



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Doctorado en Ciencias Bioquímicas

TRANSCRIPTOMA DE *Rhizobium phaseoli* EN LA INTERACCIÓN CON MAÍZ Y
FRIJOL EN LA MILPA DE LABORATORIO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M.C. JOSÉ LUIS AGUIRRE NOYOLA

Tutor principal

DRA. ESPERANZA MARTÍNEZ ROMERO
[Centro de Ciencias Genómicas, UNAM](#)

Comité tutor

DR. LUIS CARDENAS TORRES
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

DR. MARIO ALBERTO SERRANO ORTEGA
[Centro de Ciencias Genómicas, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos., Febrero 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 desarrollo del presente trabajo se llevó a cabo en el Programa de Ecología Genómica del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Esperanza Martínez Romero y como parte del programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la misma universidad. El proyecto fue financiado con apoyo de PAPIIT-UNAM (IN210021) otorgado a la Dra. Martínez y por una beca de doctorado por parte del CONACYT (CVU 633925) que recibió el M.C. José Luis Aguirre Noyola .

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi **familia, a mi mamá Eloisa y a mis hermanas Patsy y Magui** por estar siempre para mi y apoyarme en este camino de la investigación.

A la **Dra. Esperanza** por recibirme en su grupo de trabajo y haberme guiado durante el doctorado, por confiar en mis ideas y permitirme participar en otros proyectos de su laboratorio. Usted siempre será una inspiración para mi! Muchas gracias.

A mi comité tutor, el **Dr. Mario Serrano** y **Dr. Luis Cardenas** por sus valiosas aportaciones para que mi proyecto alcanzará profundidad científica.

A mi jurado de tesis: La **Dra. Eria Rebollar**, la **Dra. Rosa María Gutiérrez**, la **Dra. Ayari Fuentes**, el **Dr. Adelfo Escalante** y el **Dr. Alfredo Martínez** por sus comentarios y correcciones para mejorar mi manuscrito de tesis.

A la **Dra. Mónica Rosenblueth** por su apoyo incondicional y consejos para la realización de mi proyecto de tesis, y a **MC. Marco A. Rogel** por su ayuda técnica en mis experimentos, y a los integrantes y amigos del grupo de trabajo de microbiología simbiótica: **Victor, Rafa, Diana, Leslie, Tonalli, Pilar, Jacob** y **Lore** por su amistad y apoyo académico en todo momento.

A los cuates de la 4T, el **Dr. Migue, Jhony Ozuna, Cuax, Jessica, Jhony Padilla, Juanito** y con los que compartí buenos momentos dentro y fuera del laboratorio, por los momentos de risa y los consejos para realizar mis experimentos.

A el **Dr. Otto**, la **Dra. Isabel**, al **Dr. Christian**, a las **técnicas Lulú y Ángeles** por su apoyo y facilidades durante mi trayecto en el laboratorio.

Al **Dr. Juan Ramos** por sus consejos y apoyo incondicional en esta última etapa del doctorado.

A todos los que hicieron posible que yo alcanzaré este objetivo en mi vida.

¡MUCHAS GRACIAS!

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Maíz: cultivo e importancia	3
1.2 Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>): cultivo e importancia	5
1.3 Sistema milpa	7
1.4 Microbiota asociada a las milpas	11
1.5 Rizobacterias y su interacción con los exudados radiculares	13
2. ANTECEDENTES	18
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	22
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	23
6.1 Cultivo hidropónico de plantas y obtención de exudados radiculares.....	23
6.2 Ensayos de interacción planta-bacteria.....	24
6.3 Extracción de ARN y secuenciación masiva	25
6.4 Análisis bioinformático	26
6.5 Generación de mutantes de <i>R. phaseoli</i> Ch24-10.....	27
6.6 Ensayos de actividad β -glucuronidasa.....	28
6.7 Ensayo de actividad β -galactosidasa	29
6.8 Ensayos de reducción de acetileno	30
6.9 Ensayo de actividad de anhidrasa carbónica	30
6.10 Cultivo de maíz y frijol en vermiculita.....	31
6.11 Ensayos de interacción de <i>Arabidopsis thaliana</i> con <i>R. phaseoli</i> Ch24-10	31
6.12 Cuantificación de la producción de auxinas	33
6.13 Análisis estadísticos.....	33
7. RESULTADOS	34
7.1 Genes de <i>R. phaseoli</i> expresados en exudados de frijol	35
7.2 Genes de <i>R. phaseoli</i> expresados en exudados de maíz	38
7.3 Genes de <i>R. phaseoli</i> inducidos en común en exudados de maíz y de frijol	39
7.4 Perfiles transcriptómicos de <i>R. phaseoli</i> en la milpa.....	41
7.5 Validación de la expresión de genes inducidos por exudados radiculares	47
7.6 <i>Rhizobium phaseoli</i> como promotora del crecimiento vegetal.....	50
8. DISCUSIÓN	54
9. CONCLUSIONES	62
10. PERSPECTIVAS	63
11. BIBLIOGRAFÍA	64
12. ANEXOS	86
Anexo I Parámetros bioinformáticos	86
Anexo II Artículo científico	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema Milpas en pueblos mexicanos.	8
Figura 2. Arreglo tradicional de las plantas en el sistema milpa.	10
Figura 3. Interacciones metabólicas entre los exudados radiculares y los microorganismos.	14
Figura 4. Mecanismos de promoción de crecimiento vegetal de las PGPR.	15
Figura 5. Interacciones planta-microorganismo en la rizosfera de la milpa.	18
Figura 6. Sistema hidropónico para la obtención de exudados radiculares.	24
Figura 7. Flujo de trabajo para el análisis transcriptómico de <i>R. phaseoli</i> en presencia de exudados de maíz y frijol en monocultivo y en el sistema milpa.	25
Figura 8. Análisis de escala multidimensional de los perfiles transcriptómicos de <i>R. phaseoli</i> en exudados radiculares y solución Fahraeus.	34
Figura 9. Genes expresados diferencialmente de <i>R. phaseoli</i> en los exudados radiculares en comparación con la solución Fahraeus.	35
Figura 10. Diagrama de Venn entre los genes de <i>R. phaseoli</i> inducidos por exudados radiculares de frijol y maíz.	36
Figura 11. Expresión de genes rizobianos inducidos por exudados radiculares.	37
Figura 12. Nodulación en monocultivo de frijol y la milpa.	42
Figura 13. Diagrama de Venn entre los genes de <i>R. phaseoli</i> inducidos por exudados radiculares de los monocultivos y la milpa frijol y maíz.	42
Figura 14. Distribución de las categorías funcionales COG de los genes sobreexpresados de <i>R. phaseoli</i> en los exudados radiculares.	45
Figura 15. Representación esquemática de las funciones y vías metabólicas de <i>R. phaseoli</i> inducidas por los exudados de las raíces.	46
Figura 16. Actividades de β -galactosidasa de CCG-VP1 en respuesta a exudados radiculares	47
Figura 17. Actividad β -glucuronidasa de CCG-9A11 en asociación con plantas.	48
Figura 18. Actividad de la anhidrasa carbónica de <i>R. phaseoli</i> Ch24-10.	49
Figura 19. Efecto de <i>R. phaseoli</i> en el crecimiento de frijol y maíz.	50
Figura 20. Raíces de maíz y frijol inoculados con <i>R. phaseoli</i> Ch24-10.	51
Figura 21. Efecto de <i>R. phaseoli</i> en el crecimiento de <i>A. thaliana</i> .	52
Figura 22. <i>R. phaseoli</i> induciendo genes de respuesta a auxinas en <i>A. thaliana</i> .	52
Figura 23. Producción de ácido indolacético por <i>R. phaseoli</i> Ch24-10.	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes de <i>R. phaseoli</i> sobreexpresados en la milpa en comparación con la expresión en exudados de frijol	43
Tabla 2. Genes de <i>R. phaseoli</i> sobreexpresados en la milpa en comparación con la expresión en exudados de maíz	44

RESUMEN

El maíz y el frijol común se han cultivado juntos en Mesoamérica desde hace miles de años en un sistema de policultivos llamado "milpa". En comparación con los monocultivos, las milpas ofrecen una mayor productividad por superficie sembrada y un adecuado control de malezas y plagas, además preservan la integridad de suelo, la biodiversidad y las costumbres y saberes de la región, por lo que son consideradas patrimonio biocultural. En este agroecosistema, el frijol trepa sobre el tallo del maíz y sus raíces crecen entrecruzadas, lo que facilitaría el compartir simbiontes microbianos incluyendo endófitos como *Rhizobium*. Algunos estudios de la milpa han revelado la diversidad bacteriana en suelos donde es cultivada, pero no existen enfoques que describen la funcionalidad microbiana en este agroecosistema. En este trabajo, estudiamos el transcriptoma de *R. phaseoli* Ch24-10 (mediante RNA-seq) en interacción con exudados de las raíces de maíz y frijol cultivados en monocultivo y en sistema milpa bajo condiciones hidropónicas. En los exudados de frijol, se indujeron los genes rizobianos para la nodulación y la degradación de ácido cumárico; mientras que en exudados de maíz se observó la expresión de genes para la degradación del mucílago y el ácido ferúlico, así como los del transporte de azúcares, ácidos dicarboxílicos y sideróforos. Los perfiles transcriptómicos de *R. phaseoli* en la milpa se asemejaron a los inducidos por exudados de frijol porque ambos mostraron una alta expresión de genes de nodulación; algunos genes que se expresaron en los exudados del maíz también fueron inducidos por la milpa, especialmente aquellos para la degradación del ácido ferúlico y la pectina. *R. phaseoli* formó nódulos fijadores de nitrógeno en la milpa similares a los observados en los frijoles en monocultivo, por tanto, la presencia de maíz no interfirió en el proceso simbiótico. Los genes para el metabolismo de azúcares y aminoácidos, la tolerancia a los flavonoides y fitoalexinas, y un sistema de secreción tipo 3 se expresaron tanto en monocultivos como en la milpa, lo que revela genes en común para la colonización de leguminosas y cereales. Empleando fusiones transcripcionales del gen *putA*, que participa en el metabolismo de la prolina, y de un gen que codifica una poligalacturonasa validamos los resultados observados en el análisis transcriptómico. Además, se determinó la actividad de anhidrasa carbónica de *R. phaseoli*, cuyo gen también se sobreexpresó en presencia de los exudados de la milpa. Por otra parte, se determinó que *R. phaseoli* promueve el crecimiento del maíz y del frijol en monocultivo y asociados en la milpa. En ensayos *in vitro* *R. phaseoli* en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* observamos que esta bacteria modifica la arquitectura radicular a través de mecanismos dependientes de una respuesta a auxinas y confirmamos que esta bacteria es productora de la auxina ácido indolacético. En conjunto, los datos de este estudio nos permitirían proponer como hipótesis que los metabolitos radiculares producidos por la milpa podrían tener una mayor riqueza que los que son producidos individualmente por los monocultivos. Estamos en proceso de analizar los metabolitos exudados en estas diferentes condiciones. Los rizobios parecen adaptarse a una diversidad de compuestos expresando genes diferencialmente en cada rizosfera, a la par de promover el crecimiento vegetal. El conocimiento sobre la interacción tripartita cereal-leguminosa-microbio podría ser útil para impulsar el cultivo de las milpas y así recuperar la riqueza de los suelos y el uso de variedades nativas de plantas.

ABSTRACT

Corn and common bean have been grown together in Mesoamerica for thousands of years in polyculture systems called "milpas". Compared to monocultures, milpas offer higher productivity per area of land planted and better weed and pest control, as well as preserving soil integrity, biodiversity and the ancestral knowledge of the region, which is why they are considered biocultural heritage. In this agroecosystem, beans climb on corn stalks and their roots grow intermingled, which would facilitate the sharing of microbial symbionts including endophytes such as *Rhizobium*. Some studies about milpas have shown the bacterial diversity in soils where they are cultivated, but there are no approaches that reveal the microbial functionality and genetic expression in these polycultures. In this work, we studied the transcriptome of *R. phaseoli* Ch24-10 (by RNA-seq) interacting with root exudates of maize and bean grown alone and milpa system under hydroponic conditions.

We observed that in the presence of bean exudates rhizobial genes for nodulation and coumaric acid degradation were induced; while in maize exudates, the expression of genes for mucilage and ferulic acid degradation, as well as those for the transport of sugars, dicarboxylic acids and siderophores was detected. The transcriptomic profiles of *R. phaseoli* in milpa resembled those induced by bean exudates because both showed high expression of nodulation genes; some genes that were expressed in maize exudates were also induced by milpa, especially those for ferulic acid and pectin degradation. *R. phaseoli* formed nitrogen-fixing nodules in the milpa similar to those observed in beans in monoculture, therefore, the presence of maize did not affect the symbiotic process. Genes for sugar and amino acid metabolism, tolerance to flavonoids and phytoalexins, and a type 3 secretion system were expressed in both monocultures and milpa, revealing genes in common for rhizosphere colonization of legumes and cereals. Using transcriptional fusions of the *putA* gene, involved in proline metabolism, and a gene encoding a polygalacturonase, we validated the results observed in the transcriptomic analysis. In addition, we determined the carbonic anhydrase activity of *R. phaseoli*, whose gene was also overexpressed in the presence of milpa exudates. On the other hand, we observed that *R. phaseoli* promotes the growth of maize and bean in monoculture and in milpa system. In *in vitro* assays of *R. phaseoli* in the model plant *Arabidopsis thaliana*, we observed that this bacterium modifies root architecture through auxin-dependent mechanisms, additionally, we confirmed the auxin production by this strain. Overall, the data from this study would allow us to propose as a hypothesis that the root metabolites produced by the milpa could have a greater richness than those produced individually by monocultures. We are in the process of analyzing the metabolites exuded by roots under these different conditions. Rhizobia appear to adapt to a diversity of compounds by expressing genes differentially in each rhizosphere, while promoting plant growth. Knowledge about the tripartite cereal-legume-microbe interaction could be useful to promote the cultivation of milpas and thus recover the richness of soils and the use of native plant varieties.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Maíz: cultivo e importancia

El maíz (*Zea mays* L.) es un pasto gigante domesticado perteneciente a la familia Poaceae como otros cereales como el arroz (*Oryza sativa* L.), avena (*Avena sativa* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.), sorgo (*Sorghum* L.) y trigo (*Triticum* L.). El maíz es uno de los cultivos que ocupa mayor superficie agrícola en el mundo y aunque es destinado principalmente al consumo humano y a la industria, también es empleado como forraje, ornamental y para producir bioetanol (Ranum et al., 2014). Actualmente el maíz es el cereal más importante de América Latina y África subsahariana, y es consumido por más de 900 millones de personas en todo el mundo (McConnell, 2021). México es centro de origen y diversidad genética del maíz, con 64 razas registradas, divididas en siete grupos o complejos raciales por caracteres morfológicos, de adaptación y genéticos (isoenzimas) (Sanchez et al., 2000). Estos complejos incluyen a los grupos cónico, sierra de Chihuahua, ocho hileras, Chapalote, tropicales precoces, dentados tropicales y los de maduración tardía (CONABIO, 2020b). El proceso de domesticación del maíz inició hace más de 9000 años en el suroeste de México, por la cuenca del río Balsas, a partir de un pasto silvestre denominado teocintle (*Z. mays ssp. parviglumis*) (Van Heerwaarden et al., 2011; Matsuoka et al., 2002).

En nuestro país se producen aproximadamente 31.8 millones de toneladas de maíz cubriendo una superficie de 6.9 millones de hectáreas cultivadas por más de 2.5 millones de agricultores, considerándose una de las principales actividades económicas de México (Eakin et al., 2014). Para los mexicanos, este cereal representa la base de su alimentación, con un consumo promedio per cápita de 350 g, aportando los 23g de proteína y las 1022 kcal que

requiere una persona adulta diariamente, así como carbohidratos, vitaminas, microelementos como potasio y selenio (Rouf et al., 2016; CONABIO. 2020a).

Los cultivos de maíz alcanzan una alta productividad por su considerable área foliar y capacidad fotosintética, otorgada por la fotosíntesis C4 que llevan a cabo (von Caemmerer y Furbank, 2006). Durante la fotosíntesis C4 se disminuye la fotorrespiración debido a que la captura de CO₂ y su fijación ocurren en compartimentos separados, resultando en una mayor fijación del carbono y un mejor uso del agua y nitrógeno, en comparación con cereales que realizan la fotosíntesis C3 como el arroz, trigo y cebada (Furbank, 2016).

El maíz puede crecer en regiones al nivel del mar hasta aquellas a más de 4,000 msnm (metros sobre el nivel del mar), desde ambientes húmedos tropicales hasta en condiciones semidesérticas (Perales y Golicher, 2004). En nuestro país, dos ciclos productivos de maíz prevalecen: primavera-verano y otoño-invierno. Cada ciclo dura aproximadamente 120 días, incluyendo cuatro grandes períodos que engloban distintas etapas de crecimiento: Crecimiento de las plántulas (etapas VE y V1), crecimiento vegetativo (etapas V2, V3... Vn), floración y fecundación (etapas VT, R0, y R1) y llenado de grano y la madurez (etapas R2 a R6) (OMAFRA, 2009).

A gran escala, el maíz es monocultivado, es decir, que en los campos solo se siembra una especie vegetal empleando los mismos métodos agrícolas (control de plagas, fertilización y cosecha), sin embargo, esta práctica por largos periodos puede degradar el suelo, disminuir la biodiversidad y propiciar la selección de plagas resistentes (Ryan, 2021; Bavec y Bavec, 2015). El nitrógeno es uno de los elementos limitantes para el crecimiento del maíz, por lo que su deficiencia en los suelos genera plantas con crecimiento escaso y raro, hojas color verde pálido con coloraciones amarillentas y tamaño reducido de la mazorca y llenado

incompleto. Para incrementar el rendimiento del maíz cantidades grandes de fertilizantes nitrógenados (urea, sulfato de amonio, nitrato de amonio) son aplicados al suelo durante el ciclo agrícola, favoreciendo la disponibilidad del nitrógeno para la planta pero causando efectos negativos al ambiente (Chen et al., 2021; Sainju et al., 2019).

1.2 Frijol (*Phaseolus vulgaris*): cultivo e importancia

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas más importantes en el mundo en términos económicos y alimenticios, después de la soya (*Glycine max* L.) y el cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) (Shamseldin y Velázquez, 2020). Ya sea en forma de grano seco o vainas, el frijol tiene un elevado valor nutrimental al proveer proteínas, carbohidratos y lípidos, pero también micronutrientes como hierro, calcio y zinc, y vitaminas como la tiamina (vitamina B1) y el ácido fólico (vitamina B9) (Petry et al., 2015). Al igual que el maíz, esta leguminosa es considerada base de la alimentación para más de medio billón de personas, principalmente en países de Latinoamérica y África (He et al., 2018; Romney et al., 2003). Los frijoles también aportan metabolitos con efectos positivos para la salud humana, entre ellos destacan los polifenoles, flavonoides, antocianinas, taninos y otros con actividades antioxidantes (García-Díaz et al., 2018).

Evidencias basadas en análisis genéticos y metabolómicos indican que la domesticación del frijol ocurrió aproximadamente hace 8.000 años, con 2 orígenes geográficos distintos, Mesoamérica y los Andes, a partir de frijoles silvestres de semilla pequeña y oscura con unos 100,000 años de antigüedad (Rendón-Anaya et al., 2017; Bellucci et al., 2014). Ahora, el frijol está ampliamente distribuido y es cultivado en muchos países tropicales, subtropicales y templados del resto de América, África, Asia y Europa (Wortmann, 2006). México es reconocido como centro primario de domesticación y diversidad genética del frijol (Gepts y

Debouck, 1991), albergando 70 de las especies de *Phaseolus* de las 150 existentes en el mundo, de las cuales *P. vulgaris* (frijol), *P. coccineus* (ayocote), *P. lunatus* (frijol lima), *P. acutifolius* (frijol tepary) y *P. dumosus* (frijol acalete) han sido domesticadas (Lépiz, 2007). A su vez, *P. vulgaris* engloba variedades silvestres y domesticadas con diferencias en el desarrollo, maduración y producción de semillas con tamaños, formas y colores muy diversos (de Ron et al., 2015). Las variedades domesticadas son las más cultivadas y producen semillas más grandes con una elevada permeabilidad de la testa seminal y un menor tiempo de latencia, acompañado de una mayor variabilidad de colores y con un menor contenido de metabolitos tóxicos (Morales-Santos et al., 2017).

El frijol común puede adaptarse a una variedad de suelos y condiciones climatológicas, puede crecer a nivel del mar hasta altitudes de entre 2200 y 3000 m, y en un rango de temperatura que varía entre los 15°C y 23°C, incluso hasta en temperaturas de 35°. El pH ideal de los suelos donde se cultiva debe oscilar entre entre 6.5 y 7.5, sin embargo, algunas variedades pueden desarrollarse en suelos ligeramente ácidos (pH 4.5-5.5) (Wortmann, 2006). El ciclo de cultivo de esta leguminosa depende de la variedad, puede ser de 80 días en las variedades de mata y hasta 180 días en aquellas que desarrollan guías, conocidas como trepadoras (Clark y Francis, 1985).

En México alrededor de 570 mil productores siembran frijol alcanzando una superficie de cultivo de 2.3 millones de hectáreas por año. La producción anual del frijol supera el millón de toneladas, de las cuales 67% es generado por agricultores pequeños (SIAP, 2016). Para el 2017, esta leguminosa alcanzó una producción de más de un millón 183 mil toneladas en México, siendo el 7° productor de frijol a nivel mundial. Por tanto, el frijol es el segundo

cultivo más cultivado en nuestro país luego del maíz, con un consumo anual per cápita de 9.9 kg (Morales-Santos et al., 2017; SIAP, 2016).

P. vulgaris establece relaciones simbióticas con bacterias del género *Rhizobium*. Entre ellas *Rhizobium etli*, *R. phaseoli*, *R. leguminosarum*, *R. gallicum* y *R. tropici* son algunas especies que son capaces de inducir la formación de nódulos en las raíces del frijol común (Martínez-Romero et al., 2003; Servín-Garcidueñas et al., 2014). Dentro de los nódulos, los rizobios una vez diferenciados en bacteroides, llevan a cabo la fijación biológica de nitrógeno (Clúa et al., 2018). El aporte de nitrógeno al frijol, derivado de simbiosis con *Rhizobium*, permite su cultivo en suelos deficientes de este elemento, reduciendo la utilización de fertilizantes nitrogenados y con ello sus efectos negativos en el medio ambiente (Khan et al., 2020; Good y Beatty, 2011).

1.3 Sistema milpa

La milpa es un sistema de policultivo que se originó en Mesoamérica hace miles de años, pero su uso se ha expandido y es vigente en el resto de México y muchos países de Sudamérica (CONABIO, 2016). La palabra Milpa deriva del Nahuatl “*milli*” que significa campo o parcela y “*pan*” que significa encima de, es decir, “encima de la parcela” (Rodríguez-Robayo et al., 2020), haciendo referencia al solapamiento de las plantas en los cultivos (Figura 1). Aunque la diversidad vegetal en las milpas varía dependiendo de la región, el maíz se mantiene como cultivo principal acompañado generalmente de frijol (*Phaseolus* spp) y calabaza (*Cucurbita* spp), conocidos en conjunto como "las tres hermanas o la triada mesoamericana" (Landon, 2008). En las milpas mexicanas podemos encontrar hasta 59 razas nativas de maíz, 5 especies de frijol, 4 especies de calabaza y algunas

variedades de chiles, tomates y quelites como verdolagas, quintoniles y huazontle (Méndez-Flores et al., 2021; Mateos-Maces et al., 2016).

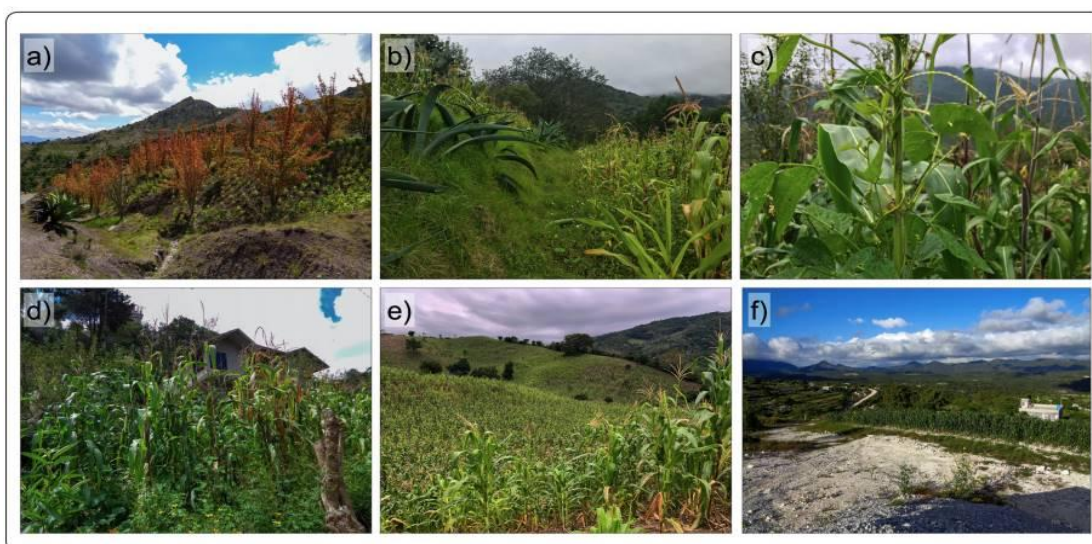


Figura 1. Sistema Milpas en pueblos mexicanos. a) Milpa en El Nogal, Ixmiquilpan; el maíz se encuentra asociado con árboles de pera; b) Milpa en el Boxo, Cardonal; la milpa está delimitada por maguey; c) Milpa en el Boxo, Cardonal; el maíz está asociado con frijol; d) Milpa en Cuesta Colorada, Ixmiquilpan; e) Milpa en Huitzilingo, Orizatlán; f) Milpa en El Pinalito, Cardonal. Tomada de Gastélum y Rocha (2020).

La composición de la milpa dependerá de las condiciones climatológicas, edafológicas y de las necesidades nutricionales y conocimientos de los agricultores, por ello este agroecosistema es considerado reservorio, no sólo de recursos genéticos sino también de saberes y tradiciones regionales (Lozada-Aranda et al., 2018; Santiago-Vera et al., 2021). Familias completas, incluso comunidades enteras, contribuyen en la elección de las semillas, el periodo de siembra, mantenimiento y cosecha de las milpas, considerándose entonces como una actividad social importante heredado de generación en generación (Santillán et al., 2014).

En términos nutricionales, la milpa ofrece una dieta balanceada con un mayor aporte de proteínas, carbohidratos y vitaminas (excepto la B12), a diferencia de los monocultivos de maíz, que no brindan la vitamina A, vitamina B9, vitamina B12 y vitamina C, y de frijol, que

carecen de la vitamina A, vitamina B12 y vitamina C (Novotny et al., 2021). Los productos de la milpa son fuente de metabolitos bioactivos como fenoles, antocianinas, fitosteroles, fitatos y peptidos con diversas actividades benéficas para la salud de sus consumidores (Méndez-Flores et al., 2021).

En muchos pueblos de México, los policultivos son sustento económico de los agricultores al producir alimentos a lo largo de todo el año, en contraparte con la siembra en monocultivos que se cosecha una vez anualmente. En general, el maíz en milpa genera un mayor rendimiento por área sembrada que su monocultivo, en cambio la producción del frijol depende mucho más de la variedad que se siembra y el tipo de suelo (Santalla et al., 2001; Zhang et al., 2014). Por ello, este modelo de asociación maíz-frijol ha sido adoptado por agricultores de países de África y Europa, obteniendo resultados agrícolas satisfactorios (Nassary et al 2021; Fischer et al 2020).

El peculiar arreglo de los cultivos en la milpa permite un mejor uso del suelo y adecuado aprovechamiento de los recursos del sistema (agua, luz y nutrientes), debido a la ausencia de surcos en el campo y a las diferencias estructurales y fisiológicas de las plantas que son cultivadas (Zhang *et al.*, 2014; López-Ridaura et al., 2021). Por ejemplo, el maíz tiene un sistema radicular más profundo y desarrollado que el frijol y la calabaza permitiéndole explorar un mayor volumen de suelo para absorber nutrientes y agua (Albino-Garduño et al 2015). Por su parte, el crecimiento de la calabaza y los quelites al ras del suelo evita el establecimiento de las malezas y la erosión del suelo. Mientras que, en la zona aérea, el frijol de guía puede trepar sobre las plantas de maíz ganando soporte y una mayor superficie para su desarrollo foliar y producción de flores y vainas (Figura 2) (López-Ridaura et al., 2021).

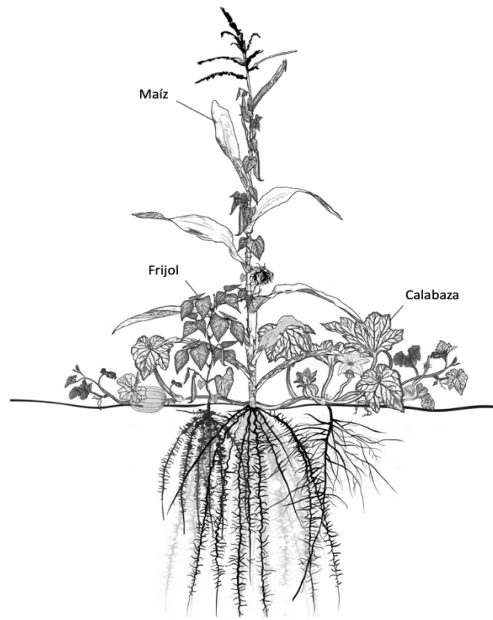


Figura 2. Arreglo tradicional de las plantas en el sistema milpa. Se muestra la interacción del maíz, frijol y la calabaza en la zona aérea y entre sus raíces en el suelo. Modificada de López-Ridaura et al (2021).

Las diferentes interacciones ecológicas en la milpa contribuyen a la conservación de la biodiversidad de la región y del país, al perpetuar el uso de semillas de razas nativas y aumentar la riqueza de especies de polinizadores y otros animales que son atraídos a los campos de cultivo. Este policultivo es eficaz para control de plagas, malezas y tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento de cepas fitopatógenas de *Burkholderia* y *Serratia* (Maravillas et al., 2019). Por lo anterior, la milpa requiere de prácticas mínimas de labranza y poco empleo de agroquímicos favoreciendo la fertilidad del suelo y con ello un efecto positivo en la microdiversidad de los campos agrícolas (Gastélum y Rocha, 2020).

A partir de la Revolución Verde, alrededor de 1940-1970, con la llegada de los fertilizantes y herbicidas, las variedades híbridas y la mecanización, el maíz y el frijol empezaron a cultivarse a gran escala como monocultivos en muchos lugares de México (Aguilar-Jimenez et al., 2019). Los pequeños agricultores que tenían terrenos sumamente pequeños, dispersos

en diferentes lugares y con una marcada pendiente (dificultando el uso de tractores) siguieron cultivando la milpa, a pesar de que es una práctica agrícola intensiva en mano de obra (Ebel et al., 2017). El uso de la tierra en monocultivo ha traído la degradación de los suelos, la preferencia en el uso de semillas híbridas y la dependencia de insumos externos (Aguilar-Jiménez et al 2019). Sería muy beneficioso que los agricultores volvieran a cultivar más tierras en milpa, para recuperar la riqueza de los suelos y preservar el uso de diversas razas nativas de la región.

1.4 Microbiota asociada a las milpas

Las prácticas agrícolas modernas y la domesticación de los cultivos han impactado en la diversidad y funcionalidad de los microbios del suelo y también de los asociados a los diferentes tejidos de las plantas. Una disminución de la diversidad microbiana ha sido observada como consecuencia de los procesos de domesticación en las plantas (Martinez-Romero et al., 2020). La milpa por ser un sistema agrícola con múltiples interacciones ecológicas ha conservado una muy alta diversidad microbiana en los suelos donde es cultivada (Gastélum y Rocha, 2020; Rebollar et al 2017; Aguirre-Von-Wobeser et al., 2018). Rebollar et al (2017) estudiaron la microbiota del suelo de milpas en la localidad de Españita, Tlaxcala (México) en las diferentes etapas del cultivo: antes de plantar (temporada de secas), durante el crecimiento temprano de las plantas (durante temporada de lluvia) y antes de la cosecha (finalizando la temporada de lluvias). Ellos encontraron a los filos bacterianos Proteobacteria (41.35%), Actinobacteria (17.33%), Acidobacteria (12.47%), Gemmatimonadetes (7.53%), y Verrucomicrobia (6.41%) como predominantes, sin embargo, no fueron detectados cambios significativos en la diversidad y composición de la microbiota a lo largo del ciclo agrícola. Interesantemente, las interacciones entre estos grupos

bacterianos si cambiaron a través del tiempo y estos coincidieron con las etapas vegetativas, la lluvia y la adición de fertilizantes.

Por otra parte, analizando las milpas de la localidad de El Boxo, Hidalgo (México), Aguirre-Von-Wobeser et al (2018) observaron que la diversidad bacteriana asociada a las raíces de maíz en milpa es menor en comparación con la presente en el suelo no rizosférico, sugiriendo que los exudados radiculares son clave en la estructuración de la microbiota en este agroecosistema. Ellos reportaron a los filos Verrucomicrobia y Actinobacteria enriquecidos en suelo rizosférico, así como al orden Burkholderiales perteneciente al filo Proteobacteria. En concordancia, Cabrera et al (2020) reportaron que los suelos de estas milpas en Hidalgo son ricos en actinobacterias del género *Amycolatopsis* y *Streptomyces* como *S. aurantiacus*, *S. glomeroaurantiacus*, *S. flavogriseus* y *S. canus*. Estas bacterias produjeron enzimas líticas y mostraron actividad inhibitoria contra el fitopatógeno del maíz *Fusarium graminearum*.

En contraste, los suelos de las milpas de Cocotitlán en el Estado de México, México presentan una abundancia elevada de los filos Bacteroidetes, FBP y Proteobacteria pero una disminuida presencia de Nitrospirae y Gemmatimonadetes (Moreno-Espíndola et al 2018).

En milpa del municipio de Huejotzingo en Puebla, México, en donde se cultiva la asociación maíz y frijol intercalada en árboles de manzano (*Malus domestica Borkh*), se determinó la diversidad y abundancia de actinomicetos totales, actinomicetos fijadores de nitrógeno, hongos, levaduras, bacterias totales y esporas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) presentes en los suelos (Duché-García et al 2021). Los autores observaron que la abundancia de estos grupos microbianos, exceptuando las levaduras y los HMA, estaba enriquecida en los suelos donde se cultivaba la milpa en comparación con los monocultivos de manzano y maíz.

Como se mencionó anteriormente, el frijol común ha sido históricamente sembrado en las milpas de México, por lo que su simbiote natural, *Rhizobium*, es ubicuo en este agroecosistema. En las milpas de Puebla, *R. etli*, *R. gallicum* y *R. phaseoli* han sido aisladas de suelo y nódulos de frijol (Silva et al., 2003; Rosenblueth y Martínez-Romero, 2004).

Si bien estos estudios dan un panorama general de la diversidad microbiana en los ambientes asociados a la milpa, se desconocen las bases genómicas y el potencial metabólico de estos microorganismos y como es que participan en el crecimiento y productividad de las diferentes plantas sembradas. Tampoco se conoce cómo es que las interacciones planta-planta en las milpas modifican los patrones de exudación de metabolitos de las raíces y cómo esto impacta en la microbiota endófito y rizosférica.

1.5 Rizobacterias y su interacción con los exudados radiculares

La rizosfera es la fracción del suelo que está adherida a las raíces de las plantas y sobre la cual sus exudados ejercen su efecto (Hiltner, 1904). Los exudados radiculares son ricos en azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y otros nutrientes que sirven como fuente de carbono y nitrógeno para los microorganismos del suelo, por lo que una alta actividad microbiana ocurre en la rizósfera y sobre las raíces (Figura 3A) (McNear et al 2013; López-Guerrero et al., 2013). Los metabolitos secundarios como alcaloides, terpenos y compuestos fenólicos también son secretados por las raíces y desempeñan múltiples procesos asociados a la simbiosis con bacterias y hongos, inhibición de fitopatógenos y alelopatía (Badri y Vivanco, 2009; Bertin Yang y Weston, 2003). Las bacterias de la rizosfera pueden metabolizar directamente los nutrientes presentes en los exudados o bien obtenerlos a través de la degradación de polímeros complejos como pectina, mucilago o ácidos fenólicos,

generando moléculas más sencillas que también pueden servir de sustrato para otra bacterias (Figura 3B) (Sasse et al., 2018).

Otras funciones reguladas por los exudados radiculares incluyen la promoción de la agregación del suelo, la meteorización, la movilización de nutrientes, la desintoxicación de metales y contaminantes orgánicos y la alteración del flujo de agua en el suelo (Oburger y Jones, 2018). En las plantas, la regulación génica de varios transportadores y canales de eflujo controla la diversidad y cantidad de metabolitos exudados por las raíces, como lo son los transportadores SWEET para los azúcares, los transportadores UMAMIT, CAT y GDU para los aminoácidos y los transportadores ALMT/malato y MATE/citrato para los ácidos orgánicos (Figura 3A) (Canarini et al., 2019).

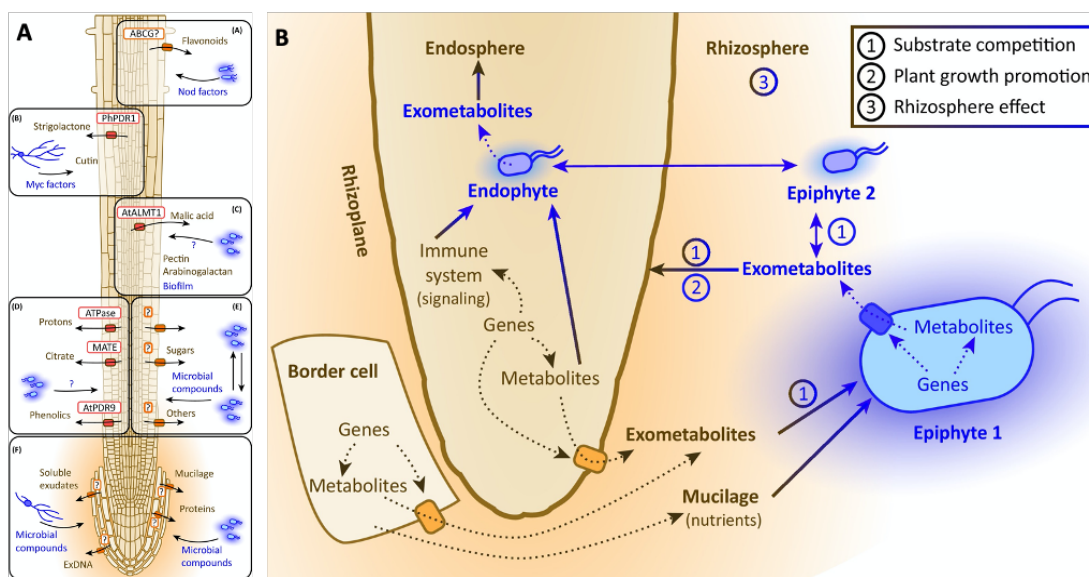


Figura 3. Interacciones metabólicas entre los exudados radiculares y los microorganismos. A) Patrones de exudación de los metabolitos por las raíces y algunas funciones asociadas. B) Metabolismo microbiano de los nutrientes de los exudados radiculares o de células de borde. Las interacciones planta-microbio y microbio-exometabolito se muestran con números: (1) competencia por el sustrato entre los microbios, o entre los microbios y las raíces; (2) promoción del crecimiento de la planta por los compuestos microbianos; y (3) efecto de la rizosfera, probablemente influenciado por la presencia de exometabolitos. Tomada de Sasse et al (2018).

Si bien la composición de los exudados radiculares depende del estatus nutricional y edad de la planta (Carvalhais et al., 2011; Korenblum et al., 2020), la microbiota de la rizosfera también reprograma los patrones de exudación de las raíces. La colonización de una zona de la raíz por un grupo bacteriano específico determina la secreción o acumulación de metabolitos en otras regiones de la raíz, el tallo y las hojas (Korenblum et al., 2020; Ankati et al., 2019).

Muchas de las bacterias asociadas a la rizosfera de las plantas se denominan rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés, Plant growth-promoting rhizobacteria) (Beneduzi et al., 2012). Las PGPRs poseen un arsenal de actividades metabólicas y enzimáticas que les permiten estimular el crecimiento a través de inducir cambios en la expresión de genes y fisiología de sus hospederos (Chandran et al., 2021). Estos mecanismos se resumen en la Figura 4 y se clasifican como directos o indirectos.

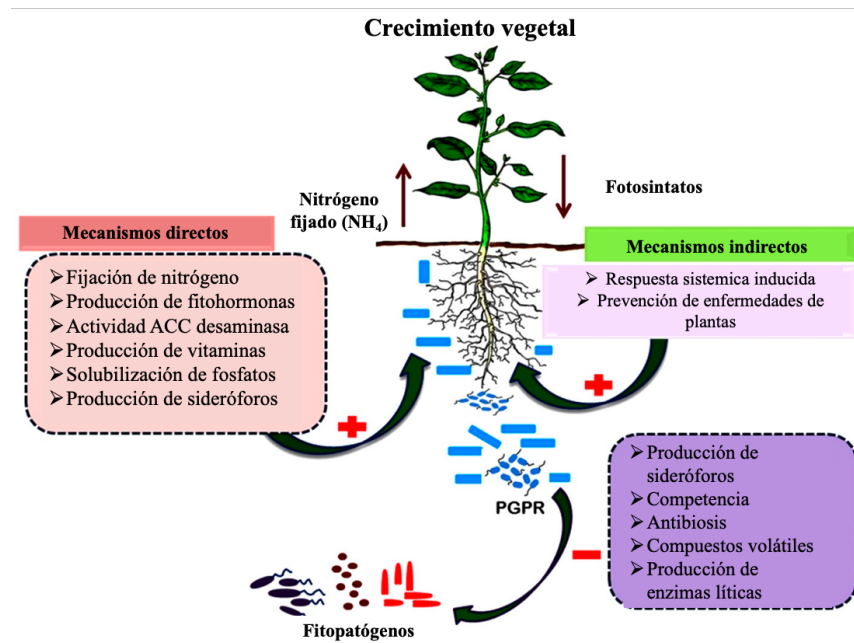


Figura 4. Mecanismos de promoción de crecimiento vegetal de las PGPRs. El recuadro naranja muestra los mecanismos directos (izquierda) y el recuadro verde indica los mecanismos indirectos (derecha). Modificada de Chandran et al (2021).

Los mecanismos directos de promoción de crecimiento vegetal están asociados a la producción de compuestos o metabolitos microbianos que sirven como nutrientes para las plantas. Entre ellos encontramos, la fijación biológica de nitrógeno, la producción de fitohormonas y la solubilización de fósforo (Nelson, 2004). Dentro de las fitohormonas que producen las PGRP destaca el ácido indolacético (AIA), capaz de incrementar el volumen radicular, la tasa de respiración de la raíz y el flujo de protones en la membrana de la raíz, provocando un aumento en la absorción de nutrientes y minerales solubles (Spaepen et al., 2014). Alrededor del 80% de las especies bacterianas que habitan la rizósfera son productoras de auxinas (Khalid et al 2014). Por otro lado, los mecanismos indirectos de promoción ocurren cuando las PGPRs producen moléculas antimicrobianas o inducen respuestas sistemas que protegen al hospedero de estrés biótico y abiótico (Chandran et al., 2021). Las bacteriocinas, biosurfactantes y sideróforos son los principales antimicrobianos secretados por las PGPRs (Santoyo et al., 2021). Los sideróforos también son efectivos en la captura de hierro en el suelo, formando complejos que son disponibles para otras bacterias y las plantas (Khan et al., 2018). Muchas PGPRs pueden colonizar los tejidos internos de la planta usando mecanismos de penetración activa o pasiva. Los pasivos ocurren a través de grietas en la zona de emergencia de las raíces, en las puntas de las raíces o las creadas por microorganismos patógenos (Afzal et al., 2019). A diferencia de la penetración activa, que se debe a la presencia de una maquinaria específica de fijación y proliferación, que incluye la secreción de enzimas que hidrolizan parcialmente la pared vegetal, adhesinas, flagelos o la inyección de efectores que atenúan los sistemas de defensa de las plantas (Pinski et al., 2019). Las bacterias endófitas también son capaces de ejercer efectos positivos en el crecimiento de las

plantas similar a los mecanismos realizados por las PGPRs (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006).

La diversidad y funcionalidad de la microbiota rizosférica se ve afectada por diferencias en los patrones de exudación de metabolitos y la rizodeposición a lo largo del sistema radicular (Doornbos et al., 2012). Los factores edafológicos, la especie vegetal, la etapa de crecimiento de las plantas y las prácticas agrícolas como la labranza, la rotación de cultivos y el uso de fertilizantes determinan la estructura de la microbiota de la rizosfera (Martínez-Romero et al., 2020).

Los análisis de transcriptomas de PGPRs, es decir el estudio de la expresión global de sus genomas, en respuesta a exudados radiculares ha permitido descifrar los mecanismos moleculares que utilizan los microbios para colonizar las raíces de diferentes cultivos agrícolas (Shidore et al., 2012; Xie et al., 2015; Yi et al., 2018). La ventaja de analizar las interacciones bacteria-exudados a corto plazo es que evidencian respuestas adaptativas tempranas que podrían quedar enmascaradas en experimentos prolongados, debido a un rápido consumo de los nutrientes o a la reabsorción de los metabolitos por las raíces (Phillips et al., 2004). De hecho, la expresión de genes bacterianos implicados en el metabolismo de algunos carbohidratos y aminoácidos disminuye luego de 48 h de interacción con exudados radiculares (Zhang et al., 2015). En conjunto, la microbiota es responsable de la salud y desarrollo de las plantas, incluso, confieren tolerancia frente a condiciones de cultivo poco favorables como la sequía, heladas, exceso de agua, alta salinidad, acidez y alcalinidad de los suelos (Kumar et al., 2019). El estudio de las PGPRs en agricultura es de gran interés para la preparación de comunidades sintéticas o bioformulaciones que aumenten el rendimiento de los cultivos en campo (Gómez-Godínez et al., 2021).

2. ANTECEDENTES

Aunque las milpas pueden estar constituidas por múltiples especies de plantas, la asociación de maíz con frijol probablemente sea de las prácticas agrícolas más antiguas, al ser ambos inicialmente domesticados en Mesoamérica, incluso su co-domesticación ha sido propuesta (Martínez-Romero, 2003; Souza et al., 1997). La milpa de la Figura 5 muestra como el frijol de guía crece enredado sobre el maíz dándole una mayor superficie de crecimiento, mientras que, en suelo, las raíces de ambas plantas crecen entrecruzadas. Se ha observado que los frijoles creciendo con maíz forman más nódulos fijadores de nitrógeno que cuando son monocultivos, luego de 60 días de inoculación con *Rhizobium* (Cardoso et al., 2007). En especial, los frijoles trepadores son más eficientes para nodular que las variedades arbustivas y tienen ciclos de cultivo tan largos como los de maíz (Graham y Rosas, 1977).

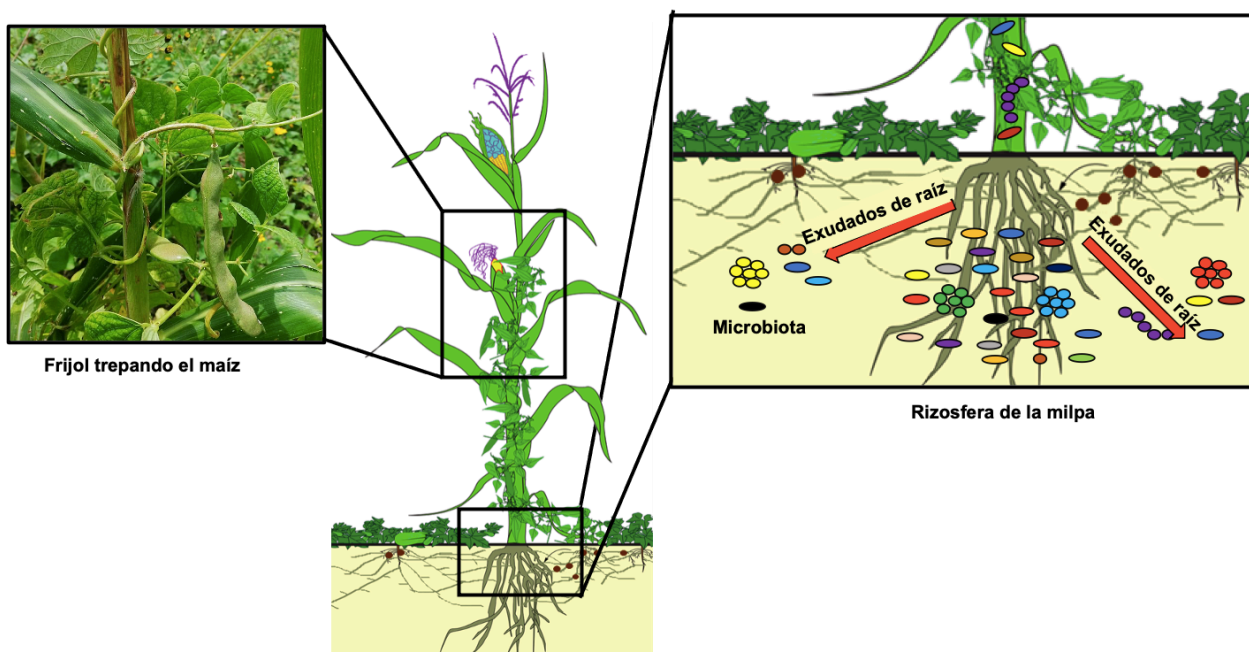


Figura 5. Interacciones planta-microorganismo en la rizosfera de la milpa.

Las raíces del maíz y frijol se encuentran entremezcladas favoreciendo el intercambio de la microbiota. Los metabolitos secretados por las raíces atraen a microorganismos de planta vecina permitiendo que nuevas interacciones ocurran y con ellos nuevos hospederos sean colonizados.

La cercanía de los cultivos en las asociaciones cereal-leguminosa permite que las plantas interactúen por contacto físico o químico (compuestos volátiles y exudados radiculares) o a través de la competencia por los nutrientes en el suelo (Subrahmaniam et al., 2018; Mommer et al., 2016; Wang et al., 2021). En la milpa, la íntima interacción raíz-raíz podría propiciar el intercambio de los microbios del frijol con los del maíz. Nuestro grupo de trabajo exploró esta posibilidad y analizó la diversidad de rizobios presentes en milpas Cholula, Puebla (México).

Rosenblueth y Martínez-Romero (2004) encontraron poblaciones de *R. etli* asociadas a la rizosfera, raíz y tallo de maíces crecidos en milpa, estos rizobios también fueron capaces de nodular el frijol y fijar nitrógeno. Entre los aislados, *R. phaseoli* Ch24-10 (inicialmente identificado como *R. etli*) mostró ser altamente competitiva frente a otros aislados para colonizar la rizosfera y raíz de maíz, además fue la única que se encontró como endófito en el tallo de maíz. En otras milpas de San Miguel Acuexcomac (Puebla, México), *R. etli* y *R. gallicum* también han sido aisladas de suelo y nódulos de frijol (Silva et al., 2003).

En este trabajo *R. phaseoli* Ch24-10 fue seleccionado como modelo de estudio para analizar su respuesta transcripcional ante la presencia de exudados de maíz y frijol crecidos en milpa. *R. phaseoli* Ch24-10 puede crecer en presencia de MBOA (6-metoxi-benzoxazolinona), compuesto derivado de la fitoalexina DIMBOA (2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona) exudada por las raíces de maíz (Cotton et al., 2019). *R. phaseoli* Ch24-10 posee 6539 genes distribuidos en un cromosoma de aproximadamente 4.43 Mpb y 4 plásmidos: pCh241d (1.1 Mpb), pCh241c pSym (1.1 Mpb), pCh241b (419 Kpb), pCh241a (365 Kpb) (López-Guerrero et al., 2012a), donde pCh241c alberga los genes necesarios para la simbiosis con frijol.

López-Guerrero et al., (2012b) exploraron el transcriptoma de *R. phaseoli* Ch24-10 en el rizoplano de frijol y maíz. Específicamente, en el frijol hubo alta expresión de genes *teu* y transportadores del tipo ABC, mientras que en maíz se observó expresión de genes que codifican para transportadores de aminoácidos, de resistencia a antibióticos, depolimerasas de polihidroxibutirato y enzimas del metabolismo de las purinas. En ambos monocultivos se detectó una alta expresión de genes extracromosómicos asociados a catabolismo de prolina, captura de hierro, biosíntesis de tiamina y giberelinas, sistemas de secreción tipo VI, transportadores de carbohidratos, bombas de extrusión, amilasas, proteasas y poligalacturonasas. Desafortunadamente, la cepa utilizada durante este estudio carecía del pCh241a y no hubo réplicas del experimento, por lo que mecanismos importantes para la interacción con el maíz y con el frijol podrían no haberse revelado.

El perfil de expresión de *R. phaseoli* Ch24-10 en interacción con otras PGPRs (*Sinorhizobium americanum*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Methylobacterium extorquens*) fue recientemente analizado por Gómez-Godínez et al (2019). Sobre las raíces del maíz en presencia de otras PGPRs, *R. phaseoli* Ch24-10 expresó genes que codifican transportadores tipo ABC para azúcares y peptidos, transportadores MFS (por sus siglas en inglés, Major Facilitator Superfamily) y muchos genes hipotéticos. Sin embargo, cuando *R. phaseoli* Ch24-10 es la única cepa inoculada en raíces de maíz, ésta expresó genes involucrados en la fijación de nitrógeno y respiración pero no se detectó actividad de nitrogenasa. En contraste, los genes que codifican el cuerpo basal y gancho del flagelo, flagelinas y proteínas necesarias para la quimiotaxis fueron reprimidas en el rizoplano de maíz.

3. JUSTIFICACIÓN

El maíz y el frijol son dos de los cultivos más producidos en el mundo y por su alto valor nutricional son base de la alimentación de países de Latinoamérica y África. En México, desde tiempos prehispánicos ambas plantas han sido sembradas juntas en los policultivos denominados “milpas”, obteniendo una mejor producción por área sembrada, en comparación con sus monocultivos. Las milpas son reservorios de una gran diversidad de plantas y animales, así como de saberes y tradiciones de los pueblos mexicanos. Lamentablemente, luego de la revolución verde (1940-1970), el maíz y el frijol empezaron a cultivarse a gran escala como monocultivos, causando la degradación de los suelos, la pérdida de semillas de variedades nativas y la dependencia de insumos externos. Los microorganismos de la rizósfera poseen mecanismos de promoción de crecimiento vegetal que mejoran la productividad y salud de los cultivos. La diversidad microbiana de suelos en donde las milpas son cultivadas ha sido analizada, sin embargo, no existe estudios que releven la expresión genética ni el metabolismo de los microorganismos en este agroecosistema. En el presente trabajo, utilizamos a *R. phaseoli* Ch24-10, un endófito proveniente de maíz de milpas de Cholula (Puebla, México) para estudiar la expresión genómica bacteriana durante la interacción con exudados de raíces de maíz y frijol cultivados en milpa bajo condiciones de laboratorio. Con esto se pretende conocer los mecanismos adaptativos que emplean los microorganismos de la milpa para adaptarse a la rizosfera, colonizar y promover el crecimiento de más de una especie de planta a la vez, con la intención de generar conocimiento útil para desarrollar estrategias que permitan recuperar el uso de la milpa en campos mexicanos y conservar nuestras tradiciones y diversidad de semillas nativas.

4. HIPÓTESIS

Los exudados de raíz de maíz y frijol en monocultivo o en la milpa inducirán la expresión de genes en *R. phaseoli* involucrados en la colonización de plantas, incluyendo genes para el transporte y metabolismo de nutrientes, así como para la tolerancia o degradación de metabolitos tóxicos.

La inoculación de *R. phaseoli* promoverá el crecimiento del maíz y la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en frijol crecidos en la milpa en comparación con los monocultivos.

5. OBJETIVOS

General

Estudiar el transcriptoma *Rhizobium phaseoli* Ch24-10 en presencia de exudados radiculares de la milpa para caracterizar los genes rizobiales involucrados en la interacción con el maíz y frijol.

Particulares

- ◆ Analizar el transcriptoma de *R. phaseoli* Ch24-10 en presencia de exudados de la milpa y compararlo con los transcriptomas en respuesta a los exudados de los monocultivos de maíz y de frijol.
- ◆ Validar con fusiones transcripcionales y ensayos enzimáticos la expresión de genes de interés detectados en los análisis transcriptómicos de *R. phaseoli* Ch24-10.
- ◆ Evaluar el efecto de *R. phaseoli* Ch24-10 en el crecimiento del maíz así como la nodulación y fijación de nitrógeno del frijol cultivados en la milpa de laboratorio.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

6.1 Cultivo hidropónico de plantas y obtención de exudados radiculares

Para este estudio se utilizaron semillas de frijol de la variedad comercial negro Jamapa y de maíz de la variedad “negro criollo” del estado de Hidalgo, México. Las semillas fueron desinfectadas con etanol al 70% (1 min), hipoclorito de sodio al 1.2% (15 min) y tiosulfato de sodio al 2% (1 min), incorporando lavados con agua destilada esteril entre cada tratamiento (Rosenblueth y Martinez-Romero, 2004). Las semillas desinfectadas fueron colocadas en placas de agar agua a 28 °C por 48 h en oscuridad. Dos germinados de frijol (monocultivo de frijol), 2 de maíz (monocultivo de maíz) o 1 de frijol con 1 maíz (sistema milpa) fueron colocados sobre pedestales de acero inoxidable dentro de tubos vidrio (25x200mm) con 50mL de solución hidropónica Fahraeus sin nitrógeno (g/L; 0.132g de CaCl_2 , 0.12g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1g de KH_2PO_4 , 0.075g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.005 g de citrato férrico y 0.07mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , H_3BO_3 y $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), y luego mantenidos por 5 días a 28 °C en fotoperiodo de luz/oscuridad (16h/8h). El sistema hidropónico propuesto (Figura 6A) permitió que la parte aérea de la planta creciera en presencia de luz para fotosintetizar adecuadamente mientras que las raíces se mantuvieron en oscuridad para no interferir con su capacidad de exudación y evitar la degradación de los metabolitos producidos. Además, se logró observar el crecimiento entremezclado de las raíces de la milpa y los exudados generados (Figura 6B). Para descartar la contaminación del sistema hidropónico, los exudados fueron inoculados en placas de medio PY (5 g de peptona, 3 g de extracto de levadura, 18 g de agar por litro de H_2O) y LB (10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl y 18 g de agar por litro de H_2O) e incubados a 30°C por 72 h. Las plantas con signos de enfermedad o infección por hongos fueron excluidas.

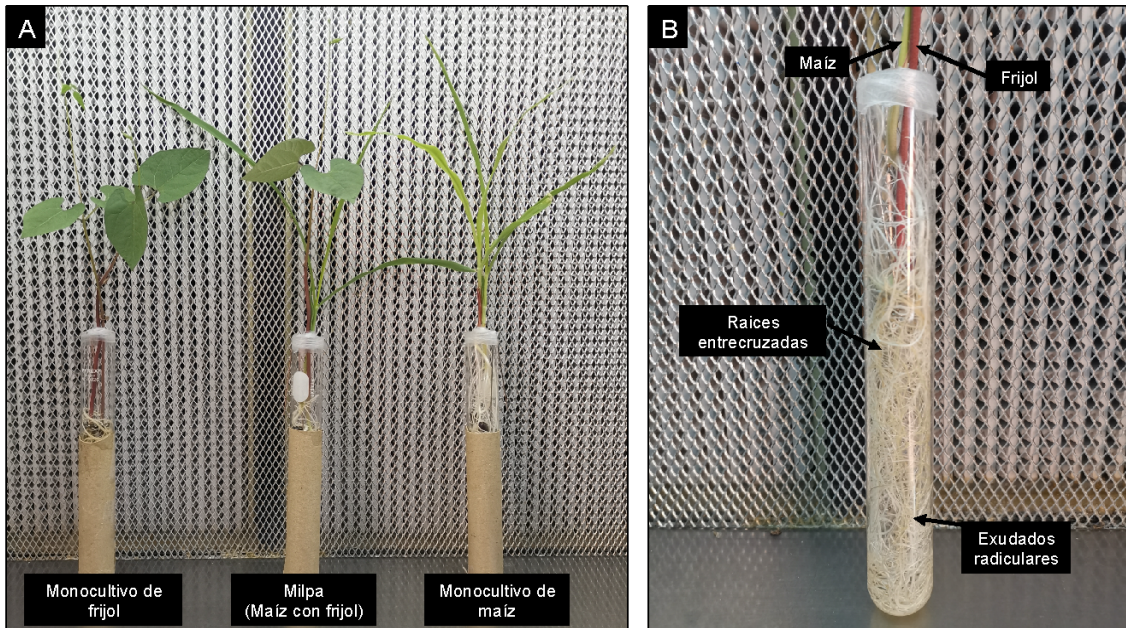


Figura 6. Sistema hidropónico para la obtención de exudados radiculares. A) Maíz y frijol creciendo separados en monocultivo y en asociación en la milpa. B) Raíces de la milpa utilizadas para la producción de exudados radiculares.

6.2 Ensayos de interacción planta-bacteria

R. phaseoli Ch24-10 fue cultivada por 24 h a 30°C en agitación constante (280 rpm). Los cultivos fueron recuperados por centrifugación a 4025 g por 5 minutos y las células fueron lavadas una vez con MgSO₄ (10 mM). Los exudados radiculares de los monocultivos de frijol, monocultivos de maíz y del sistema milpa fueron inoculados con 1x10⁸ células de *R. phaseoli* Ch24-10 y después de 2 horas de interacción se adicionó RNALater® al 10% (Ambion). Los transcriptomas de bacterias en respuesta a exudados radiculares en corto plazo (menos de 4h) evidencian respuestas tempranas que podrían quedar enmascaradas en interacciones más prolongadas, debido a un rápido consumo de los nutrientes o a la reabsorción de los metabolitos por las raíces (Phillips et al., 2004; Zhang et al., 2015).

La solución Fahraeus también fue inoculada como control experimental. Tres réplicas biológicas compuestas por 3 tubos fueron incluidas para cada uno de los 4 tratamientos (Figura 7). Las células posttratamiento fueron recuperadas a 4025 g por 5 minutos y la biomasa fue congelada inmediatamente con nitrógeno líquido.

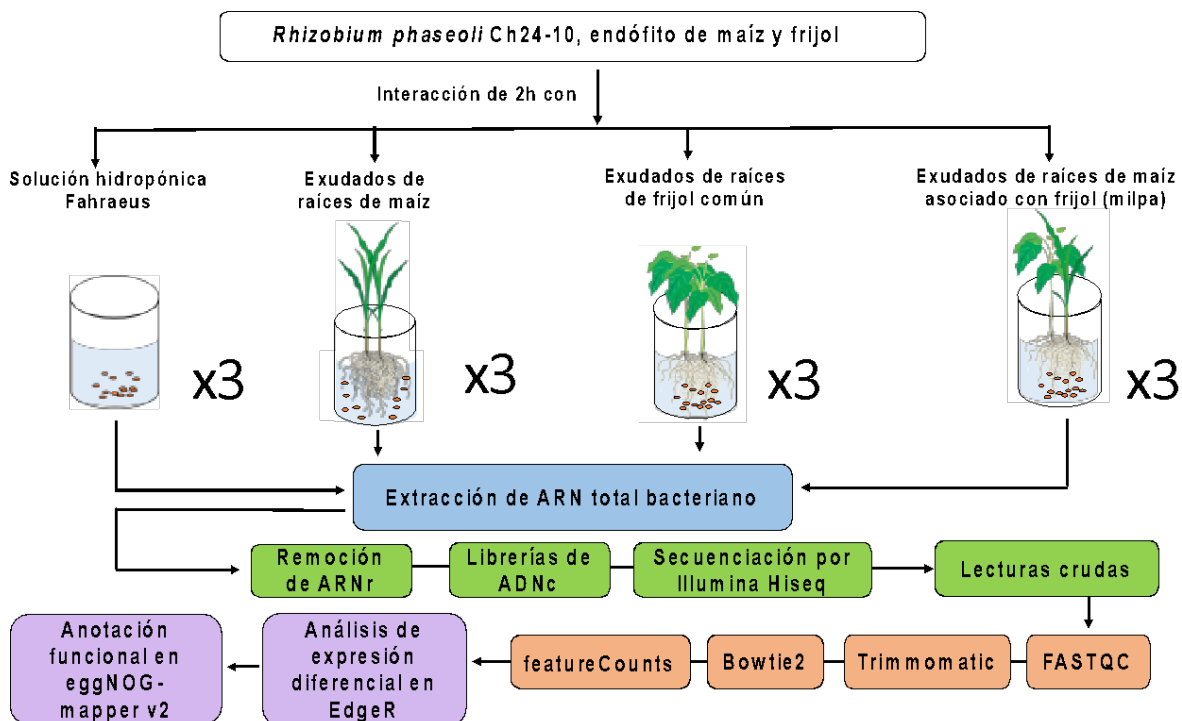


Figura 7. Flujo de trabajo para el análisis transcriptómico de *R. phaseoli* en presencia de exudados de maíz y frijol en monocultivo y en el sistema milpa. Los bloques verdes muestran procedimientos para el RNA-seq, los naranjas indican los programas para el análisis bioinformático y los morados el tratamiento de datos para el análisis de expresión diferencial y anotación funcional.

6.3 Extracción de ARN y secuenciación masiva

El ARN total de las células fue extraído con RNeasy Mini Kits (Qiagen) y DNAsa I (Sigma-Aldrich) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Un tratamiento previo con proteinasa K (Qiagen) y lisozima (Sigma-Aldrich) fue incluido para optimizar la extracción de ARN.

La integridad del ARN obtenido fue valorada usando un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y un TapeStation 2,200 (Agilent Technologies). Las muestras con un rRNA ratio >0.8 y un RIN (por sus siglas en inglés, RNA Integrity Number) >8 fueron consideradas apropiadas para secuenciación masiva. Los ARN ribosomales fueron removidos con Ribo-Zero Bacteria (Illumina) y las librerías de ADN complementario fueron preparadas con el protocolo TruSeq non-stranded (Illumina). La secuenciación masiva de las librerías fue realizada con la plataforma HiSeq 4000 (Illumina) por MacroGen Inc. (Servicio de secuenciación, Corea del Sur).

6.4 Análisis bioinformático

Las lecturas de RNA-seq obtenidas de todos los tratamientos se analizaron empleando los métodos bioinformáticos resumidos en la figura 7 y descritos en el anexo I. La calidad de las secuencias obtenidas fue evaluada con FASTQC v0.11.8 (Andrews, 2010), aquellas de baja calidad y adaptadores fueron eliminadas usando Trimmomatic v0.39 (Bolger et al., 2014) con los parámetros LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:36. Las secuencias de alta calidad fueron alineadas al genoma de *R. phaseoli* Ch24-10 (GCF_000268285.2_RPHCH2410v2) usando Bowtie2 v2.3.5 (Langmead and Salzberg, 2012) con los parámetros --very-sensitive -q -p 20 -x -2 -S. Las lecturas pareadas y mapeadas asociadas a cada gen fueron cuantificadas con featureCounts v1.6.4 (Liao et al., 2014). Con la paquetería de edgeR v3.6.0 de Bioconductor se realizaron los análisis de expresión diferencial de los datos transcriptómicos (Robinson et al., 2010). Las cuentas por millón (cpm) fueron normalizadas usando el método TMM (por sus siglas en inglés, trimmed mean of M-values) para estimar los niveles de expresión de cada gen. Un gen fue considerado como diferencialmente sobreexpresado si tenía un Log2 fold change > 1 y un FDR (por sus siglas

en inglés, false discovery rate) de 0.95 con valores de p ajustados ≤ 0.05 (Bustamante-Brito et al., 2019). Diagramas de Venn fueron obtenidos para detectar genes exclusivos y compartidos entre los transcriptomas usando el sitio web <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>. Los genes sobreexpresados se clasificaron en categorías COG (por sus siglas en inglés, clusters of orthologous groups) usando la versión en línea de eggNOG-mapper v2 (<http://eggno-mapper.embl.de>) (Huerta-Cepas et al., 2019).

6.5 Generación de mutantes de *R. phaseoli* Ch24-10

Dos cepas derivadas de *R. phaseoli* Ch24-10 (CCG-9A11 y CCG-VP1) con genes reporteros fueron obtenidas para comprobar la transcripción de genes rizobianos que se expresaron en presencia de exudados radiculares. Para CCG-9A11, se realizó una mutagénesis por transposición con pCAM140 (Tn5-*gusA*) (Wilson et al., 1995). Se seleccionaron los mutantes que se indujeron con exudados de maíz utilizando el sustrato X-gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico). Se verificó que sólo había una inserción de Tn5 mediante hibridación Southern utilizando un fragmento de Tn5 como sonda. Para localizar el sitio de inserción, se obtuvo un clon y se secuenció. La inserción se produjo en el gen RPHASCH2410_PD02690, que codifica una poligalacturonasa GH28 (poli-alfa-1,4-galacturónido glicanohidrolasa). Para CCG-VP1, se realizó una mutagénesis dirigida al sitio del gen *putA*, que codifica una prolina deshidrogenasa/pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa necesaria para el metabolismo de la prolina. Este gen fue seleccionado debido a que la prolina es secretada por las raíces de maíz y de frijol, y además observamos la sobreexpresión de transportadores de este aminoácido en los transcriptomas de *R. phaseoli* en respuesta a exudados radiculares. Primero, se amplificó un fragmento del gen *putA* de *R.*

phaseoli Ch24-10 mediante PCR con los cebadores put767F (5'TTCAGTCGACGCGGCATCTATGACGTCCTG3') y put1527R (5'TTCAGGATCCATCAGCCTCGACCGAAACA3') y se clonó en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras comprobar mediante electroforesis en gel que las clonas tenían el tamaño correcto, se secuenciaron para confirmar la secuencia del gen *putA*. Se seleccionó una de ellas para transferir el fragmento al vector suicida pJQ200mp18 (Quandt y Hynes, 1993). El casete *lacZ* (pKOK6, Kokotek y Wolfgang, 1989) se insertó en el sitio BglIII de *putA*. Esta construcción se transfirió a *R. phaseoli* Ch24-10 con una conjugación triparental. Para seleccionar las clonas dobles recombinantes, las transconjugantes se sembraron en placas de LB con 12% de sacarosa. El perfil de plásmidos se visualizó mediante la técnica de Eckhardt (1978), modificada por Hynes y McGregor, (1990). Todas las construcciones se introdujeron en células competentes de *Escherichia coli* DH5- α y se seleccionaron con los antibióticos adecuados.

6.6 Ensayos de actividad β -glucuronidasa

Las plantas de maíz y frijol se cultivaron en monocultivo y en sistema milpa (como se mencionó anteriormente) y los exudados radiculares se centrifugaron durante 15 minutos a 4025 g para eliminar los restos de las plantas. Se inoculó 1 mL de exudados radiculares con 10^6 células mL⁻¹ de la mutante CCG-9A11, que tiene el gen *gusA* de la β -glucuronidasa como reportero, y se incubó a 30°C durante 24 h. La actividad β -glucuronidasa inducida por los exudados radiculares se midió utilizando un ensayo fluorométrico con 4-MUG (metilumbeliferil- β -D-glucurónido hidratado) (Sigma-Aldrich) en un lector de microplacas Synergy H1 (BioTek Instruments) a una longitud de onda de emisión/excitación de 365/460nm (Jefferson, 1987 con modificaciones de Xi et al., 1999). Las actividades

enzimáticas se mostraron como nmMU/min/10⁶ células utilizando una curva de referencia de metilumbeliferona (MU). Para detectar la actividad β -glucuronidasa dentro de las raíces, las plántulas de 3 días de maíz y frijol en monocultivo y en milpa fueron inoculadas con CCG-9A11 en matraces de 250mL con Fahraeus semisólido libre de N (0.75 % de agar). Las plantas se cultivaron a 28 °C en fotoperiodo de luz/obscuridad (16h/8h) por 15 días. Luego, las raíces enteras se lavaron dos veces con agua MQ y se colocaron en tubos de 50mL con solución de X-gluc (100 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ pH 7.0, 0.5 mM K₃[Fe (CN)₆], 0.5 mM K₄[Fe (CN)₆], 10 mM EDTA, 0.5 mM triton X-100 y 1 mg/mL 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido) durante 48 h a 28 °C en un agitador rotatorio (Shamseldin, 2007). La señal azul en el interior de las raíces y los nódulos indicó la inducción del gen, en contraste con las raíces incoloras no inoculadas.

6.7 Ensayo de actividad β -galactosidasa

Para los ensayos de β -galactosidasa, la cepa CCG-VP1 se cultivó en un medio mínimo (MM) que contenía (por litro) K₂HPO₄ 3.8 g, KH₂PO₄ 3 g, sacarosa 1 g, NH₄Cl 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g, CaCl₂ 0.1 g, H₃BO₃ 2.86 mg, citrato férrico 5 mg, MnSO₄·4H₂O 2.03 mg, ZnSO₄·7H₂O 0.22 mg, CuSO₄·5H₂O 0.08 mg y Na₂MoO₄·H₂O 0.8 mg a 30 °C durante 48 h con agitación continua de acuerdo con Montes-Grajales et al (2019) con algunas modificaciones. Se mezcló 1 mL de cultivo bacteriano con 1 mL de los exudados de maíz, frijol o milpa y se incubó durante 2 h. Posteriormente, se midieron las actividades de β -galactosidasa utilizando ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido, Sigma-Aldrich) y se reportaron en unidades Miller (Mu) (Li et al., 2012). Se utilizó MM con prolina (20 mM) como control positivo de inducción.

6.8 Ensayos de reducción de acetileno

Diez plántulas de 3 días de frijol en monocultivo y asociados con maíz en milpa fueron inoculadas con *R. phaseoli* Ch24-10 en matraces de 250 mL con Fahraeus semisólido libre de N. Luego de 15 días, las raíces con nódulos fueron colocadas en un frasco de vidrio de 35mL que después fue sellado herméticamente con un tapón de goma. 1 mL de aire fue extraído del frasco con una microjeringa y luego sustituido con acetileno. Una hora después el gas fue extraído del frasco e inyectado en un cromatógrafo de gases (Varian 3300 Gas Chromatograph) para detectar la reducción del etileno por la nitrogenasa bacteriana. Los resultados se reportaron como nmol C₂H₄ (etileno)/h/planta. Además, los nódulos de cada raíz fueron recuperados para cuantificar su peso fresco.

6.9 Ensayo de actividad de anhidrasa carbónica

Diez mL de exudados radiculares de maíz, frijol y milpa se inocularon con 1×10^6 células de *R. phaseoli* Ch24-10 y se incubaron a 30 °C. Las células se cosecharon a las 2 h y 24 h por centrifugación a 9500 g durante 10 minutos. Los botones celulares se suspendieron en Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y se rompieron por sonicación (tres ciclos: 15 s más 60 s de reposo) en condiciones anaeróbicas. A continuación, el homogeneizado celular se centrifugó a 6080 g a 4 °C durante 3 minutos y el sobrenadante (extracto proteico) se mantuvo en hielo y se utilizó inmediatamente para la determinación de la actividad enzimática (Santiago-Martínez et al., 2016). Dos mg del extracto protéico se incubaron con 1 mL del buffer de reacción anaeróbica (45 mM de Na-bicarbonato pH 6.8 con 0.02 mM de ZnCl₂) en frascos de 2 mL sellados con un tapón de goma a 25°C. El buffer se burbujeó previamente con nitrógeno durante 30 minutos, y el aire en el espacio de cabeza de cada frasco se sustituyó por nitrógeno para mantener las condiciones anaeróbicas. Para detectar la formación de CO₂, se tomaron 5 µL

del espacio de cabeza y se inyectaron a diferentes tiempos (0, 30, 60 y 120 s) en un cromatógrafo de gases (Shimadzu GC2010) equipado con una columna capilar HP-PLOT/U de 30 m de longitud, 0.32 mm de diámetro interior y 10 µm de película (Agilent, USA), y un detector de conductividad térmica. Se utilizó la α -anhidrasa carbónica comercial de eritrocitos bovinos (Sigma-Aldrich) como control positivo (modificado de Veitch y Blankenship, 1963; Lira-Silva et al. 2012).

6.10 Cultivo de maíz y frijol en vermiculita

Las semillas desinfectadas de maíz y frijol se sembraron en macetas (13cm x 17cm) con vermiculita previamente lavada con agua destilada y esterilizada dos veces a una presión de 15 lb (121°C) por 45 min. Así se estableció el monocultivo de frijol y de maíz y el sistema milpa con 10 plantas por cada tratamiento. A los 5 días, la mitad de las macetas fueron inoculadas con *R. phaseoli* Ch24-10. Las plantas estuvieron a 28 °C en fotoperiodo de luz/obscuridad (16h/8h) regadas con 50 mL solución Fahraeus cada tercer día durante 30 días.

6.11 Ensayos de interacción de *Arabidopsis thaliana* con *R. phaseoli* Ch24-10

Sesenta semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0) y de la línea DR5:*gusA* fueron proporcionadas por el Dr. Mario Alberto Serrano Ortega del CCG-UNAM. Las semillas fueron desinfectadas como se mencionó en el apartado 6.1 y luego germinadas en placas con medio Murashige y Skoog (MS) 0. 2X suplementado con 0.8% de agar y 1% de sacarosa. Las placas se mantuvieron a 4 °C durante 2 días y se incubaron a 21 °C durante 3 días en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad. Luego, 1×10^6 células de *R. phaseoli* fueron inoculadas sobre la raíz de las plantas e incubadas por 7

días bajo las mismas condiciones. La raíz primaria y el número de raíces laterales de *A. thaliana* col-0 fueron comparadas con el control sin inoculación.

Además, se cuantificó la expresión del gen SAUR (por sus siglas en inglés, small auxin up-regulated RNA) de *A. thaliana* Col-0 en interacción con *R. phaseoli* Ch24-10. Para ello se extrajo el ARN total de 5 plantas de *A. thaliana* col-0 por triplicado usando TRizol (Invitrogene) según las indicaciones del fabricante. La concentración e integridad del ARN total se determinaron utilizando un NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific). El ARN se retrotranscribió en ADNc con el RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific). La qRT-PCR se realizó en placas de 96 pocillos con el equipo Applied Biosystems StepOne™ y StepOnePlus™ (ThermoFisher Scientific) utilizando Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (ThermoFisher Scientific). Las condiciones de la qRT-PCR fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, seguido de desnaturalización durante 15 s a 95 °C, alineamiento durante 30 s a 60 °C y extensión durante 30 s a 72 °C durante 45 ciclos. La normalización de la expresión genética se realizó considerando la expresión media de los genes CF150 (At1g72150), ACT-1 (actina) y UBQ (ubiquitina) usando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen y Livak, 2008).

Por otra parte, las plantas de *A. thaliana* DR5:*gusA* fueron enjuagadas con buffer Z (100 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 10mM KCl, pH 7.4) y luego incubadas con la solución de X-gluc (100 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ pH 7.0, 0.5 mM K₃[Fe (CN)₆], 0.5 mM K₄[Fe (CN)₆], 10 mM EDTA, 0.5 mM tritón X-100 y 1 mg/mL 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronido) por 24 h a 37°C en obscuridad. Las plantas fueron lavadas dos veces con buffer Z, cuatro veces con etanol al 70% y una vez con acetanol:metanol (3:1) para clarificar la raíz

y extraer la clorofila. La actividad β -glucuronidasa de las raíces fue evidenciada por una señal color azul en *A. thaliana*. La construcción DR5:*gusA* contiene un reportero que es inducido en presencia de auxinas exógenas y permite visualizar sitios en donde esta hormona se acumula en la planta (Jefferson, 1987).

6.12 Cuantificación de la producción de auxinas

La producción de ácido indol acético (AIA) se evaluó en caldo PY adicionado con triptófano. Los cultivos de *R. phaseoli* se incubaron durante 6 días a 30 °C con agitación constante. Cada 24 h, los cultivos se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min, y 1 mL de sobrenadante se mezcló con 1 mL de reactivo de Salkowski (4.5 g de FeCl₃ y 10.8 M de H₂SO₄). Las mezclas se dejaron incubar a 30°C en oscuridad. La absorbancia de la reacción se midió a 492 nm y las concentraciones se estimaron a partir de una curva de concentraciones de IAA comercial (Sigma-Aldrich) (Herrera-Quiterio et al., 2020).

6.13 Análisis estadísticos

Se utilizó la prueba t de Student para comparar el peso fresco y la actividad nitrogenasa de los nódulos de las raíces de frijol procedentes del monocultivo y de la milpa. También para comparar el largo de la raíz primaria, el número de raíces secundarias y la expresión del gen SAUR de *A. thaliana* inoculada y no con *R. phaseoli* usando el programa GraphPad Prism 9. Se utilizó el paquete agricolae v1.3.5 en R studio para comparar las actividades enzimáticas de *R. phaseoli* en respuesta a exudados radiculares de maíz, frijol y la milpa mediante ANOVA de una vía y una prueba de Tukey (de Mendiburu y de Mendiburu, 2019). Para todos los casos se consideró un valor $p \leq 0.05$ como estadísticamente diferente.

7. RESULTADOS

Empleamos RNA-seq con el objetivo de caracterizar las respuestas transcriptómicas de *R. phaseoli* Ch24-10 en interacción con los exudados radiculares de maíz y frijol crecidos en milpa y en monocultivo. En nuestro estudio, se recuperó una media de 75 millones de lecturas emparejadas y mapeadas de cada triplicado de los cuatro tratamientos: (1) con exudados radiculares del frijol, (2) con exudados radiculares de maíz, (3) con exudados radiculares de la milpa (maíz y frijol en asociación) y (4) con solución hidropónica Fahraeus sin nitrógeno. Más del 98% de las lecturas de RNAseq se asignaron al genoma *R. phaseoli* Ch24-10. El escalado multidimensional (EMD, figura 8) con base a las cuentas por millón normalizadas, es decir el número de lecturas asignadas a cada gen de *R. phaseoli* en cada condición, mostró que las réplicas se distribuyeron en cuatro grupos que corresponden a los tratamientos, indicativo de una alta reproducibilidad del experimento.

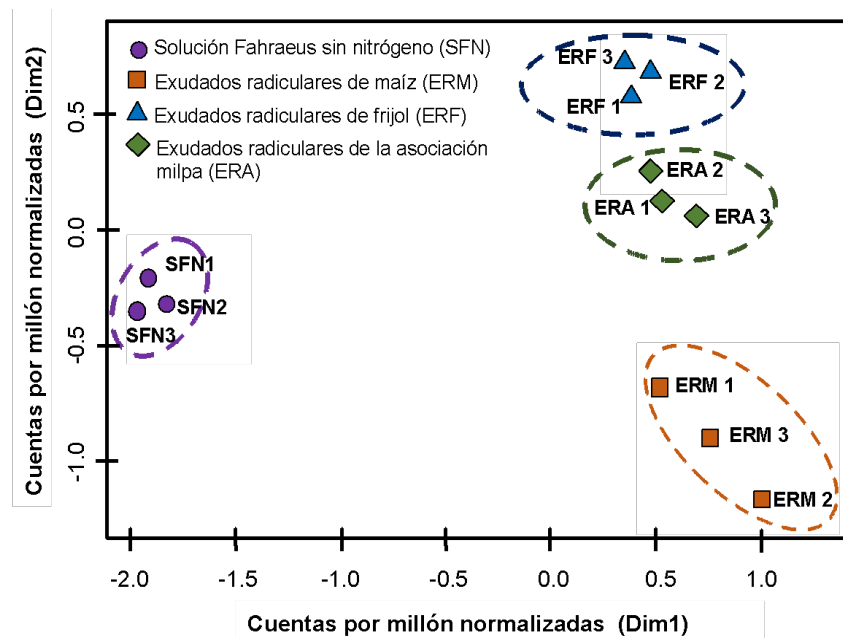


Figura 8. Análisis de escala multidimensional de los perfiles transcriptómicos de *R. phaseoli* en exudados radiculares y solución Fahraeus. Los círculos indican la agrupación de las 3 de las réplicas biológicas de los 4 tratamientos.

Los datos transcriptómicos de *R. phaseoli* en la solución de Fahraeus difieren en gran medida de los obtenidos en los exudados radiculares, a su vez, los perfiles transcriptómicos en los exudados del frijol y de la milpa son más cercanos entre sí, pero distantes de los inducidos por los exudados radiculares del maíz. Se encontraron 792 genes sobreexpresados en *R. phaseoli* en interacción con frijol, 932 genes en exudados de maíz y 785 genes en exudados de la milpa (Figura 9).

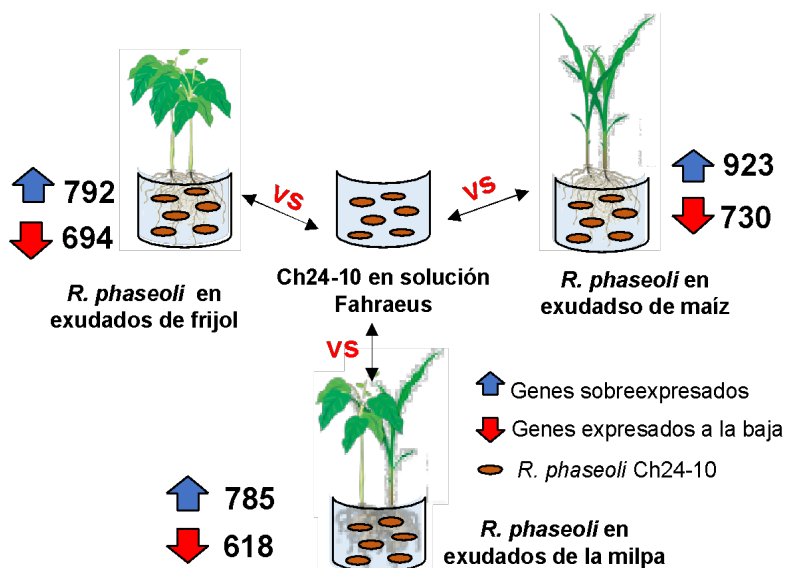


Figura 9. Genes expresados diferencialmente de *R. phaseoli* en los exudados radiculares en comparación con la solución Fahraeus. Un gen se consideró diferencialmente expresado si tenía un Log2 fold change > 1 y un FDR de 0.95 con valores de p ajustados ≤ 0.05 .

7.1 Genes de *R. phaseoli* expresados en exudados de frijol

En los exudados de frijol, 176 genes de *R. phaseoli* Ch24-10 se sobreexpresaron en comparación con los exudados de maíz (Figura 10). Estos genes se distribuyeron en el cromosoma (66%), el crómido pRpCh24-10d (17%), el plásmido simbiótico (pSym) pRpCh24-10c (7%), el plásmido pRpCh24-10b (5%) y el plásmido pRpCh24-10a (5%).

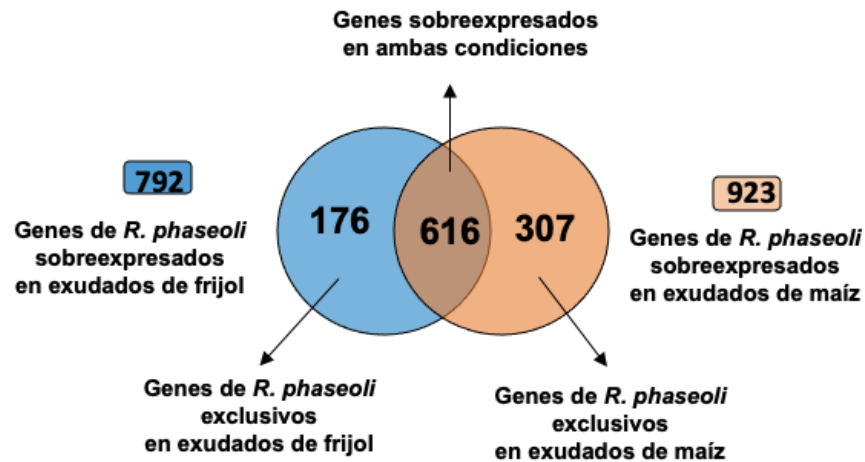


Figura 10. Diagrama de Venn entre los genes de *R. phaseoli* inducidos por exudados radiculares de frijol y maíz. Los diagramas de Venn se generaron utilizando la herramienta web disponible en <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/> para mostrar los genes exclusivos y compartidos entre los tratamientos.

Entre los genes en respuesta a exudados de frijol se detectaron los genes *nodA*, *nodB* y *nodC*, necesarios para la síntesis de los factores de nodulación (factores Nod). También los genes *nodS*, *nodU*, *nodZ*, *nolO*, *noeI* y *noll*, que codifican enzimas que modifican los factores Nod mediante metilación, carbamoilación, fucosilación o acetilación, así como los genes *nodIJ* implicados en su secreción (Fig. 11 A). En concordancia con estos hallazgos, se encontraron tres genes reguladores *nodD*, siendo *nodD1* el más expresado. Así mismo, la expresión de gen *pobA* fue detectada. PobA es una hidroxibenzoato hidrolasa implicada en la formación de protocatecuato a partir de hidroxibenzoato, que es uno de los principales fenoles unidos a la pared vegetal (Sircar and Mitra, 2008). Los genes del regulón *pca* y su regulador positivo *pcaR* para el catabolismo del protocatecuato fueron inducidos por los exudados del frijol en monocultivo (Figura 11 B).

El gen que codifica para la 4-oxalocrotonato tauomerasa, que oxida el benceno, el tolueno y el xileno en productos intermediarios del ciclo de Krebs, se encontró sobreexpresado de manera diferencial. También encontramos un aumento en los genes implicados en la resistencia al estrés osmótico, como el sistema de transporte de glicina/betaína y prolina/betaína similar al mecanismo ProVWX de *Escherichia coli* (Lucht y Bremer, 1994). Del mismo modo, la quinolinato sintasa NadA expresada en los bacteroides de *R. etli* en nódulos de frijol (Xi, et al 2001) se encontró sobreexpresada en *R. phaseoli* Ch24-10 en presencia de exudados de frijol. Otro hallazgo fue el aumento de la expresión de los genes que codifican la fosfoglicerato deshidrogenasa, la fosfoserina transaminasa y la fosfatasa fosfórica que participan en la vía de la biosíntesis de la L-serina, que también es necesaria para la biosíntesis de la cisteína y la glicina. El gen que codifica para el transportador de eflujo LysE para el transporte de treonina/homoserina/homoserina lactona también se detectó sobreexpresado.

7.2 Genes de *R. phaseoli* expresados en exudados de maíz

Trescientos siete genes fueron sobreexpresados como únicos en los exudados de maíz en comparación con los inducidos por exudados de frijol (Figura 10). Doscientos nueve de estos genes se encontraron en el cromosoma, 48 genes en el cromido, 23 genes en pRpCh24-10b, 21 genes en pRpCh24-10a, y sólo 6 genes en plásmido simbiótico pRpCh24-10c.

Los genes de *R. phaseoli* para transportar fucosa, ramnosa, xilosa, maltosa, manitol y arabinosa se encontraron expresados en respuesta a exudados de maíz (Figura 11D) y también los genes para la degradación del mucílago incluidos la α -fucosidasa, α -galactosidasa y β -glucosidasa (Figura 11C). Los genes de los transportadores DctPQM para ácidos

dicarboxílicos se encontraron altamente expresados, así como los genes del sistema de regulación *dctB/dctD*. También se observó un aumento de la expresión de los genes necesarios para la degradación del eugenol (*calA* y *calB*) y del ácido ferúlico (*fsc* y *ech*) (Figura 10B). Genes de transportadores que capturan hierro, para la producción de sideróforos (Figura 10E), así como para la proteína reguladora de la absorción férrica (Fur), que controla la homeostasis del hierro y para la biosíntesis de sideróforos (Hassan y Troxell, 2013) se encontraron más expresados en exudados de maíz que en otras condiciones.

Se detectaron sobreexpresadas tres copias del gen *dapA*, que codifica la dihidrodipicolinato sintasa de la vía de biosíntesis de la lisina, y el mismo caso para las sintasas de corismato y antranilato que podrían contribuir a la producción de fenilalanina, tirosina y triptófano en los exudados de maíz. Además, en estas condiciones también se indujo la expresión de genes de reguladores transcripcionales de la familia Lrp/AsnC, comúnmente activado por aminoácidos exógenos (Thaw et al., 2006).

7.3 Genes de *R. phaseoli* inducidos en común en exudados de maíz y de frijol

Cuando se compararon los perfiles transcriptómicos de *R. phaseoli* en los exudados de frijol con los observados en los exudados del maíz, se encontraron 616 genes sobreexpresados compartidos en ambas condiciones (Figura 10). La mayor parte de los genes expresados en común se localizaron en el cromosoma (72%) y en el cromido (13%) y unos pocos en los plásmidos pRpCh24-10b (7%), pRpCh24-10a (4%) y el pSym pRpCh24-10c (4%).

Entre los genes con mayor expresión, identificamos los que codifican transportadores ABC para azúcares, aminoácidos, poliaminas, nitratos, sulfatos y fosfatos, así como los genes *tctABC* y *occQMPT* necesarios para el transporte de tricarboxilatos y octopina, respectivamente (Figura 11D). Otro sistema de transporte observado activado por ambos

exudados fue el codificado por operón *dppBCDF*, responsable de la importación de di/tripéptidos. Los genes de *R. phaseoli* para el transporte de oligopéptidos también fueron encontrados en el estudio de expresión de genes en el rizoplano de maíz y de frijol (López-Guerrero et al., 2012). En cuanto al metabolismo de aminoácidos, los genes de enzimas clave implicadas en el catabolismo de la lisina, la histidina, el glutamato y la treonina se expresaron en respuesta a ambos exudados, incluidos los genes *hutH*, *hutU*, *hutI*, *hutF* y *hutG*, que comprenden por completo las dos rutas principales de utilización de la histidina.

También se observó la inducción de genes para varias bombas de eflujo como RmrAB, AcrAB-TolC, EmrAB-TolC y MATE (por sus siglas en inglés, Multidrug and Toxic Compound Extrusion) implicadas en la resistencia a fitoalexinas y flavonoides. Los genes estructurales de un sistema de secreción de tipo 3 (SST3) que se asemeja al aparato de virulencia Ysc-Yop de *Yersinia enterocolitica* se encontraron inducidos por ambos exudados (Figura 11F). Los genes para el ensamblaje del motor flagelar, el gancho y el complejo basal y para la biosíntesis de la flagelina se encontraron expresados en ambos transcriptomas. Sin embargo, se recuperaron más transcritos flagelares en los exudados de frijol que en los del maíz.

Genes que codifican proteínas ribosomales fueron sobreexpresados en ambos exudados radiculares, incluyendo la S1, S2, S3-S15, y S18-S21 asociados a la subunidad 30S y de L1-L6, L9, L10, L11, L13, L14, L18-L25, L27, L28, y L31 -L36 asociados a la subunidad 50S, así como genes que codifican aminoacil-ARNt ligasas para metionina, cisteína, aspartato, tirosina, fenilalanina, histidina e isoleucina. También detectamos en común reguladores transcripcionales sobreexpresados como los pertenecientes a las familias FadR, DeoR/GlpR, TetR/AcrR y ROK. Estos factores transcripcionales orquestan respuestas fisiológicas

asociadas al metabolismo de los azúcares, la detección de quórum, la resistencia a múltiples antibióticos y la extrusión de compuestos tóxicos, entre otras muchas.

7.4 Perfiles transcriptómicos de *R.phaseoli* en la milpa

Setecientos ochenta y cinco genes de *R. phaseoli* se encontraron altamente expresados en la milpa en comparación con los datos transcriptómicos en la solución Fahraeus (Figura 9). Entre ellos, se encontraron 566 genes en el cromosoma, 104 en el crómido, 43 en pRpCh24-10b y 36 tanto en pRpCh24-10a como en el plásmido simbiótico pRpCh24-10c. Otra comparación interesante fue la de los transcriptomas de *R. phaseoli* en exudados de la milpa frente a los observados en los exudados del frijol y del maíz en monocultivo, donde encontramos 42 y 38 genes sobreexpresados en la milpa, respectivamente (Tabla 1 y 2).

En general, los perfiles transcriptómicos observados en milpa se asemejan a los inducidos por los exudados de frijol, debido que ambos comparten una alta expresión de los genes de nodulación *nodA*, *nodB* y *nodC* (implicados en síntesis de los factores Nod), *nodS*, *nodU*, *nodZ*, *nolO*, *noeI* y *nolL* (modificadores de la estructura) y *nodIJ* (implicados en el transporte). En concordancia, el frijol crecido en milpa formó nódulos fijadores de nitrógeno tras 15 días de inoculación con *R. phaseoli* Ch24-10 en medio semisólido (Figura 12A) y no encontramos diferencias significativas en peso fresco y la fijación de nitrógeno al compararlos con los nódulos del frijol en monocultivo (Figuras 12B y C). Cabe notar que los exudados de maíz indujeron significativamente la expresión del gen *nodA* (Log2FoldChange = 1.4) pero no a los niveles que se observaron en presencia de los exudados de la milpa (Log2FoldChange = 4.5) y los exudados de frijol (Log2FoldChange = 4.7).

Por otra parte, los genes de la degradación del protocatecato y del ácido ferúlico (Figura 11B) expresados en la milpa se expresaron de forma similar en los exudados de maíz. Después comparamos los transcriptomas de los monocultivos de maíz y frijol contra los transcriptomas en la milpa y encontramos 591 genes de *R. phaseoli* compartidos (Figura 13).

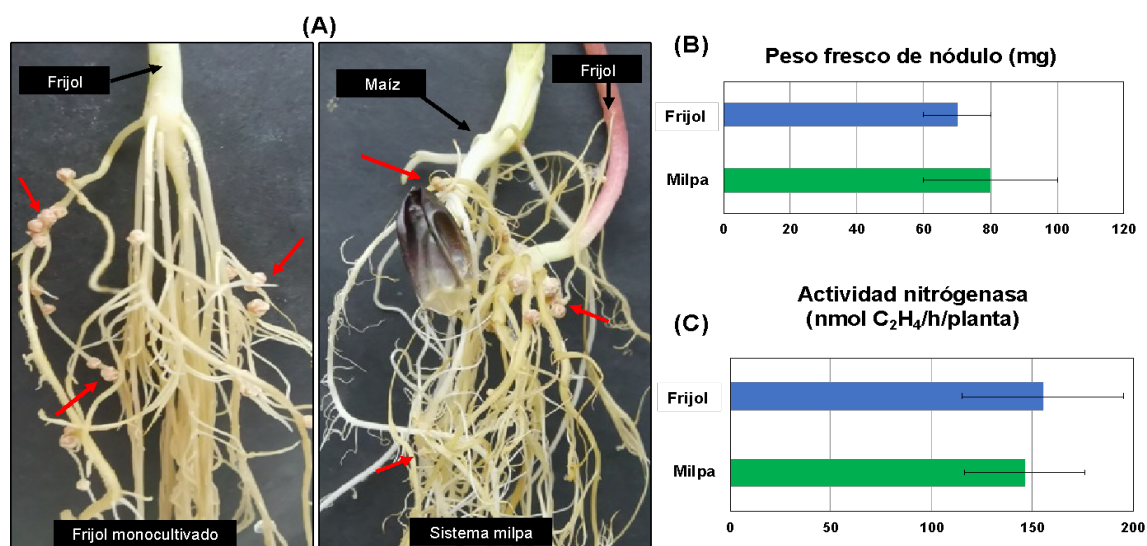


Figura 12. Nodulación en monocultivo de frijol y la milpa. (A) Nódulos fijadores de nitrógeno de plantas de frijol 15 días después de la inoculación con *R. phaseoli* Ch24-10. Los nódulos se muestran con flechas rojas. Comparación de (B) el peso fresco y (C) la actividad nitrogenasa de los nódulos de frijol del monocultivo y de la milpa.

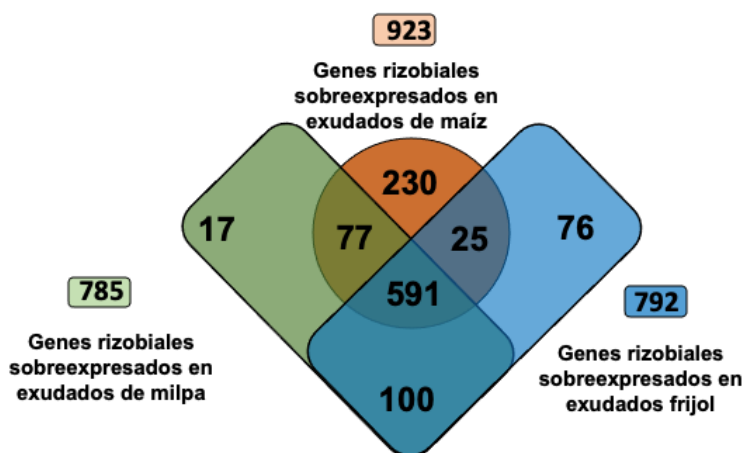


Figura 13. Diagrama de Venn entre los genes de *R. phaseoli* inducidos por exudados radiculares de los monocultivos y la milpa frijol y maíz. Los diagramas de Venn indican el número de genes sobreexpresados exclusivos y compartidos entre los tratamientos.

Tabla 1. Genes de *R. phaseoli* sobreexpresados en la milpa en comparación con la expresión en exudados de frijol. CDS= región codificante.

CDS	Proteína	Log2FoldChange
cds245	peptide ABC transporter substrate-binding protein	1.4
cds268	histidine/lysine/arginine/ornithine ABC transporter HisP	1.4
cds269	amino acid ABC transporter	1.3
cds637	alpha-glucosidase/alpha-galactosidase	1.2
cds1428	flotillin family protein	1.0
cds1728	polygalacturonase	1.1
cds1729	glycosyl hydrolase	1.3
cds1832	DUF1236 domain-containing protein	1.3
cds1905	BON domain-containing protein	1.6
cds2199	crotonase	1.5
cds2200	feruloyl-CoA synthetase	2.3
cds2561	DUF1236 domain-containing protein	1.1
cds2881	sugar ABC transporter ATP-binding protein	1.2
cds2943	agmatinase	1.2
cds2978	hypothetical protein	1.3
cds3055	DegQ family serine endoprotease	1.9
cds3235	PDZ domain-containing protein	2.8
cds3236	DNA-binding response regulator	2.4
cds3237	sensor histidine kinase	1.9
cds3248	efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit	1.3
cds3457	hypothetical protein	2.2
cds3571	hypothetical protein	1.2
cds3572	MFS transporter	2.3
cds3573	dihydrodipicolinate synthase family protein	7.8
cds3574	LacI family DNA-binding transcriptional regulator	1.7
cds4015	hypothetical protein	1.9
cds4065	DUF1236 domain-containing protein	1.1
cds4094	CopG family transcriptional regulator	1.0
cds4340	efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit	1.0
cds4414	protocatechuate 3%2C4-dioxygenase	1.6
cds4466	hypothetical protein	1.6
cds4529	GTP-binding protein	2.9
cds4530	hypothetical protein	3.1
cds4531	membrane protein	2.5
cds4572	DUF1442 domain-containing protein	1.6
cds4585	DUF1800 domain-containing protein	1.7
cds4939	cytochrome b	1.6
cds4981	hypothetical protein	1.1
cds5089	DUF3309 domain-containing protein	1.1
cds5278	TetR/AcrR family transcriptional regulator	1.1
cds5947	calcium-binding protein	3.8
cds6416	oxidoreductase	1.8

Tabla 2. Genes de *R. phaseoli* sobreexpresados en la milpa en comparación con la expresión en exudados de maíz. CDS= región codificante.

CDS	Proteína	Log2FoldChange
cds152	ABC transporter permease	1.05
cds509	quinolinate synthase NadA	1.17
cds820	hypothetical protein	4.04
cds821	nodulation protein	2.81
cds822	hypothetical protein	1.46
cds827	hypothetical protein	3.53
cds828	LysR family transcriptional regulator	1.03
cds829	cupin domain-containing protein	1.40
cds830	nodulation protein NodJ	1.60
cds831	nodulation factor ABC transporter ATP-binding protein NodI	2.13
cds832	hypothetical protein	2.42
cds833	methyltransferase domain-containing protein	2.53
cds834	chitooligosaccharide synthase NodC	2.81
cds835	chitooligosaccharide deacetylase NodB	3.48
cds836	hypothetical protein	3.81
cds838	nodulation protein NodZ	2.25
cds839	hypothetical protein	1.02
cds872	nodulation protein A	3.12
cds886	LLM class flavin-dependent oxidoreductase	1.54
cds997	hypothetical protein	1.05
cds998	hypothetical protein	1.02
cds1424	PIN domain-containing protein	1.04
cds1719	efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit	1.28
cds1720	efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit	1.77
cds1721	TetR/AcrR family transcriptional regulator	1.31
cds1728	polygalacturonase	1.14
cds1731	carbohydrate ABC transporter substrate-binding protein	1.14
cds1891	TetR/AcrR family transcriptional regulator	1.45
cds1997	hypothetical protein	1.02
cds1998	hypothetical protein	1.24
cds2850	5-dehydro-4-deoxyglucarate dehydratase	1.47
cds2851	mannonate dehydratase	1.84
cds2852	FadR family transcriptional regulator	1.12
cds2853	ABC transporter substrate-binding protein	1.19
cds2868	GFA family protein	1.19
cds3868	tripartite tricarboxylate transporter TctB family protein	1.03
cds4739	FadR family transcriptional regulator	1.14
cds5037	nitrogen regulatory protein P-II 1	1.07

Por ejemplo, se detectaron genes que codifican transportadores ABC para azúcares, aminoácidos, octopinas y hierro, así como enzimas para la producción de ornitina, putrescina y homospermidina. Asimismo, se observó la expresión de genes para el catabolismo de aminoácidos como la histidina, la tirosina y la fenilalanina. Muchos de los genes de *R. phaseoli* expresados en común en todos los exudados estuvieron asociados a categorías funcionales del COG, como el transporte y el metabolismo de los carbohidratos, los aminoácidos y los iones inorgánicos, la transcripción, la traducción y la biogénesis de los ribosomas (Figura 14). Se observó un mayor nivel de expresión de los genes de *R. phaseoli* que codifican proteínas para la extrusión de metabolitos tóxicos de las plantas en respuesta a los exudados de los monocultivos como de la milpa. Genes que codifican el translocon SecYEG, el complejo multimérico de exportación de proteínas Sec y componentes de un sistema de secreción tipo 3 fueron encontrados expresados en común (Figura 11F).

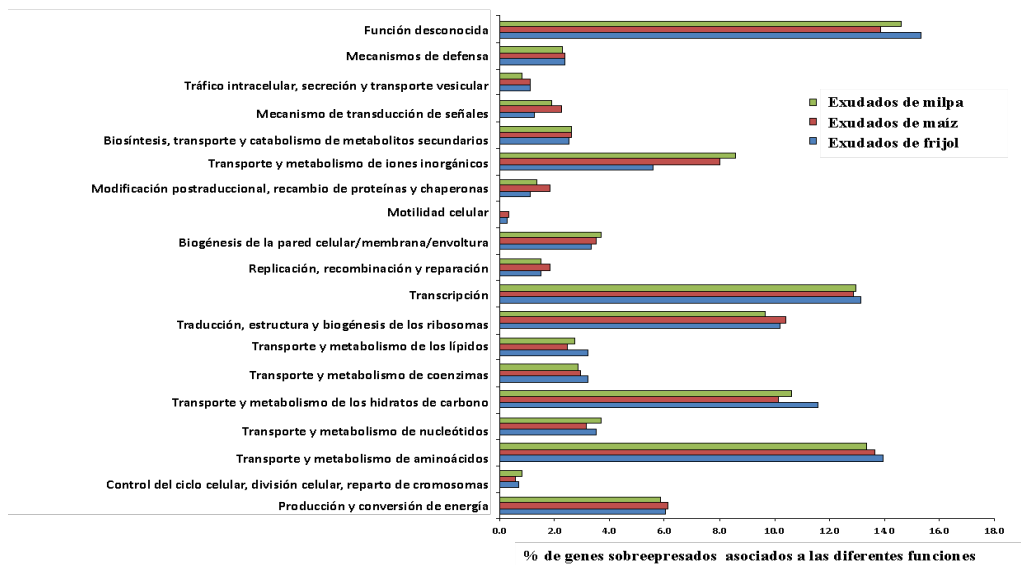


Figura 14. Distribución de las categorías funcionales COG de los genes sobreexpresados de *R. phaseoli* en los exudados radiculares. La clasificación funcional se llevó a cabo en eggNOG-mapper v2 utilizando 792, 923 y 785 genes sobreexpresados obtenidos del análisis de expresión diferencial de los exudados de frijol, maíz y milpa, respectivamente.

Con los datos obtenidos de los transcriptomas de *R. phaseoli* en respuesta a los exudados radiculares propusimos un modelo celular que muestra las principales vías metabólicas y funciones celulares de este rizobio en la rizosfera de los monocultivos de maíz y de frijol, así como durante asociación maíz-frijol en la milpa de laboratorio (Figura 15).

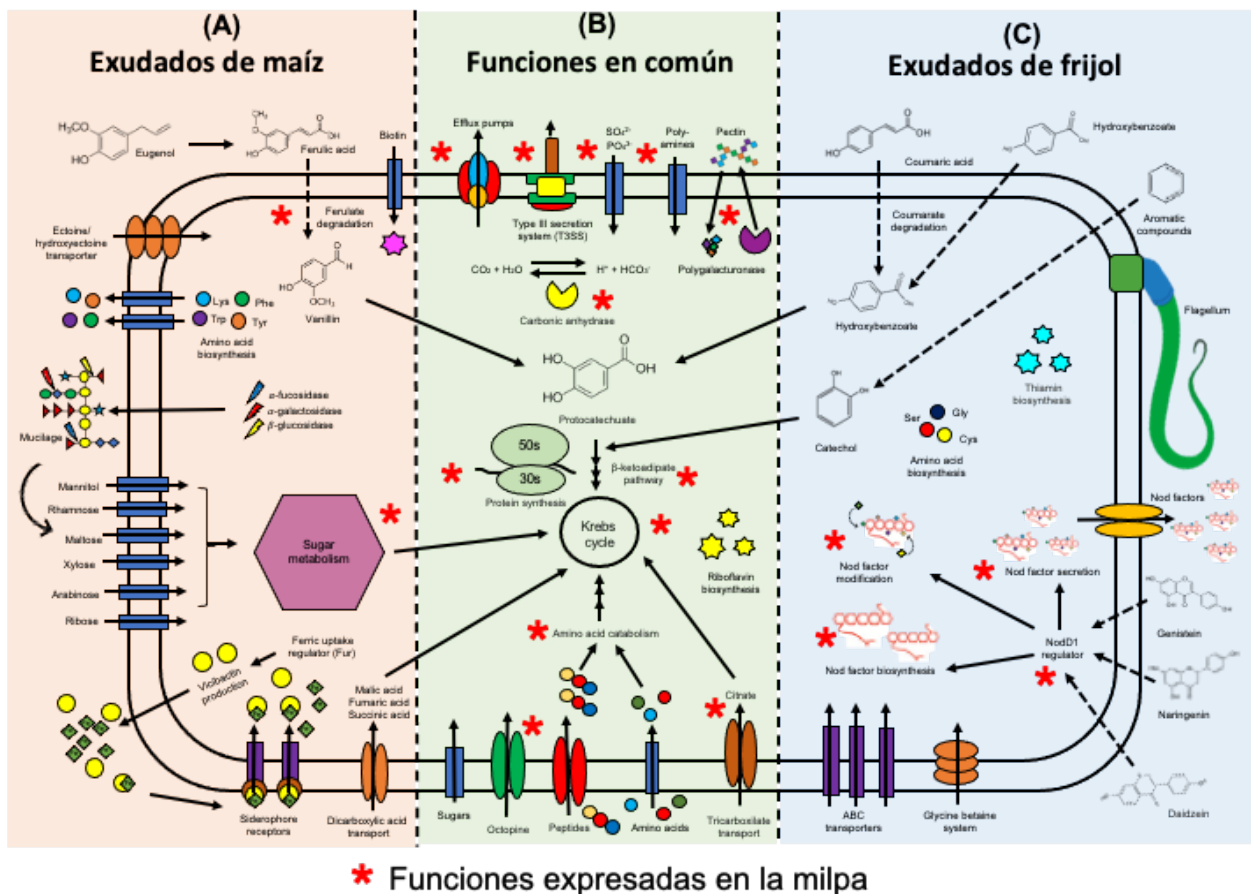


Figura 15. Representación esquemática de las funciones y vías metabólicas de *R. phaseoli* inducidas por los exudados de las raíces. La zona naranja (A) destaca las funciones rizobianas asociadas a los exudados del maíz, la zona azul (C) muestra las funciones en presencia de exudados del frijol, y la zona verde (B) indica las funciones compartidas en ambas condiciones. Los procesos metabólicos *R. phaseoli* Ch24-10 inducidos por los exudados de la milpa se indican con un asterisco rojo. La información utilizada aquí se obtuvo a partir de los datos del análisis transcriptómico y de los datos reportados en la literatura sobre la composición química de los exudados (Bolaños-Vásquez y Werner, 1997; Carvalhais et al., 2011; Fan et al., 2012; Tawaraya et al., 2014; Zhang et al., 2020).

7.5 Validación de la expresión de genes inducidos por exudados radiculares

De acuerdo con el análisis transcriptómico presentado, genes de *R. phaseoli* que codifican varios transportadores de prolina se sobreexpresaron en presencia de exudados radiculares. Generamos la cepa CCG-VP1, que es un mutante de *R. phaseoli* Ch24-10 afectada en el gen *putA*, que codifica una prolina deshidrogenasa/pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa bifuncional implicada en el catabolismo de la prolina (Liu et al., 2017). En CCG-VP1, la expresión de *putA* está fusionada a la expresión del gen reportero *lacZ*. Mediante ensayos de actividad β -galactosidasa con CCG-VP1 determinamos que la expresión del gen *putA* es inducida por los exudados radiculares. Sin embargo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre la expresión inducida por los monocultivos de frijol (436.90 ± 46.60) y maíz (489.32 ± 57) y por la milpa (578.64 ± 124.43), sin embargo, una ligera expresión más alta fue observada en este último tratamiento (Figura 16).

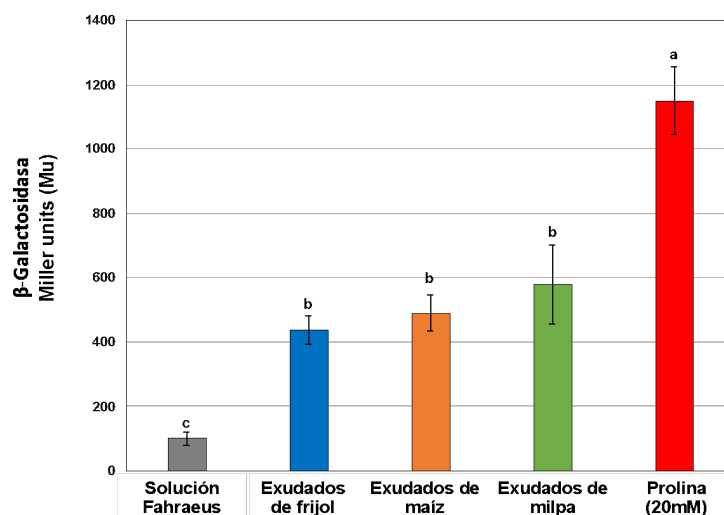


Figura 16. Actividades de β -galactosidasa de CCG-VP1 en respuesta a exudados radiculares. CCG-VP1 es *R. phaseoli* Ch24-10 que contiene el gen reportero *lacZ* adyacente al gen *putA*. La actividad β -galactosidasa se determinó con un ensayo colorimétrico utilizando ONPG. Las letras minúsculas diferentes entre tratamientos muestran diferencias estadísticamente significativas (valor $p \leq 0,05$) según un ANOVA seguido de una prueba de diferencia honestamente significativa de Tukey.

Entre los genes que se sobreexpresaron en milpa en comparación con los monocultivos, encontramos genes que codifican glucósido hidrolasas involucrados en la degradación de la pectina. La expresión de los genes de estas enzimas se exploró más a fondo con la cepa CCG-9A11. Esta cepa cuenta con una fusión transcripcional *gusA* asociada al gen RPHASCH2410_PD02690 de *R. phaseoli* que codifica una poligalacturonasa (poli-alfa-1,4-galacturonido glicanohidrolasa) de la familia GH28. Estas enzimas actúan sobre el ácido poligalacturónico y las pectinas de bajo grado de metoxilación. Evaluamos la expresión este gen usando ensayos de actividad β -glucuronidasa. Durante las primeras 2 h de exposición a los exudados radiculares, la expresión del gen de la poligalacturonasa fue mayor en los experimentos con exudados de maíz y la milpa en comparación con inducción con exudados del frijol (Figura 17A). Sin embargo, a las 24 h, la expresión del gen fue mayor en respuesta a los exudados de milpa (199.1 ± 16 nmMU) en comparación con los exudados radiculares del frijol (168.2 ± 3 nmMU) y del maíz (170.1 ± 9 nmMU).

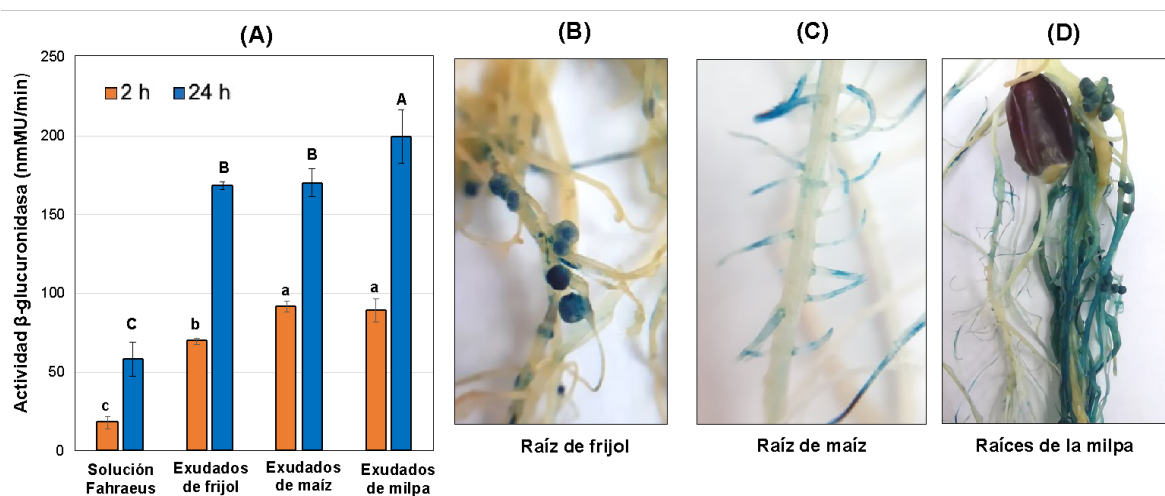


Figura 17. Actividad β -glucuronidasa de CCG-9A11 en asociación con plantas. CCG-9A11 es *R. phaseoli* Ch24-10 con una fusión del gen de la poligalacturonasa GH28 con *gusA* (A) Actividad β -glucuronidasa inducida por los exudados radiculares medida con ensayo fluorométrico con 4-MUG. Actividad de la β -glucuronidasa dentro de los nódulos del frijol (B), las raíces del maíz (C) y en el sistema milpa (D). La señal azul dentro de las raíces es indicativa de la inducción del gen de la poligalacturonasa de *R. phaseoli*.

Inoculamos CCG-9A11 en las plantas, y luego de 15 días se detectó la actividad β -glucuronidasa dentro de los nódulos de frijol (Figura 17B), así como en las raíces laterales de maíz (Figura 17C), ya sea que se cultivaron por separado o en asociados en la milpa (Figura 17D). Este hallazgo sugiere que la poligalacturonasa GH28 es expresada por *R. phaseoli* cuando este se encuentra colonizando las raíces como endófito.

Por otra parte, el gen RPHASCH2410_CH12295 que codifica una β -anhidrasa carbónica cromosómica se expresó en condiciones de monocultivo y de milpa, por lo que evaluamos esta actividad enzimática en condiciones de exudados radiculares. Los resultados mostraron que, en los exudados de milpa, la actividad de la anhidrasa carbónica fue mayor a las 2 h (794 ± 56 nmol CO₂ producido/min/mg) en comparación con los exudados de maíz (640 ± 42 nmol CO₂ producido/min/mg de proteína) y de frijol (673 ± 45 nmol CO₂ producido/min/mg de proteína), y esta tendencia se mantuvo a las 24 h (Figura 18)

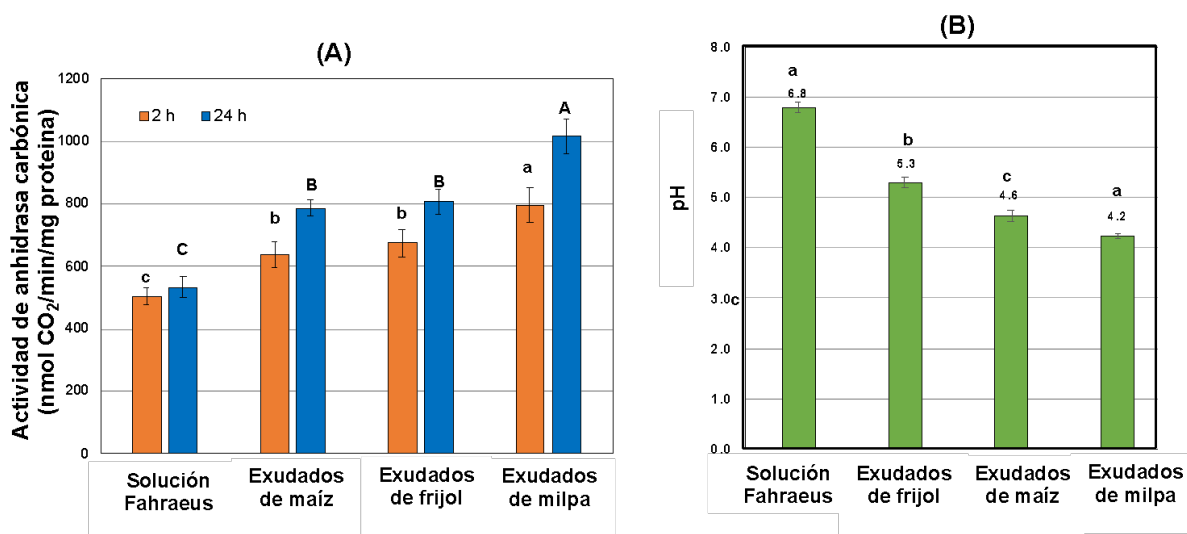


Figura 18. Actividad de la anhidrasa carbónica de *R. phaseoli* Ch24-10.

A) Comparación de anhidrasa carbónica tras el tratamiento con exudados radiculares durante 2 h y 24 h. B) Valores de pH de los exudados radiculares. Las letras diferentes entre tratamientos muestran diferencias estadísticamente significativas, con un valor $p \leq 0,05$, según ANOVA y una prueba de diferencia honestamente significativa de Tukey.

También medimos el pH de los exudados radiculares y observamos que los exudados secretados por las raíces acidifican la solución hidropónica, siendo más ácidos los de la milpa. Cabe resaltar que los resultados de anhidrasa carbónica se correlacionan negativamente con los valores de pH de los exudados (Figura 18B), es decir una menor actividad enzimática se observó en un pH más alto.

7.6 *Rhizobium phaseoli* como promotora del crecimiento vegetal

El papel promotor del crecimiento vegetal de *R. phaseoli* fue evaluado inoculando plantas de maíz y frijol creciendo en monocultivo y asociadas en la milpa (Figura 19). Luego de 30 días, se observó que la inoculación de *R. phaseoli* mejoró el crecimiento del frijol e indujo la formación de nódulos fijadores de nitrógeno (Figura 19A). Un efecto similar se observó en el maíz en monocultivo que presentó un mayor altura y un aumento del volumen radicular en asociación con el rizobio (Figura 19B). Cuando la milpa no fue inoculada se observó un crecimiento limitado de ambas plantas, pero este mejoró con *R. phaseoli* (Figura 19C).

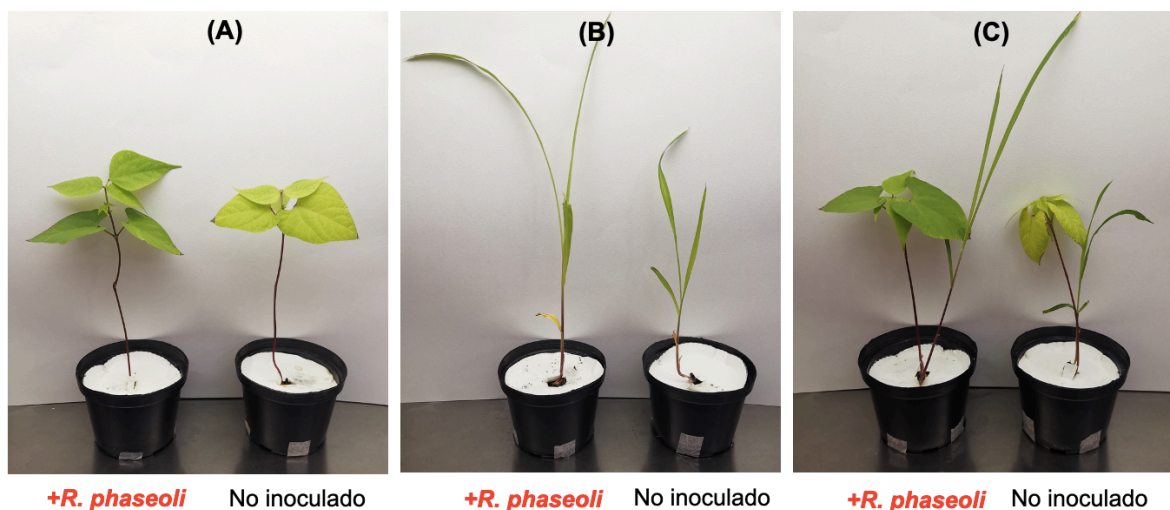


Figura 19. Efecto de *R. phaseoli* en el crecimiento de frijol y maíz. A) Monocultivo de frijol, B) monocultivo de maíz C) y el sistema milpa crecida en vermiculita por 30 días e inoculadas con *R. phaseoli* Ch24-10.

La raíz del frijol en milpa mostró nódulos más jóvenes que los observados en monocultivo, sin embargo, la distribución de los nódulos fue más amplia con nódulos más alejados del tallo (Figura 20). Por otra parte, el volumen radicular del maíz fue mayor en monocultivo que en la milpa cuando se inocularon con *R. phaseoli*, pero ambos fueron mayores con respecto a las plantas no inoculadas.

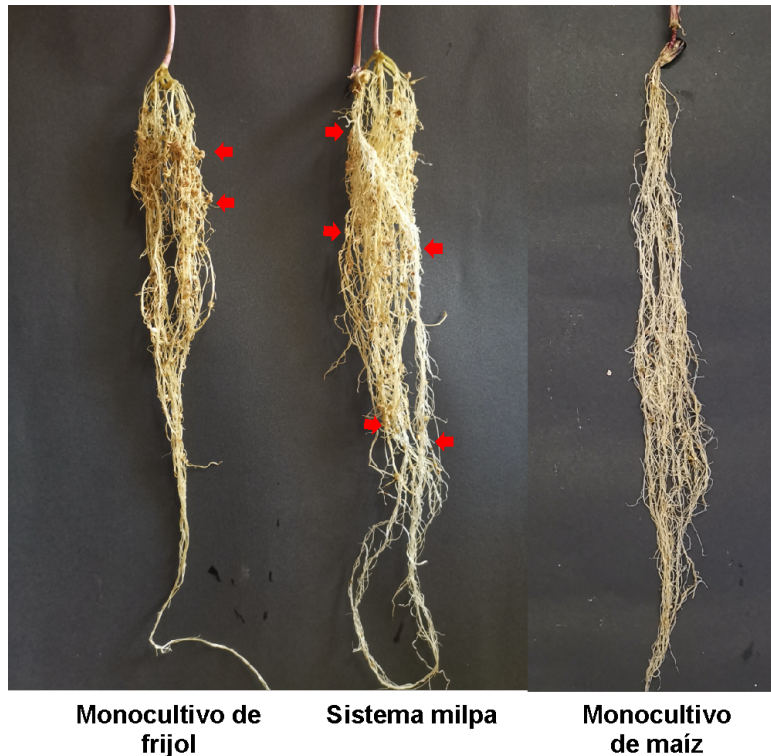


Figura 20. Raíces de maíz y frijol inoculados con *R. phaseoli* Ch24-10. Los nódulos fijadores de nitrógeno son indicados con flechas rojas.

Posteriormente utilizamos a la planta modelo *A. thaliana* para elucidar los mecanismos que utiliza *R. phaseoli* Ch24-10 para estimular el crecimiento del maíz y frijol. Cuando inoculamos *R. phaseoli* en las raíces de *A. thaliana* col-0 observamos una reducción del crecimiento de la raíz primaria (Figuras 21 A y B) y aumento del número de raíces laterales (Figura 21 A y C), en contraste con las plantas no inoculadas.

Además, detectamos la activación del reportero DR5:*gusA* (señal azul) en las raíces laterales de *A. thaliana* cuando interactúa con *R. phaseoli* (Figura 22 A), indicando que las modificaciones en la arquitectura radicular estaban mediados por auxinas.

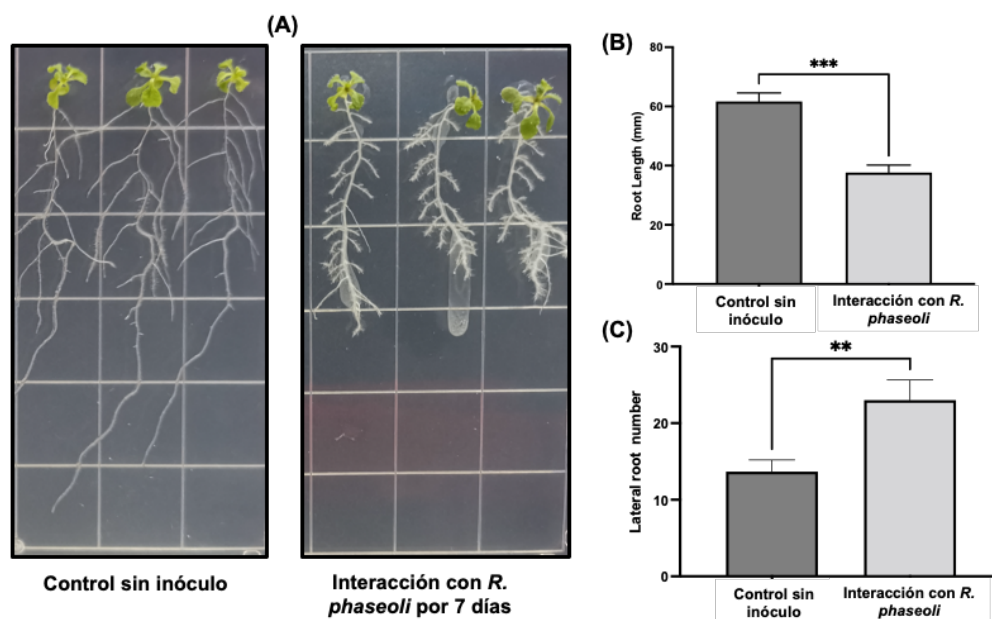


Figura 21. Efecto de *R. phaseoli* en el crecimiento de *A. thaliana*. A) Arquitectura radicular de *A. thaliana* inoculada con *R. phaseoli*. Las plantas tratadas y las control tienen la misma edad. B) Longitud de la raíz primaria y C) el número de raíces laterales.

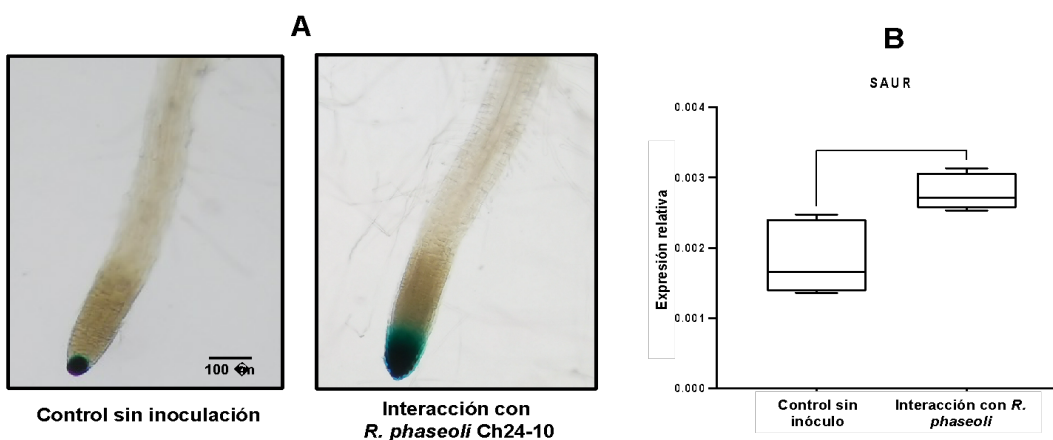


Figura 22. *R. phaseoli* induciendo genes de respuesta a auxinas en *A. thaliana*. A) Ensayos de β -glucuronidasa de reportero DR5:*gusA*. B) Niveles de expresión relativa del gen SAUR de *A. thaliana* en presencia de *R. phaseoli*.

Para confirmarlo, cuantificamos mediante qRT-PCR la expresión del gen SAUR, asociado a las respuestas tempranas a auxinas. Se observó un incremento en la expresión de SAUR en *A. thaliana* en presencia de *R. phaseoli* (Figura 22B). Finalmente, detectamos la producción de la auxina ácido indolacético por este rizobio alcanzando un pico máximo de 48 ± 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en los sobrenadantes de cultivos de 96 h (Figura 23). En conjunto estos resultados indican que *R. phaseoli* Ch24-10 secreta auxinas capaces de afectar el crecimiento de *A. thaliana*.

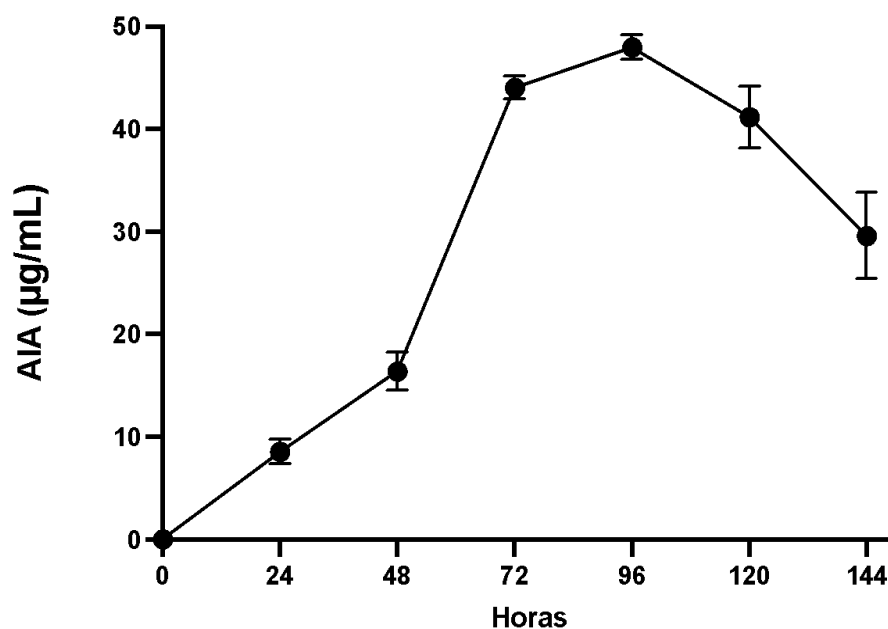


Figura 23. Producción de ácido indolacético por *R. phaseoli* Ch24-10. La cuantificación de auxina fue realizada cada 24 h usando un método colorimétrico con reactivo de Salkowski.

8. DISCUSIÓN

El maíz y el frijol han sido cultivados en asociación por miles de años en las milpa de Mesoamérica, puesto que ambos cultivos fueron domesticados en esta zona. Cuando un cereal se combina con una leguminosa, las enfermedades y las plagas de insectos se controlan mejor (Fininsa, 1996), y el suelo conserva su integridad física y química, en contraste con los monocultivos. Además, la diversidad microbiana de la rizosfera de los cultivos asociados suele ser mayor porque los exudados de las raíces actúan como nutrientes y moléculas señalizadoras que atraen a microorganismos simbioses de las plantas vecinas (Gutiérrez-Zamora y Martínez-Romero, 2001; Mommer et al., 2016). En este trabajo, diseñamos una milpa en el laboratorio en condiciones hidropónicas para evaluar los efectos de los exudados de la milpa en *R. phaseoli* Ch24-10, que es una cepa aislada del tallo del maíz capaz de establecer simbiosis con el frijol.

La composición de los exudados radiculares no es una característica específica y constante de una especie vegetal, puede diferir entre individuos de una misma especie, variar con la edad de la planta, los factores ambientales y los nutrientes disponibles del suelo (Carvalhais et al., 2011). La exudación de metabolitos del maíz y el frijol cambian con el tiempo; sin embargo, algunos metabolitos radiculares se liberan tanto en las etapas tempranas como tardías del crecimiento de la planta y son específicos de leguminosas o cereales (da Silva Lima et al., 2014; Tawaraya et al., 2014). Los exudados podrían ser diferentes cuando las raíces crecen asociadas. A su vez, los cambios en los perfiles de exudación afectan la diversidad y metabolismo de la microbiota rizosférica (Chaparro et al., 2013; Vacheron et al., 2013).

El maíz posee una alta eficiencia fotosintética mayor que otros cultivos como el frijol, lo que puede derivar en una mayor exudación de fotosintatos. Hasta un 25% de los compuestos orgánicos que fluyen hacia el sistema radicular del maíz son liberados por los exudados (Haller y Stolp, 1985). Las raíces del maíz secretan principalmente glucosa, melibiosa, maltosa y fructosa (Fan et al., 2012). Sus exudados también son ricos en aminoácidos como el ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina, serina y alanina, pero son bajos en lisina (Carvalhais et al., 2011). Los transcriptomas de *R. phaseoli* en exudados de maíz mostraron la inducción de genes asociados al transporte y metabolismo de algunos de estos azúcares, así como para la degradación de mucílago, incluidos los que codifican fucosidasas y galactosidasas. Los azúcares como galactosa, fucosa, manosa, arabinosa, xilosa y glucosa, junto con los ácidos urónicos como el ácido galacturónico y el ácido glucurónico, son los principales componentes del mucílago (Nazari et al., 2020). La producción de enzimas que degradan mucílago podría brindarle a *R. phaseoli* una fuente de nutrientes adicional a los presentes en los exudados, tal como se vio con la expresión de transportadores de arabinosa y xilosa que son escasos en los exudados, pero abundantes en el mucílago. Algunas especies de *Rhizobium* producen carbohidrasas asociadas a su capacidad de crecer en el mucílago como única fuente de carbono (Knee et al., 2001).

Muchas bacterias suelen utilizar los azúcares y aminoácidos de los exudados de las plantas como principales nutrientes, por lo que los ácidos orgánicos suelen acumularse en la rizosfera (Koo et al., 2005). El ácido málico, el ácido fumárico y el ácido succínico son los principales ácidos dicarboxílicos secretados por las raíces del maíz en concentraciones mayores que muchos azúcares (Fan et al., 2012). Los exudados radiculares del maíz tienen un pH más bajo que los de frijol, sugiriendo una elevada producción de ácidos orgánicos. Nuestros datos del

transcriptoma muestran que los mecanismos bacterianos especializados en detectar y transportar ácidos dicarboxílicos fueron inducidos por los exudados del maíz. Estos ácidos son utilizados preferentemente por los rizobios y su transporte es esencial para una simbiosis efectiva (Iyer et al., 2016).

En este trabajo cuantificamos las actividades enzimáticas de la anhidrasa carbónica en los extractos celulares de *R. phaseoli* expuesto a los diferentes exudados radiculares. Se obtuvieron actividades similares en las células bajo los tratamientos con exudados de maíz o frijol pero una mayor actividad en respuesta a los exudados de milpa. La anhidrasa carbónica produce carbonato que los rizobios podrían excretar en las raíces y disminuir la acidez de los exudados como un mecanismo de protección contra el estrés ácido, sin embargo, no detectamos alcalinización de los exudados luego de la inoculación con *R. phaseoli*. También puede que el carbonato funcione como una fuente de carbono para el rizobio que le permite beneficiarse del CO₂ derivado de la raíz, y esto puede proporcionar una ventaja ecológica en la rizosfera. El papel de la anhidrasa carbónica bacteriana en las interacciones entre plantas y microorganismos es aún desconocido; sin embargo, los endófitos del trigo que producen esta enzima aumentan la fotosíntesis y el crecimiento de las plantas (Aslam et al., 2018).

Aminoácidos como asparagina, fenilalanina, triptófano, treonina y valina son liberados tanto por las raíces del maíz como de frijol, así como los ácidos orgánicos como ácido cítrico y ácido fumárico (Pellet et al., 1995; Carvalhais et al., 2011; Fan et al., 2012; Tawaraya et al., 2014). Detectamos la expresión de genes de *R. phaseoli* que codifican transportadores para el citrato, aminoácidos y péptidos en los transcriptomas en ambos exudados. Los transportadores de putrescina y espermidina también se sobreexpresaron en exudados de maíz y de frijol. Se han encontrado estas poliaminas producidas por frijol (Tawaraya et al.,

2014), pero su presencia en los exudados del maíz no ha sido bien estudiada. La prolina es otro aminoácido abundante en los exudados del maíz (Phillips et al., 2004) y también es producida por las raíces de frijol en diferentes etapas de crecimiento (Tawaraya et al., 2014). El gen *putA* es clave en el metabolismo de la prolina, por lo que se ha utilizado como biosensor para monitorizar la exudación de este aminoácido por las raíces de chícharo (*Pisum sativum* L.) (Rubia et al., 2020). La sobreexpresión de *putA* en *Sinorhizobium meliloti* aumenta su competitividad para colonizar y nodular alfalfa (*Medicago sativa* L.) (van Dillewijn et al., 2001). En este trabajo, la expresión de *putA* fue inducida en una exposición a exudados durante 2 h, pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones de los monocultivos y la milpa. Sin embargo, la cepa CCG-VP1, mutante en *putA*, presentó en la colonización de la raíces de maíz pero si es menos competitiva en la ocupación de los nódulos de frijol en comparación con la cepa silvestre. Un análisis del exometaboloma de *R. phaseoli* Ch24-10 reveló que puede excretar aminoácidos como ácido aspártico, alanina, tirosina y la fenilalanina cuando crece en medios mínimos (Montes-Grajales et al., 2019), por tanto, es posible que además de captar aminoácidos de los exudados también pueda liberarlos y nutrir a las plantas.

Los genes de las vías de degradación de ácido ferúlico y ácido cumárico se observaron expresados por *R. phaseoli* en exudados de maíz y frijol, respectivamente. Estos hallazgos sugieren que el ácido ferúlico puede ser un componente importante para la nutrición de los rizobios en los exudados del maíz. El ácido ferúlico es un ácido fenólico abundante unido a las paredes de las plantas y su abundancia en el maíz es al menos diez veces mayor que en otros cereales (Bento-Silva et al., 2018). El ácido ferúlico también es liberado por las raíces del maíz (Zhang et al., 2020). Mientras que, en la rizosfera de frijol, el ácido cumárico y el

4-hidroxibenzoato pueden ser utilizados preferentemente por *R. phaseoli* según el nivel de expresión del gen *pobA* y del operón *pca*. Estos compuestos aromáticos son abundantes en los exudados de frijol en las primeras etapas de crecimiento (Tawaraya et al., 2014). También detectamos en los transcriptomas, la expresión diferencial de los genes para la quimiotaxis hacia los compuestos aromáticos. La capacidad de *R. phaseoli* para degradar compuestos aromáticos de plantas podría proporcionar una mejor aptitud en la rizosfera al brindar fuentes de carbono, así como mecanismos de desintoxicación, ya que estos compuestos tienen efectos antimicrobianos.

Las fitoalexinas producidas por el sistema milpa no han sido determinadas; sin embargo, detectamos la sobreexpresión de los genes *rmrA* y *rmrB* en *R. phaseoli* en respuesta a los exudados radiculares, estos genes han sido descritos en *R. etli* como importantes en la tolerancia a la fitoalexina phaseolina y a los flavonoides del frijol (González-Pasayo y Martínez-Romero, 2000). Los genes que codifican los componentes de un sistema de secreción tipo 3 (SST3) rizobiano fueron inducidos por los exudados de los monocultivos y la milpa. Los efectores SST3 de *Rhizobium* se inyectan en las células de la planta-huésped y tienen funciones en la simbiosis, quizás inhibiendo las respuestas de defensa de la planta (Marie et al., 2001). Los componentes estructurales del SST3 que codifican los componentes de la jeringa son bastante conservados mientras que los efectores pueden ser más variables y sus efectos no han sido completamente dilucidados (Nelson y Sadowsky, 2015).

En este trabajo, en los transcriptomas de *R. phaseoli* interactuando con exudados de frijol, se observó la expresión de los genes involucrados en la síntesis de factores Nod. Los flavonoides como daidzeína, naringenina y genisteína son secretados por el frijol y permiten que inicie el proceso de nodulación. Fusiones transcripcionales han confirmado la inducción de los genes

nod en presencia de los flavonoides sintético, sin embargo, la inducción es mucho mayor cuando se usan los exudados de frijol, posiblemente por un efecto sinérgico de la mezcla de flavonoides (Bolaños-Vásquez y Werner, 1997). También se observó la expresión de genes que modifican la estructura de los factores Nod mediante acetilaciones y fucosilaciones, responsables de la preferencia de los rizobios para nodular las plantas de *Phaseolus* (Laeremans et al., 1999).

El maíz puede sintetizar varios flavonoides y algunos de ellos son secretados por las raíces (Li et al., 2016; Jin et al., 2017). Detectamos que el gen *nodA* de *R. phaseoli* estaba sobreexpresado en los exudados de maíz en comparación con la solución Fahraeus, pero no tan fuertemente como en los exudados de frijol. Una fusión transcripcional *nodA-lacZ* de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* fue inducida por los exudados de granos de maíz (Hungria et al., 1997). Un análisis proteómico realizado por Vora et al. (2021) mostró la expresión de la proteína NodU de *Sinorhizobium fredii* NGR234 en respuesta a los exudados del maíz cultivado en monocultivo y en asociación con gandúl (*Cajanus cajan*). El mecanismo por el que el maíz activa la expresión de algunos genes *nod* todavía se desconoce, pero sería interesante explorar si, como en el caso de las leguminosas, la inducción de genes rizobianos por el maíz difiere entre cultivares.

En condiciones de milpa, hubo un efecto dominante de los exudados de frijol sobre el transcriptoma de *R. phaseoli*, posiblemente porque contienen flavonoides que son específicos para inducir la expresión de genes de *Rhizobium* (Bolaños-Vásquez y Werner, 1997) o porque es más afín a consumir los nutrientes secretados por su hospedero natural. Los metabolitos de los exudados no fueron cuantificados; sin embargo, encontramos niveles similares de expresión de los genes *nod* *R. phaseoli* en ambos exudados. Los extractos de suelos en los

que se cultivaron conjuntamente maíz y frijol son eficientes inductores de genes de nodulación en *Rhizobium* (Hungria et al., 1997). En los ensayos en plantas de 15 días, observamos resultados similares, puesto que hubo una nodulación similar en los frijoles cultivados solos y en los asociados con el maíz, tanto en peso fresco como en fijación de nitrógeno.

Se han encontrado resultados diferentes en el campo, donde el número y la biomasa de los nódulos del frijol intercalado con el maíz tiende a ser mayor que en los que crecen solos, luego de 60 días de la siembra (Cardoso et al., 2007; Latati et al., 2013). Las concentraciones de nitrógeno en la rizosfera del co-cultivo maíz-frijol también es más elevada que en los monocultivos, sin embargo, este efecto varía en función de las características fisicoquímicas del suelo y de las variedades de las semillas cultivadas (Latati et al., 2013). A largo plazo, el nitrógeno suministrado por los nódulos fijadores de nitrógeno puede ser beneficioso para el maíz, que necesita este elemento en altas cantidades para su crecimiento.

Para confirmarlo cultivamos milpas en vermiculita inoculadas y no con *R. phaseoli*. Luego de 30 días, observamos que las milpas sin la bacteria presentaron un menor crecimiento y signos de deficiencia nutricional, que sugiere que las plantas podrían estar compitiendo por los nutrientes del sustrato. Sin embargo, este efecto negativo no se presentó en las milpas inoculadas. Posiblemente, el maíz se está beneficiando del nitrógeno provisto por la simbiosis de *R. phaseoli* con el frijol. Esta complementariedad metabólica entre los rizobios, el frijol y el maíz podría contribuir al alto rendimiento de grano observado en el campo (Cardoso et al., 2007; Zhang et al., 2014; Aguilar-Jiménez et al., 2019).

Por otra parte, observamos que *R. phaseoli* es productora de ácido indolacético y que es capaz de inducir la expresión del reportero DR5:*gusA* y del gen SAUR en *A. thaliana*. DR5 contiene

elementos de respuesta a la auxina (AuxREs), que consisten en la secuencia TGTCTC que están en los promotores de los genes inducibles por la auxina en tejidos como las hojas, las raíces y los tallos (Chen et al 2013). Por su parte, SAUR está involucrado en las respuestas tempranas a auxinas en más de 100 especies de plantas incluidas cereales y leguminosas (Stortenbeker y Bemer 2019) y es considerado un efector en las señales hormonales y ambientales que regulan el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Ren y Gray, 2015). En conjunto, los datos indican que *R. phaseoli* modifica la raíz de *A. thaliana* a través de una respuesta mediada por auxinas, y que este mecanismo puede ser el responsable del aumento del volumen radicular de las plantas de maíz y frijol inoculados con esta bacteria, tanto en monocultivo como en la milpa, favoreciendo el crecimiento de las plantas al incrementar la capacidad de absorción de nutrientes y agua por las raíces (Spaepen y Vanderleyden, 2011).

9. CONCLUSIONES

- Los perfiles transcriptómicos de *Rhizobium phaseoli* Ch24-10 en la milpa fueron más parecidos a los obtenidos en respuesta al frijol, debido a que en ambas condiciones se detectó una alta expresión de genes nodulación, indicando la preferencia del rizobio por los metabolitos exudados por el frijol creciendo en la milpa.
- En exudados de maíz, *R. phaseoli* expresó genes exclusivos para la degradación del mucílago y ácido ferúlico y para el transporte de azúcares, ácidos dicarboxílicos y hierro (mediado por sideróforos).
- Los exudados de la milpa indujeron la expresión de un menor número de genes de *R. phaseoli* en comparación con los monocultivos, sin embargo, algunos genes rizobiales solo fueron sobreexpresados en la milpa, como los que codifican la poligalacturonasa GH28 y una anhidrasa carbónica.
- *R. phaseoli* puede nodular y fijar nitrógeno eficientemente en frijoles crecidos en la milpa, por lo que la presencia de maíz no afecta la simbiosis rizobio-leguminosa.
- El efecto de promoción de crecimiento vegetal de *R. phaseoli* involucra mecanismos de respuesta a auxinas acompañado de un aumento en el volumen radicular.
- Nuestros resultados mostraron que la asociación del maíz con el frijol es beneficiada por la presencia de rizobios. En campo, las rizobacterias podrían jugar un rol importante en el establecimiento de múltiples cultivos en la milpa acortando los tiempos de cultivo y mejorando la productividad.

10. PERSPECTIVAS

- Realizar un análisis metabolómico de los exudados radiculares del maíz y frijol creciendo en monocultivo y en la milpa, y detectar aquellos compuestos que son únicos en cada condición. Así, identificaremos los metabolitos responsables de la inducción de la expresión genes en *R. phaseoli*.
- Realizar un análisis proteómico de *R. phaseoli* expuesto a los exudados radiculares de maíz, frijol y la milpa en diferentes tiempos de interacción, y asociar los hallazgos con el perfil metabolómico de los exudados. Esto nos permitirá conocer que genes se expresan en etapas tempranas y tardías de la colonización de las plantas.
- Realizar fusiones transcripciones de la región promotora de los genes sobreexpresados con genes de proteínas fluorescentes para detectar patrones de expresión a lo largo de las raíces de maíz y frijol.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., & Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, 221, 36-49.
- Aguilar-Jiménez, C. E., Galdámez-Gadámez, J., Martínez-Aguilar, F. B., Guevara-Hernández, F., Vázquez-Solis, H. (2019). Eficiencia del policultivo maíz-frijol-calabaza bajo manejo orgánico en la Frailesca, Chiapas, México. *Revista Científica Agroecosistemas*. 7(3):64-72.
- Aguirre-von-Wobeser, E., Rocha-Estrada, J., Shapiro, L. R., de la Torre, M. (2018). Enrichment of Verrucomicrobia, Actinobacteria and Burkholderiales drives selection of bacterial community from soil by maize roots in a traditional milpa agroecosystem. *PloS One*, 13(12), e0208852. doi: 10.1371/journal.pone.0208852.
- Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Ankati, S., & Podile, A. R. (2019). Metabolites in the root exudates of groundnut change during interaction with plant growth promoting rhizobacteria in a strain-specific manner. *Journal of Plant Physiology*, 243, 153057.
- Aslam, A., Ahmad, Z. Z., Asghar, H.N., Shahid, M. (2018). Effect of carbonic anhydrase-containing endophytic bacteria on growth and physiological attributes of wheat under water-deficit conditions. *Plant Production Science*, 21(3):244-255. doi: 10.1080/1343943X.2018.1465348.

- Badri, D. V., & Vivanco, J. M. (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment*, 32(6), 666-681.
- Bavec, F., & Bavec, M. (2015). Underutilized crops and intercrops in crop rotation as factors for increasing biodiversity on fields. In *Biodiversity in Ecosystems-Linking Structure and Function*. IntechOpen.
- Bellucci, E., Bitocchi, E., Rau, D., Rodriguez, M., Biagetti, E., Giardini, A. & Papa, R. (2014). Genomics of origin, domestication and evolution of *Phaseolus vulgaris*. In *Genomics of Plant Genetic Resources* (pp. 483-507). Springer, Dordrecht.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 1044-1051.
- Bento-Silva, A., Patto M. C. V., do Rosário Bronze, M. (2018). Relevance, structure and analysis of ferulic acid in maize cell walls. *Food Chemistry*. 246:360-378. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.11.012.
- Bertin, C., Yang, X., & Weston, L. A. (2003). The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 256(1), 67-83.
- Bolaños-Vásquez, M.C., and Werner D. (1997). Effects of *Rhizobium tropici*, *R. etli*, and *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* on nod gene-inducing flavonoids in root exudates of *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 10(3):339-346. doi: 10.1094/mpmi.1997.10.3.339.
- Cabrera, R., García-López, H., Aguirre-von-Wobeser, E., Orozco-Avitia, J. A., & Gutiérrez-Saldaña, A. H. (2020). *Amycolatopsis* BX17: An actinobacterial strain isolated from

- soil of a traditional milpa agroecosystem with potential biocontrol against *Fusarium graminearum*. *Biological Control*, 147, 104285.
- Canarini, A., Kaiser, C., Merchant, A., Richter, A., Wanek, W. (2019). Root exudation of primary metabolites: mechanisms and their roles in plant responses to environmental stimuli. *Frontiers in Plant Science*. 10:157. doi: 10.3389/fpls.2019.00157.
- Cardoso, E., Nogueira, M. A., Ferraz, S. (2007): Biological N₂ fixation and mineral N in common bean-maize intercropping or sole cropping in southeastern Brazil. *Experimental Agriculture*, 43(3), 319-330
- Carvalho, L. C., Dennis, P. G., Fedoseyenko, D., Hajirezaei, M. R., Borriss, R., & von Wirén, N. (2011). Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174(1), 3-11.
- Chandran, H., Meena, M., & Swapnil, P. (2021). Plant growth-promoting rhizobacteria as a green alternative for sustainable agriculture. *Sustainability*, 13(19), 10986.
- Chaparro, J. M., Badri, D. V., Bakker, M. G., Sugiyama, A., Manter, D. K., Vivanco, J. M. (2013). Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS One*: 8:e55731. doi: 10.1371/journal.pone.0055731
- Chen, L., Li, K. K., Shi, W. J., Wang, X. L., Wang, E. T., Liu, J. F., ... & Chen, W. X. (2021). Negative impacts of excessive nitrogen fertilization on the abundance and diversity of diazotrophs in black soil under maize monocropping. *Geoderma*, 393, 114999.
- Chen, Y., Yordanov, Y. S., Ma, C., Strauss, S., & Busov, V. B. (2013). DR5 as a reporter system to study auxin response in *Populus*. *Plant Cell Reports*, 32(3), 453-463.

- Clark, E. A., & Francis, C. A. (1985). Bean-maize intercrops: a comparison of bush and climbing bean growth habits. *Field Crops Research*, 10, 151-166.
- Clúa, J., Roda, C., Zanetti, M. E., & Blanco, F. A. (2018). Compatibility between legumes and rhizobia for the establishment of a successful nitrogen-fixing symbiosis. *Genes*, 9(3), 125.
- CONABIO. 2016. La milpa. <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/sistemas-productivos/milpa>. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Cd. de México. México.
- CONABIO. 2020a. Qué nos aportan los maíces https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/que-nos-aportan/N_maices. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Cd. de México. México.
- CONABIO. 2020b. Razas de maíz de México <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/maices/razas-de-maiz>. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Cd. de México. México.
- Cotton, T. E. A., Petriacq, P., Cameron, D. D., Meselmani, M. A., Schwarzenbacher, R., Rolfe, S. A., et al. (2019). Metabolic regulation of the maize rhizobiome by benzoxazinoids. *ISME Journal*.13, 1647–1658. doi: 10.1038/s41396-019-0375-2
- da Silva Lima, L., Olivares, F. L., De Oliveira, R. R., Vega, M. R. G., Aguiar, N. O., Canellas, L. P. (2014). Root exudate profiling of maize seedlings inoculated with

- Herbaspirillum seropedicae* and humic acids. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 1(1), 1-18. doi: <https://doi.org/10.1186/s40538-014-0023-z>.
- de Mendiburu, F., and de Mendiburu, M. F. (2019). Package “Agricolae”. R Package, Version, 1-2.
- De Ron, A. M., Papa, R., Bitocchi, E., González, A. M., Debouck, D. G., Brick, M. A., ... & Casquero, P. A. (2015). Common bean. In *Grain legumes* (pp. 1-36). Springer, New York, NY.
- Doornbos, R. F., van Loon, L. C., & Bakker, P. A. (2012). Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(1), 227-243.
- Duché-García, T. T., Ocampo-Fletes, I., Cruz-Hernández, J., Hernández-Guzmán, J. A., Macías-López, A., Jiménez-García, D., & Hernández-Romero, E. (2021). Microbial groups in a milpa agroecosystem interclassified with fruit trees in high valleys of Puebla, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 24(2).
- Eakin, H., Perales, H., Appendini, K., & Sweeney, S. (2014). Selling maize in Mexico: the persistence of peasant farming in an era of global markets. *Development and Change*, 45(1), 133-155.
- Ebel, R., Pozas Cárdenas, J. G., Soria Miranda, F., & Cruz González, J. (2017). Manejo orgánico de la milpa: rendimiento de maíz, frijol y calabaza en monocultivo y policultivo. *Terra Latinoamericana*, 35(2), 149-160.
- Eckhardt, T. (1978). A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid*. 1:584-588 doi: 10.1016/0147-619X(78)90016-1.

- 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 Microbiology*, 12(1):1-13. doi: 10.1186/1471-2180-12-116.
- Fischer, J., Boehm, H., & Heß, J. (2020). Maize-bean intercropping yields in Northern Germany are comparable to those of pure silage maize. *European Journal of Agronomy*, 112, 125947.
- Furbank, R. T. (2016). Walking the C4 pathway: past, present, and future. *Journal of Experimental Botany*, 67(14), 4057-4066.
- García-Díaz, Y. D., Aquino-Bolaños, E. N., Chávez-Servia, J. L., Vera-Guzmán, A. M., & Carrillo-Rodríguez, J. C. (2018). Bioactive compounds and antioxidant activity in the common bean are influenced by cropping season and genotype. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 78(2), 255-265.
- Gastélum, G., and Rocha, J. (2020). Milpas as a model for studying microbial diversity and plant-microbe interactions. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 23(1), 1-13. doi: <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.254>.
- Gepts, P., & Debouck, D. (1991). Origin, domestication, and evolution of the common bean. *Common beans: research for crop improvement*, 7-53.
- Gómez-Godínez, L. J., Fernandez-Valverde, S. L., Romero, J. C. M., & Martínez-Romero, E. (2019). Metatranscriptomics and nitrogen fixation from the rhizosphere of maize plantlets inoculated with a group of PGPRs. *Systematic and Applied Microbiology*, 42(4), 517-525.

- Gómez-Godínez, L. J., Martínez-Romero, E., Trejo, J. B., & Arteaga-Garibay, R. I. (2021). Tools and challenges to exploit microbial communities in agriculture. *Current Research in Microbial Sciences*, 100062.
- González-Pasayo, R., and Martínez-Romero, E. (2000). Multiresistance genes of *Rhizobium etli* CFN42. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 13(5):572-577. doi: 10.1094/MPMI.2000.13.5.572.
- Good, A. G., Beatty, P. H. (2011). Fertilizing nature: A tragedy of excess in the commons. *PLoS Biology*. 9, e1001124. doi: 10.1371/journal.pbio.1001124
- Graham, P. H., & Rosas, J. C. (1977). Growth and development of indeterminate bush and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium*. *The Journal of Agricultural Science*, 88(2), 503-508.
- Gutiérrez-Zamora, M. L., and Martínez-Romero, E. (2001). Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *Journal of Biotechnology*. 91(2-3):117-26. doi: 10.1016/s0168-1656(01)00332-7.
- Hassan, H. M., and Troxell, B. (2013). Transcriptional regulation by ferric uptake regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* 3:59. doi: 10.3389/fcimb.2013.00059.
- He, S., Simpson, B. K., Sun, H., Ngadi, M. O., Ma, Y., & Huang, T. (2018). *Phaseolus vulgaris* lectins: A systematic review of characteristics and health implications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(1), 70-83.
- Herrera-Quiterio, A., Toledo-Hernández, E., Aguirre-Noyola, J. L., Romero, Y., Ramos, J., Palemón-Alberto, F., & Toribio-Jiménez, J. (2020). Antagonic and plant growth-

- promoting effects of bacteria isolated from mine tailings at El Fraile, Mexico. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(3), 231-239.
- Hiltner, L. 1904. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft*, **98**, 59–78
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S. K., Cook, H., et al. (2019). eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Res.* 47(D1):D309-D314. doi: 10.1093/nar/gky1085.
- Hungria, M., Andrade, D. D. S., Colozzi-Filho, A., Balota, É. L. (1997). Interação entre microrganismos do solo, feijoeiro e milho em monocultura ou consórcio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 32(8), 807-818.
- Hynes, M. F., and McGregor, N. F. (1990). Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Molecular Microbiology*. 4:567-574. doi: 10.1111/j.1365-2958.1990.tb00625.x.
- Iyer, B., Rajput, M. S., Jog, R., Joshi, E., Bharwad, K., Rajkumar, S. (2016). Organic acid mediated repression of sugar utilization in rhizobia. *Microbiology Research*. 192:211-220. doi: 10.1016/j.micres.2016.07.006.
- Jefferson, R. A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS genes fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*. 5: 387-405. doi: 10.1007/BF02667740.
- Jin, M., Zhang, X., Zhao, M., Deng, M., Du, Y., Zhou, Y., et al. (2017). Integrated genomics-based mapping reveals the genetics underlying maize flavonoid biosynthesis. *BMC Plant Biology*, 17(1), 1-17. doi: <https://doi.org/10.1186/s12870-017-0972-z>.

- Khalid, A., Tahir, S., Arshad, M., & Zahir, Z. A. (2004). Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere and non-rhizosphere soils. *Soil Research*, 42(8), 921-926.
- Khan, A., Singh, P., & Srivastava, A. (2018). Synthesis, nature and utility of universal iron chelator–Siderophore: A review. *Microbiological research*, 212, 103-111.
- Khan, M. S., Koizumi, N., Olds, J. L. (2020). Biofixation of atmospheric nitrogen in the context of world staple crop production: Policy perspectives. *Science of the Total Environment*. 701, 134945. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134945
- Knee, E. M., Gong, F. C., Gao, M., Teplitski, M., Jones, A. R., Foxworthy, A., et al. (2001). Root mucilage from pea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14(6):775-784. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.6.775.
- Kokotek, W., and Lotz, W. (1989). Construction of a *lacZ*-kanamycin-resistance cassette, useful for site-directed mutagenesis and as a promoter probe. *Gene*. 84(2):467-71. doi: 10.1016/0378-1119(89)90522-2.
- Koo, B-J., Adriano, D. C., Bolan, N. S., Barton, C. D. (2005). Root exudates and microorganisms. In: Daniel Hillel, editor. *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Elsevier. p. 421-428. doi: <https://doi.org/10.1016/B0-12-348530-4/00461-6>
- Korenblum, E., Dong, Y., Szymanski, J., Panda, S., Jozwiak, A., Massalha, H., ... & Aharoni, A. (2020). Rhizosphere microbiome mediates systemic root metabolite exudation by root-to-root signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(7), 3874-3883.

- Kumar, A., Patel, J. S., Meena, V. S., & Srivastava, R. (2019). Recent advances of PGPR based approaches for stress tolerance in plants for sustainable agriculture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *20*, 101271.
- Laeremans, T., Snoeck, C., Mariën, J., Verreth, C., Martínez-Romero, E., Promé, J. C., & Vanderleyden, J. (1999). *Phaseolus vulgaris* recognizes *Azorhizobium caulinodans* Nod factors with a variety of chemical substituents. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *12*(9), 820-824.
- Landon, A. The “how” of the three sisters: The origins of agriculture in Mesoamerica and the human niche. *Nebraska Anthropologist*. **2008**, *40*, 110–124.
- Langmead, B., and Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* *9*:357-359. doi: 10.1038/nmeth.1923.
- Latati, M., Pansu, M., Drevon, J. J., Ounane, S. M. (2013). Advantage of intercropping maize (*Zea mays* L.) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on yield and nitrogen uptake in Northeast Algeria. *International Journal of Applied Science and Research* .1, 1-7.
- López I., R (ed). 2007. *Avances de investigación 2003-2006. Red Frijol*. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). Las Agujas, Municipio de Zapopan, Jalisco, México.97 pp.
- Li, B., Li, Y. Y., Wu, H. M., Zhang, F. F., Li, C. J., Li, X. X., et al. (2016). Root exudates drive interspecific facilitation by enhancing nodulation and N₂ fixation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(23), 6496-6501. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1523580113>.

- Li, W., Zhao, X., Zou, S., Ma, Y., Zhang, K., Zhang, M. (2012). Scanning assay of β -galactosidase activity. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 48, 603–607 (2012).
<https://doi.org/10.1134/S0003683812060075>
- Liao, Y., Smyth, G. K., Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30:923-930. doi: 10.1093/bioinformatics/btt656
- Liu LK, Becker DF, Tanner JJ. 2017. Structure, function, and mechanism of proline utilization A (PutA). *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 632:142-157. doi: 10.1016/j.abb.2017.07.005
- López-Guerrero, M. G., Ormeño-Orrillo, E., Acosta, J. L., Mendoza-Vargas, A., Rogel, M. A., Ramírez, M. A., & Martínez-Romero, E. (2012). Rhizobial extrachromosomal replicon variability, stability and expression in natural niches. *Plasmid*, 68(3), 149-158.
- López-Guerrero, M. G., Ormeño-Orrillo, E., Acosta, J. L., Mendoza-Vargas, A., Rogel, M. A., Ramírez, M. A. et al. (2012). Rhizobial extrachromosomal replicon variability, stability and expression in natural niches. *Plasmid*, 68(3), 149-158. doi: 10.1016/j.plasmid.2012.07.002.
- López-Guerrero, M. G., Ormeño-Orrillo, E., Velázquez, E., Rogel, M. A., Acosta, J. L., González, V., & Martínez-Romero, E. (2012). *Rhizobium etli* taxonomy revised with novel genomic data and analyses. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(6), 353-358.

- Lopez-Guerrero, M., Ormeño-Orrillo, E., Rosenblueth, M., Martínez-Romero, J., & Martínez-Romero, E. (2013). Buffet hypothesis for microbial nutrition at the rhizosphere. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 188.
- Lozada-Aranda, M., Yanes, A. M., Ponce-Mendoza, A., Burgeff, C., Orjuela-R., M. A. & Galindo., O. O. (2018). Milpas de México. *Oikos*, *9*, 10–12.
- Lucht, J. M., and Bremer, E. (1994). Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system ProU. *FEMS Microbiology Reviews*. 14(1):3-20. doi: 10.1111/j.1574-6976.1994.tb00067.x.
- Maravillas, K. E., Diaz-Almeyda, E., & Gerardo, N. (2019). Bacterial growth in milpa polyculture and monoculture soils [Emory University]. *Journal of Student Research*.
- Marie, C., Broughton, W. J., and Deakin, W. J. (2001). *Rhizobium* type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Current Opinion in Plant Biology*. *4*, 336–342. doi: 10.1016/S1369-5266(00)00182-5
- Martínez-Castro, C. J., Ríos-Castillo, M., Castillo-Leal, M. (2019). La revolución verde y sus consecuencias socioeconómicas en la agricultura mexicana. *Ra Ximhai*. *15*(2):101-116
- Martínez-Romero, E. (2003). Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant and Soil*, *252*(1), 11-23.
- Martínez-Romero, E., Aguirre-Noyola, J. L., Taco-Taype, N., Martínez-Romero, J., & Zuñiga-Dávila, D. (2020). Plant microbiota modified by plant domestication. *Systematic and Applied Microbiology*, *43*(5), 126106.

- Mateos-Maces, L., Castillo-González, F., Servia, J. L. C., Estrada-Gómez, J. A., & Livera-Muñoz, M. (2016). Manejo y aprovechamiento de la agrobiodiversidad en el sistema milpa del sureste de México. *Acta Agronómica*, 65(4), 413-421.
- Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M. M., Sanchez, J., Buckler, E., & Doebley, J. (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), 6080-6084.
- McConell, M. (2021). *Feedgrains Sector at a Glance*. USDA. Recuperado de <https://www.ers.usda.gov/topics/crops/corn-and-other-feedgrains/feedgrains-sector-at-a-glance/> [04 de octubre del 2021].
- McNear Jr., D. H. (2013) The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything In Between. *Nature Education Knowledge* 4(3):1
- Méndez-Flores, O. G., Ochoa-Díaz López, H., Castro-Quezada, I., Olivo-Vidal, Z. E., García-Miranda, R., Rodríguez-Robles, et al. (2021). The Milpa as A Supplier of Bioactive Compounds: A Review. *Food Reviews International*, 1-18. doi: <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1934001>
- Mommer, L., Kirkegaard, J., van Ruijven, J. (2016). Root–root interactions: towards a rhizosphere framework. *Trends in Plant Science*, 21(3), 209-217. doi: 10.1016/j.tplants.2016.01.009.
- Montes-Grajales, D., Esturau-Escofet, N., Esquivel, B., Martínez-Romero, E. (2019). Exo-metabolites of *Phaseolus vulgaris*-nodulating rhizobial strains. *Metabolites* 9(6):105. doi: 10.3390/metabo9060105.
- Morales-Santos, M. E., Peña-Valdivia, C. B., García-Esteva, A., Aguilar-Benítez, G., & Kohashi-Shibata, J. (2017). Características físicas y de germinación en semillas y

- plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) silvestre, domesticado y su progenie. *Agrociencia*, 51(1), 43-62.
- Moreno-Espíndola, I. P., Ferrara-Guerrero, M. J., Luna-Guido, M. L., Ramírez-Villanueva, D. A., León-Lorenzana, D., Arit, S., & Dendooven, L. (2018). The bacterial community structure and microbial activity in a traditional organic milpa farming system under different soil moisture conditions. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2737.
- Nassary, E. K., Baijukya, F., & Ndakidemi, P. A. (2020). Productivity of intercropping with maize and common bean over five cropping seasons on smallholder farms of Tanzania. *European Journal of Agronomy*, 113, 125964.
- Nazari, M., Riebeling, S., Banfield, C. C., Akale, A., Crosta, M., Mason-Jones, K. (2020). Mucilage polysaccharide composition and exudation in maize from contrasting climatic regions. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1968. doi: 10.3389/fpls.2020.587610.
- Nelson, L. M. (2004). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. *Crop management*, 3(1), 1-7.
- Nelson, M. S., and Sadowsky, M. J. (2015). Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. *Frontiers in Plant Science*. 6:491. doi: 10.3389/fpls.2015.00491.
- Novotny, I. P., Tittonell, P., Fuentes-Ponce, M. H., López-Ridaura, S., & Rossing, W. A. (2021). The importance of the traditional milpa in food security and nutritional self-sufficiency in the highlands of Oaxaca, Mexico. *PloS One*, 16(2), e0246281.
- Oburger, E., & Jones, D. L. (2018). Sampling root exudates—mission impossible?. *Rhizosphere*, 6, 116-133.

- OMAFRA [Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs]. (2009). Field scouting: using growing degree days and crop heat units. Accessed from www.omafra.gov.on.ca/english/crops/pub811/10using.htm
- Pellet, D. M., Grunes, D. L., Kochian, L. V. (1995). Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays L.*). *Planta*, 196(4), 788-795. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00197346>.
- Perales, H. y Golicher, D. (2014). Mapping the diversity of maize races in Mexico. *PLoS One*, 9 (12), e114657. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114657>
- Petry, N., Boy, E., Wirth, J. P., & Hurrell, R. F. (2015). The potential of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) as a vehicle for iron biofortification. *Nutrients*, 7(2), 1144-1173.
- Phillips, D. A., Fox, T. C., King, M. D., Bhuvaneshwari, T. V., Teuber, L. R. (2004). Microbial products trigger amino acid exudation from plant roots. *Plant Physiology*. 136(1):2887-2894. doi: 10.1104/pp.104.044222.
- Pinski, A., Betekhtin, A., Hupert-Kocurek, K., Mur, L. A., & Hasterok, R. (2019). Defining the genetic basis of plant–endophytic bacteria interactions. *International journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1947.
- Quandt, J., and Hynes, M. F. (1993). Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene*. 127(1):15-21. doi: 10.1016/0378-1119(93)90611-6.
- Ranum P, Peña-Rosas JP, Garcia-Casal MN. 2014. Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1312:105–112.
- Rebollar, E. A., Sandoval-Castellanos, E., Roessler, K., Gaut, B. S., Alcaraz., L. D., Benítez, M, et al (2017). Seasonal changes in a maize-based polyculture of central Mexico

- reshape the co-occurrence networks of soil bacterial communities. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2478. doi: 10.3389/fmicb.2017.02478.
- Ren, H., & Gray, W. M. (2015). SAUR proteins as effectors of hormonal and environmental signals in plant growth. *Molecular plant*, 8(8), 1153-1164.
- Rendón-Anaya, M., Montero-Vargas, J. M., Saburido-Álvarez, S., Vlasova, A., Capella-Gutierrez, S., Ordaz-Ortiz, J. J., & Gabaldón, T. (2017). Genomic history of the origin and domestication of common bean unveils its closest sister species. *Genome biology*, 18(1), 60.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J, Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139-40. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616.
- Rodríguez-Robayo, K. J., Méndez-López, M. E., Molina-Villegas, A., Juárez, L. (2020). What do we talk about when we talk about milpa? A conceptual approach to the significance, topics of research and impact of the mayan milpa system. *Journal of Rural Studies*, 77, 47-54. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2020.04.029>.
- Romney, D. L., Thorne, P., Lukuyu, B., & Thornton, P. K. (2003). Maize as food and feed in intensive smallholder systems: management options for improved integration in mixed farming systems of east and southern Africa. *Field crops research*, 84(1-2), 159-168.
- Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2004). *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. *Archives of microbiology*, 181(5), 337-344.
- Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(8), 827-837.

- Rouf Shah, T., Prasad, K., & Kumar, P. (2016). Maize—A potential source of human nutrition and health: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1166995.
- Rubia, M. I., Ramachandran, V. K., Arrese-Igor, C., Larrainzar E, Poole, P. S. (2020). A novel biosensor to monitor proline in pea root exudates and nodules under osmotic stress and recovery. *Plant Soil*. 452: 413-422. doi: 10.1007/s11104-020-04577-2.
- Ryan, M. R. (2021). Crops better when grown together. *Nature Sustainability*, 4(11), 926-927.
- Sainju, U. M., Ghimire, R., & Pradhan, G. P. (2019). Nitrogen fertilization I: Impact on crop, soil, and environment. In *Nitrogen Fixation*. IntechOpen.
- Sanchez G. JJ, Goodman MM, Stuber CW. 2000. Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. *Economic Botany*. 54:43–59.
- Santalla, M., Rodino, A. P., Casquero, P. A., De Ron, A. M. (2001). Interactions of bush bean intercropped with field and sweet maize. *Eur J Agron*. 15(3):185-196. doi: 10.1016/S1161-0301(01)00104-6.
- Santiago Vera, T., Rosset, P. M., Saldívar Moreno, A., Méndez, V. E., & Ferguson, B. G. (2021). La milpa: sistema de resiliencia campesina. Estudio de dos organizaciones campesinas en Chiapas. *Región y sociedad*, 33.
- Santiago-Martínez, M. G., Encalada, R., Lira-Silva, E., Pineda, E., Gallardo-Pérez, J. C., Reyes-García, M. A., et al. (2016). The nutritional status of *Methanosarcina acetivorans* regulates glycogen metabolism and gluconeogenesis and glycolysis fluxes. *FEBS Journal* . 283(10):1979-1999. doi:10.1111/febs.13717.

- Santillán, M. L. (2014). La milpa, tradición milenaria de agricultura familiar. Recuperado el 3 de septiembre del 2020, de Recuperado el 3 de septiembre del 2020, de http://ciencia.unam.mx/leer/356/La_milpa_tradicion
- Santoyo, G., Urtis-Flores, C. A., Loeza-Lara, P. D., Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2021). Rhizosphere colonization determinants by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Biology*, *10*(6), 475.
- Sasse, J., Martinoia, E., & Northen, T. (2018). Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome?. *Trends in plant science*, *23*(1), 25-41.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, *3*(6), 1101-1108.
- Servín-Garcidueñas, L. E., Zayas-Del Moral, A., Ormeño-Orrillo, E., Rogel, M. A., Delgado-Salinas, A., Sánchez, F., & Martínez-Romero, E. (2014). Symbiont shift towards *Rhizobium* nodulation in a group of phylogenetically related *Phaseolus* species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *79*, 1-11.
- Shamseldin, A. (2007). Use of DNA marker to select well-adapted *Phaseolus*-symbionts strains under acid conditions and high temperature. *Biotechnology Letters*. *29*(1):37-44. doi: 10.1007/s10529-006-9200-x
- Shamseldin, A., & Velázquez, E. (2020). The promiscuity of *Phaseolus vulgaris* L.(common bean) for nodulation with rhizobia: a review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *36*(5), 1-12.
- Shidore, T., Dinse, T., Öhrlein, J., Becker, A., & Reinhold-Hurek, B. (2012). Transcriptomic analysis of responses to exudates reveal genes required for rhizosphere competence

- of the endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Environmental Microbiology*, 14(10), 2775-2787.
- SIAP(Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera), 2016: Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Cierre de la producción agrícola por estado, http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp
- Silva, C., Vinuesa, P., Eguiarte, L. E., Martínez-Romero, E., & Souza, V. (2003). *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: population genetics and biogeographic implications. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 884-893.
- Sircar, D., and Mitra, A. (2008). Evidence for p-hydroxybenzoate formation involving enzymatic phenylpropanoid side-chain cleavage in hairy roots of *Daucus carota*. *Journal of Plant Physiology*, 165(4), 407-414.
- Souza V, Bain J, Silva C, Bouchet V, Valera A *et al.* (1997). Ethnomicrobiology: Do agricultural practices modify the population structure of the nitrogen fixing bacteria *Rhizobium etli* biovar *phaseoli*. *Journal of Ethnobiology*. 1997; 17:249–266
- Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(4), a001438.
- Spaepen, S., Bossuyt, S., Engelen, K., Marchal, K., & Vanderleyden, J. (2014). Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. *New Phytologist*, 201(3), 850-861.

- Stortenbeker, N., & Bemer, M. (2019). The SAUR gene family: the plant's toolbox for adaptation of growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 70(1), 17-27.
- Subrahmaniam, H. J., Libourel, C., Journet, E. P., Morel, J. B., Muños, S., Niebel, A., & Roux, F. (2018). The genetics underlying natural variation of plant–plant interactions, a beloved but forgotten member of the family of biotic interactions. *The Plant Journal*, 93(4), 747-770.
- Tawaraya, K., Horie, R., Saito, S., Wagatsuma, T., Saito, K., Oikawa, A. (2014). Metabolite profiling of root exudates of common bean under phosphorus deficiency. *Metabolites*, 4(3), 599-611. doi: 10.3390/metabo4030599.
- Thaw, P., Sedelnikova, S. E., Muranova, T., Wiese, S., Ayora, S., Alonso, J. C., ... & Rafferty, J. B. (2006). Structural insight into gene transcriptional regulation and effector binding by the Lrp/AsnC family. *Nucleic acids research*, 34(5), 1439-1449.
- Trigo, Y. M., & Montenegro, J. L. (2002). El maíz en México: biodiversidad y cambios en el consumo. *Análisis económico*, 17(36), 281-303.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M. L., Touraine, B., Moenne-Loccoz, Y., Muller, D., et al. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*. 4:356. doi: 10.3389/fpls.2013.00356
- Van Dillewijn P., Soto M. J., Villadas, P.J., Toro, N. Construction and environmental release of a *Sinorhizobium meliloti* strain genetically modified to be more competitive for alfalfa nodulation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001 Sep;67(9):3860-5. doi: 10.1128/AEM.67.9.3860-3865.2001.

- Van Heerwaarden, J., Doebley, J., Briggs, W. H., Glaubitz, J. C., Goodman, M. M., Gonzalez, J. D. J. S., & Ross-Ibarra, J. (2011). Genetic signals of origin, spread, and introgression in a large sample of maize landraces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(3), 1088-1092.
- Von Caemmerer, S., & Furbank, R. T. (2016). Strategies for improving C4 photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, *31*, 125-134.
- Vora, S. M., Ankati, S., Patole, C., Podile, A. R., Archana, G. (2021). Alterations of primary metabolites in root exudates of intercropped *Cajanus cajan*–*Zea mays* modulate the adaptation and proteome of *Ensifer (Sinorhizobium) fredii* NGR234. *Microbial Ecology*, 1-18. doi: <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01818-4>.
- Wang, N. Q., Kong, C. H., Wang, P., & Meiners, S. J. (2021). Root exudate signals in plant–plant interactions. *Plant, Cell & Environment*, *44*(4), 1044-1058. doi: <https://doi.org/10.1111/pce.13892>.
- Wilson, K. J., Sessitsch, A., Corbo, J. C., Giller, K. E., Akkermans, A. D., Jefferson, R. A. (1995). β -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies or rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiology*. 141:1691-1705. doi: 10.1099/13500872-141-7-1691.
- Wortmann, C.S (2006). *Phaseolus vulgaris* L. (common bean). Record from PROTA4U. M.Brink& G. Belay, (Editors). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Resources vegetables de l’Afrique tropicale), Wageningen, Netherlands.
- Xi, C., Dirix, G., Hofkens, J., De Schryver, F. C., Vanderleyden, J., & Michiels, J. (2001). Use of dual marker transposons to identify new symbiosis genes in *Rhizobium*. *Microbial Ecology*, *41*(4), 325-332.

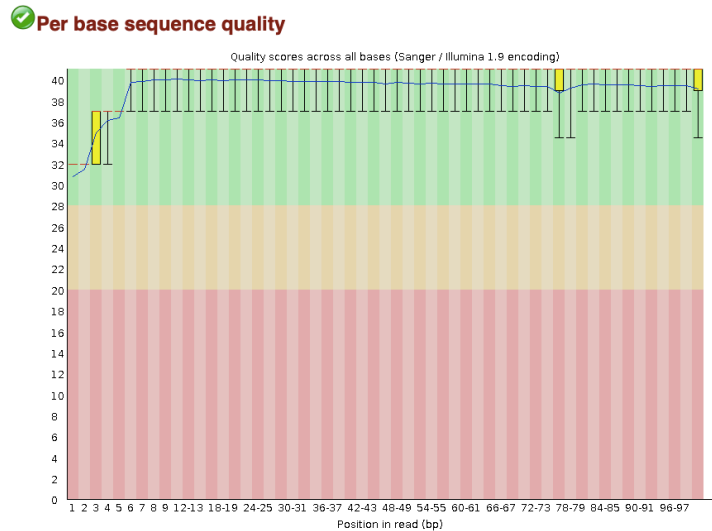
- Xi, C., Lambrecht, M., Vanderleyden, J., Michiels, J. (1999). Bi-functional *gfp*- and *gusA*-containing mini-*Tn5* transposon derivatives for combined gene expression and bacterial localization studies. *Journal of Microbiological Methods*. 35(1):85-92. doi: 10.1016/s0167-7012(98)00103-1.
- Xie, S., Wu, H., Chen, L., Zang, H., Xie, Y., Gao, X. (2015). Transcriptome profiling of *Bacillus subtilis* OKB105 in response to rice seedlings. *BMC microbiology*, 15(1), 1-14. doi: 10.1186/s12866-015-0353-4.
- Yi, Y., Li, Z., Kuipers, O. P. (2018). Plant-microbe interaction: transcriptional response of *Bacillus mycoides* to potato root exudates. *Journal of Visualized Experiments*. (137):57606. doi: 10.3791/57606.
- Zhang, C., Postma, J. A., York, L. M., Lynch, J. P. (2014). Root foraging elicits niche complementarity-dependent yield advantage in the ancient ‘three sisters’(maize/bean/squash) polyculture. *Annals of Botany*. 191:1719-1733. doi: 10.1093/aob/mcu191.
- Zhang, H., Yang, Y., Mei, X., Li, Y., Wu, J., Li, Y. et al (2020). Phenolic acids released in maize rhizosphere during maize-soybean intercropping inhibit *Phytophthora blight* of soybean. *Frontiers in Plant Science*, 11, 886. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00886>

12. ANEXOS

Anexo I Parámetros bioinformáticos

Análisis de la calidad de las lecturas con FASTQC v0.11.8 (Andrews, 2010).

FASTQC se utiliza para realizar el control de calidad de los datos crudos de secuenciación masiva. A continuación un ejemplo de los gráficos de calidad de las secuencias obtenidas en este estudio.

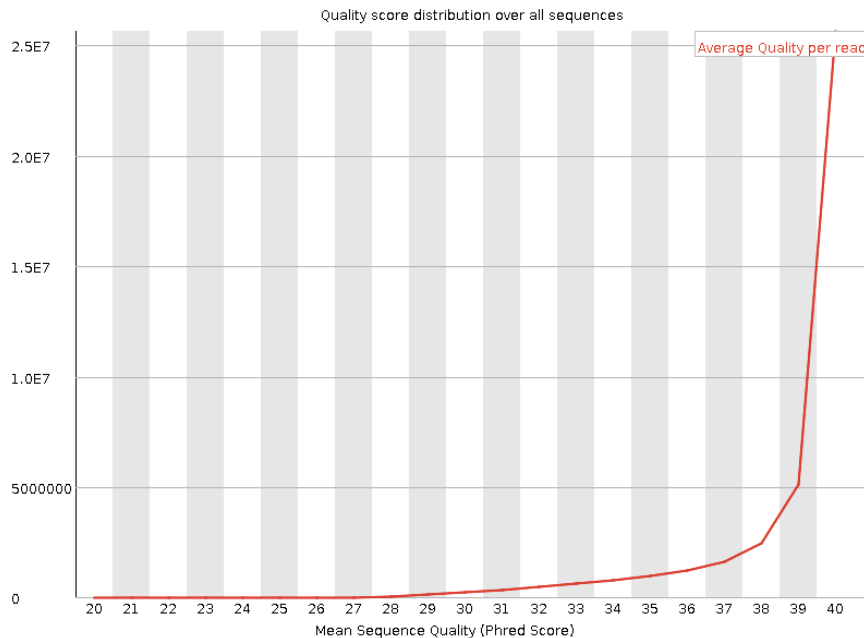


El eje horizontal representa cada una de las bases de las secuencias obtenidas (de la 1 a la 100). El eje vertical muestra el puntaje de calidad de las bases distribuidas en 3 intervalos de calidad Phred o Q: 0-20 (zona roja) indicativa de mala secuenciación; 20-28 (zona naranja) con secuencias de calidad pobre y 28 a 40 (color verde) con secuencias de alta calidad.

Las secuencias con un $Q > 36$ fueron seleccionadas para los análisis bioinformáticos, puesto que valores de $Q \geq 30$ presentan una tasa de error menor de 0.1%.

En la siguiente figura, el pico es cercano a 40, lo que indica que las lecturas tuvieron una calidad media $> Q39$, y la calidad de secuenciación fue muy alta.

✔ Per sequence quality scores



Parámetros de Trimmomatic v0.39 (Bolger et al., 2014) empleados para la limpieza de las secuencias de RNAseq.

Trimmomatic es una herramienta para procesamiento, recorte y filtrado de las lecturas de datos de secuenciación masiva.

MINLEN:36. Descarta la lectura si está por debajo de la longitud especificada.

LEADING:3 = Elimina las bases iniciales de baja calidad (por debajo de la calidad 3)

TRAILING:3 = Elimina las bases finales de baja calidad (por debajo de la calidad 3)

SLIDINGWINDOW:4:15 = Escanea la lectura con una ventana de 4 bases, cortando cuando la calidad media por base sea inferior a 15.

ILLUMINACLIP = Elimina adaptadores de la plataforma de secuenciación Illumina

Parámetros de Bowtie2 v2.3.5 (Langmead and Salzberg, 2012)

Bowtie 2 es una herramienta para alinear lecturas de secuenciación con secuencias de referencia largas o genomas.

-q = Las lecturas son archivos FASTQ

-p 20 = hace que Bowtie 2 ejecute un número determinado de procesos de búsqueda en paralelo

-x = nombre base del índice del genoma de referencia

-S = indica que archivo en el que se escriben las alineaciones es SAM.

--very-sensitive (-D 20 -R 3 -N 0 -L 20 -i S,1,0.50) = Busca alineaciones distintas y válidas para cada lectura. Cuando encuentra un alineamiento válido, generalmente continuará buscando alineamientos que sean casi tan buenos o mejores. Eventualmente dejará de buscar, ya sea porque excedió un límite puesto en el esfuerzo de búsqueda (ver -D y -R) o porque ya sabe todo lo que necesita saber para reportar un alineamiento.

Parámetros de featureCounts v1.6.4 (Liao et al., 2014)

featureCounts ofrece un resumen del número de las lecturas mapeadas a un genoma o secuencia de referencia, ya sea de origen eucariota o procariota.

-p = Si se especifica, se contarán los fragmentos (o plantillas) en lugar de las lecturas. Esta opción sólo es aplicable a las lecturas pareadas.

-a GCF_000268285.2_RPHCH2410v2_genomic.gff = Archivo de anotación

-t CDS = Especifica el tipo de característica en la anotación GTF.

-g ID = Especifica el tipo de atributo en la anotación GTF.

-o = Nombre del archivo de salida que incluye los recuentos de lecturas

Justificación para el uso de EdgeR v3.6.0 (Robinson et al., 2010) de Bioconductor.

Debido a la alta reproducibilidad observada en nuestros datos de RNA-seq elegimos EdgeR. Este método emplea métricas estadísticas basadas en las distribuciones binomiales negativas, incluyendo la estimación empírica de Bayes, pruebas exactas, modelos lineales generalizados y pruebas de cuasi-verosimilitud. EdgeR puede usarse para al análisis qRT-PCR, CHIP-seq, ATAC-seq, Bisulfite-seq, SAGE yCAGE.

Justificación del uso del método TMM (por sus siglas en inglés, trimmed mean of M-values) para estimar los niveles de expresión de cada gen

Este método es apropiado para analisis con EdgeR porque en ambos se consideran muestras con distribución paramétrica. Con TMM, las muestras que tienen las expresiones medias más cercanas a la media de todas las muestras son consideradas muestras de referencia, y todas las demás son muestras problema. Para cada muestra problema, el factor de escala se calcula en base a la media ponderada de las relaciones logarítmicas entre la muestra problema y la de referencia.

Justificación del uso de eggNOG-mapper v2 (Huerta-Cepas et al., 2019).

EggNOG-mapper es una herramienta para la anotación funcional de secuencias. Utiliza grupos ortólogos y filogenias de la base de datos eggNOG para transferir la información funcional a las secuencias problema. EggNOG-mapper incluyen la anotación de nuevos datos de genomas, transcriptomas o incluso catálogos de genes metagenómicos.

Anexo II Artículo científico

Los resultados obtenidos en este proyecto fueron publicados en siguiente artículo científico:

Aguirre-Noyola, J. L., Rosenblueth, M., Santiago Martínez, M. G., & Martínez-Romero, E. (2021). Transcriptomic responses of *Rhizobium phaseoli* to root exudates reflect its capacity to colonize maize and common bean in an intercropping system. *Frontiers in microbiology*, 3087. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.740818>



ORIGINAL RESEARCH
published: 29 October 2021
doi: 10.3389/fmicb.2021.740818



Transcriptomic Responses of *Rhizobium phaseoli* to Root Exudates Reflect Its Capacity to Colonize Maize and Common Bean in an Intercropping System

José Luis Aguirre-Noyola¹, Mónica Rosenblueth¹, Michel Geovanni Santiago-Martínez² and Esperanza Martínez-Romero^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Wei Zhang,
Michigan State University,
United States

Reviewed by:

Wen Fang Chen,
China Agricultural University, China
Lionel Moulin,
Institut de Recherche Pour le
Développement (IRD), France

*Correspondence:

Esperanza Martínez-Romero
emartine@ccp.unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Microbe and Virus Interactions with
Plants,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 13 July 2021

Accepted: 22 September 2021

Published: 29 October 2021

Citation:

Aguirre-Noyola JL,
Rosenblueth M,
Santiago-Martínez MG and
Martínez-Romero E (2021)
Transcriptomic Responses
of *Rhizobium phaseoli* to Root
Exudates Reflect Its Capacity
to Colonize Maize and Common Bean
in an Intercropping System.
Front. Microbiol. 12:740818.
doi: 10.3389/fmicb.2021.740818

¹ Programa de Ecología Genómica, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México, ² Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Pennsylvania State University, University Park, PA, United States

Corn and common bean have been cultivated together in Mesoamerica for thousands of years in an intercropping system called “milpa,” where the roots are intermingled, favoring the exchange of their microbiota, including symbionts such as rhizobia. In this work, we studied the genomic expression of *Rhizobium phaseoli* Ch24-10 (by RNA-seq) after a 2-h treatment in the presence of root exudates of maize and bean grown in monoculture and milpa system under hydroponic conditions. In bean exudates, rhizobial genes for nodulation and degradation of aromatic compounds were induced; while in maize, a response of genes for degradation of mucilage and ferulic acid was observed, as well as those for the transport of sugars, dicarboxylic acids and iron. Ch24-10 transcriptomes in milpa resembled those of beans because they both showed high expression of nodulation genes; some genes that were expressed in corn exudates were also induced by the intercropping system, especially those for the degradation of ferulic acid and pectin. Beans grown in milpa system formed nitrogen-fixing nodules similar to monocultured beans; therefore, the presence of maize did not interfere with *Rhizobium*–bean symbiosis. Genes for the metabolism of sugars and amino acids, flavonoid and phytoalexin tolerance, and a T3SS were expressed in both monocultures and milpa system, which reveals the adaptive capacity of rhizobia to colonize both legumes and cereals. Transcriptional fusions of the *putA* gene, which participates in proline metabolism, and of a gene encoding a polygalacturonase were used to validate their participation in plant–microbe interactions. We determined the enzymatic activity of carbonic anhydrase whose gene was also overexpressed in response to root exudates.

Keywords: RNA-seq, milpa system, agriculture, polygalacturonase, proline, carbonic anhydrase, symbiotic nitrogen fixation