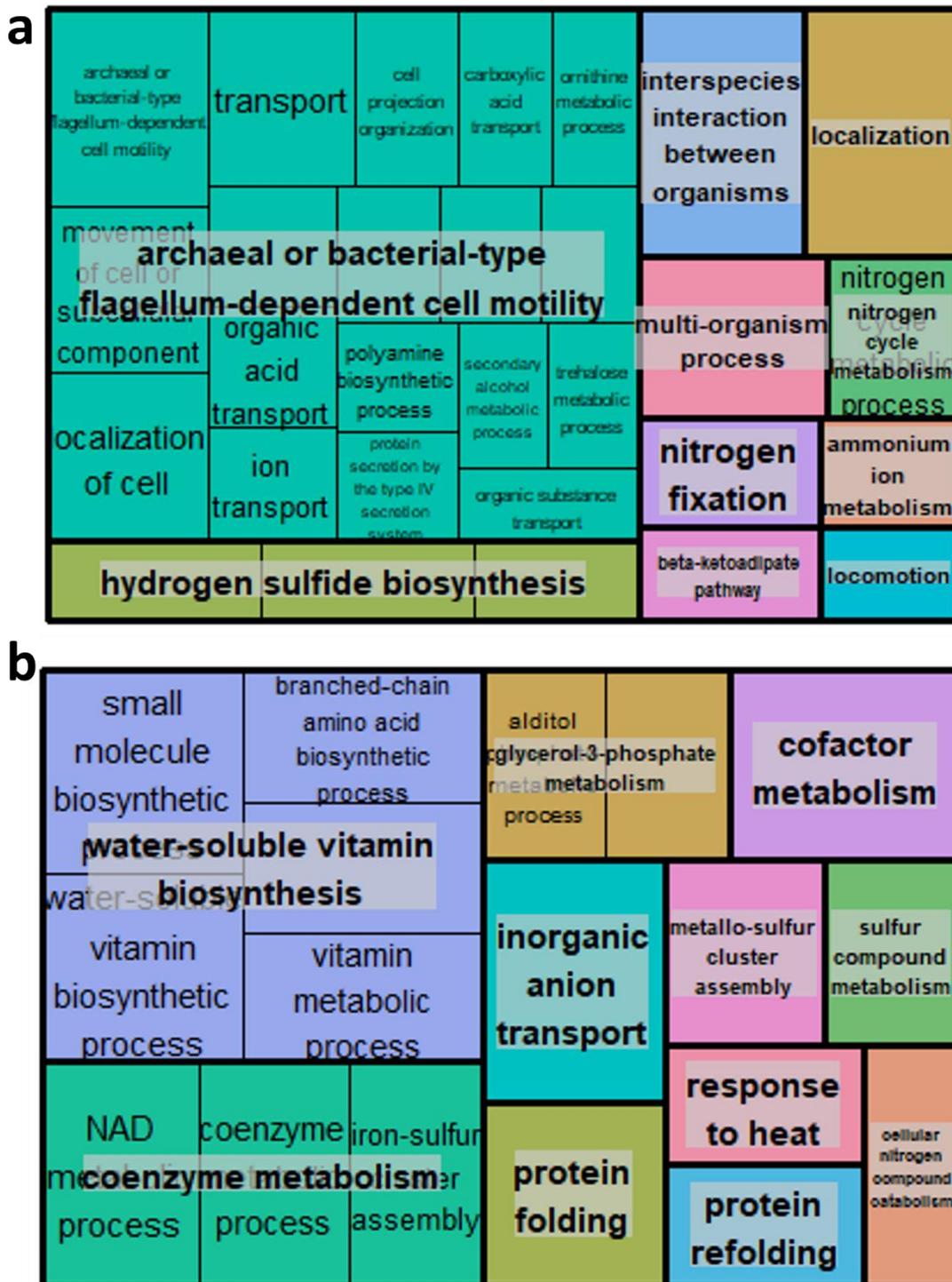


Figura 158. Términos GO al comparar *R. phaseoli* con comunidad en PY contra *R. phaseoli* Ch24-10 con comunidad cultivada en planta. Treemaps de los términos enriquecidos con GO utilizando REVIGO a) Se muestran los genes sobreexpresados b) Se muestran los genes sub expresados.

Finalmente, y a modo de resumen en la figura 19 se muestra una gráfica comparativa de los genes sobreexpresados y subexpresados, de cada una de las comparaciones. La primera barra, representa al tratamiento del IM en medio PY versus IM en planta donde tuvimos 972 genes sobreexpresados y 546 subexpresados, la segunda barra es el tratamiento de *Rhizobium* en planta versus IM en planta con 110 genes sobreexpresados y 53 subexpresados, la tercer barra es el tratamiento de *Rhizobium* en PY versus IM en PY con 349 genes sobreexpresados y 431 subexpresados y finalmente la cuarta barra representa a *Rhizobium* en PY versus *Rhizobium* planta con 730 genes sobreexpresados y 376 subexpresados. En la figura 20 podemos ver un esquema que representa las diferentes comparaciones de los transcriptomas de *Rhizobium*, el número de genes sobreexpresados y subexpresados, así como ejemplos de las funciones de éstos genes.

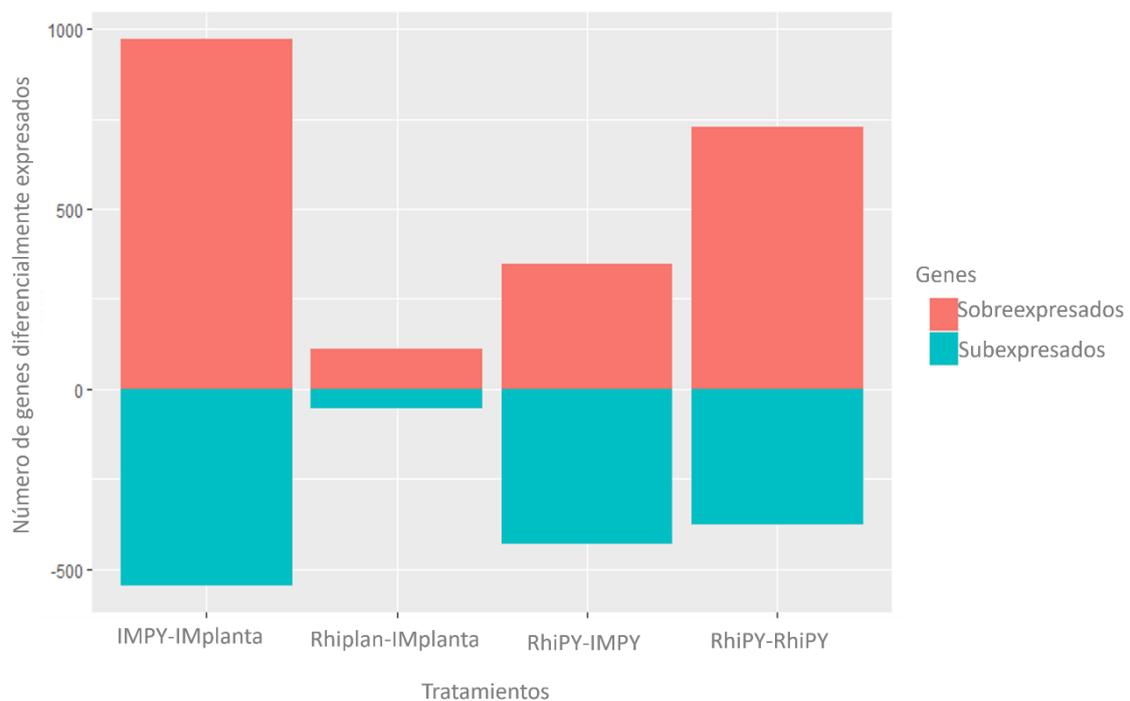


Figura 19. Genes de *Rhizobium* diferencialmente expresados en los diferentes tratamientos.

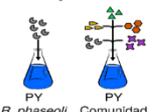
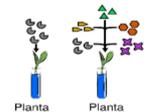
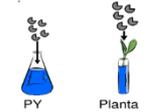
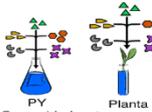
Tratamiento	Número de genes a la alta	Número de genes a la baja	Genes a la alta	Genes a la baja
 PY <i>R. phaseoli</i> Comunidad	349	341	Transportadores tipo ABC Metabolismo central Biosíntesis de aminoácidos Transporte de iones	Motilidad celular Quimiotaxis Localización celular Locomoción
 Planta <i>R. phaseoli</i> Comunidad	110	53	Metabolismo de arginina Transporte transmembranal Metabolismo de carbamoil fosfato	Transporte de aniones Transporte de ácido orgánicos Fijación de nitrógeno
 PY <i>R. phaseoli</i> Planta <i>R. phaseoli</i>	730	376	Fijación de nitrógeno Metabolismo del ciclo de nitrógeno Ensamble de complejo de citocromo Cadena respiratoria	Quimiotaxis Locomoción Localización celular Transporte de ion hierro
 PY Comunidad    Planta <i>R. phaseoli</i>	972	546	Motilidad celular Transporte tipo ABC Metabolismo de ion amonio	Metabolismo de coenzimas Biosíntesis de vitaminas Plegamiento de proteínas

Figura 20. Genes sobreexpresados y subexpresados en las diferentes comparaciones.

## 9.5 Expresión diferencial de genes de los integrantes del inóculo multiespecie.

El objetivo principal del trabajo fue evaluar los genes que se expresan diferencialmente en *R. phaseoli*, cuando se encuentra en la planta de maíz y conviviendo con los integrantes del IM. Sin embargo, también fue de nuestro interés estudiar la respuesta transcriptómica de los integrantes del inóculo multiespecie cultivados en medio PY y de plantulas de maíz, por lo cual hicimos la expresión diferencial de genes de los integrantes de la comunidad, cuando se encuentran en la planta, tomando como control las réplicas crecidas en PY.

### 9.5.1 Expresión diferencial de genes de *Azospirillum*

Se obtuvieron 1,163 genes diferencialmente sobreexpresados (Tabla A.9), cuando *Azospirillum* se encuentra en planta, dentro de éstos genes tenemos los involucrados con transportadores tipo ABC, el transportador tipo ABC de azúcar de unión a ATP y un transportador de carbohidratos, que ayudan a transportar moléculas orgánicas e inorgánicas presentes en el medio, derivadas probablemente de los demás organismos, algunos genes sobreexpresados que llaman la atención, son los involucrados con los procesos de biosíntesis de toxinas como el sistema toxina-antitoxina HicB. Los sistemas de toxina-antitoxina (TA) son elementos genéticos pequeños compuestos de un gen de toxina y su antitoxina afín. Las toxinas de todos los sistemas de TA conocidos

son proteínas, mientras que las antitoxinas son proteínas o ARN no codificantes, los sistemas TA actúan sobre procesos celulares cruciales que incluyen traducción, replicación, formación de citoesqueleto, integridad de membrana y biosíntesis de la pared celular [76].

El análisis reveló 1,377 genes subexpresados (Tabla A.10), donde destacan los involucrados con la quimiotaxis, ensamble flagelar, el ensamble de organelos, y algunos factores transcripcionales como GntR, TetR/AcrR, LysR, ArgP, las interacciones llevadas a cabo entre el ADN y las proteínas son fundamentales para una gran diversidad de procesos biológicos, como la recombinación, replicación, reparación y transcripción del ADN. Dentro de los mecanismos principales de regulación de la expresión génica es la unión específica de los factores de transcripción (TF) al ADN, aquí los encontramos regulados a la baja, indicando una probable disminución en ciertos procesos biológicos (Figura 22). Las réplicas tuvieron una alta correlación arriba de 0.91 y mediante un MDS plot se visualizó la correlación entre las réplicas (Figura 21).

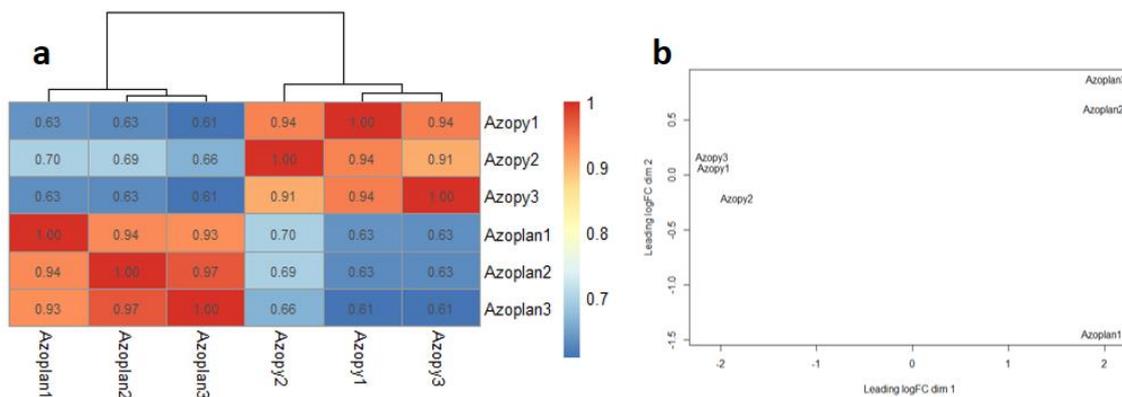


Figura 21. Correlación entre las muestras de *Azospirillum*. a) Mapa de calor de la correlación (coeficiente de Spearman), de cada una de las muestras las muestras de *Azospirillum* en PY, muestran correlación arriba de 0.91 y las muestras de *Azospirillum* en planta muestran correlaciones arriba de 0.93. b) Gráfico Multidimensional nos muestra como se agrupan las réplicas de *Azospirillum* en PY, así como las muestras de *Azospirillum* en planta.

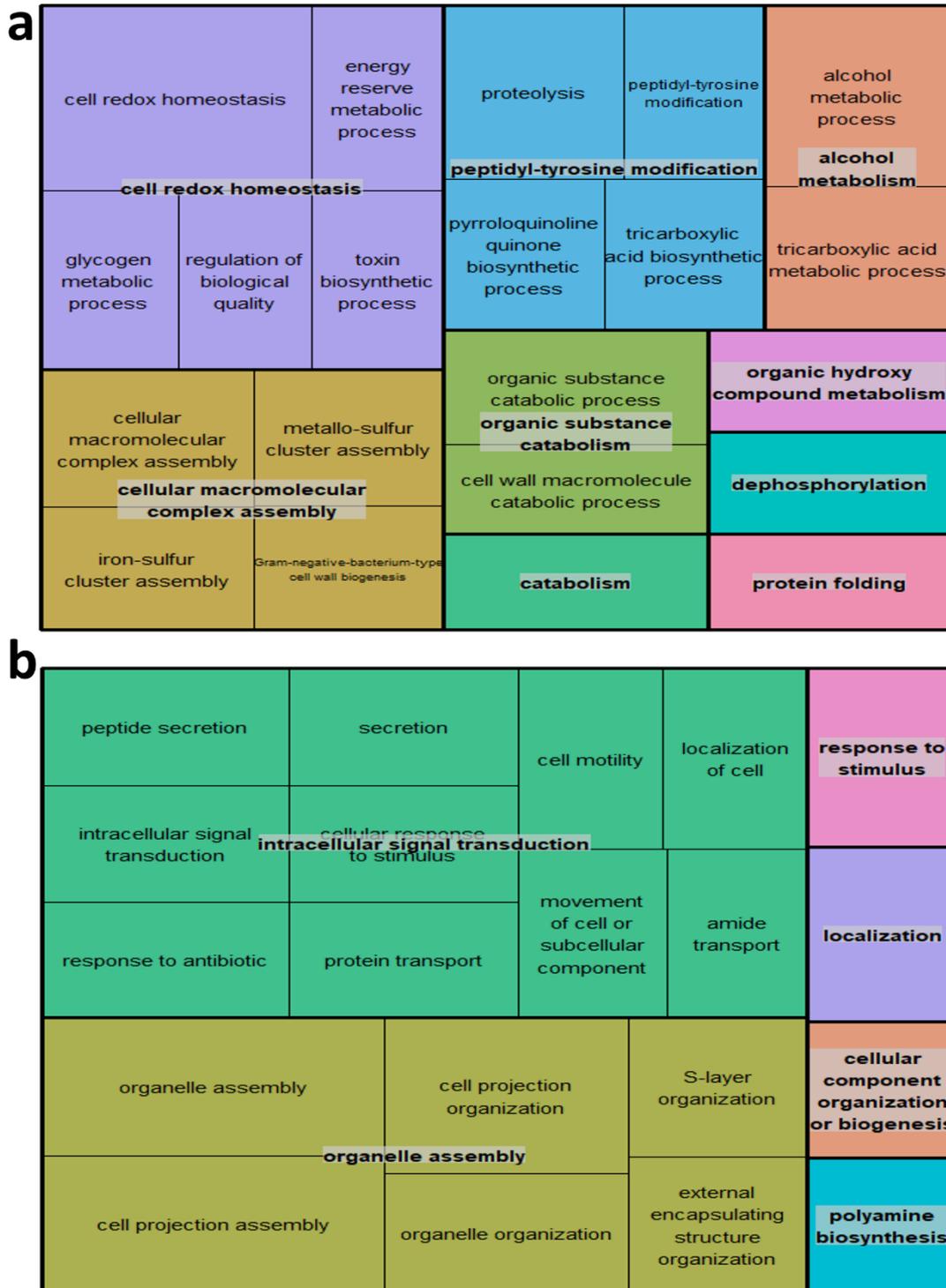


Figura 22. Visualización de términos GO de la comparación de *Azospirillum* crecido en medio PY y crecido en planta. Treemaps de los términos enriquecidos con GO utilizando REVIGO al comparar *Azospirillum* con comunidad en PY contra *Azospirillum* con comunidad cultivada en planta a) Se muestran los genes sobreexpresados b) Se muestran los genes sub expresados.

### 9.5.2 Expresión diferencial de genes de *Bacillus*

Se obtuvieron 363 genes diferencialmente sobreexpresados (Tabla A.11) y 255 genes subexpresados (Tabla A.12). Dentro de los genes que sobre expresó *Bacillus* se encuentran los relacionados con la formación de biopelícula, la motilidad celular, la síntesis de flagelo, estos últimos pudieran servir para moverse hacia el biopelícula. En las bacterias se ha reportado que la formación de biopelículas es una respuesta adaptativa para resistir diferentes tipos de estrés en el medio, como cambios de pH o compuestos bactericidas, [31] (17,24, 36 ). Algunos otros genes involucrados con transportadores de hierro, magnesio y azúcar también se sobreexpresaron. Los genes regulados por disminución codifican principalmente los componentes de los transportadores de tipo ABC y las enzimas para el metabolismo de los carbohidratos, así como muchas proteínas hipotéticas (Figura 24). Las réplicas se visualizaron mediante un MDS plot sin embargo la muestra de *Bacillus* en planta 1 no se agrupó entre sus réplicas, por lo que decidimos quitarla para los siguientes análisis (Figura23).

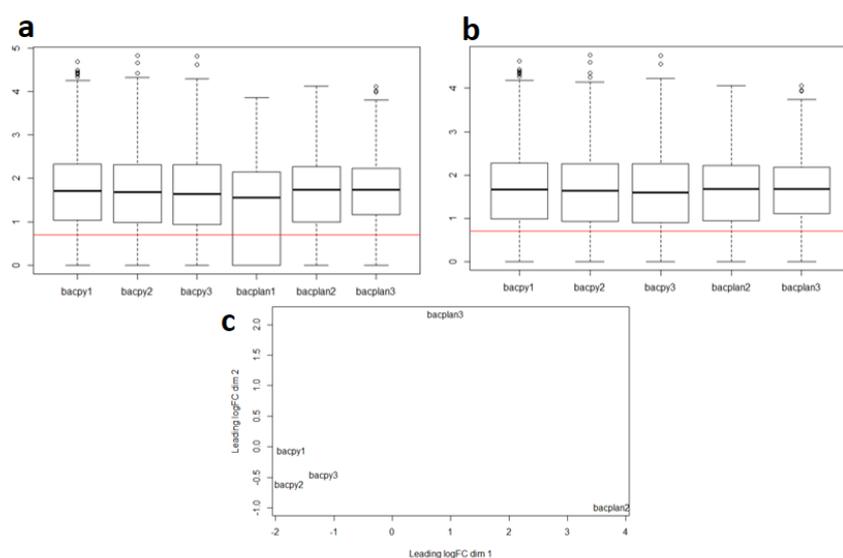


Figura 23. Correlación entre las muestras de *Bacillus*. a) Boxplot de las diferentes réplicas de *Bacillus*, las primeras 3 corresponden al tratamiento de PY y las últimas al tratamiento de planta. b) Boxplot de las réplicas de bacillus sin la réplica 1 del tratamiento de planta. c) MDS plot de las muestras de bacillus en PY y en planta (sin réplica 1).

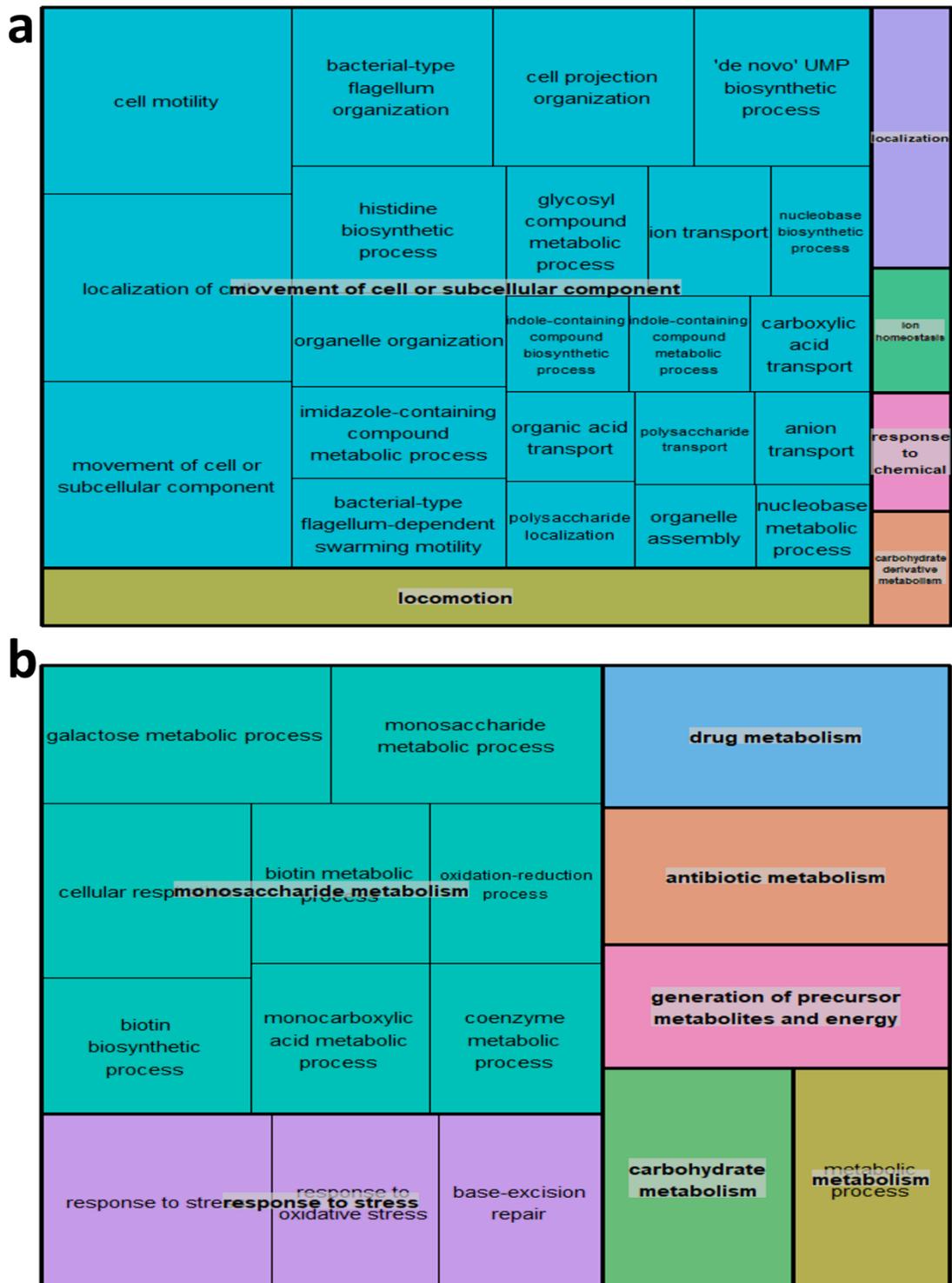


Figura 24. Visualización de términos GO de la comparación de *Bacillus* crecido en medio PY y en planta. Treemaps de los términos enriquecidos con GO utilizando REVIGO al comparar *Bacillus* con comunidad en PY contra *Bacillus* con comunidad cultivada en planta a) Se muestran los genes sobreexpresados b) Se muestran los genes subexpresados.

### 9.5.3 Expresión diferencial de genes de *Methylobacterium*

Se obtuvieron 104 genes sobreexpresados (Tabla A.13) y dos genes subexpresados (Tabla A.14). Dentro de los genes regulados a la alta, tenemos los involucrados con procesos biosintéticos celulares, procesos biosintéticos de compuestos orgánicos, síntesis de proteína entre otros genes involucrados en el metabolismo de *Methylobacterium* [38]. Dentro de los genes regulados a la baja, tenemos los involucrados con las biosíntesis de valina (Figura 26). Se ha reportado que la biosíntesis de L-valina en biopelícula inhibe el crecimiento de algunas bacterias como *E.coli* K-12 [77]. Las réplicas se visualizaron mediante un MDS plot, encontrado una buena agrupación entre las réplicas (Figura 25).

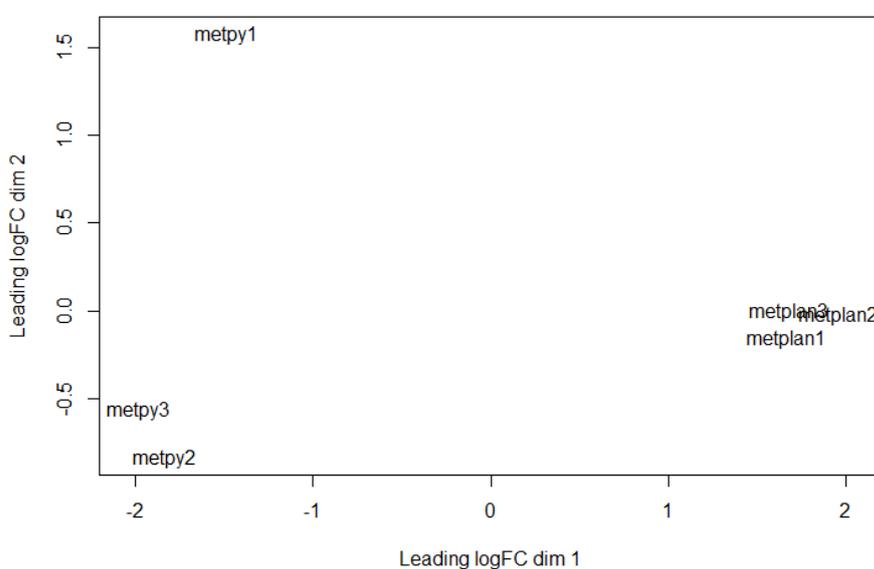


Figura 25. Correlación de las muestras de *Methylobacterium*. MDS plot de las muestras de *Methylobacterium* en PY y en planta.

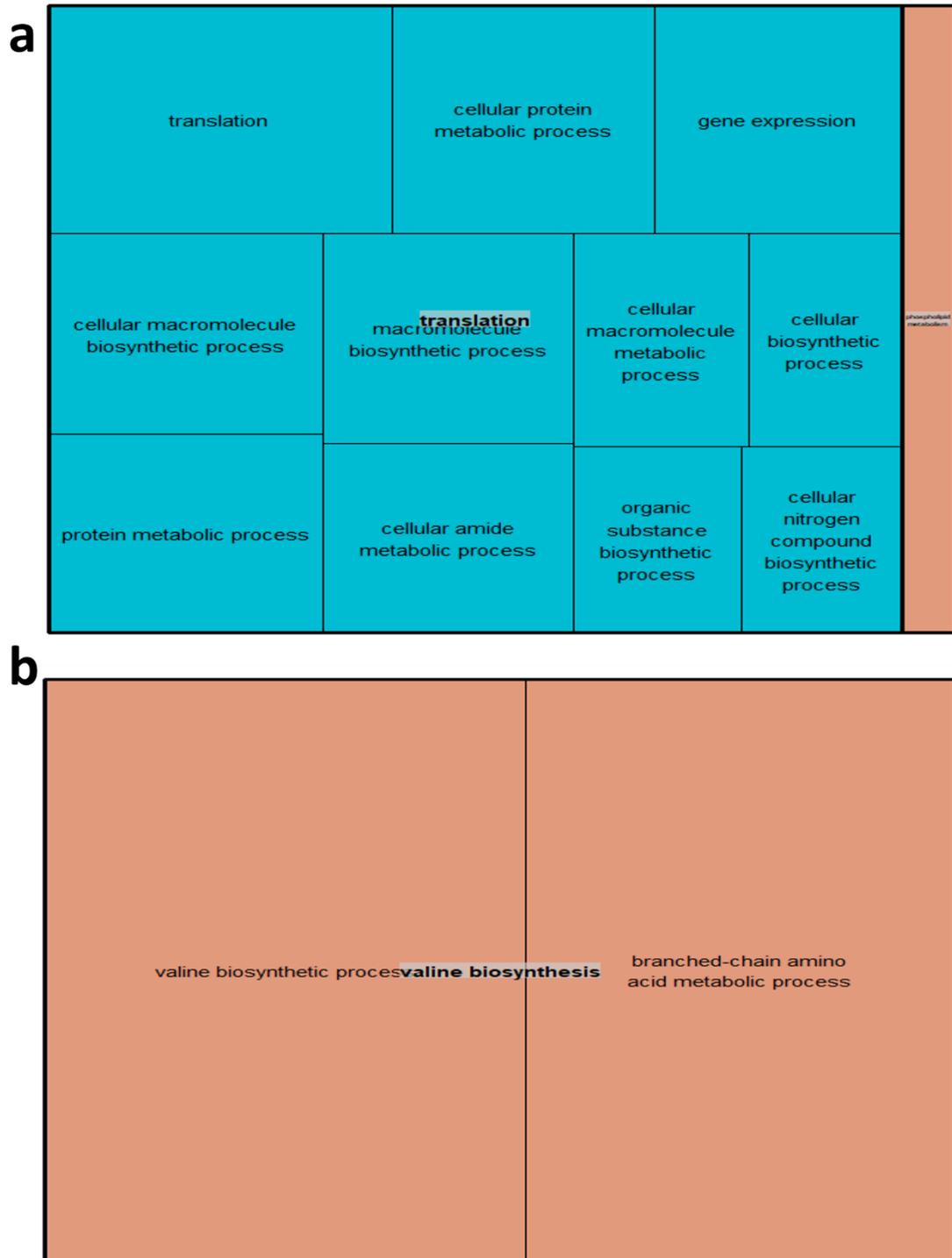


Figura 26. Visualización de términos GO de la comparación de *Methylobacterium* crecido en medio PY y en planta. Treemaps de los términos enriquecidos con GO utilizando REVIGO al comparar *Methylobacterium* con comunidad en PY contra *Methylobacterium* con comunidad cultivada en planta a) Se muestran los genes sobreexpresados b) Se muestran los genes sub expresados.

#### 9.5.4 Expresión diferencial de genes de *Sinorhizobium*

Desafortunadamente no logramos obtener la cantidad de células suficientes, para la expresión diferencial de *Sinorhizobium*, por lo cual en este trabajo no lo discutiremos, y quedará como perspectiva diseñar un método de análisis para recuperar y explotar los datos de *Sinorhizobium*.

#### 9.6. Interacción conjunta del IM para favorecer el crecimiento de plantas de maíz

Finalmente, en este trabajo, proponemos un modelo en el que el IM favorece el crecimiento del maíz. Por un lado, el maíz exuda al medio diferentes compuestos, como aminoácidos, carbohidratos y ácidos orgánicos [30], que se sabe favorecen el crecimiento de las bacterias, que están alrededor, y las bacterias, toman estos elementos del ambiente como fuentes de carbono y energía [22,26,42]. Los exudados, también actúan como moléculas señal para desencadenar la formación de biopelículas en *Bacillus* [20].

Por otro lado, las bacterias importan y exportan al medio diferentes moléculas, como aminoácidos, poliaminas, carbohidratos, que otras bacterias pueden estar tomando para su metabolismo. Cabe señalar que cuando *Rhizobium* se encuentra en la planta expresa genes involucrados en la producción de poliaminas y éstas pueden actuar como inductores del crecimiento en las plantas de maíz [34]. En *Rhizobium*, también encontramos genes involucrados en la producción de sideróforos, que se sabe es otra estrategia para la promoción del crecimiento en las plantas [71]. El hierro es un factor limitante en el crecimiento bacteriano, y es un micro nutriente necesario para el crecimiento de las plantas. En la naturaleza el hierro se encuentra de forma insoluble (Fe III); sin embargo, existen bacterias que tienen la capacidad de producir moléculas como los sideróforos que secuestran moléculas de hierro y las ponen disponibles para las plantas y las bacterias de alrededor, produciendo así un bien público [79].

En *Azospirillum*, los genes relacionados con los transportadores que pudieran permitir que las bacterias tomen compuestos del ambiente producidos por otras bacterias o producidos por la planta se expresaron a niveles altos. También se sobreexpresan los genes implicados con el catabolismo de compuestos

orgánicos, que se han descrito como inductores del crecimiento bacteriano y como potenciadores de la fijación de nitrógeno [26]. Curiosamente, encontramos genes involucrados en la producción de auxinas, que favorecen el crecimiento de las plantas [23], así como genes relacionados con la fijación de nitrógeno, que potencia el efecto promotor del crecimiento de las plantas de maíz. En *Bacillus*, se expresaron los genes involucrados en la producción de biopelículas, lo que favorece la ingesta y el intercambio de nutrientes entre los miembros del IM. Los biopelículas ayudan a enfrentar las condiciones de estrés osmótico, creemos que las biopelículas también pueden actuar como generadores de un entorno de microaerobiosis, lo que favorece la fijación biológica de nitrógeno por parte de *Azospirillum* y, debido a esto, encontramos una mayor fijación de nitrógeno en los ensayos de ARA, cuando se co-inocula *Azospirillum* y *Bacillus* juntos (Figura 27).

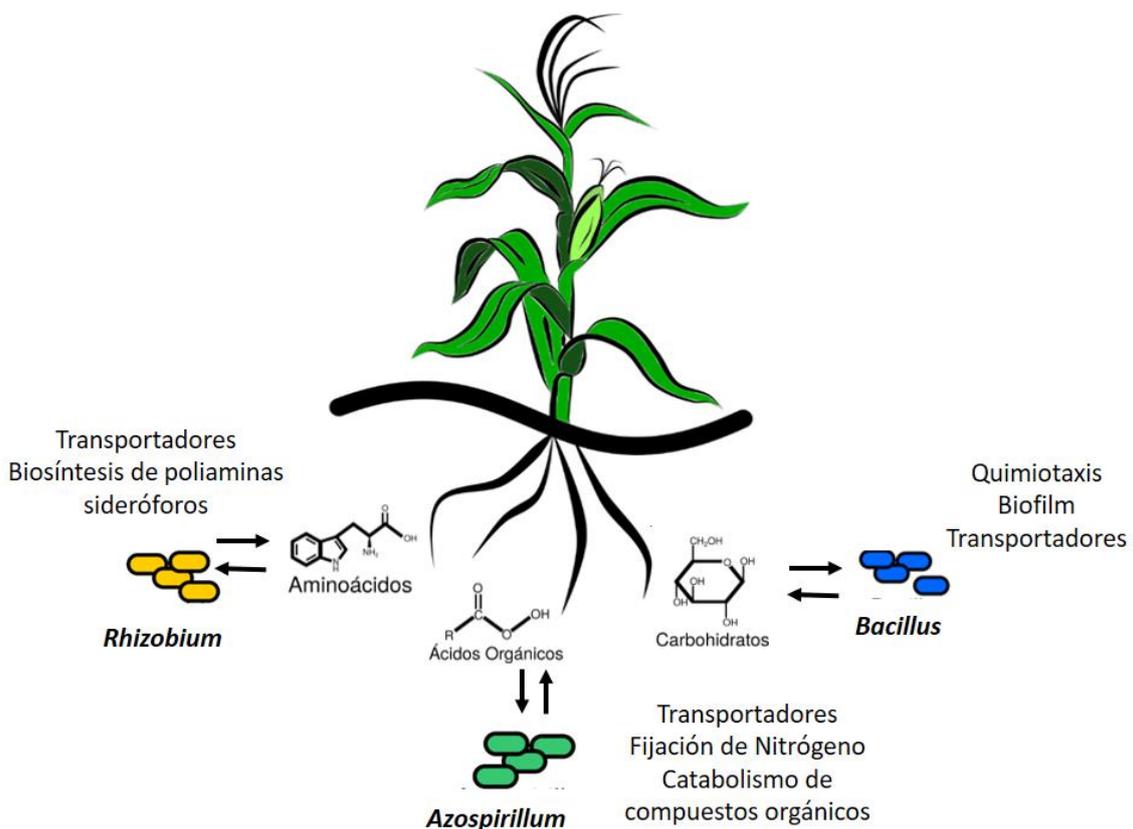


Figura 27. Esquema de interacción entre plantas y bacterias.

## 10. Conclusiones

Se diseñó un IM capaz de crecer sin inhibición de crecimiento entre los integrantes.

Las plantas inoculadas con el IM aumentan significativamente su biomasa, su tasa fotosintética y su fijación biológica de nitrógeno con respecto a las plantas sin inóculo.

La fijación biológica de nitrógeno en el IM es llevada a cabo por *A. brasilense*.

A nivel de expresión transcripcional encontramos muchos genes bacterianos relacionados con el transporte, el metabolismo y el intercambio de nutrientes entre la planta y las bacterias.

Cuando el IM se encuentra en conjunto, se tiene una sobre-expresión de genes implicados en las vías principales de la síntesis de hormonas vegetales, como las auxinas involucradas en el crecimiento de la planta de maíz, y genes implicados en la fijación de nitrógeno.

## 11. Perspectivas

Recuperar mediante diferentes programas los transcritos de *Methylobacterium* y de *Sinorhizobium*.

Analizar una tercera muestra del transcriptoma con el IM en la planta, la cual no se reporta aquí donde *Rhizobium* es más abundante que en las dos muestras analizadas.

Probar diferentes combinaciones eliminando algunos de los integrantes del inóculo para determinar cuál combinación tiene la misma capacidad de promoción de crecimiento y fijación de nitrógeno que el inóculo ensayado originalmente. Esto permitiría diseñar el inóculo mínimo descartando alguna especie que no contribuya.

## 12. Artículo publicado

Derivado del trabajo realizado durante el doctorado, se publicó el siguiente artículo.

Systematic and Applied Microbiology 42 (2019) 517–525

---

Contents lists available at ScienceDirect



# Systematic and Applied Microbiology

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/syapm>



---

## Metatranscriptomics and nitrogen fixation from the rhizoplane of maize plantlets inoculated with a group of PGPRs



Lorena Jacqueline Gómez-Godínez<sup>a</sup>, Selene Lizbeth Fernandez-Valverde<sup>b</sup>,  
Julio Cesar Martinez Romero<sup>a</sup>, Esperanza Martínez-Romero<sup>a,4</sup>

<sup>a</sup> Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México Campus Morelia, Av. Universidad 1001, Col. Chantitas, 62210 Carriacana, Morelia, Mexico  
<sup>b</sup> CONAOT, Unidad de Genética Avanzada, Laboratorio Nacional de Genética para la Biodiversidad (LARGEBIO), Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del IPN, Inapuate, Cuernavaca, Mexico

---

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 14 March 2019  
Received in revised form 16 May 2019  
Accepted 17 May 2019

**Keywords:**  
Biological nitrogen fixation  
Azospirillum  
Rhizobium  
Bacillus

### ABSTRACT

Plant roots are inhabited by a large diversity of microbes, some of which are beneficial for the growth of plants and known as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). In this work, we designed a multispecies inoculum of PGPRs containing *Rhizobium phaseoli*, *Sinorhizobium americanum* and *Azospirillum brasilense* nitrogen-fixing strains and other plant-growth promoting bacteria such as *Bacillus amyloquelificans* and *Methylobacterium extorquens*. We evaluated the effect of this group of bacteria on the growth of one-month-old maize plants. The multispecies inoculum exerted a beneficial effect on maize plants that was greater than that obtained with single-bacteria. Using the same multispecies inoculum, acetylene reduction was recorded in 5-day-old roots indicating active nitrogen fixation by bacteria in maize. *Azospirillum* nitrogen fixation was lower than that obtained with the multispecies inoculum. We focused on the analysis of *R. phaseoli* gene expression in presence of other PGPRs. Many *R. phaseoli* up-regulated genes in roots in the presence of other bacteria are hypothetical, showing our poor knowledge of bacteria-bacteria interactions. Other genes indicated bacterial nutrient competition and *R. phaseoli* stress. Differentially expressed transcriptional regulators were identified that may be key in bacteria-bacteria interaction regulation. Additionally, gene expression was analyzed from *Azospirillum* but not from *sinorhizobia* and *methylobacteria* due to the low number of transcripts obtained from maize roots. The metatranscriptomic analysis from maize roots showed expression of *Azospirillum* *nf* genes in the presence of PGPR bacteria. Our hypothesis is that other bacteria stimulate *Azospirillum* capacity to fix nitrogen and this should be further explored.

© 2019 Elsevier GmbH. All rights reserved.

---

### Introduction

In nature and agricultural fields there is a great diversity of bacteria associated with plants. Many plant-borne bacterial isolates when individually tested in plant trials are able to promote plant growth [20,26,27,33,38,41,42]. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) can produce phytohormones or volatile substances, solubilize nutrients, fix nitrogen or inhibit pests and pathogens. Among them, nitrogen-fixing bacteria are in general a minority, possibly due to the metabolic load of nitrogen fixation [2,37,46].

Most trials with PGPRs are carried out with plants inoculated with a single species. However, considering that different bacterial species co-exist in soil and plants, recent inoculation trials have made use of more than single strains, and combinations of *Azospirillum* and rhizobia, or bacilli and rhizobia have been successful in plant-growth promotion [3,59,66,85]. The inoculation of *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* improves nodulation and nitrogen fixation in legumes such as soybeans [40] and, in chickpeas a combined inoculation with *Mesorhizobium*, *Pseudomonas* and the fungus *Piriformospora indica* increased dry weight of plants by 31% [57]. Similarly, the co-inoculation of *Azospirillum* with rhizobacteria increased corn grain production [60] and the co-inoculation of *Azospirillum brasilense* Az 39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109 improved growth and yield of soybean exposed to arsenic [11].

Among the PGPRs, *Azospirillum* deserves special attention. It was one of the first diazotrophs isolated from non-legumes [75,78]. A

---

**Abbreviations:** PGPR, plant growth promoting rhizobacteria; MI, multispecies inoculum; MCPs, methyl-accepting chemotaxis proteins.  
<sup>\*</sup> Corresponding author.  
E-mail address: [emartinez@ccg.unam.mx](mailto:emartinez@ccg.unam.mx) (E. Martínez-Romero).

<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.05.003>  
0223-2020/© 2019 Elsevier GmbH. All rights reserved.

global analysis of 30 years of *Azospirillum* inoculation trials in agricultural crops, including corn, showed an average increase in yield of 10–30% [60]. In a controlled trial under water stress, *Azospirillum* in maize plants increased the number of shoots by 10% and the height of the plant by 7% [13]. Given its plant growth promoting properties, *Azospirillum* is now widely used as a commercial product. Three different enzymatic routes have been described to produce auxins in *Azospirillum* [72,75], and mutants that overproduce auxins are more efficient at promoting plant growth [31]. Thus, the production of auxins by *Azospirillum* is considered the main mechanism of plant growth promotion [20,72].

*Bacillus* is considered a PGPR as it has also been reported to improve plant growth [24,76,83], and produce auxins [43] as well as many antibiotics [7]. *Bacillus* is also known to increase corn plant resistance against drought [82], and osmotic stress [25]; as well as to increase plant biomass, relative water content and water potential of the leaf [82]. A great diversity of bacilli has been found in the roots of maize [64], and of *Phaseolus vulgaris* [55]. As *P. vulgaris* and maize are grown as associated crops [62], they presumably share similar root microbiomes, including *Bacillus* symbionts which have been found also to be seed-borne [50].

Methylobacteria are found in many plants in roots, leaves and stems [71], and are capable of producing cytokinins and metabolizing the methanol produced as a secondary product during plant wall synthesis [47]. Furthermore, they are known to promote growth in plants and mosses [47]. *Methylobacterium extorquens* is a bacterium with high potential to promote the growth of corn and other crops such as wheat, tomatoes, strawberries and tobacco [1]. *Methylobacterium* has also been shown to help maize plants cope with salinity conditions (150 mM NaCl) [45].

Rhizobia are the best-studied plant symbionts and have been used in agriculture for over 120 years. They are used in commercial inoculants for a variety of crops, especially soybeans [79]. Rhizobia form nodules and fix nitrogen. In nodules, rhizobia can fix more than 250 kg of N per ha per year, which is equivalent to a substantial chemical fertilization. In addition, rhizobia can colonize the rhizospheres of many plants and the internal tissues of non-legumes [45,79]. Rhizobia can exert beneficial effects on non-legume plants similar to those triggered by other PGPRs. *nif* genes necessary for the free-living nitrogen fixation were found in *Sinorhizobium* [28], suggesting that *Sinorhizobium* could be a candidate for nitrogen fixation in non-legumes.

Due to worldwide cereal consumption, the identification of mechanisms to increase yield and to reduce the cost of crop production is an active area of research. Cereals require large amounts of expensive nitrogenous chemical fertilizers resulting in a considerable cost to farmers [70]. Thus, the identification of methods or organisms that allow nitrogen fixation would be of benefit to the cereal farming industry [29], and would potentially reduce the impact of fertilizers on the environment.

Bacterial genes of *Bacillus* [84], *Azospirillum* [17], *Sinorhizobium* [51] and *Rhizobium* [86] have been shown to be differentially regulated when inoculated onto plants in trials of a single strain. Specifically, *Bacillus* grown in maize exudates showed increased expression of genes for nutrient utilization, synthesis of antimicrobial peptides, chemotaxis, motility [34] and biofilm formation [87]. *A. brasilense* showed increased expression of genes involved in biofilm formation, chemotaxis and nitrogen fixation (*nif* genes) in wheat roots [17]. In rice roots, *Azospirillum lipoferum* expressed genes related to detoxification of ROS and multidrug flow pumps, however, *nif* genes were not induced [32]. An antioxidant response has also been described in *Methylobacterium* when exposed to exudates from the soybean root [10]. In *Rhizobium phaseoli*, genes expressed in roots are involved in exudate transport and in the defense to plant phytoalexins [54].

In addition to changes in response to roots and exudates, bacterial gene expression can be further altered in the presence of other root bacteria [50]. Bacteria-bacteria interactions in roots have been rarely characterized by functional genomics. Since *R. phaseoli* is our main research interest, we focused on the analysis of its gene expression with the aim to detect genes that are expressed in the presence of PGPRs by using a metatranscriptomic study with native Mexican maize.

## Materials and methods

### Strains and bacterial cultures

*R. phaseoli* Ch24-10 was isolated from three-month-old corn plants in Cholula, Puebla. This strain was the most competitive corn endophyte in inoculation experiments [68]. *A. brasilense* Sp7 was isolated from *Digitaria decumbens* and proved to promote maize, rice and wheat growth in different assays [32,78]. *Bacillus amyloliquefaciens* CCGE2031 is an endophytic bacterium of *P. vulgaris* [55]. *M. extorquens* bacteria are common leaf epiphytes and capable of colonizing different plants, *M. extorquens* AM1 is one of the most studied methylobacterial strains and was kindly provided by ME Lidstrom, University of Washington, USA [9]. *Sinorhizobium americanum* CFNE156 was isolated from *Acacia* nodules [80] and promotes *Acacia* plant growth [21].

### Multispecies culture in PY medium and RNA extraction

Multibacterial cultures were started by inoculating 30 ml (final volume) of PY medium with *R. phaseoli* Ch24-10, *A. brasilense* Sp7, *M. extorquens* AM1, *B. amyloliquefaciens* CCGE2031 and *S. americanum* CFNE156. *R. phaseoli* Ch24-10 (single-strain) culture had an initial bacterial concentration of  $5 \times 10^8$  in 30 ml of liquid PY. All treatments were in triplicate. After 24 h, RNAlater (Ambion) was added to attain a 10% final concentration, samples were centrifuged for 15 min at 464 g at 4 °C to obtain a bacterial pellet from which total RNA was extracted (Fig. S1). RNA extraction was performed using the Qiagen protocol [65]. RNA obtained was quantified by Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). The integrity of the total RNA was verified by electrophoresis in 1% agarose gels as well as by Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

### Germination, inoculation and growth of one month plants

Creole black seeds from Hidalgo, Mexico, were superficially disinfected as described [68]. Disinfected seeds were germinated on agar-water plates in the dark for 48 h at 30 °C, and subsequently transplanted into flasks with sterile vermiculite, one seed per flask. Plants were inoculated with 1 ml of culture with  $10^8$  cells mL<sup>-1</sup> of each bacterium, individual inoculants were used with each of the bacteria separately: *R. phaseoli* Ch24-10, *A. brasilense* Sp7, *M. extorquens* AM1, *B. amyloliquefaciens* CCGE2031 and *S. americanum* CFNE156. Maize plants were inoculated as well with all bacteria together (referred to as multispecies inoculum or MI). Non-inoculated plants were negative controls. Plants were watered once a week with nitrogen-free Fahraeus solution (0.132 g/L CaCl<sub>2</sub>, 0.12 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.075 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 5 mg/L Fe-citrate and 0.07 mg/L each of MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, ZnCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub> and Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) [36], adjusted to pH 7.5 before autoclaving, alternating with sterile deionized water. Plants were maintained at 28 °C with a light/dark period of 12 h. Thirty days after inoculation, shoot fresh and dry weight and chlorophyll content were measured (with the portable LI-6400XT photosynthetic systems) [48]. Data obtained from plant length, dry weight and chlorophyll content were analyzed with ANOVA variance and the Tukey comparison tests ( $p = 0.05$ ) (Fig. 1).

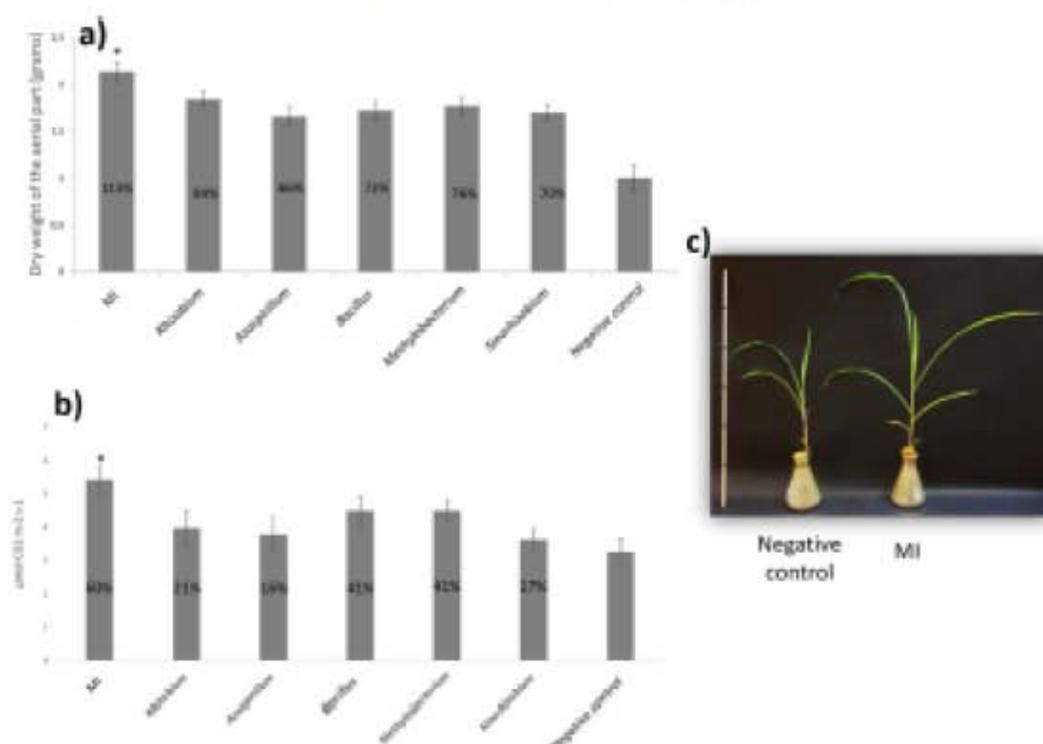


Fig. 1. (a) Average dry weight of ten shoots from thirty day-old plants inoculated with the multispecies inoculum or single strains, negative controls were non-inoculated plants; (b) Average photosynthetic rate of ten leaves from thirty day-old plants inoculated with the multispecies inoculum or single strains. Numbers within the bars are differences in percentage compared to the negative control. Asterisks indicate treatments that showed statistical significant differences obtained with the Tukey test ( $p$  value < 0.05). Lines represent  $\pm$  standard deviation (SD). (c) Maize non-inoculated plant (negative control) and a plant colonized with MI 30 days after inoculation.

#### ARA assay to determine nitrogen fixation in maize plantlets five days post-inoculation

Corn seeds were disinfected, germinated and maintained in hydroponic and axenic conditions. The disinfected seedlings were transferred to glass tubes (one per tube). Seedlings were inoculated with  $1 \times 10^8$  bacteria resuspended in Fahraeus medium. Ten technical replicates were used per treatment, which consisted of inoculating each of the individual bacteria (*R. phaseoli* Ch24-10, *A. brasilense* sp7, *M. extorquens* AM1, *B. amyloliquefaciens* CCGE2031 and *S. americanum* CFNEI 156). Ten maize plants were also inoculated with the MI that contained  $10^8$  bacterial cells of each species. Positive control plants were inoculated with *Klebsiella variicola* [69] and negative control plants were not inoculated. Plants were kept for five days at 28 °C with a light/dark period of 12 h. Under those conditions plants fitted well in the containers without showing stress symptoms [54].

Nitrogenase activity was estimated by an acetylene reduction assay with ten roots per treatment, as described [74]. After five days, 5 g of roots (by treatment) were cut and sealed in 70 ml vials, one ml of air with acetylene and vials were incubated at room temperature. After 24 h, 1 ml of gas was removed from each vial and analyzed by gas chromatography to measure the ethylene concentration. The specific activity was expressed as nmol ethylene  $\text{min}^{-1} \text{vol}^{-1}$ . ANOVA and the Tukey comparison test ( $p < 0.05$ ) were used to analyze variance.

#### RNA extraction from plant rhizoplane, construction of the RNA-seq library and sequencing

For RNA extraction, plants were grown under hydroponic and axenic conditions as described above. Disinfected seedlings were transferred to glass tubes (one seedling per tube) containing 10 ml of Fahraeus medium. Plants were inoculated with  $1 \times 10^8$  bacteria for single inoculant trials while controls were without inoculant. Plants for the MI assay were inoculated with  $10^8$  cells from each species. Plants were kept at 28 °C with a light/dark period of 12 h.

Five days after inoculation, fifty rootlets were placed in 50 ml of  $\text{MgSO}_4$  (10 mM) with 5 ml of RNAlater stabilization solution (Ambion) and bacteria were detached from roots using an ultrasonic cleaner by the indirect method for 20 min. The liquid was filtered with miracloth (pore size 22–25  $\mu\text{m}$ ) to remove plant debris and bacteria were recovered by centrifugation (464 g, 15 min, 4 °C). The cell pellet was resuspended in RNAlater solution. Total RNA was extracted as in [15] using a QIAGEN RNeasy Mini Kit (50) and treated with DNase (QIAGEN) following the manufacturer's instructions. RNA high-throughput sequencing was performed in the Genomics and Bioinformatics Service of Texas A&M AgriLife. rRNA was eliminated using the Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Bacteria) Protocol (Illumina). Sequencing libraries were prepared using the TruSeq Stranded protocol (Illumina) and sequenced with the Illumina HiSeq 2500 platform (125 nt paired-end reads) (Fig. S1).

In total, twelve libraries were sequenced: Six from PY media (three of *Rhizobium* alone, and three of the MI) and six from plants

(three of *Rhizobium* alone, and three of the MI, (Fig. S1). The raw sequencing data is available at NCBI's Sequence Read Archive (SRA), under bioproject number PRJNA490163.

#### Data analysis

The raw sequencing data were scanned for adapters and the quality was evaluated using FASTQC (v0.11.2) [8]. Sequencing adapters and low quality sequences were filtered using Trimmomatic (v0.38) [14] with the following parameters: 'ILLUMINA: Adapter.fasta: 2:30:7 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:50'. Sequencing paired end reads were aligned to a composite fasta file containing the full genomes of all members of the community (versions NZ\_CM003278.1 *R. phaseoli* Ch24-10 plasmid pRphCh2410a, whole genome shotgun sequence, NC\_CP012914.1 *A. brasilense* strain Sp7, complete sequence, NC\_014551.1 *R. amylophilum* DSM7 complete genome, NC\_012808.1 *M. extorquens* AM1, complete genome, NODE\_1\_length\_380726\_cov\_117871\_ID\_2128270, downloaded from NCBI) as well as the latest version of the genome of *Zea mays* (version NC\_024450.2 *Zea mays* cultivar B73 chromosome 1, B73 RefGen\_v4, whole genome shotgun sequence, downloaded from NCBI) using Bowtie2 (v2.1.0) [49], with the following parameters: 'sensitive -rg 1000,1000 -rfg 1000,1000 1 -20'. Any single paired-end read was only considered as being transcribed from a specific genome if both ends of each fragment aligned to the same genome. Only uniquely mapping paired-end reads were used for quantification. Gene abundance was quantified using featureCounts from the Subread package (v1.6.2) [52] using the following parameters: '-T 8 -p -a -t CDS -g ID -o.'. Genes that did not have at least one count per million (cpm) in at least one sample were removed from subsequent analyses (Fig. S2).

The R package, edgeR (v. Bioconductor 3.7 v.R 3.5.1 v.edgeR\_3.22.5 [67]), was used to estimate differential gene expression, considering that a gene was differentially expressed if it had an FDR < 0.05. Functional annotation was performed with Trinotate (v3.0.1), and GO term enrichment analysis was performed with the topGO R package (v2.32.0) [5] using a classic Fisher's test and establishing an enrichment threshold of  $p$  value < 0.05 (Fig. S2).

## Results

### Multispecies inoculum improves corn growth

We compared plants grown for 30 days with a single bacterial strain or with the MI (see methods). The weight of the aerial part of the plants and chlorophyll content were significantly larger in plants inoculated with the MI than those of plants inoculated with a single bacterial strain (Fig. 1). Using the same multispecies inoculum, at five days in hydroponics we detected acetylene reduction activity which was detected as well from roots inoculated with *Azospirillum* or *Klebsiella* (used as a positive control) (Fig. 2). The metatranscriptomic analysis was carried out with maize plants five days after inoculation (see below).

### Differential gene expression in *R. phaseoli* Ch24-10 in corn plants

We carried out a metatranscriptomic analysis of bacteria in free-living conditions (in culture PY medium) and in maize roots. Each sample had three biological replicates (Fig. S1). We obtained on average 40 million reads per sample that after quality filtering were mapped to reference genomes. The Spearman correlation coefficient of the read counts for the inoculated libraries of *R. phaseoli* alone and *R. phaseoli* in the MI was 0.90 on average, indicating high reproducibility between biological replicates (Fig. S3).

When we compared samples of *R. phaseoli* Ch24-10 from PY medium and plants, 730 genes were found to be significantly up-regulated ( $\log_2$  fold-change > 1 and FDR  $\leq$  0.05) (Dataset S1) and 376 genes were significantly down-regulated (Dataset S2). Genes up-regulated in *R. phaseoli* in the presence of roots encoded transporters for putrescine, urea or cations (Dataset S1). Genes related to nitrogen fixation NifX and NifZ, nitrogenase cofactor biosynthesis protein NifB, and the nitrogenase stabilization protein NifW (Fig. 3) and cellular respiration were also found to be up-regulated in *R. phaseoli* including the genes encoding the FixP subunit of the type T cbb3 cytochrome c oxidase, the CcoS assembly protein of cytochrome oxidase type cbb3, cytochrome b, cytochrome c and cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I.

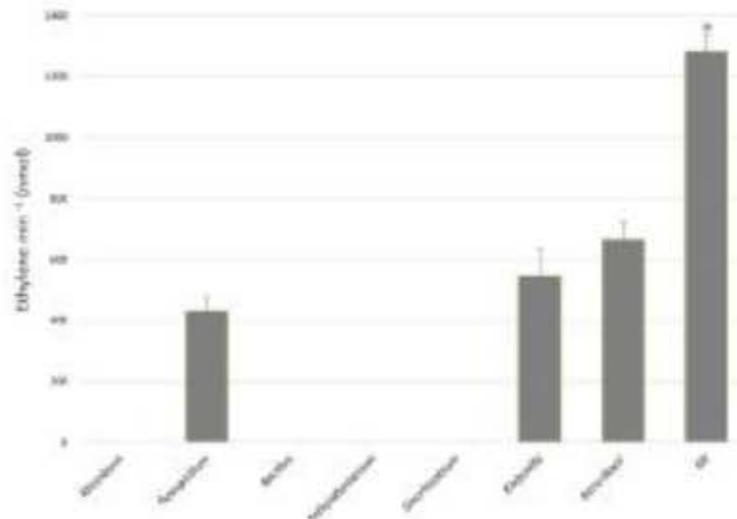
Within the genes that were significantly down-regulated (when comparing *R. phaseoli* Ch24-10 grown in PY versus plants), were those encoding chemotaxis proteins CheR and CheW and the regulator of the chemotactic protein-glutamate methyltransferase response or CheB. Down-regulated genes for flagella were those encoding the basal body protein (FliL), the basal rod proteins (FliC and FliG), the hook-basal protein complex (FlhE), the motor switch protein FlhN, flagellin, flagellin protein C, the regulator of flagellin synthesis and the repressor of flagellum biosynthesis (FlhT) (Dataset S2).

A particular relevant comparison was the one considering *R. phaseoli* Ch24-10 versus *R. phaseoli* Ch24-10 within the MI, both in roots that allowed us to identify genes expressed in the presence of other bacteria. Specifically, we found 110 genes to be up-regulated (Dataset S3) and 53 genes down-regulated (Dataset S4). Genes that increased their expression included those for transport which encode an ATP binding protein, sugar ABC transporter permease, sugar ABC transporter substrate binding protein, MFS transporter, ABC peptide transporter, ATP binding protein of the sugar ABC transporter and many hypothetical genes [53], (Dataset S3).

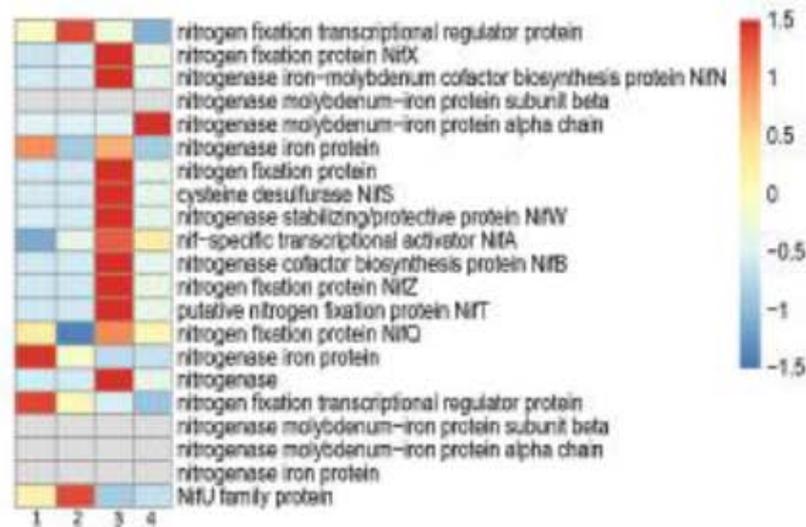
Notably, when *Rhizobium* is the only bacterial inoculant in maize roots, its machinery for nitrogen fixation and respiration was expressed (Fig. 3), while when *Rhizobium* is inoculated as part of the MI community, its nitrogen fixation machinery is repressed. Genes down-regulated in *R. phaseoli* in the MI in roots were those encoding the flavoprotein subunit of electron transfer proteins of the alpha/FixB family, as well as the nitrogen fixation protein NifZ, nitrogenase cofactor biosynthesis protein NifB, and nitrogenase, iron-molybdenum co-factor biosynthesis protein NifN (Dataset S4).

### *Azospirillum* differential gene expression

When we compared *Azospirillum* genes expressed from the MI in plants to MI in PY, we found that *Azospirillum* in roots of corn over-expressed 1147 genes (Dataset 5) and 1376 genes were down-regulated (Dataset 6). Among the over-expressed genes, we found those involved with ABC type transporters and carbohydrate ABC transporter permease. Some of the notable over-expressed genes are for toxin biosynthesis, such as the HicB toxin-antitoxin system. The toxins of all known TA systems are proteins, while the antitoxins are proteins or small RNAs (sRNAs). The TA systems act on crucial cellular processes that include translation, replication, cytoskeleton formation, membrane integrity and cell wall biosynthesis [81]. Other up-regulated genes are those involved in nitrogen fixation, like Fe-S cluster assembly family protein NifU, nitrogen fixation proteins NifZ, NifW, and NifJ family protein (Fig. 4). These proteins are responsible for carrying out biological nitrogen fixation in free-living conditions. Also over-expressed were genes for the production of auxins such as indolepyruvate/phenylpyruvate decarboxylase, indole-3-glycerol phosphate synthase (TrpC), which would have a role in plant-growth promotion [73]. Within the genes that were down-regulated in *Azospirillum* from plants, we found those involved with chemo-



**Fig. 2.** Ethylene produced in maize roots by the acetylene reduction assay (ARA) using different single species, the MI and *Klebsiella* positive control. *Azospirillum* + *Bacillus* was the combination of *Azospirillum* plus *Bacillus*. The asterisk shows the statistically significant treatment obtained with the Tukey test ( $p$  value < 0.05). Lines indicate  $\pm$  standard deviation (SD).



**Fig. 3.** Fold change of *nif* gene expression in different comparisons. Columns (1) *R. phaseolii* in the multiplexed inoculum (MI) in PY to *R. phaseolii* in PY; (2) *R. phaseolii* in MI in plant to *R. phaseolii* in plant; (3) *R. phaseolii* in plant to *R. phaseolii* in PY; (4) *R. phaseolii* in MI in plant to *R. phaseolii* in MI in PY.

axis and flagellar assembly, and some transcriptional factors such as *GntR*, *TeiR/AcrR*, *XRE*, *Fix*, *LysR*, and *ArgP*.

#### *Bacillus* differential gene expression

When analyzing *Bacillus* transcripts from MI in maize roots, we found 362 over-expressed genes (Dataset 7) and 254 sub-expressed genes in comparison to *Bacillus* in MI in PY medium (Dataset 8). Many of the over-expressed genes are involved with cell motility, flagellum synthesis, biofilm formation [16,23,34]. Genes for iron, magnesium and sugar transporters were also over-expressed. Down-regulated genes mainly encoded components of ABC type

transporters and enzymes for carbohydrate metabolism, as well as many hypothetical proteins.

#### Discussion

Although it is known that microorganisms favor the growth of crops, less is known about the interactions between microbes in plants and how this influences plant growth promoting properties [3,4,19,20,57,66,72]. Notably, we found that plants with not available fixed-nitrogen and inoculated with MI were significantly larger than plants inoculated with a single species or non-inoculated plants. The transcriptome results showed that *Azospirillum* is the main nitrogen-fixing bacterium in the MI in roots as *Azospirillum nif*



**Fig. 4.** Fold change of *Azospirillum nif* genes expressed in the presence of other bacteria either in PY medium or in plant. (1) *Azospirillum* in MI in PY, compared to *Azospirillum* in MI in plant (2) in MI in plant, compared to *Azospirillum* in MI in PY. Down-regulated genes are in blue, in red up-regulated. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

genes were found highly expressed. In congruence acetylene reduction was detected in maize plants inoculated only with *Azospirillum*.

The few reads assigned to *Methylobacterium* and *Shorhizobium* precluded a differential expression study to be performed for these bacteria (Fig. S4). In roots with the MI, most transcript-reads corresponded to *Azospirillum* and in one plant *Rhizobium* transcripts (not analyzed here) were as abundant as those from *Azospirillum* (Fig. S4), suggesting that these bacteria were successful maize-root colonizers in one-month-old plants. We also tested an inoculum of *Azospirillum* and *Bacillus* in hydroponics as *Bacillus* transcripts were abundant in MI in PY, but this double inoculant did not attain the nitrogen fixation levels obtained with the MI (Fig. 2). Thus, it seems plausible that the community as a whole provides suitable conditions for *Azospirillum* to fix nitrogen. Additional plant growth promotion tests using bacterial mixtures eliminating one by one the bacterial members of the MI would help to determine the minimum number of strains to achieve maximum nitrogen fixation in maize. Biofilm formation induced in *Bacillus* by root exudates [22] and *Azospirillum* forming aggregates [41], may provide favorable nitrogen-fixing conditions by protecting bacteria from oxygen. Bacteria in the MI may help to maintain low oxygen conditions or may provide nutrients that stimulate *Azospirillum* nitrogen fixation. There are examples of metabolic complementation that can occur between different symbiotic species in laboratory assays [58]. The functional synergism that can lead to the promotion of growth by the community tested on the roots may reflect long term bacterial interactions in the rhizosphere [36].

Nitrogen fixation is a key service in the ecology of plants, but it is an energy-expensive process. Therefore, diazotrophs are usually a minority among bacterial communities in plants [61], and nitrogen fixation is a tightly regulated process that is deactivated when fixed nitrogen is available. Here fixed nitrogen (which would inhibit nitrogen fixation) was not added to the Fahraeus solution and mainly root exudates (which contain sugars, organic acids, amino acids and vitamins) would support bacterial growth. Nitro-

gen fixation would support plant and bacterial growth. It is known that corn exudates contain carbohydrates, amino acids and organic acids that serve as carbon sources for bacteria in the rhizosphere [18]. Van Deynze et al. reported that biological nitrogen fixation was observed by adding corn mucilage to two nitrogen-fixing bacteria, *Herbaspirillum* and *Azospirillum* [30]. Notably wheat plants that have the capacity to excrete large amounts of organic acids showed increased nitrogen fixation [26], indicating that some substances from root exudates are favorable for nitrogen fixation. The selection of crop plants that overproduce them would allow increased nitrogen fixation in agriculture.

To promote nitrogen fixation, we included three different diazotrophs in the bacterial corn inoculant. In the single-species inoculation trial, our results confirmed previous experiments showing growth promotion in maize plants with *R. phaseoli* [22,70]. In previous studies to identify diazotrophs in non-legume roots with a culture-independent approach, *nif* genes of *Rhizobium* were found expressed in rice and sugar cane [35], suggesting that nitrogen fixation by rhizobia occurred in non-legume plants [44]. We showed here that *R. phaseoli* turned on its *nif* gene machinery on maize roots, in addition *Rhizobium* expressed bacterial respiration genes which are directly related to the supply of ATP necessary to provide enough energy for nitrogen fixation to take place. Nitrogen-fixing bacteria use *cbb3*-type oxidases encoded by the *fixNOQP* operon and this was also expressed [88,56]. Although *Rhizobium* nitrogen fixation genes were expressed, no acetylene reduction was detected in these bacteria associated with the plants even when they were inoculated as single species. Clearly, there are other elements that are provided by the nodule that are necessary for *Rhizobium* to fix nitrogen or the ARA assay is not sensitive enough to detect low levels of nitrogen fixation.

Exudates, mucilage and border cells are nutrient providers that support bacterial growth on roots. When in presence of other bacteria, *R. phaseoli* seemingly has to compete for root nutrients and showed enhanced expression of transporters which could serve to

uptake sugars and other molecules [53], (Dataset 1 and 3). Iron competition seems to occur under those conditions as genes for iron uptake were upregulated in *R. phaseoli* as well.

The osmolality of a typical soil water has been estimated as less than 50 mOsm/kg [61]. Rapid bacterial adaptation to increased osmolality would facilitate rhizosphere colonization [61]. Genes to tolerate hyperosmolar conditions were found expressed in *Azospirillum* sp. B510, *Burkholderia phytofirmans* PsJN, *Methylobacterium populi* BJ001, and *Pseudomonas putida* W619 when associated with different plants [63]. We had previously detected the expression of *R. phaseoli* genes for osmotolerance in corn roots [54] and in the presence of other bacteria, this stress seems to be accentuated. An ectoine biosynthetic gene was found up-regulated and ectoine has a role in protection from osmotic stress in rhizobia [77] and may inhibit melanin production [87]. Additional evidence that *R. phaseoli* is encountering stress (in the presence of other bacteria) is its upregulation of universal stress protein, oxygenases, and oxidases. *R. phaseoli* produces melanin in nodules and *in vitro* with added tryptophan and copper. The *R. phaseoli* genes overexpressed related to spermidine and melanin synthesis would be indicative of their bacterial production in roots in the presence of other bacteria. Transcripts for melanin synthesis were reported in *P. vulgaris* nodules in a recently published transcriptomic study that compares *Rhizobium leguminosarum* expression in determinate and non-determinate nodules [39]. Melanin may serve as antioxidant.

Growth on surfaces versus liquid medium has major effects on rhizobial gene expression [6]. Exopolysaccharides and adhesins may come into contact with the host and may be necessary for bacterial early binding on the surfaces of the roots [12]. The transcriptome analysis which was performed in liquid medium would not allow nutrient gradients to form and consequently chemotaxis and motility would not have an important role therein. Under those conditions down-regulated genes were those that involve motility encoding flagellar synthesis.

Notably the very large number of hypothetical genes up-regulated in the MI (Dataset 1 and 3) evidence our very poor knowledge of genes that function in bacterial interactions which is certainly an area that needs to be studied and this work is a basis for it. Transcriptional regulators (Dataset 1 and 3) may participate in orchestrating the expression of *R. phaseoli* genes in the presence of other bacteria and the differentially expressed transcriptional regulators may be key to continue studying bacteria-bacteria interactions.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Basic Science grant [253116] and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIT) [IN207718]. We thank M. Dunn, M. Rosenblueth, and J.L. Aguirre-Noyola for critically reading the manuscript. Lorena Jacqueline Gómez-Godínez was a student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and was supported by CONACYT [CVU 419877]. Selene I. Fernández-Valverde is supported by the Cátedras CONACYT program 2015 - [72223].

## References

[1] Abanda-Nkwani, D., Mlath, M., Tschiersch, J., Boettner, M., Schwab, W. (2006) Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. *J. Exp. Bot.* 15, 4025–4032. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erl173>.

[2] Ahrland, H., Fraai, C.M.A.P., Druat, N. Ben, Gálvez, A. (2011) Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol. Rev.* 35 (1), 201–232. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6975.2010.02044.x>.

[3] Akhtar, N., Ahrland, I., Steink, M.A., Qureshi, M.A., Selenis, J., Ali, L. (2012) Co-inoculation with *Rhizobium* and *Bacillus* sp. to improve the phosphorus availability and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Agric. Plant Sci.* 23 (1), 100–127.

[4] Alagawadi, A.R., Gaur, A.C. (1992) Inoculation of *Azospirillum brasilense* and phosphate-solubilizing bacteria on yield of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] in dry land. *Trop. Agric.* 69(4), 347–350 (Trinidad Tobago).

[5] Alexa, A., Rahnenführer, J. (2016) topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology. R Package Version 2.26.0.

[6] Araya-Gomez, C.V., Santiago, J., Cañal, V., Nogales, J., Ochoa, J., van Dillewijn, P., Soto, M.J., Dominguez-Fernandez, A. (2010) Transcriptome profiling of a *Spirillum volutinum* mutant reveals the role of rhizobactin 1021 biosynthesis and regulation genes in the control of swarming. *BMC Genomics* 11 (1), 157. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-157>.

[7] Armit, A., Khan, M.A., Elshorbagy, M., Haroon, U., Azam, S.M.F., Harwood, A. (2012) Production of peptide antibiotics by *Bacillus* sp. GU 057 indigenously isolated from saline soil. *Braz. J. Microbiol.* 43 (4), 1340–1346. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000400015>.

[8] Andrews, S. (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. *Bioinformatics* 26, <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>.

[9] Anthony, C. (1982) *The Biochemistry of Methylobacteria*, vol. 100, Academic Press, London.

[10] Araújo, W.L., Santos, D.S., Dêni-Andrade, F., Salgueiro-Landolfo, J.K., Carrasco-Neves, A.A., Andrade, F.D., Dourado, M.N. (2015) Genes related to antioxidant metabolism are involved in *Methylobacterium extorquens*-soybean interaction. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 108 (4), 951–963. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-015-0548-6>.

[11] Arzoumanian, A.L., Talano, M.A., Olmos Nicotza, M.F., Encarnación, L., Bresser, M.L., Porporatto, C., Aguilari, E. (2015) Impact of double inoculation with *B Bradyrhizobium japonicum* T109 and *Azospirillum brasilense* Ac39 on soybean plants grown under anoxic stress. *Plant Physiol. Biochem.* 128, 26–35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.02.018>.

[12] Baharwalli, E., Tadra-Sheir, M.Z., Faoro, H., Pankovitch, V.C., de Souza, V.A., Pedrosa, F.O., de Souza, E.M., Dixon, R., Monteiro, R.A. (2016) Molecular adaptations of *Methylobacterium extorquens* during colonization of the maize rhizosphere. *Environ. Microbiol.* 18 (8), 2243–2256. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.12887>.

[13] Bano, Q., Ryan, N., Bano, A., Zafar, N., Akram, A., Hussain, F.U.L. (2013) Effect of *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays* L.) under drought stress. *Pak. J. Bot.* 45 (S1), 13–20.

[14] Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30 (15), 2114–2120. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.

[15] Bustamante-Brito, R., Vera-Ponce de León, A., Rosendahl, M., Martínez-Romero, J., Martínez-Romero, E. (2019) Metatranscriptomic analysis of the bacterial symbiont *Dactylopietia caroliniana* from the coccine cochineal *Dactylopius coccis* (Hemiptera: Coccinella: Dactylopiidae). *Life* 9 (1), 4. <http://dx.doi.org/10.3390/life9010004>.

[16] Cairns, L.S., Hobbey, L., Stanley-Wall, N.R. (2014) Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: new insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Mol. Microbiol.* 92 (4), 587–598. <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.12407>.

[17] Camillo-Neto, D., Boratto, F., Wassera, R., Tadra-Sheir, M.Z., Brumarelli-Santos, L.C.C., Valdameri, G., Doratti, L., Faoro, H., Weiss, A., Chhabra, L.S., Pedrosa, F.O., Souza, E.M. (2014) Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. *BMC Genomics* 15 (1), 378. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-378>.

[18] Carvalhais, L.C., Dermit, P.G., Fedoseyenko, D., Hajizadeh, M.-R., Borrijo, R., von Wierst, N. (2011) Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize is affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 174 (1), 3–11. <http://dx.doi.org/10.1007/s10261-010-0000-5>.

[19] Casado, F., Peritt, D., Sgroi, V., Mastarelli, O., Perena, C., Lusa, V. (2009) *Azospirillum brasilense* Ac39 and *B Bradyrhizobium japonicum* T109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur. J. Soil Biol.* 45 (1), 28–35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.08.005>.

[20] Cassin, F., Vanderleyden, J., Spaepen, S. (2014) Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (pgrb) belonging to the genus *Azospirillum*. *J. Plant Growth Regul.* 23 (2), 440–453. <http://dx.doi.org/10.1007/s00344-013-0262-4>.

[21] Ceccon, E., Alvarado-Rojas, A., Martínez-Romero, E., Toledo, I. (2012) The effect of inoculation of an indigenous bacteria on the early growth of *Acacia farnesiana* in a degraded area. *CERNE* 18 (1), 49–57. <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-77632012000100007>.

[22] Chabot, R., Antoun, H., Giroux, M.P. (1996) Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. phaseoli. *Plant Soil* 184 (2), 313–321. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00010460>.

[23] Chai, Y., Vuorelainen, H., Beauregard, P.B., Kolter, R., Lesick, R. (2012) *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (17), E1621–1630. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1218984110>.

[24] Chen, L., Liu, Y., Wu, G., Veronican Njiri, K., Shen, Q., Zhang, N., Zhang, R. (2016) Induced maize salt tolerance by rhizosphere inoculation of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Physiol. Plant.* 158 (1), 34–44. <http://dx.doi.org/10.1111/ppf.12461>.

[25] Cheng, X., Ji, X., Ge, Y., Li, J., Qi, W., Qiao, K. (2019) Characterization of antagonistic *Bacillus methylotrophicus* isolated from rhizosphere and its biocontrol

- effects on maize stalk rot. *Phytopathology* 109(4), 571–581, <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0220-R>.
- [26] Christiansen-Weniger, C., Grossman, A.J., van Veen, J.A. (1992) Associative N<sub>2</sub> fixation and root exudation of organic acids from wheat cultivars of different aluminium tolerance. *Plant Soil* 139 (2), 167–174, <http://dx.doi.org/10.1007/BF00020307>.
- [27] Collin, Y., Nicolitch, O., Van Nostrand, J.D., Zhou, J.Z., Turpault, M.P., Uroz, S. (2017) Taxonomic and functional shifts in the beech rhizosphere microbiome across a natural soil toposequence. *Soil Res.* 7 (1), 9054, <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-07029-1>.
- [28] Defez, R., Espósito, R., Angelini, C., Blanco, C. (2016) Overproduction of indole-3-acetic acid in free-living *Rhizobium* induces transcriptional changes resembling those occurring in nodular bacteroids. *Mol. Plant Microbe Interact.* 29 (6), 484–495, <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-01-16-0010-R>.
- [29] Dent, D., Cocking, E. (2017) Establishing symbiotic nitrogen fixation in cereals and other non-legume crops: the Green Revolution. *Agric. Food Secur.* 6(1), 1–9, <http://dx.doi.org/10.1186/s40086-016-0084-2>.
- [30] Van Deynze, A., Zamora, F., Delaux, P.M., Heilmann, C., Jayaraman, D., Rajasekar, S., Graham, D., Masada, J., Gibson, D., Schwartz, K.D., Berry, A.M., Bhattacharya, S., Jospin, G., Darling, A., Jeanvoine, R., Lopez, J., Wittmer, R.C., Stern, J.A., Stupar, H.Y., Ané, J.M., Bernatz, A.E. (2018) Nitrogen fixation in a landscape of maize is supported by a mycelium-associated diazotrophic microbiota. *PLoS Biol.* 16 (8), 1–21, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1006252>.
- [31] Dehbiatani, S., Cronenberg, A., Thy, A., Vande Broek, A., Vandenrijden, J. (2008) Phyto-stimulatory effect of *Acetivibrium brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil* 212 (2), 153–162, <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-008-9000-8>.
- [32] Drogosz, R., Sangani, H., Chumran, A., Monar, M., Llanza, C., Panzani, G., Pellegrini-Corbelli, C., Piccoli, N., Wisniewski-Dyja, F. (2014) Plant root transcription profiling reveals a strain-dependent response during *Acetivibrium*-rice co-cultivation. *Front. Plant Sci.* 5 (1), <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00607>.
- [33] Dinwand, H., Maheshwari, D.K. (2018) Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: action mechanisms and future prospects. *Ecolyst.* *Environ. Saf.* 156(October 2017), 225–246, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.013>.
- [34] Fan, B., Carvalho, L.C., Becker, A., Fedorovskii, D., Von Wirén, N., Borriss, R. (2012) Transcriptomic profiling of *Bacillus aryabhattai* DSM 2042 in response to maize root exudates. *BMC Microbiol.* 12 (1), 112–116, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-12-116>.
- [35] Fischer, D., Pfisterer, R., Schmid, M., Simões-Araújo, J.L., Reix, V.M., Pereira, W., Ormão-Orellana, E., Hui, B., Hofmann, A., Schöler, M., Martínez-Romero, E., Baldani, J.L., Hartman, A. (2012) Molecular characterization of the diazotrophic bacterial community in inoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum sp.*). *Plant Soil* 356(1–2), 83–99, <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-011-0812-0>.
- [36] Fukami, J., de la Osa, C., Ollero, F.J., Megias, M., Hargreav, M. (2018) Co-inoculation of maize with *Acetivibrium brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. *Front. Plant Biol.* 45 (2), 328, <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2017.0167>.
- [37] Glck, B.R. (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41 (2), 109–117, <http://dx.doi.org/10.1139/cjms-015>.
- [38] Govada, S., Kerry, R.G., Das, G., Paranjithothi, S., Shrivastava, S., Patra, J.K. (2018) Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiol. Res.* 206 (August 2017), 131–140, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>.
- [39] Green, R.T., East, A.K., Kararukutan, R., Downie, J.A., Poole, P.S. (2019) Transcriptomic analysis of *Rhizobium leguminosarum* bacteroids in determinate and indeterminate nodules. *Genomics* 5 (2), 1–16, <http://dx.doi.org/10.1093/genom/gkz005>.
- [40] Gupta, M.D., Zawoznik, M.S., Tomaro, M.L. (1998) Effect of co-inoculation with *B Bradyrhizobium japonicum* and *Acetivibrium brasilense* on soybean plants. *Ear. J. Soil Biol.* 34 (2), 75–80, <http://dx.doi.org/10.1051/jst/1998342556326960004-3>.
- [41] Härtel, M., Schwartzbard, R., Okon, Y., Hardman, S., Jankovitch, E. (1998) Aggregation in *Acetivibrium brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. *Microbiology* 144 (7), 1989–1999, <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-144-7-1989>.
- [42] Hartman, K., van der Heijden, M.G.A., Roussely-Prouzet, V., Walter, J.C., Schlaeppli, K. (2017) Deciphering composition and function of the root microbiome of a legume plant. *Microbiome* 5 (2), 1–13, <http://dx.doi.org/10.1186/s12876-016-0220-z>.
- [43] Idro, E.E., Iglesias, D.J., Takai, M., Borriss, R. (2007) TrypTOPan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus aryabhattai* DSM 2042. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20 (6), 619–626, <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-20-6-0619>.
- [44] James, E.K., Baldani, J.L. (2012) The role of biological nitrogen fixation by non-legumes in the sustainable production of food and biofuels. *Plant Soil* 356(1–2), 1–2, <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-012-1317-1>.
- [45] Kim, K., Hwang, S., Saravanan, V.S., Sa, T. (2012) Effect of *Rhizobacterium lotum* n56 and *Methylobacterium oryzae* CRME20 inoculation on seed germination and early growth of maize and sorghum-sudangrass hybrid seedling under different salinity levels. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 45 (1), 51–58, <http://dx.doi.org/10.7745/jksf.2012.45.1.051>.
- [46] Klopper, J.W., Lihitz, R., Zabolotzka, R.M. (1989) Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7 (2), 39–44, [http://dx.doi.org/10.1016/0169-7729\(89\)90057-7](http://dx.doi.org/10.1016/0169-7729(89)90057-7).
- [47] Kutschera, U. (2007) Plant-associated methylobacteria as co-evolved phyto-symbionts: a hypothesis. *Plant Signal. Behav.* 2 (2), 74–78, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pls.2.2.4073>.
- [48] Labik, A., Lovato, F. (1996) Determining photosynthetic parameters from leaf CO<sub>2</sub> exchange and chlorophyll fluorescence (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase specificity factor, dark respiration in the light, excitation distribution between photosystems, alternative electron transport rate, and mesophyll diffusion resistance). *Plant Physiol.* 110 (3), 903–912, <http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.3.903>.
- [49] Langmead, B., Salzberg, S.L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9 (1), 357–359, <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
- [50] Lawes, A., Burton, F., Schäfer, P. (2016) Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant Mol. Biol.* 90 (6), 575–587, <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-015-0417-8>.
- [51] Li, Y., Tian, C.F., Chen, W.F., Wang, L., Sai, X.H., Chen, W.X. (2013) High-resolution transcriptomic analysis of *sinorhizobium* sp. ngr234 bacteroids in determinate nodules of *vicia unguiculata* and indeterminate nodules of *Lotus corniculatus*. *PLoS One* 8 (8), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0070531>.
- [52] Liao, Y., Smyth, G.K., Shi, W. (2014) FeatureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30 (7), 923–929, <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btt056>.
- [53] Liu, Y., Jiang, X., Guo, D., Zhou, W., Ma, M., Zhao, E., Cao, F., Li, L., Li, J. (2017) Transcriptomic analysis of genes involved in competitive nodulation in *Bradyrhizobium diazoefficiens* at the presence of soybean root exudates. *Sci. Rep.* 7 (1), 1–11, <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-11727-0>.
- [54] López-Guerrero, M.G., Ormão-Orellana, E., Acosta, J.L., Mendoza-Vargas, A., Rogel, M.A., Ramírez, M.A., Rosenblatt, M., Martínez-Romero, J., Martínez-Romero, E. (2012) Rhizobial extrachromosomal replicon variability, stability and expression in natural niches. *Plant Dis* 96 (2), 149–158, <http://dx.doi.org/10.1094/phyto.2012.96.2.0702>.
- [55] López-López, A., Rogel, M.A., Ormão-Orellana, E., Martínez-Romero, J., Martínez-Romero, E. (2010) *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 33 (6), 322–327, <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2010.07.005>.
- [56] Lopez, D., Morera, C., Miranda-Rios, J., Girard, L., Romero, D., Soboron, M. (2001) Regulation of gene expression in response to oxygen in *Rhizobium* spp.: role of *FixN* in *FixNOQ* expression and in symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 183 (24), 7090–7095, <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.24.7090-7095.2001>.
- [57] Marrota, P., Sharma, P., Sharma, S. (2015) Bioaugmentation of *Mesorhizobium lotum* and *Pisum sativum* for sustainable chickpea production. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 21 (2), 385–393, <http://dx.doi.org/10.1007/s12298-015-0296-0>.
- [58] Marcano-marín, A. (2011) *Serratia symbiotica* from the aphid *Circulifer tenellus*: a missing link from facultative to obligate insect endosymbiont. *PLoS Genet.* 7 (11), e1002257, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002257>.
- [59] Zeffa, D.M., Perini, L.J., Silva, M.B., de Souza, N.V., Scapim, C.A., Oliveira, A.L.M., Amaral Júnior, A.T.D., Azeredo Gonçalves, L.S. (2019) *Acetivibrium brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. *PLoS One* 14 (4), e0215332, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0215332>.
- [60] Marks, B.R., Megias, M., Ollero, F.J., Nogueira, M.A., Araújo, R.S., Hargreav, M. (2015) Maize growth promotion by inoculation with *Acetivibrium brasilense* and metabolites of *Rhizobium tropici* enriched on *lipo-chitosol* glycoconjugates (LCOs). *AMB Express* 5 (1), 71, <http://dx.doi.org/10.1186/s12958-015-0154-z>.
- [61] Miller, K.J., Wood, J.M. (1996) Coadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 50 (1), 101–136, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.101>.
- [62] Morgado, L.B., Wiley, R.W. (2003) Effects of plant population and nitrogen fertilizer on yield and efficiency of maize-bean intercropping. *Pequi. Agropec. Res.* 38 (11), <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X030001100002>.
- [63] Naweed, M., Mittler, B., Reichmanzer, T.G., Wlochowik, K., Senftsch, A. (2014) Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Bacillus* in phytohemagglutinin and *Endo* oblique sp. FD17. *Environ. Exp. Bot.* 97 (1), 30–39, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.08.004>.
- [64] Pereira, P., Baltes, F., Rosenblatt, M., Schewery, 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.* <http://dx.doi.org/10.5402/2011/518546>, Article ID 518546.
- [65] Qiagen, 2007 *Qiagen RNeasy® Micro Handbook*, Micro (December).
- [66] Rajendran, G., Sing, F., Deval, A.J., Archana, G. (2008) Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of bacterial strains with *Abrus* spp. *Bioresour. Technol.* 99 (11), 4544–4550, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.029>.
- [67] Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K. (2010) edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26 (1), 139–140, <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.
- [68] Rosenblatt, M., Martínez-Romero, E. (2004) *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. *Arch. Microbiol.* 181 (5), 337–344, <http://dx.doi.org/10.1007/s00033-004-0661-0>.
- [69] Rosenblatt, M., Martínez, L., Silva, J., Martínez-Romero, E. (2004) *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Syst. Appl. Microbiol.* 27 (1), 27–35, <http://dx.doi.org/10.1079/S1373-2023-000161>.
- [70] Rosenblatt, M., Ormão-Orellana, E., López-López, A., Rogel, M.A., Reyes-Herrández, R.J., Martínez-Romero, J.C., Reddy, P.M., Martínez-Romero, E. (2018) Nitrogen fixation in cereals. *Front. Microbiol.* 9, 1794, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.07794>.

- [71] Schaefer, S., Klämpfer, P., Wehner, S., Spröber, C., Kutschera, U. (2011) *Methylobacterium marchantiae* sp. nov., a pink-pigmented, facultatively methylotrophic bacterium isolated from the thallus of a liverwort. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61 (4), 870–876, <http://dx.doi.org/10.1093/ijs/61.4.870>.
- [72] Somers, K., Ptasnik, D., Gyssens, P., Srinivasan, M., Vanderleyden, J. (2005) *Acetivibrium brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (4), 1803–1810, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.4.1803-1810.2005>.
- [73] Spaepen, S., Vermaes, W., Cocker, D., Pohl, M., Steycart, J., Vanderleyden, J. (2007) Characterization of phenylpyruvate decarboxylase, involved in auxin production of *Acetivibrium brasilense*. *J. Bacteriol.* 189 (21), 7626–7633, <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00830-07>.
- [74] Hardy, R.D., Holsten, Jackson, E.K., Burns, R.C. (1968) The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43 (8), 1185–1207.
- [75] Steenhoudt, O., Vanderleyden, J. (2000) *Acetivibrium*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* 24 (4), 487–506, [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6445\(00\)00026-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00026-3).
- [76] Talboys, P.J., Owen, D.W., Healey, J.R., Withers, P.J.A., Jones, D.L. (2014) Auxin secretion by *Bacillus arylobacteriensis* D2842 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Trifolium arvense*. *BMC Plant Biol.* 14 (51), <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-14-51>.
- [77] Talbani, R., Jethava, M., Goussbet, G., Hindi-Kabbah, S., Wróblewski, H., Blasco, C., Bernard, T. (2004) Gene adaptation in rhizobia: ectoine-induced salt tolerance. *J. Bacteriol.* 176 (17), 5210–5217, <http://dx.doi.org/10.1128/jb.176.17.5210-5217.2004>.
- [78] Tarrand, J.J., Krieg, N.R., Döbereiner, J. (1978) A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Acetivibrium* gen. nov. and two species, *Acetivibrium lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Acetivibrium brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24(8), 967–980, <http://dx.doi.org/10.1139/cj78-101>.
- [79] Thaita, M., Pypers, P., Herrmann, L., Okolelo, R.J., Othman, C., Muma, E., Lemaire, D. (2012) Commercial rhizobial inoculants significantly enhance growth and nitrogen fixation of a promiscuous soybean variety in Kenyan soils. *Biol. Fertil. Soils* 48 (1), 87–96, <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-011-0611-z>.
- [80] Toledo, I., Lioret, L., Martínez-Romero, E. (2003) *Shorhizobium americanum* sp. nov., a new *Shorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. *Syst. Appl. Microbiol.* 26 (1), 54–64, <http://dx.doi.org/10.1078/072320203222207317>.
- [81] Unterholzner, S.J., Poppenberger, B., Röhren, W. (2014) Toxin-antitoxin systems. *Bioessays* 36, 1–11, <http://dx.doi.org/10.4161/bes.26219>.
- [82] Vardarajula, S., Ali, S.Z., Grover, M., Reddy, G., Bardi, V. (2011) Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. *J. Plant Interact.* 6 (1), <http://dx.doi.org/10.1080/17429145.2010.535778>.
- [83] Vardarajula, S., Zulficar Ali, S., Grover, M., Reddy, G., Bardi, V. (2011) Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. *J. Plant Interact.* 6 (1), <http://dx.doi.org/10.1080/17429145.2010.535778>.
- [84] Xie, S., Wu, H., Chen, L., Zang, H., Xie, Y., Gao, X. (2015) Transcriptome profiling of *Bacillus subtilis* Q63105 in response to rice seedlings. *BMC Microbiol.* 15 (21), <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-015-0253-4>.
- [85] Yabukun, E., Okon, Y., Dewar, A. (1987) *Acetivibrium* effects on susceptibility to *Rhizobium* nodulation and on nitrogen fixation of several forage legumes. *Can. J. Microbiol.* 33 (6), 510–514, <http://dx.doi.org/10.1139/w62-014>.
- [86] Yuan, S., Li, R., Chen, S., Chen, H., Zhang, C., Chen, L., Rao, Q., Sun, Z., Yang, Z., Qiu, D., Zhang, X., Zhou, X. (2016) RNA-Seq analysis of differential gene expression responding to different *Rhizobium* strains in soybean (*Glycine max*) roots. *Front. Plant Sci.* 7 (721), <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.00721>.
- [87] Zhang, N., Yang, D., Wang, D., Miao, Y., Shao, J., Zhou, X., Xu, Z., Li, Q., Feng, H., Li, S., Shen, Q., Zhang, R. (2015) Whole transcriptomic analysis of the plant-beneficial rhizobacterium *Bacillus arylobacteriensis* SQR9 during enhanced biofilm formation regulated by maize root exudates. *BMC Genomics* 16 (1), 685, <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-1825-5>.
- [88] Zufferey, R., Pérois, O., Herrero, H., Thöny-Meyer, L. (1996) Assembly and function of the cytochrome *cbhD* oxidase subunit in *Streptomyces griseus*. *J. Biol. Chem.* 271 (15), 9114–9119, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.15.9114>.

### 13. Bibliografía

- [1] Abanda-Nkpwatt, D., Müsch, M., Tschiersch, J., Boettner, M., Schwab, W. (2006) Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: Growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. *J. Exp. Bot.*, Doi: 10.1093/jxb/erl173.
- [2] Abriouel, H., Franz, C.M.A.P., Omar, N. Ben., Galvez, A. (2011) Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol. Rev.*, Doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x.
- [3] Akinrinlola, R.J., Yuen, G.Y., Drijber, R.A., Adesemoye, A.O. (2018) Evaluation of *Bacillus* Strains for Plant Growth Promotion and Predictability of Efficacy by In Vitro Physiological Traits. *Int. J. Microbiol.* 2018, Doi: 10.1155/2018/5686874.
- [4] Alagawadi, A.R., Gaur, A.C. (1992) Inoculation of *Azospirillum brasilense* and phosphate-solubilizing bacteria on yield of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] in dry land. *Trop. Agric. (Trinidad Tobago)*.
- [5] Alexa A and Rahnenfuhrer J. (2016) topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology. R Package Version 2.26.0.
- [6] Amin, A., Khan, M.A., Ehsanullah, M., Haroon, U., Azam, S.M.F., Hameed, A. (2012) Production of peptide antibiotics by *Bacillus* sp. GU 057 indigenously isolated from saline soil. *Brazilian J. Microbiol.* 43(4), 1340, Doi: 10.1590/s1517-838220120004000015.
- [7] Andrews, S. (2010) FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. *Babraham Bioinforma.*, Doi: 10.1016/S1048-9843(02)00144-3.
- [8] Backer, R., Rokem, J.S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., Smith, D.L. (2018) Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Front. Plant Sci.*, Doi: 10.3389/fpls.2018.01473.
- [9] Balsanelli, E., Tadra-Sfeir, M.Z., Faoro, H., Pankievicz, V.C., de Baura, V.A., Pedrosa, F.O., de Souza, E.M., Dixon, R., Monteiro, R.A. (2016) Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. *Environ. Microbiol.*, Doi: 10.1111/1462-2920.12887.
- [10] Bano, Q., Ilyas, N., Bano, A., Zafar, N., Akram, A., Fayaz, A., Hassan, U. (2013) Effect of *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays* L.) under drought stress. *Pak. J. Bot.*
- [11] Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J., Bakker, P.A.H.M. (2012) The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.*, Doi: 10.1016/j.tplants.2012.04.001.
- [12] Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B. (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, Doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.

- [13] Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E.V.L., Schulze-Lefert, P. (2013) Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, Doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120106.
- [14] Cassán, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C., Luna, V. (2009) *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur. J. Soil Biol.*, Doi: 10.1016/j.ejsobi.2008.08.005.
- [15] Cassán, F., Vanderleyden, J., Spaepen, S. (2014) Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. *J. Plant Growth Regul.*, Doi: 10.1007/s00344-013-9362-4.
- [16] Cavaglieri, L., Orlando, J., Etcheverry, M. (2009) Rhizosphere microbial community structure at different maize plant growth stages and root locations. *Microbiol. Res.*, Doi: 10.1016/j.micres.2007.03.006.
- [17] Cavaliere, M., Feng, S., Soyer, O.S., Jiménez, J.I. (2017) Cooperation in microbial communities and their biotechnological applications. *Environ. Microbiol.*, Doi: 10.1111/1462-2920.13767.
- [18] Chabot, R., Antoun, H., Cescas, M.P. (1993) Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Can. J. Microbiol.*, Doi: 10.1139/m93-142.
- [19] Chabot, R., Antoun, H., Cescas, M.P. (1996) Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovaR. *phaseoli*. *Plant Soil*, Doi: 10.1007/BF00010460.
- [20] Chai, Y., Vlamakis, H., Beauregard, P.B., Kolter, R., Losick, R. (2013) *Bacillus subtilis* biopellicula induction by plant polysaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110(17), E1621–30, Doi: 10.1073/pnas.1218984110.
- [21] Chen, L., Liu, Y., Wu, G., Veronican Njeri, K., Shen, Q., Zhang, N., Zhang, R. (2016) Induced maize salt tolerance by rhizosphere inoculation of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Physiol. Plant.*, Doi: 10.1111/ppl.12441.
- [22] Christiansen-Weniger, C., Groneman, A.F., van Veen, J.A. (1992) Associative N<sub>2</sub> fixation and root exudation of organic acids from wheat cultivars of different aluminium tolerance. *Plant Soil* 139(2), 167–74, Doi: 10.1007/BF00009307.
- [23] Cloots, L., Das, F., Vanderleyden, J., Engelen, K., Spaepen, S., Marchal, K., Van Puyvelde, S. (2011) Transcriptome Analysis of the Rhizosphere Bacterium *Azospirillum brasilense* Reveals an Extensive Auxin Response. *Microb. Ecol.* 61(4), 723–8, Doi: 10.1007/s00248-011-9819-6.
- [24] Daniel, R. (2005) The metagenomics of soil. *Nat. Rev. Microbiol.*, Doi: 10.1038/nrmicro1160.
- [25] Davidson, A.L., Chen, J. (2004) {ATP}-binding cassette transporters in

- [26] Van Deynze, A., Zamora, P., Delaux, P.M., Heitmann, C., Jayaraman, D., Rajasekar, S., Graham, D., Maeda, J., Gibson, D., Schwartz, K.D., Berry, A.M., Bhatnagar, S., Jospin, G., Darling, A., Jeannotte, R., Lopez, J., Weimer, B.C., Eisen, J.A., Shapiro, H.Y., Ané, J.M., Bennett, A.B. (2018) Nitrogen fixation in a landrace of maize is supported by a mucilage-associated diazotrophic microbiota. *PLoS Biol.* 16(8), 1–21, Doi: 10.1371/journal.pbio.2006352.
- [27] Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A. (1999) Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil*, Doi: 10.1023/A:1004658000815.
- [28] Duijff, B.J., Recorbet, G., Bakker, P.A.H.M., Loper, J.E., Lemanceau, P. (1999) Microbial Antagonism at the Root Level Is Involved in the Suppression of *Fusarium* Wilt by the Combination of Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358. *Phytopathology*, Doi: 10.1094/PHYTO.1999.89.11.1073.
- [29] Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N.K., Bhatnagar, S., Eisen, J.A., Sundaresan, V. (2015) Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Doi: 10.1073/pnas.1414592112.
- [30] Fan, B., Carvalhais, L.C., Becker, A., Fedoseyenko, D., Von Wirén, N., Borriss, R. (2012) Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates. *BMC Microbiol.*, Doi: 10.1186/1471-2180-12-116.
- [31] Farasin, J., Koechler, S., Varet, H., Deschamps, J., Dillies, M.A., Proux, C., Erhardt, M., Huber, A., Jagla, B., Briandet, R., Coppée, J.Y., Arsène-Ploetze, F. (2017) Comparison of biopelícula formation and motility processes in arsenic-resistant *Thiomonas* spp. strains revealed divergent response to arsenite. *Microb. Biotechnol.* 10(4), 789–803, Doi: 10.1111/1751-7915.12556.
- [32] FIRA, F.I. en R. con la A. (2016) Panorama Agroalimentario. Dir. Evaluación y Evaluación Económica y Sect., Doi: clave que ese articulo tiene.
- [33] Gamalero, E., Glick, B.R. (2011) Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting Bacteria. *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management*, Springer Berlin Heidelberg, pp. 17–46.
- [34] Gao, X.-W., Wu, H.-J., Wu, L.-M., Xie, S.-S., Zhu, Q.-Q., Zang, H.-Y. (2014) Plant Growth Promotion by Spermidine-Producing *Bacillus subtilis* OKB105. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27(7), 655–663, Doi: 10.1094/mpmi-01-14-0010-r.
- [35] Glick, B.R. (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.*, Doi: 10.1139/m95-015.

- [36] Grebe, T.W., Stock, J. (1998) Bacterial chemotaxis: the five sensors of a bacterium. *Curr. Biol.*, Doi: 10.1016/S0960-9822(98)00098-0.
- [37] Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., Peterson, S.B. (2010) Bacterial competition: Surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol.*, Doi: 10.1038/nrmicro2259.
- [38] Hu, B., Lidstrom, M.E. (2014) Metabolic engineering of *Methylobacterium extorquens* AM1 for 1-butanol production. *Biotechnol. Biofuels* 7(1), 156, Doi: 10.1186/s13068-014-0156-0.
- [39] Jones, D.L., Nguyen, C., Finlay, R.D. (2009) Carbon flow in the rhizosphere: Carbon trading at the soil-root interface. *Plant Soil*, Doi: 10.1007/s11104-009-9925-0.
- [40] Kim, K., Hwang, S., Saravanan, V.S., Sa, T. (2012) CBMB20 Inoculation on Seed Germination and Early Growth of Maize and Sorghum-sudangrass hybrid Seedling under Different Salinity Levels 45(1), 51–8.
- [41] Kloepper, J.W., Lifshitz, R., Zablutowicz, R.M. (1989) Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.*, Doi: 10.1016/0167-7799(89)90057-7.
- [42] Knee, E.M., Gong, F.C., Gao, M., Teplitski, M., Jones, A.R., Foxworthy, A., Mort, A.J., Bauer, W.D. (2001) Root mucilage from pea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 14(6), 775–84, Doi: 10.1094/MPMI.2001.14.6.775.
- [43] Krehenbrink, M., Allan, J.A. (2008) Identification of protein secretion systems and novel secreted proteins in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae. *BMC Genomics*, Doi: 10.1186/1471-2164-9-55.
- [44] Laisk, A., Loreto, F. (1996) Determining Photosynthetic Parameters from Leaf CO<sub>2</sub> Exchange and Chlorophyll Fluorescence (Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Specificity Factor, Dark Respiration in the Light, Excitation Distribution between Photosystems, Alternative Electron Transport Rate, and Mesophyll Diffusion Resistance. *Plant Physiol.* 110(3), 903–12.
- [45] Lakshmanan, V., Selvaraj, G., Bais, H.P. (2014) Functional Soil Microbiome: Belowground Solutions to an Aboveground Problem. *PLANT Physiol.*, Doi: 10.1104/pp.114.245811.
- [46] Langmead, B., Salzberg, S.L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods*, Doi: 10.1038/nmeth.1923.
- [47] Li, X., Rui, J., Mao, Y., Yannarell, A., Mackie, R. (2014) Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. *Soil Biol. Biochem.*, Doi: 10.1016/j.soilbio.2013.10.017.
- [48] Liao, Y., Smyth, G.K., Shi, W. (2014) FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, Doi: 10.1093/bioinformatics/btt656.
- [49] López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J.C., Hernández-Calderón, E.,

- Velásquez-Becerra, C., Farías-Rodríguez, R., Macías-Rodríguez, L.I., Valencia-Cantero, E. (2007) *Bacillus megaterium* Rhizobacteria Promote Growth and Alter Root-System Architecture Through an Auxin- and Ethylene-Independent Signaling Mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, Doi: 10.1094/MPMI-20-2-0207.
- [50] López-Guerrero, M.G., Ormeño-Orrillo, E., Acosta, J.L., Mendoza-Vargas, A., Rogel, M.A., Ramírez, M.A., Rosenblueth, M., Martínez-Romero, J., Martínez-Romero, E. (2012) Rhizobial extrachromosomal replicon variability, stability and expression in natural niches. *Plasmid*, Doi: 10.1016/j.plasmid.2012.07.002.
- [51] Lopez, O., Morera, C., Miranda-Rios, J., Girard, L., Romero, D., Soberon, M. (2001) Regulation of gene expression in response to oxygen in *Rhizobium etli*: Role of FnrN in fixNOQP expression and in symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.*, Doi: 10.1128/JB.183.24.6999-7006.2001.
- [52] Lu, C.D. (2006) Pathways and regulation of bacterial arginine metabolism and perspectives for obtaining arginine overproducing strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Doi: 10.1007/s00253-005-0308-z.
- [53] Mansotra, P., Sharma, P., Sharma, S. (2015) Bioaugmentation of *Mesorhizobium cicer*, *Pseudomonas* spp. and *Piriformospora indica* for Sustainable Chickpea Production. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, Doi: 10.1007/s12298-015-0296-0.
- [54] Marasco, R., Rolli, E., Ettoumi, B., Vigani, G., Mapelli, F., Borin, S., Abou-Hadid, A.F., El-Beairy, U.A., Sorlini, C., Cherif, A., Zocchi, G., Daffonchio, D. (2012) A Drought Resistance-Promoting Microbiome Is Selected by Root System under Desert Farming. *PLoS One*, Doi: 10.1371/journal.pone.0048479.
- [55] Mark, G.L., Dow, J.M., Kiely, P.D., Higgins, H., Haynes, J., Baysse, C., Abbas, A., Foley, T., Franks, A., Morrissey, J., O’Gara, F. (2005) Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Doi: 10.1073/pnas.0506407102.
- [56] Marks, B.B., Megías, M., Ollero, F.J., Nogueira, M.A., Araujo, R.S., Hungria, M. (2015) Maize growth promotion by inoculation with *Azospirillum brasilense* and metabolites of *Rhizobium tropici* enriched on lipo-chitooligosaccharides (LCOs). *AMB Express*, Doi: 10.1186/s13568-015-0154-z.
- [57] Masalha, J., Kosegarten, H., Elmaci, Ö., Mengel, K. (2000) The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biol. Fertil. Soils* 30(5–6), 433–9, Doi: 10.1007/s003740050021.
- [58] Mavrodi, D. V., Thomashow, L.S., Blankenfeldt, W. (2008) Biosynthesis and Regulation of Phenazine Compounds in *Pseudomonas* spp. *Pseudomonas: Model Organism, Pathogen, Cell Factory*.
- [59] Newman, M.M., Lorenz, N., Hoilett, N., Lee, N.R., Dick, R.P., Liles, M.R., Ramsier, C., Kloepper, J.W. (2016) Changes in rhizosphere bacterial gene

- expression following glyphosate treatment. *Sci. Total Environ.*, Doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.02.078.
- [60] Ormeño-Orrillo, E., Rosenblueth, M., Luyten, E., Vanderleyden, J., Martínez-Romero, E. (2008) Mutations in lipopolysaccharide biosynthetic genes impair maize rhizosphere and root colonization of *Rhizobium tropici* CIAT899. *Environ. Microbiol.*, Doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01541.x.
- [61] 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.*, Doi: 10.5402/2011/938546.
- [62] Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., Van Der Putten, W.H. (2013) Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.*, Doi: 10.1038/nrmicro3109.
- [63] Qiagen. (2007) Qiagen RNeasy® Micro Handbook. Micro (December).
- [64] Rajendran, G., Sing, F., Desai, A.J., Archana, G. (2008) Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* spp. *Bioresour. Technol.*, Doi: 10.1016/j.biortech.2007.06.057.
- [65] 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.*, Doi: 10.1186/gb-2011-12-10-r106.
- [66] Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K. (2009) edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, Doi: 10.1093/bioinformatics/btp616.
- [67] Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, Doi: 10.1093/bioinformatics/btp616.
- [68] Rodríguez, H., Fraga, R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.*, Doi: 10.1016/S0734-9750(99)00014-2.
- [69] Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E. (2004) *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. *Arch. Microbiol.*, Doi: 10.1007/s00203-004-0661-9.
- [70] Rosenblueth, M., Ormeño-Orrillo, E., López-López, A., Rogel, M.A., Reyes-Hernández, B.J., Martínez-Romero, J.C., Reddy, P.M., Martínez-Romero, E. (2018) Nitrogen Fixation in Cereals. *Front. Microbiol.*, Doi: 10.3389/fmicb.2018.01794.
- [71] Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B.K., Bhattacharjee, S., Tribedi, P. (2016) Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23(5), 3984–99, Doi: 10.1007/s11356-015-4294-0.
- [72] Sasirekha, B., Shivakumar, S. (2012) Multifarious antagonistic potentials

of rhizosphere associated bacterial isolates against soil borne diseases of Tomato. Asian J. Plant Sci. Res.

- [73] Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R. (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiol. Rev., Doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x.
- [74] Talbi, C., Sánchez, C., Hidalgo-Garcia, A., González, E.M., Arrese-Igor, C., Girard, L., Bedmar, E.J., Delgado, M.J. (2012) Enhanced expression of *Rhizobium etli* cbb 3 oxidase improves drought tolerance of common bean symbiotic nitrogen fixation. J. Exp. Bot., Doi: 10.1093/jxb/ers101.
- [75] Tambalo, D.D., Yost, C.K., Hynes, M.F. (2015) Motility and Chemotaxis in the Rhizobia. Biol. Nitrogen Fixat. 1–2, 337–48, Doi: 10.1002/9781119053095.ch33.
- [76] Unterholzner, S.J., Poppenberger, B., Rozhon, W. (2013) Toxin-antitoxin systems: Biology, identification, and application. Mob. Genet. Elements 3(5), e26219, Doi: 10.4161/mge.26219.
- [77] Valle, J., Da Re, S., Schmid, S., Skurnik, D., D'Ari, R., Ghigo, J.M. (2008) The amino acid valine is secreted in continuous-flow bacterial biopelículas. J. Bacteriol. 190(1), 264–74, Doi: 10.1128/JB.01405-07.
- [78] Vardharajula, S., Ali, S.Z., Grover, M., Reddy, G., Bandi, V. (2011) Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: Effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. J. Plant Interact., Doi: 10.1080/17429145.2010.535178.
- [79] West, S.A., Diggle, S.P., Buckling, A., Gardner, A., Griffin, A.S. (2007) The Social Lives of Microbes. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst., Doi: 10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095740.
- [80] Wilkens, S. (2015) Structure and mechanism of ABC transporters. F1000Prime Rep., Doi: 10.12703/P7-14.
- [81] Yahalom, E., Okon, Y., Dovrat, A. (1987) *Azospirillum* effects on susceptibility to *Rhizobium* nodulation and on nitrogen fixation of several forage legumes. Can. J. Microbiol. 33(6), 510–4.
- [82] Zufferey, R., Preisig, O., Hennecke, H., Thöny-Meyer, L. (1996) Assembly and function of the cytochrome cbb3 oxidase subunits in *Bradyrhizobium japonicum*. J. Biol. Chem., Doi: 10.1074/jbc.271.15.9114.

**Apéndice I: Tablas adicionales, pueden ser visualizadas en el siguiente link**  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0723202019301183>

Tabla A 1. Genes sobreexpresados de la comparación de *R. phaseoli* Ch24-10 PY en comparación con *R. phaseoli* Ch24-10 y comunidad en PY

Tabla A.2. Genes subexpresados de la comparación de *R. phaseoli* Ch24-10 PY en comparación con *R. phaseoli* Ch24-10 y comunidad en PY

Tabla A.3 Genes sobreexpresados de *R. phaseoli* Ch24-10 en planta en comparación con *R. phaseoli* Ch24-10 + comunidad en planta

Tabla A.4 Genes sobreexpresados de *R. phaseoli* Ch24-10 en planta en comparación con *R. phaseoli* Ch24-10 + comunidad en planta

Tabla A.5 Genes sobreexpresados de *R. phaseoli* Ch24-10 en PY en comparación con *R. phaseoli* Ch24-10 en planta

Tabla A.6 Genes subexpresados de *R. phaseoli* Ch24-10 en PY en comparación con *R. phaseoli* Ch24-10 en planta

Tabla A.7 Genes sobreexpresados de *R. phaseoli* Ch24-10 con la comunidad en PY en comparación con *R. phaseoli* Ch24-10 con la comunidad en planta

Tabla A.8 Genes subexpresados de *R. phaseoli* Ch24-10 con la comunidad en PY en comparación con *R. phaseoli* Ch24-10 con la comunidad en planta

Tabla A.9 Genes sobreexpresados de *Azospirillum* con la comunidad en PY en comparación con *Azospirillum* con la comunidad en planta

Tabla A.10 Genes subexpresados de *Azospirillum* con la comunidad en PY en comparación con *Azospirillum* con la comunidad en planta

Tabla A.11 Genes sobreexpresados de *Bacillus* con la comunidad en PY, en comparación con *Bacillus* con la comunidad en planta

Tabla A.12 Genes subexpresados de *Bacillus* con la comunidad en PY, en comparación con *Bacillus* con la comunidad en planta

Tabla A.13 Genes sobreexpresados de *Methylobacterium* con la comunidad en PY, en comparación con *Methylobacterium* con la comunidad en planta

Tabla A.14 Genes subexpresados de *Methylobacterium* con la comunidad en PY en comparación con *Methylobacterium* con la comunidad en planta