



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

**ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DEL  
RIZOBIOMA EN LÍNEAS DE TRIGO (*Triticum aestivum*),  
ANTE EL EFECTO DE *Azospirillum brasilense* COMO  
INOCULANTE.**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Agricultura Sustentable)

P r e s e n t a

**Carlos Julián Aguilar Martínez**

La Paz, Baja California Sur, septiembre de 2022.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 05 del Mes de Septiembre del 2022, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Análisis de las comunidades microbianas del rizobioma en líneas de trigo (*Triticum aestivum*), ante el efecto de *Azospirillum brasilense* como inoculante"**

Presentada por el alumno:

**Carlos Julián Aguilar Martínez**

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Agricultura Sustentable**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

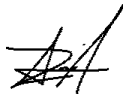
LA COMISIÓN REVISORA



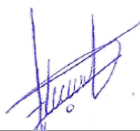
Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes  
Co-Directora de Tesis



Dr. Aaron Barraza Celis  
Co-Director de Tesis



Dr. Raúl Álvarez Venegas  
Co-Tutor de Tesis



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos.

La Paz, Baja California Sur, a 05 de septiembre de 2022.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante Carlos Julián Aguilar Martínez del Programa de Maestría en Uso, Manejo y Preservación de Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:  
Ithenticate
- Filtros utilizados:  
Excluir citas  
Excluir bibliografía
- Porcentajes de similitud:  
Máximo 20% para tesis  
Posgrado  
Se muestra captura de pantalla

INFORME DE ORIGINALIDAD

**19%**

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://cibnor.repositorioinstitucional.mx">cibnor.repositorioinstitucional.mx</a> Internet	647 palabras — 6%
2	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Internet	198 palabras — 2%
3	<a href="http://hidrobiologica.izt.uam.mx">hidrobiologica.izt.uam.mx</a> Internet	62 palabras — 1%
4	<a href="http://repositorio.una.edu.ni">repositorio.una.edu.ni</a> Internet	48 palabras — < 1%
5	<a href="http://Helvia.uco.es">Helvia.uco.es</a> Internet	46 palabras — < 1%
6	<a href="http://Repositorio.unal.edu.co">Repositorio.unal.edu.co</a> Internet	40 palabras — < 1%
7	<a href="http://repositorio.ipicyt.edu.mx">repositorio.ipicyt.edu.mx</a> Internet	39 palabras — < 1%
8	<a href="http://revistas.iiap.gob.pe">revistas.iiap.gob.pe</a> Internet	36 palabras — < 1%
9	<a href="http://www.tecnologiahorticola.com">www.tecnologiahorticola.com</a> Internet	33 palabras — < 1%

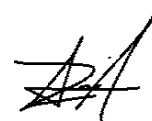
Firmas del comité



**Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes**  
Co-Directora de Tesis



**Dr. Aaron Barraza Celis**  
Co-Director de Tesis



**Dr. Raúl Álvarez Venegas**  
Co-Tutor de Tesis

## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.  
Co-Directora de Tesis

Dr. Aarón Barraza Celis  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.  
Co-Director de Tesis

Dr. Raúl Álvarez Venegas  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN  
Co-Tutor de Tesis

### **Comité Revisor de Tesis**

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes  
Dr. Aarón Barraza Celis  
Dr. Raúl Álvarez Venegas

### **Jurado del Examen**

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes  
Dr. Aarón Barraza Celis  
Dr. Raúl Álvarez Venegas

### **Suplente**

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

## Resumen

El trigo (*Triticum aestivum*) es uno de los cereales más cultivados alrededor del mundo produciéndose unos 770 millones de toneladas de grano anualmente. Estos elevados niveles de producción son difíciles de mantener sin el uso de agroquímicos. El empleo de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) es una alternativa para disminuir estas prácticas de uso. Dentro de las PGPR está *A. brasilense*. Con ello se planteó la siguiente pregunta científica ¿Los efectos benéficos en el rendimiento de las líneas de trigo (*Triticum aestivum*) provocaran cambios en la estructura de la comunidad microbiana, asociados a la colonización exitosa de *A. brasilense*? Este trabajo tiene como objetivo determinar los cambios en la comunidad microbiana de la rizosfera, de 14 líneas de trigo de la población para mapeo (SynOpDH) las cuales se seleccionaron basados en el rendimiento (alto y bajo) y los tiempos de cosecha, que fueron inoculados con *A. brasilense*, para así establecer la relación microbioma-genotipo, microbioma-rendimiento y microbioma-inoculación. Se analizó la composición y estructura de las comunidades microbianas asociadas a las raíces de trigo a través del uso de las herramientas de secuenciación masiva del gen 16S ADNr y su respectivo análisis a través de la paquetería de DADA2 en R a través de la interfaz de RStudio, derivado del procesamiento de las secuencias se generaron las tablas de ASV para los análisis ecológicos de las comunidades microbianas. Se encontró que la estructura y composición de las comunidades estaba mayormente compuesta por Phyla (*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteriodota*, *Chloroflexi* y *Firmicutes*) y Familias asociadas y reportadas en trabajos previos con trigo, además las estructura se veía alterada con la introducción de *A. brasilense*. Al observar los análisis de alfa diversidad solo la variable tratamiento produjo diferencias significativas en algunas de las líneas estudiadas. Al realizar los análisis de beta diversidad mediante PCoA con las distancias de Bray-Curtis no se observaron agrupaciones basadas la productividad, pero con los análisis estadísticos de PERMANOVA si hubo diferencias estadísticamente significativas en las tres variables de estudio. Con estos resultados se observa que el tratamiento de *A. brasilense* genera cambios en la estructura y composición de las comunidades microbianas asociadas a las raíces de trigo.

**Palabras claves:** *A. brasilense*, genotipo, PGPR, rendimiento grano.

**ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-0338-3567>

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis



Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes



Dr. Aarón Barraza Celis

## Summary

Wheat (*Triticum aestivum*) is one of the most cultivated cereals around the world, producing some 770 million tons of grain annually. These high levels of production are difficult to maintain without the use of agrochemicals. The use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) is an alternative to reduce these use practices. Within the PGPR is *A. brasilense*. With this, the following scientific question was raised: Will the beneficial effects on the yield of wheat lines (*Triticum aestivum*) cause changes in the structure of the microbial community, associated with the successful colonization of *A. brasilense*? This work aims to determine the changes in the rhizosphere microbial community of 14 wheat lines of the population for mapping (SynOpDH) which were selected based on yield (high and low) and harvest times, which were inoculated with *A. brasilense*, in order to establish the microbiome-genotype, microbiome-yield and microbiome-inoculation relationship. The composition and structure of the microbial communities associated with wheat roots was analyzed through the use of massive sequencing tools of the 16S rDNA gene and its respective analysis through the DADA2 package in R through the RStudio interface, derived from the processing of the sequences, the ASV tables were generated for the ecological analyzes of the microbial communities. It was found that the structure and composition of the communities was mainly composed of Phyla (*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteriodota*, *Chloroflexi* and *Firmicutes*) and Associated Families and reported in previous works with wheat, in addition the structure was altered with the introduction of *A. brasilense*. Likewise, when observing the alpha diversity analyzes, only the treatment variable produced significant differences in some of the lines studied. When performing the beta diversity analyzes using PCoA with the Bray-Curtis distances, no productivity-based groupings were observed, but with the PERMANOVA statistical analyzes, there were statistically significant differences in the three study variables. With these results, it is observed that the treatment of *A. brasilense* generates changes in the structure and composition of the microbial communities associated with wheat roots.

**Keywords:** *A. brasilense*, genotype, PGPR, grain yield.

**ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-0338-3567>

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis



Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes



Dr. Aarón Barraza Celis

## Dedicatoria

*A mi familia, que son el apoyo de mi vida.*

## Agradecimientos

Este trabajo fue llevado a cabo con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con la Beca de Manutención para nivel Maestría 1082826 y con el proyecto CONACYT de Ciencia Básica 0281080 “Análisis fisiológico y genético para una población para mapeo de trigo en respuesta a la inoculación de *A. brasilense*” a cargo de la Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. por permitirme desarrollarme y brindarme el espacio necesario y a la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos por el apoyo y seguimiento que me brindaron.

Al Laboratorio Biotechnologica A2, por el acceso a sus instalaciones y el material de trabajo prestado para el procesamiento de las muestras biológicas.

Al Dr. Aarón Barraza Celis, por compartir conmigo su conocimiento en el área y guiarme en esta etapa. Por mostrar interés verdadero en mi desarrollo y crecimiento académico, para formarme como un mejor profesionalista.

A la Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes, por la confianza, la paciencia y el apoyo otorgado desde el inicio de esta etapa. Por siempre mostrar interés en mi progreso académico y la guía brindada para completar y mejorar mi trabajo.

Al Dr. Raúl Álvarez Venegas, por su valiosa orientación y sus sugerencias aportadas para enriquecer y mejorar mi trabajo.

A mis amigos y compañeros, por el apoyo y ayuda que siempre mostraron en los momentos que lo requería.

A mi familia, porque son el principal apoyo en mi vida. Porque todos mis logros son de ellos también.



## Contenido

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	ii
<b>Dedicatoria</b> .....	iii
<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Contenido</b> .....	v
<b>Lista de figuras</b> .....	vii
<b>Lista de tablas</b> .....	ix
<b>Abreviaturas</b> .....	x
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1 El trigo.....	3
2.2 Comunidades microbianas asociadas al trigo .....	4
2.3 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.....	5
2.4 <i>Azospirillum brasilense</i> .....	7
2.5 <i>Azospirillum brasilense</i> como PGPR .....	7
2.6 Inconsistencias del uso <i>Azospirillum spp.</i> en cultivos .....	8
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	10
<b>4. HIPOTESIS</b> .....	12
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	13
5.1 Objetivo general .....	13
5.2 Objetivos particulares.....	13
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	14
6.1. Diseño experimental del reto en campo con <i>Azospirillum brasilense</i> .....	14
6.2. Colecta de Muestras.....	14
6.3. Extracción de ADN, preparación de librerías y secuenciación .....	15
6.4. Análisis bioinformático .....	15
<b>7. RESULTADOS</b> .....	18
7.1 Métricas de secuenciación .....	18
7.2 Índices de diversidad alfa .....	19
7.3 Análisis de curvas de rarefacción .....	24
7.4 Índice de diversidad beta .....	27

7.5 Estructura y composición de las comunidades bacterianas.....	32
7.6 Análisis de Diagramas de Venn.....	38
7.7 Análisis de OTUs diferencialmente abundantes (DAOTUS) .....	40
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>44</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>49</b>
<b>10. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>50</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Total de secuencias fastq obtenidas por muestra. ....	18
<b>Figura 2.</b> Índice de diversidad alfa de Shannon (Silva). ....	19
<b>Figura 3.</b> Índice de diversidad alfa de Shannon (rdp). ....	19
<b>Figura 4.</b> Índice de diversidad alfa de Shannon (Green-genes). ....	20
<b>Figura 5.</b> Índice de diversidad alfa de Simpson (Silva). ....	20
<b>Figura 6.</b> Índice de diversidad alfa de Simpson (rdp). ....	21
<b>Figura 7.</b> Índice de diversidad alfa de Simpson (Green-genes). ....	21
<b>Figura 8.</b> Índice de diversidad alfa de Chao1 (Silva). ....	22
<b>Figura 9.</b> Índice de diversidad alfa de Chao1 (rdp). ....	22
<b>Figura 10.</b> Índice de diversidad alfa de Chao1 (Green-genes). ....	23
<b>Figura 11.</b> Índice de diversidad alfa de especies observadas (Silva). ....	23
<b>Figura 12.</b> Índice de diversidad alfa de especies observadas (rdp). ....	24
<b>Figura 13.</b> Índice de diversidad alfa de especies observadas (Green-genes). ....	24
<b>Figura 14.</b> Curvas de rarefacción (Silva). (A) Estimaciones del índice de Shannon, (B) Estimaciones del índice de Simpson, (C) Estimaciones del índice de Chao1 mediante curvas de muestreo de rarefacción interpolación y extrapolación, (D) leyenda de las muestras. ....	25
<b>Figura 15.</b> Curvas de rarefacción (rdp). (A) Estimaciones del índice de Shannon, (B) Estimaciones del índice de Simpson, (C) Estimaciones del índice de Chao1 mediante curvas de muestreo de rarefacción interpolación y extrapolación, (D) leyenda de las muestras. ....	26
<b>Figura 16.</b> Curvas de rarefacción (Green-genes) (A) Estimaciones del índice de Shannon, (B) Estimaciones del índice de Simpson, (C) Estimaciones del índice de Chao1 mediante curvas de muestreo de rarefacción interpolación y extrapolación, (D) leyenda de las muestras. ....	27
<b>Figura 17.</b> Gráfico de PCoA (Silva). Ordenación por Coordenadas Principales (PCoA) mediante distancias de Bray-Curtis. En color rojo se muestran las muestras con tratamiento (Azos) y en color verde se muestran las muestras control (Ctrl). ....	28
<b>Figura 18.</b> Gráfico de NMDS (Silva). Escalamiento Multidimensional No Metrico (NMDS) mediante distancias de Bray-Curtis. En color rojo se muestran las muestras con tratamiento (Azos) y en color verde se muestran las muestras control (Ctrl). ....	29
<b>Figura 19.</b> Gráfico de PCoA (rdp). Ordenación por Coordenadas Principales (PCoA) mediante distancias de Bray-Curtis. En color rojo se muestran las muestras con tratamiento (Azos) y en color verde se muestran las muestras control (Ctrl). ....	29
<b>Figura 20.</b> Gráfico de NMDS (rdp). Escalamiento Multidimensional No Metrico (NMDS) mediante distancias de Bray-Curtis. En color rojo se muestran las muestras con tratamiento (Azos) y en color verde se muestran las muestras control (Ctrl). ....	30
<b>Figura 21.</b> Gráfico de PCoA (Green-genes). Ordenación por Coordenadas Principales (PCoA) mediante distancias de Bray-Curtis. En color rojo se muestran las muestras con tratamiento (Azos) y en color verde se muestran las muestras control (Ctrl). ....	30
<b>Figura 22.</b> Gráfico de NMDS (Green-genes). Escalamiento Multidimensional No Metrico (NMDS) mediante distancias de Bray-Curtis. En color rojo se muestran las muestras con tratamiento (Azos) y en color verde se muestran las muestras control (Ctrl). ....	31
<b>Figura 23.</b> Abundancia relativa a nivel de Phylum (Silva). Las barras muestran la abundancia relativa porcentual de ASVs asignadas a cada Phylum. ....	33

<b>Figura 24.</b> Abundancia relativa a nivel de Familia (Silva). Las barras muestran la abundancia relativa porcentual de ASVs asignadas a cada Familia.....	34
<b>Figura 25.</b> Abundancia relativa a nivel de Phylum (rdp). Las barras muestran la abundancia relativa porcentual de ASVs asignadas a cada Phylum. ....	35
<b>Figura 26.</b> Abundancia relativa a nivel de Familia (rdp). Las barras muestran la abundancia relativa porcentual de ASVs asignadas a cada Familia.....	36
<b>Figura 27.</b> Abundancia relativa a nivel de Phylum (Green-genes). Las barras muestran la abundancia relativa porcentual de ASVs asignadas a cada Phylum. ....	37
<b>Figura 28.</b> Abundancia relativa a nivel de Familia (Green-genes). Las barras muestran la abundancia relativa porcentual de ASVs asignadas a cada Familia.....	38
<b>Figura 29.</b> Diagrama de Venn (Silva). ASVs compartidos entre las muestras control y tratamiento. ....	39
<b>Figura 30.</b> Diagrama de Venn (rdp). ASVs compartidos entre las muestras control y tratamiento. ....	39
<b>Figura 31.</b> Diagrama de Venn (Green-genes). ASVs compartidos entre las muestras control y tratamiento. ....	40
<b>Figura 32.</b> Grafica de DAOTUs (Silva). ASVs diferencialmente abundantes basados en la variable tratamiento. ....	41
<b>Figura 33.</b> Grafica de DAOTUs (rdp). ASVs diferencialmente abundantes basados en la variable tratamiento. ....	42
<b>Figura 34.</b> Grafica de DAOTUs (Green-genes). ASVs diferencialmente abundantes basados en la variable tratamiento. ....	43

**Lista de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Líneas de trigo seleccionadas para trabajar .....	15
<b>Tabla 2.</b> Prueba de PERMANOVA (Silva).....	31
<b>Tabla 3.</b> Prueba de PERMANOVA (rdp).....	31
<b>Tabla 4.</b> Prueba de PERMANOVA (Green-genes).....	32

**Abreviaturas**

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNr</b>	Ácido desoxirribonucleico ribosómico
<b>ASV</b>	Variante de secuencia de amplicón (Amplicon Sequence Variant)
<b>DAOTUs</b>	Análisis diferencial de OTUs
<b>IAA</b>	Ácido indol-3-acético
<b>ISR</b>	Resistencia sistémica inducida
<b>NMDS</b>	Escalamiento multidimensional no métrico (Non-metric Multidimensional Scaling)
<b>OTU</b>	Unidad Taxonómica Operativa (Operational Taxonomic Unit)
<b>PCoA</b>	Análisis de Coordenadas Principales (Principal Coordinates Analysis)
<b>PGPR</b>	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant growth-promoting Rhizobacteria)

## 1. INTRODUCCIÓN

El trigo (*Triticum aestivum*) es una planta monocotiledónea hexaploide anual, y uno de los tres cereales más cultivados alrededor del mundo junto con el arroz y el maíz. En el mundo se producen unos 770 millones de toneladas de grano de trigo, siendo Rusia, China, India y países de la Unión Europea los mayores productores de este cereal (FAO, 2022). En México se produce alrededor de 3 millones de toneladas anuales. Estos elevados niveles de producción de trigo alrededor del mundo son difíciles de mantener sin el empleo de fertilizantes químicos, de los cuales ya se han documentado las problemáticas de su uso intensivo (Moss, 2008). Por ello, en los últimos años, se han implementado nuevas estrategias para disminuir el uso de esos productos químicos, con el fin de alcanzar dicho objetivo. Una de estas estrategias es el empleo de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés).

Las PGPR se encuentran asociadas a la rizósfera de las plantas y promueven el crecimiento de las mismas de forma directa (mediante la secreción de reguladores del crecimiento vegetal), y de forma indirecta (induciendo los mecanismos de defensa contra los fitopatógenos) (Castro-Sowinski *et al.*, 2007; Backer *et al.*, 2018). Las bacterias que poseen actividad reportada de promover el crecimiento en plantas pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Burkholderia*, entre otras más (Castro-Sowinski *et al.*, 2007; de-Bashan *et al.*, 2007; Backer *et al.*, 2018). Dentro de las PGPR más usadas y estudiadas para su aplicación en sistemas agrícolas, se encuentra el género *Azospirillum*. Este género presenta propiedades promotoras de crecimiento vegetal destacadas, sobre todo la especie *Azospirillum brasilense*. Esta bacteria es una *Alpha proteobacteria*, fijadora de nitrógeno, aerobia facultativa, la cual se aisló inicialmente en pastos, trigo y maíz, además de otros cultivos como el tomate, arroz, chile y otros más (de-Bashan *et al.*, 2007).

En trigo se ha reportado el uso de *A. brasilense* como promotora de crecimiento, promoviendo el desarrollo de las raíces de dicha planta mediante la producción de ácido 3-indolacético (IAA) (de-Bashan *et al.*, 2007). No obstante, se pueden presentar diferencias significativas en el desarrollo y rendimientos entre las distintas variedades de los cultivos. Por ejemplo, Rojas *et al.*,

(2013) demostraron la preferencia de *A. brasilense* al adherirse en mayor número a ciertas variedades de trigo y Díaz de León *et al.*, (2015) demostraron la variación de adhesión de *A. brasilense*, mediante el uso de una población para mapeo de 114 líneas de trigo.

Los fertilizantes químicos en la producción agrícola son un problema, debido a que su uso origina el aumento de compuestos potencialmente tóxicos a partir de los mismos, en forma de lixiviados, en los mantos freáticos. Además, su uso intensivo incrementa la salinidad del suelo, dando lugar a bajos rendimientos (Moss, 2008; Chandini *et al.*, 2019; Krasilnikov *et al.*, 2022).

Por ende, el uso de nuevas alternativas como el empleo de PGPR para mejorar el rendimiento de cultivos de importancia agronómica ha tomado importancia creciente en los últimos años. Sin embargo, debido a resultados inconsistentes en su aplicación, se ha sugerido que su efecto sea genotipo dependiente. Para comprobar esto, se evaluó una población para mapeo de trigo (SynOpDH) para determinar los cambios en la comunidad microbiana en plantas de trigo (*Triticum aestivum*), que fueron inoculados con *A. brasilense*.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 El trigo

El trigo (*Triticum aestivum*) es el cereal más cultivado y consumido alrededor del mundo junto con el arroz y el maíz, produciéndose alrededor de unos 770 millones de toneladas anualmente en todo el mundo, siendo Rusia, China, India y países de la unión Europa los mayores productores; y unos 3 millones de toneladas anuales en México (FAO, 2022).

El trigo se puede clasificar en dos tipos principales: trigo harinero hexaploide y trigo duro tetraploide. El trigo harinero hexaploide es el más cultivado representando un 95% del total de trigo cultivado en el mundo (Tadesse *et al.*, 2015). El trigo es uno de los alimentos de mayor importancia alrededor del mundo ya que a lo largo de la historia ha sido fundamental en la civilización humana mejorando la seguridad alimentaria a nivel mundial. Esto debido a que proporciona el 19% de las calorías y el 21% de las proteínas necesarias en la dieta a nivel mundial. Además, representa un alimento básico para el 40% de la población mundial (Shewry y Hey, 2015).

En las últimas décadas el crecimiento de la población mundial ha disparado el aumento en la producción de alimentos alrededor del mundo, por ello la demanda del trigo también se ha intensificado (Shewry y Hey, 2015; Tadesse *et al.*, 2015). El aumento reciente en la producción de trigo se atribuye principalmente a las mejoras en los métodos de producción que trajeron consigo la “Revolución verde”, más específicamente el uso de variedades de trigo mejoradas con una mejor respuesta a fertilizantes, sistemas de riego mejorados, y resistencia a enfermedades y pesticidas (Flachs, 2016; Ameen y Raza, 2018). De acuerdo con predicciones estadísticas, la población mundial se elevará a unos 9 mil millones de habitantes para el año 2050, por lo tanto, la demanda de trigo también aumentaría a unos 900 millones de toneladas anuales para lograr satisfacer las necesidades alimentarias de toda la población (Tadesse *et al.*, 2015).

## 2.2 Comunidades microbianas asociadas al trigo

Numerosos estudios se han realizado sobre las comunidades microbianas asociadas al trigo, a través de los cuales se ha tratado de dilucidar su microbioma central, y para lo cual se han empleado una gran cantidad de datos de estudios previos para comparación. Sin embargo, esto sigue siendo una tarea difícil debido a los diferentes factores de estudio que intervienen.

Algunos trabajos realizados sobre comunidades microbianas de trigo encontraron estructuras y composiciones microbianas similares, como el estudio de Velázquez-Sepúlveda *et al.*, (2012) en donde a través del análisis de comunidades microbianas de trigo recolectado en Michoacán, se detectaron 30 OTUs (del inglés "Operational Taxonomic Unit"), de la Clase *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacilli*, *Clostridia*. En donde los géneros más abundantes fueron *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Bacillus*.

Otro trabajo realizado fue el de Chen *et al.*, (2019) en donde compararon las comunidades bacterianas y fúngicas de trigo bajo el efecto de diferentes niveles de fertilización con nitrógeno inorgánico. Estos autores encontraron que dichas comunidades microbianas estaban compuestas principalmente por *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Patiscibacteria*, *Planctomycetes* y *Verrucomicrobia*. Mientras que a nivel de comunidades fúngicas estaba compuesto principalmente por *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Glomeromycota* y *Zygomycota*.

En otro estudio Dai *et al.*, (2020) determinaron la composición de las comunidades microbianas asociadas al trigo en hoja, raíz y suelo bajo el efecto de una enfermedad. Ellos encontraron 2885 OTUs de todas las muestras en donde *Proteobacteria* era el Phylum dominante en los tres compartimientos, de ahí le seguían *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes*.

Youseif *et al.*, (2021) hicieron un estudio para determinar comunidades bacteria de la rizósfera de trigo mediante enfoques cultivo dependiente e independiente. A través del enfoque de

análisis metagenómico encontraron que los Phyla mayormente abundantes eran *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes*.

Cangioli *et al.*, (2022) realizaron un estudio comparativo de comunidades microbianas de trigo bajo efecto de distintas variedades de planta y tratamiento con fertilizantes. Ellos encontraron que la variedad de planta tiene más efecto en la estructura y composición de las comunidades bacterianas de trigo que el tratamiento con fertilizantes. Se asignaron unos 10,271 ASVs (del inglés "Amplicon Sequence Variant") de bacterias, dentro de los cuales los Phyla más abundantes fueron *Acidobacteriota*, *Actinobacteriota*, *Chloroflexi*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia*.

Han sido muchos los estudios que abordan las comunidades bacterianas asociadas al trigo bajo distintos enfoques y variables de estudio. Con esto se han descrito que los Phyla mayormente asociados a trigo son *Proteobacteria* (principalmente *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*), *Bacteroidota*, *Firmicutes* y *Actinobacteriota*. Mientras que a nivel de género se han descrito su asociación a los géneros *Pseudomonas*, *Rhodanobacter*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Streptomyces*, entre otros más (Kavamura *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022).

### **2.3 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal**

En las raíces de plantas se pueden encontrar bacterias las cuales tienen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas y por lo tanto se denominan rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). Muchas PGPR ya se han comercializado para el control biológico o como biofertilizante (Castro-Sowinski *et al.*, 2007; Olanrewaju *et al.*, 2017; Backer *et al.*, 2018).

Las PGPR se pueden clasificar según su ubicación en la rizosfera: (a) PGPR extracelular, que se encuentra en la rizosfera y en el rizoplasma; y (b) PGPR intracelular, que se encuentran dentro de las células de la raíz, generalmente en estructuras nodulares (Prashar *et al.*, 2014).

Las bacterias que se han estudiado y enlistado como posibles PGPR, debido a su capacidad para mejorar el crecimiento de las plantas y controlar fitopatógenos, pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Streptomyces*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizococcus* y *Rhodococcus* (Castro-Sowinski *et al.*, 2007; de-Bashan *et al.*, 2007; Prashar *et al.*, 2014; Backer *et al.*, 2018).

Las PGPR promueven el crecimiento de las plantas mediante una variedad de mecanismos directos e indirectos. La promoción directa del crecimiento de las plantas se basa en la estimulación de la división celular a partir de compuestos bacterianos, o mejorando la absorción de nutrientes por parte de la planta (Prashar *et al.*, 2014; Olanrewaju *et al.*, 2017). Dentro de estos mecanismos se pueden enlistar a la producción de auxinas que está presente en alrededor del 80% de los microbios de la rizosfera. Tales microorganismos pueden sintetizar y liberar auxina (por ejemplo: ácido indol-3-acético [IAA]), siendo posiblemente el mecanismo más ampliamente distribuido (Spaepen *et al.*, 2007). Otro mecanismo es la producción de citocinas, las cuales regulan la senescencia vegetal por acumulación de clorofila, formación de tejido celular, desarrollo de raíces, alargamiento y formación de pelo, iniciación del tallo y expansión de hojas (Sakakibara, 2006). La producción de sideróforos, o péptidos quelantes de hierro, son otro mecanismo de promoción de crecimiento (Olanrewaju *et al.*, 2017). Las bacterias solubilizadoras de fosfato aportan fosfato a las plantas por lo cual es otro mecanismo de promoción de crecimiento (Alori *et al.*, 2017). Por último, la fijación de nitrógeno es considerado como otro mecanismo de promoción de crecimiento esto debido a que el nitrógeno gaseoso no puede ser utilizado por las plantas, las cuales solamente pueden emplear el amoníaco, que a su vez es producido por bacterias (Olanrewaju *et al.*, 2017).

La promoción indirecta del crecimiento de las plantas se basa en la prevención de los efectos deletéreos por parte de fitopatógenos. El principal mecanismo que utilizan las PGPR para contrarrestar a los fitopatógenos, es la síntesis de antibióticos. Además, algunas PGPR de compiten con los fitopatógenos, por nutrientes o por sitios en la raíz de la planta (Mawarda *et al.*, 2020). La resistencia sistémica inducida (ISR, por sus siglas en inglés) es un mecanismo de

respuesta que poseen las plantas ante la presencia de patógenos. El pretratamiento de las plantas con un PGPR prepara a la planta para que reaccione más rápido y fuerte a un ataque posterior. La ISR prepara a la planta contra muchos fitopatógenos diferentes. Estas respuestas están controladas por vías de señalización que están reguladas por fitohormonas (Van Loon *et al.*, 1998; Choudhary *et al.*, 2007; Pieterse *et al.*, 2014).

#### **2.4 *Azospirillum brasilense***

*Azospirillum brasilense* es una bacteria que pertenece al Phylum *Proteobacteria*, a la Clase *Alphaproteobacteria*, al Orden *Rhodospirillales*, a la Familia *Azospirillaceae* y al Género *Azospirillum*. Esta es una bacteria de vida libre, Gram negativa, fijadora de nitrógeno, las cuales se aislaron y caracterizaron originalmente en Brasil, de las raíces de plantas gramíneas (Tarrand *et al.*, 1978). Posteriormente se identificó en maíz, arroz y trigo (Döbereiner, 1988). No obstante, el género *Azospirillum* está ampliamente distribuido alrededor del mundo. Se han descrito varias especies del género *Azospirillum* dentro de las que destacan *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. doebereinerae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. canadiense*, *A. zaeae*, *A. rugosum*, *A. palatum*, *A. picis* y *A. thiophilum* (Domingues Duarte *et al.*, 2020).

#### **2.5 *Azospirillum brasilense* como PGPR**

*A. brasilense* en las últimas décadas se ha empleado como una PGPR en estudios de promoción de crecimientos de diversos cultivos de interés agronómico. En el trigo se ha reportado que *A. brasilense* promueve el crecimiento de las raíces de trigo mediante la exudación de auxinas, más específicamente de Ácido Indol-3-Acético (IAA) (Kapulnik *et al.*, 1985; Barbieri *et al.*, 1986; Harari *et al.*, 1988; Spaepen *et al.*, 2008), el cual interviene en la división celular de las raíces de trigo, dando lugar a la estimulación del crecimiento de las raíces. El aumento en el crecimiento de las raíces de trigo, por su parte, favorece el incremento de la superficie de contacto de las mismas con el suelo, lo que posibilita a la planta en la obtención de mayor cantidad de nutrientes (Kapulnik *et al.*, 1985; Barbieri y Galli, 1993; Bashan y de-Bashan, 2010).

## 2.6 Inconsistencias del uso *Azospirillum spp.* en cultivos

Si bien se han realizados diversos estudios que comprueban el efecto benéfico de *Azospirillum brasilense* junto con los mecanismos que intervienen en diversos modelos de plantas, existen diversos factores que influyen directamente en la efectividad del uso de estas bacterias, tales como los factores bióticos (comunidades microbianas nativas del suelo) y abióticos (clima y condiciones del suelo). Desde los primeros estudios del uso de *Azospirillum* como PGPR se tenían ciertos indicios de la preferencia en su interacción con ciertas variedades de trigos y otros cultivos.

Reinhold *et al.*, (1985) compararon las respuestas quimiotácticas de cepas de *Azospirillum spp.* con sus respectivos hospederos, en donde ellos propusieron que existía una adaptación de *Azospirillum spp.* con sus respectivos huéspedes con lo que existe quimiotaxis cepa específica.

Después, García de Salamone *et al.*, (1996) investigaron el efecto de la inoculación de cepas de *Azospirillum spp.* sobre el crecimiento de cuatro genotipos de maíz, en donde se determinó que la inoculación de las cepas de *Azospirillum spp.* generaban aumentos en el rendimiento del grano en dos genotipos de maíz, mientras que los otros dos genotipos mostraron poca respuesta a la inoculación.

En otro experimento realizado por García de Salomone y Döbereiner, (1996) llevó a cabo el análisis con genotipos de maíz argentino y brasileño, en donde los inocularon con cuatro cepas de *A. brasilense* y tres de *A. lipoferum*. Se determinó que las cepas de *Azospirillum spp.* tuvieron efectos diferentes en la bioquímica y fisiología del maíz.

Saubidet y Barneix, (1998) compararon el efecto de doce cepas de *A. brasilense* en plantas de trigo. La mayoría de las cepas lograron estimular el crecimiento de raíces, pero el grado de estimulación fue diferente para cada cepa. Ellos sugirieron que el efecto benéfico de *A. brasilense* depende probablemente de la interacción específica de la bacteria-cultivar.

También, se ha sugerido que *A. brasilense* reconoce y se adhiere mejor en algunas variedades de trigo. Por lo cual, Rojas *et al.*, (2013) estudiaron la adhesión de *A. brasilense* en distintos genotipos de trigo en donde encontraron que *A. brasilense* se adhería mejor a la variedad de trigo Ópata que a las variedades Norwich y Ciano T79. Además, en las variedades Chinese Spring y líneas sintéticas haploides dobladas no se encontraron bacterias asociadas a raíz. Lo cual sugiere que la adhesión de *A. brasilense* a las raíces de trigo se debe al genotipo heredado.

En otro estudio realizado por Díaz de León *et al.*, (2015) mediante el uso de una población para mapeo genético compuesto por 114 líneas de haploides dobladas, las cuales eran la cruce de la variedad Opata y la variedad sintética hexaploide WSH67.2l., se realizó un estudio de adhesión con *A. brasilense* en donde caracterizaron el polimorfismo de adhesión en la población para mapeo. En donde un 32% de las líneas totales de la población para mapeo presentaron el fenotipo de adhesión, y el 68% restantes de las líneas no se determinó la adhesión de células a las raíces.

Debido a la alta variabilidad en cuanto a los resultados diferenciales en el efecto de las cepas de *Azospirillum spp.* en las plantas inoculadas en los de estudios, se ha propuesto que el efecto pueda ser genotipo-dependiente.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El trigo es uno de los tres cereales más cultivados alrededor del mundo, con una producción anual estimadas en 770 millones de toneladas y se espera que para 2050 se eleve esta producción. La agricultura en la actualidad está completamente dominada por el empleo de una gran variedad de compuestos sintéticos como fertilizantes, fungicidas, insecticidas y pesticidas.

El uso de estos compuestos sintéticos ha traído, desde su popularización a inicios de los años 60 con la Revolución verde, consecuencias en la salud de los suelos de uso agrícola; debido a que se incrementan los lixiviados de compuestos sintéticos en los mantos freáticos, incremento en la salinidad del suelo, así como un impacto a las comunidades microbianas del suelo, ya que se reduce la riqueza y diversidad de estas. Por ello, a partir de las décadas de los 80 y 90 del siglo pasado, se empezaron a realizar estudios sobre el uso de alternativas para disminuir el empleo de estos compuestos y sus consecuencias negativas (incluida la salud humana).

Dentro de estas alternativas planteadas se encuentra el uso de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), las cuales son bacterias que se encuentran asociadas a la rizosfera de las plantas, y que mediante la activación de mecanismos de señalización celular promueven el crecimiento de las plantas.

Dentro de las PGPR, una de las especies de bacterias más estudiadas sobre todo en cultivos de cereales, hasta el día de hoy es *A. brasilense*, bacteria con la cual se han realizado diversos estudios de promoción de crecimiento en cultivos de arroz, maíz, trigo, tomate entre otros. Sin embargo, en muchos de estos estudios se ha presentado una alta variabilidad de respuesta a la inoculación. Lo anterior podría ser explicado por la capacidad de adhesión de *A. brasilense* a las raíces de ciertas variedades de cultivo, por lo cual el efecto de promoción de crecimiento de *A. brasilense* podría ser genotipo-dependiente.

Por lo cual, el interés de este estudio radica en comprender el efecto que provocaría la inoculación de una cepa de *A. brasilense* en las comunidades microbianas de las raíces de trigo de una población para mapeo (SynOpDH) generado a partir de una variedad de trigo con alta



adhesión de *Azospirillum* (Opata) y otra variedad de trigo sin adhesión de *Azospirillum* a sus raíces (Sintético W7984). La utilidad de esta población para mapeo radica en demostrar que el efecto benéfico que provee *A. brasilense* esté ligado a su adhesión a las raíces y al genotipo de las mismas. La información generada será de utilidad para los mejoradores de trigo, así como para seleccionar de mejor manera a las bacterias con potencial benéfico.

#### 4. HIPOTESIS

*Azospirillum brasilense* posee un efecto benéfico, presumiblemente genotipo dependiente, que provoca diferencias significativas en el crecimiento de cultivos de trigo cuando dicha bacteria logra adherirse a las raíces de trigo. Los efectos benéficos en el rendimiento de las líneas de trigo (*Triticum aestivum*) provocarán a su vez cambios en la estructura de la comunidad microbiana, asociados a la colonización exitosa de *A. brasilense*.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Determinar los cambios en la comunidad microbiana en plantas de trigo (*Triticum aestivum*), de una población de mapeo, que fueron inoculados con *A. brasilense*.

### 5.2 Objetivos particulares

- Analizar la estructura de la comunidad microbiana de las líneas de trigo inoculadas con *A. brasilense* en campo.
- Determinar el efecto de los factores como productividad, tratamiento y líneas sobre la estructura de la comunidad microbiana asociada a líneas de trigo inoculadas con *A. brasilense*.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Diseño experimental del reto en campo con *Azospirillum brasilense*

A partir del mes de diciembre de 2019 se realizó el experimento en campo con la inoculación de *A. brasilense* en una población de 100 líneas para mapeo de trigo (SynOpDH). El experimento se realizó en el campo experimental del CIBNOR, el cual estaba dividido en dos parcelas: parcela control y parcela inoculada con la PGPR. En cada una de estas parcelas estaba sembrados los triplicados de cada una de las líneas de trigo, y cada uno de estos triplicados estaban constituidos por 15 semillas de trigo, sembrados en tres surcos separados. La inoculación con la bacteria se realizó junto con el agua de riego en donde *A. brasilense* CD fue agregado a una concentración de  $10^7$  UFC/ml. Desde el inicio del experimento en diciembre de 2019 hasta mayo de 2020, se realizaron reinoculaciones de *A. brasilense* cada 2 semanas hasta su etapa de maduración.

### 6.2. Colecta de Muestras

Se recolectaron muestras de raíces de trigo de una población de 100 líneas para mapeo de trigo (SynOpDH) inoculadas con *A. brasilense* y sus respectivos controles (agua de riego), entre los meses de abril y junio del 2020 cuando todas las réplicas de las líneas estaban en su última etapa de maduración. Las raíces fueron extraídas del tallo de la planta y se colocaron en bolsas de plástico con tierra adherida para posteriormente ser almacenadas en ultracongelación a  $-80$  °C, hasta su posterior procesamiento. De acuerdo con los rendimientos de producción (obtenidos a partir de medidas morfométricas de las plantas de trigo) y a los tiempos de maduración (menor tiempo en llegar a su etapa de maduración) de las líneas de trigo obtenidas se seleccionaron 14 líneas de trigo divididas en dos grupos: el primer grupo estaba constituido por 7 líneas de trigo en donde los tratamientos con *A. brasilense* con respecto sus controles mostraron un aumento en el rendimiento de producción, y el segundo grupo estaba constituido por 7 líneas de trigo en donde los tratamientos con *A. brasilense* con respecto a sus controles no mostraron un aumento en el rendimiento de la producción o fue menor que el control (Tabla 1).

**Tabla 1.** Líneas de trigo seleccionadas para trabajar

Alta productividad	Baja productividad
ITMI_DH_20	ITMI_DH_56
ITMI_DH_60	ITMI_DH_117
ITMI_DH_82	ITMI_DH_126
ITMI_DH_85	ITMI_DH_141
ITMI_DH_92	ITMI_DH_142
ITMI_DH_97	ITMI_DH_144
ITMI_DH_213	ITMI_DH_164

### 6.3. Extracción de ADN, preparación de librerías y secuenciación

Las muestras de raíces de las líneas seleccionadas se pulverizaron con pistilo y mortero usando nitrógeno líquido y se almacenaron en la solución comercial DNA/RNA Shield Zymo Research (Zymo Research, Irvine, CA, USA) hasta la extracción del ADN. Se extrajo el ADN total de todas las muestras utilizando el kit Quick-DNA-Fecal/Soil MiniPrep (Zymo Research, Irvine CA, USA). El ADN total se cuantificó en el Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La integridad del ADN total se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Se llevó a cabo la amplificación por PCR de la región V3 ADNr 16S usando los cebadores universales V3- 338f y V3- 533r con adaptadores Illumina. Los productos amplificados de la región V3 resultantes se cuantificaron en un Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) para obtener un conjunto equimolar para cada muestra. Las lecturas de secuenciación se generaron utilizando la química de longitud de lectura de base de 2 x 150 (300 ciclos) de la plataforma Illumina MiniSeq.

### 6.4. Análisis bioinformático

El procesamiento de las lecturas de secuenciación siguió el pipeline DADA2 (Versión 1.16) (Callahan *et al.*, 2016). Las lecturas de secuenciación generadas (secuencias fastq) se filtraron utilizando la función “filterAndTrim”, con los parámetros de máximo valor de expectancia de error de 2% y 5% (para las lecturas R1 y R2, respectivamente), se eliminaron las secuencias de baja calidad a partir del nucleótido 140 y 115 (para las lecturas R1 y R2, respectivamente). De

acuerdo con los parámetros del algoritmo se utilizaron un millón de lecturas para establecer la identificación de los posibles errores de los datos de 16S ADNr. Las quimeras se eliminaron con la función “removeBimeraDenovo”. La asignación taxonomía de los ASVs generados se llevó a cabo utilizando tres bases de datos distintas: Silva (Versión 138.1), rdp (Versión 18) y Green-genes (Versión 13.8). Posteriormente las lecturas procesadas fueron analizadas con ayuda del paquete Phyloseq, en donde las lecturas fueron curadas eliminando las lecturas no asignadas, las que correspondían a eucariotas, mitocondrias y cloroplastos.

Se estimaron los índices de biodiversidad Alpha de Chao1, Shannon y Simpson con el paquete “vegan”. Se realizaron pruebas de ANOVA a una sola vía seguido de la prueba post hoc de Tukey con la función “HSD.test” para establecer cuales muestras poseían diferencias estadísticamente significativas entre las variables de tratamiento y producción. Se realizó el análisis de interpolación y extrapolación de muestreo de curvas para dichos índices de diversidad con la función “iNEXT” del paquete “iNEXT”, y se generaron las curvas de rarefacción correspondientes con la función “ggiNEXT”.

Los análisis de beta diversidad se realizaron mediante las estimaciones de distancia de similitud de Bray-Curtis las cuales se calcularon usando la función “ordinate”, junto con el modelo de ordenamiento de análisis de componentes principales (PCoA) y el modelo de Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS). Se realizó un análisis de varianza permutacional (PERMANOVA) para determinar la respuesta de las variables de estudio sobre las agrupaciones generadas en los análisis de beta diversidad (Tratamiento, Productividad y Líneas). El análisis estadístico de PERMANOVA se realizó con la función “adonis” de la paquetería “vegan” y tomando como base las distancias de similitud de Bray-Curtis. Además, se realizó un análisis de similitud (ANOSIM) con la función “anosim” para establecer si existían similitudes entre los conjuntos de comunidades de las muestras a partir de una distancia de Bray-Curtis.

Se evaluaron los OTUs diferencialmente abundantes (DAOTUs) usando la paquetería “DESeq2” con las funciones “phyloseq\_to\_deseq2” y “DESeq”. Los diagramas de Venn se generaron para

establecer el efecto que tiene el tratamiento en la agrupación de las comunidades microbianas con el paquete “ggVennDiagram” y la función “ggVennDiagram”.

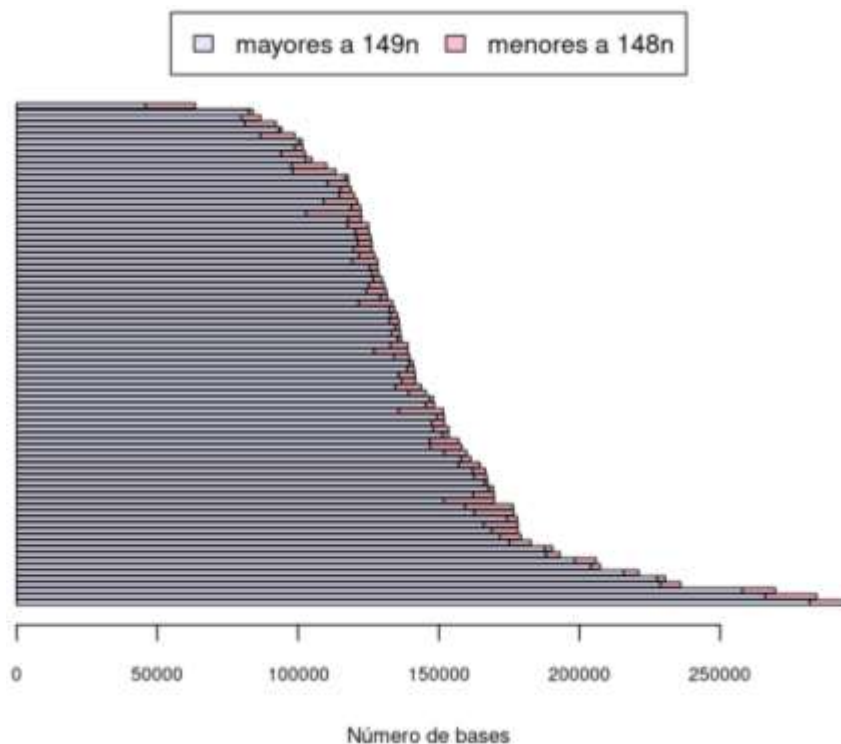
Por último, la composición y la estructura de la comunidad microbiana se generaron obteniendo la abundancia relativa porcentual a nivel de Phyla, Clase, Orden, Familia y Género, y visualizados en gráficos de barras apiladas.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Métricas de secuenciación

Se secuenciaron 84 muestras, de las cuales se obtuvieron un total de 12,453,122 secuencias (R1 y R2) en formato fastq, en promedio 148,251 secuencias o “reads” pareados por muestra (Máximo: 295,732 mínimo: 63,408) con una calidad promedio de Q 32.3. Del total de secuencias, 95 % fueron iguales o mayores a 149 bases de longitud (Fig. 1).

Las secuencias de los archivos fastq correspondientes a R1 y R2 ingresaron al flujo de trabajo de DADA2, después de realizar el “paired-end” o pareado de las mismas los reads se agruparon en 6,226,561 lecturas. Después, se filtraron las secuencias con los parámetros antes mencionados (máximo valor de expectativa de error y de las calidades) se obtuvieron unas 5,814,061 lecturas. Se procedió con el empalme o “merging” para obtener 5,264,457 lecturas. Y, finalmente, se eliminaron las quimeras, para obtener unas 2,809,262 lecturas procesadas.

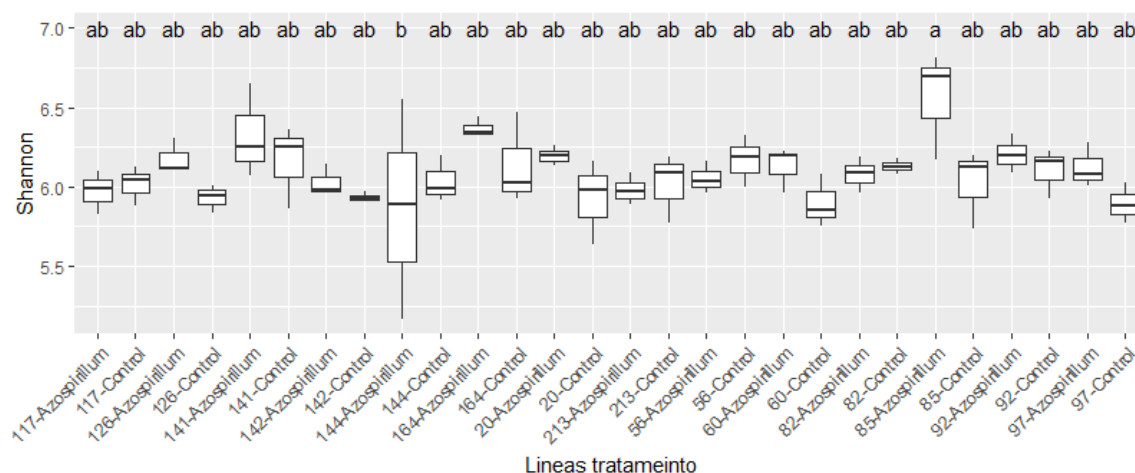


**Figura 1.** Total de secuencias fastq obtenidas por muestra.

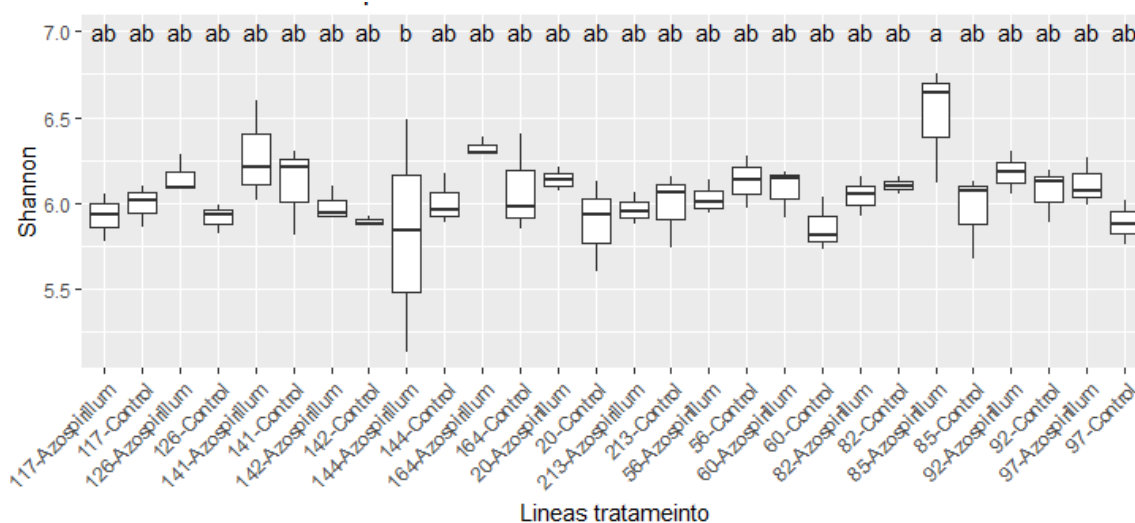


## 7.2 Índices de diversidad alfa

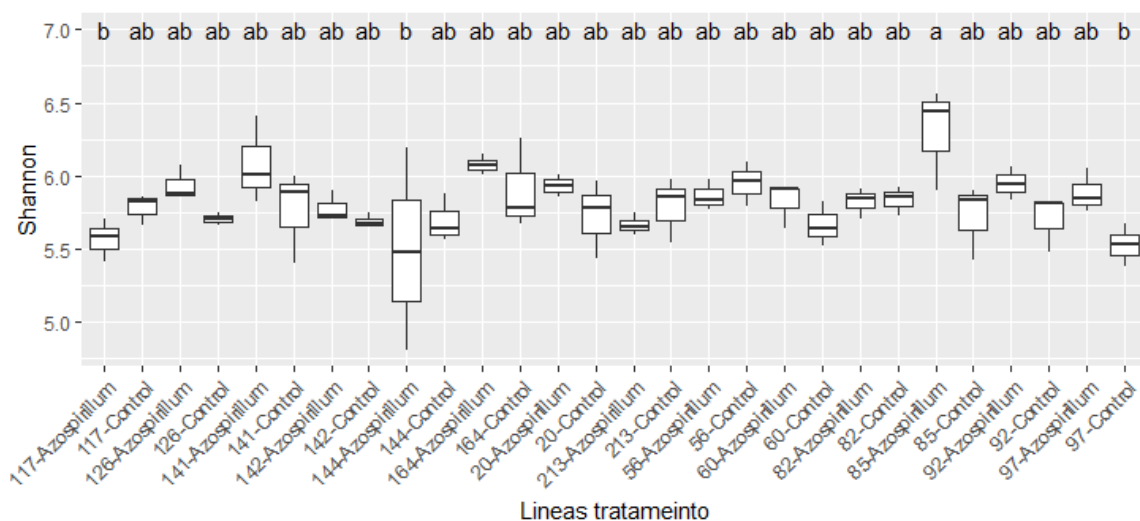
Los valores de riqueza o índice de Shannon presentaron valores en el rango de 5.5 a 6.5 con las 3 bases de datos usadas (Fig. 2-4). Se realizó la prueba de ANOVA de una sola vía para el análisis de las variables tratamiento y productividad entre las distintas líneas de trigo. Solo hubo diferencias estadísticamente significativas para la variable del tratamiento. Posteriormente, se realizó una prueba post-hoc de Tukey para establecer los grupos con diferencias estadísticas. Las líneas 85 y 144 son las que presentaron diferencias estadísticamente significativas. Esta diferencia estadística tuvo concordancia entre las 3 bases de datos utilizadas.



**Figura 2.** Índice de diversidad alfa de Shannon (Silva).

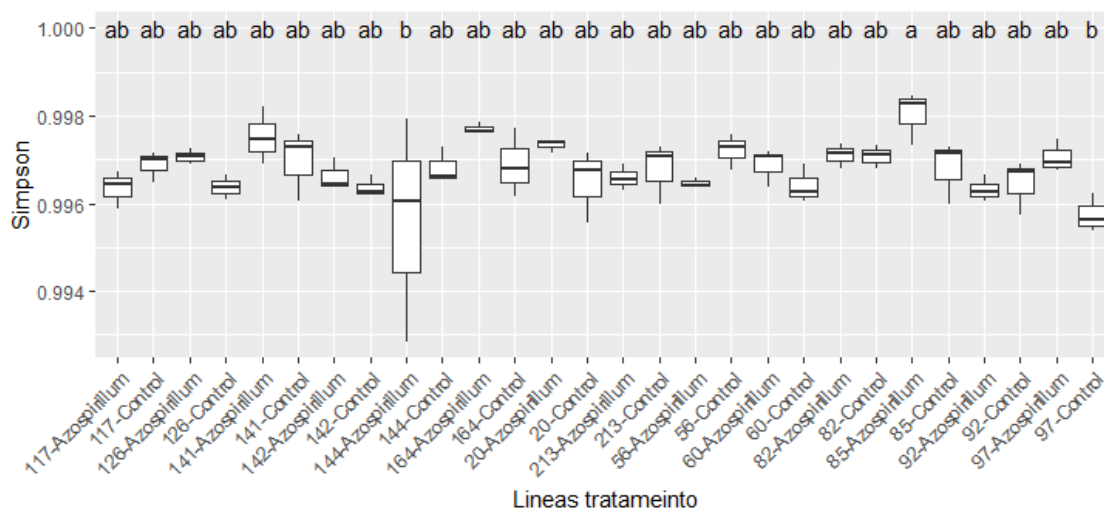


**Figura 3.** Índice de diversidad alfa de Shannon (rdp).

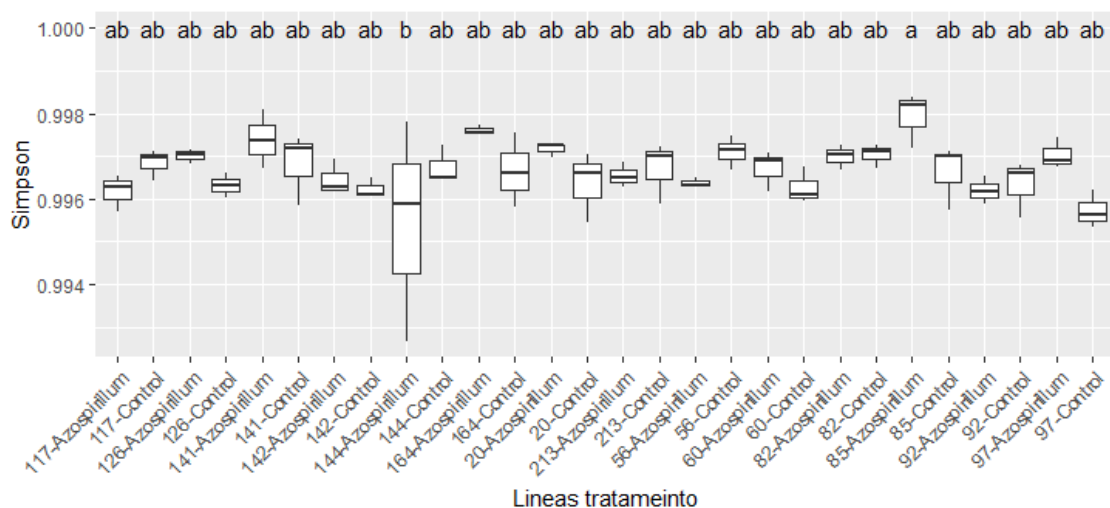


**Figura 4.** Índice de diversidad alfa de Shannon (Green-genes).

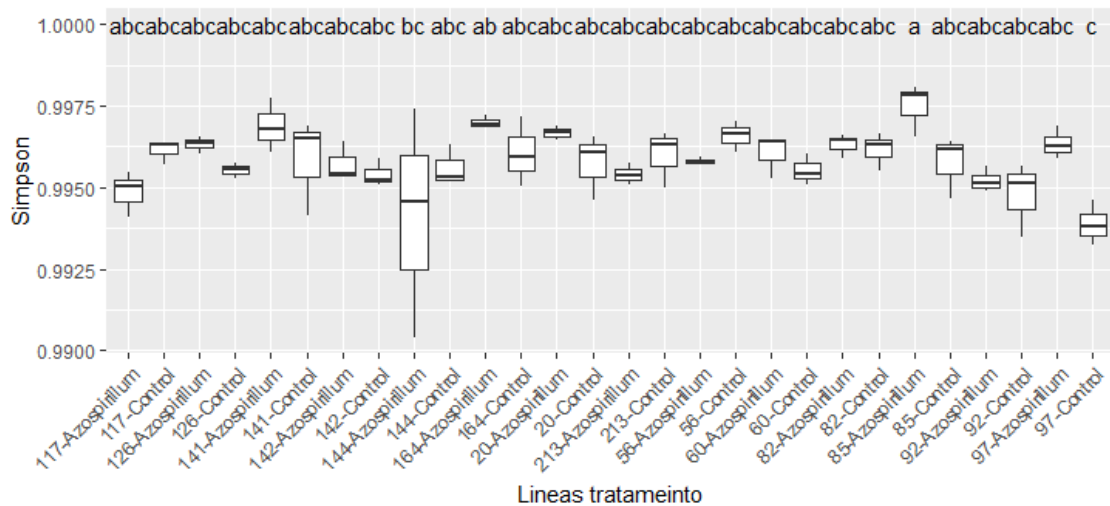
El índice de Simpson presento valores entre 0.995 a 0.998 (cerca de 1) con el uso de las 3 bases de datos. Este índice estima la homogeneidad taxonómica de los integrantes de las muestras analizadas. Se realizó la prueba de ANOVA para la variable tratamiento. Posteriormente se realizó una prueba post-hoc de Tukey para establecer los grupos con diferencias estadísticamente significativas. Solo presentaron diferencias estadísticas significativas entre las líneas 85 y 144; lo cual tuvo concordancia entre las 3 bases de datos utilizadas (Fig. 5-7).



**Figura 5.** Índice de diversidad alfa de Simpson (Silva).

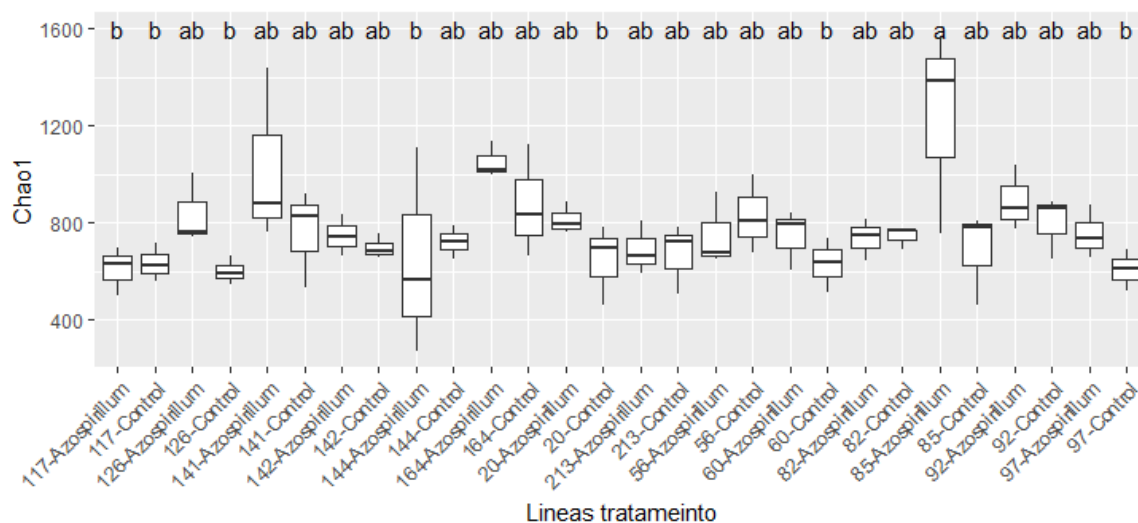


**Figura 6.** Índice de diversidad alfa de Simpson (rdp).

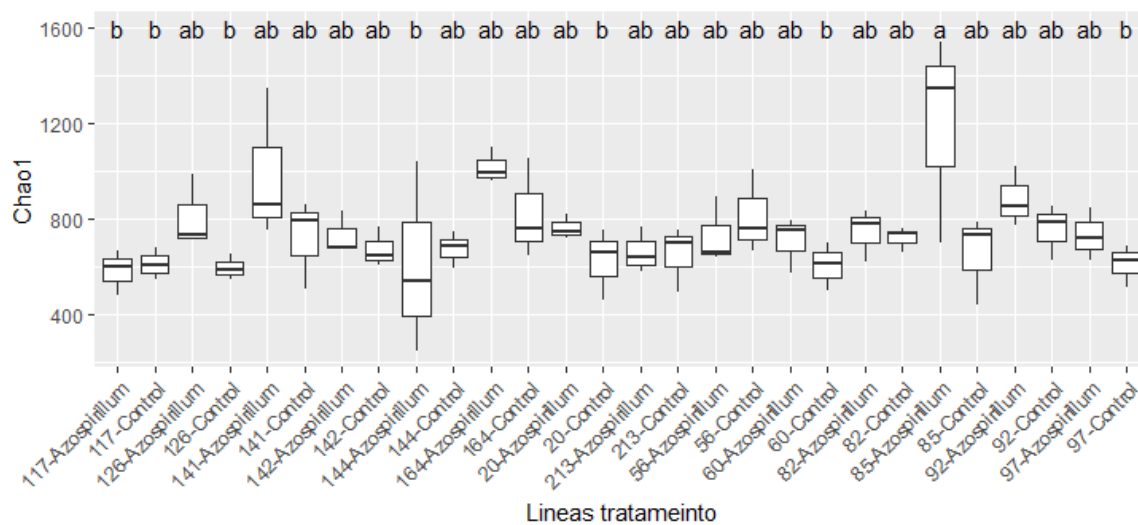


**Figura 7.** Índice de diversidad alfa de Simpson (Green-genes).

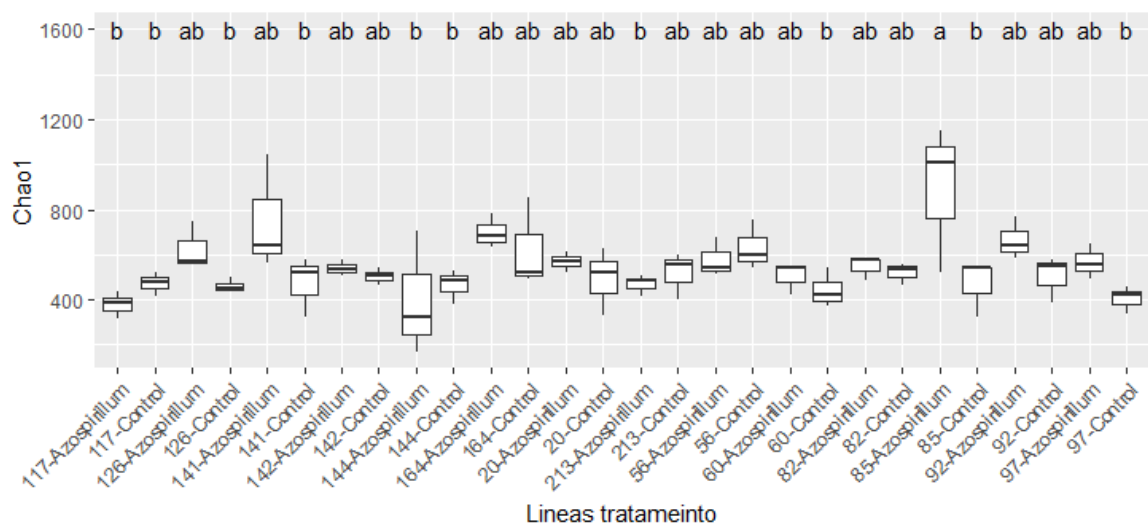
El índice de Chao1 y las especies observadas presentaron valores entre 400 a 1600, en las 3 bases de datos usadas. Este índice estima la diversidad de las muestras analizadas. Se realizó la prueba de ANOVA para la variable tratamiento. Posteriormente se realizó una prueba post-hoc de Tukey para establecer los grupos con diferencias estadísticamente significativas. Solo presentaron diferencias estadísticamente significativas las líneas 60, 85, 97 y 126; lo cual tuvo concordancia entre las 3 bases de datos utilizadas (Fig. 8-13).



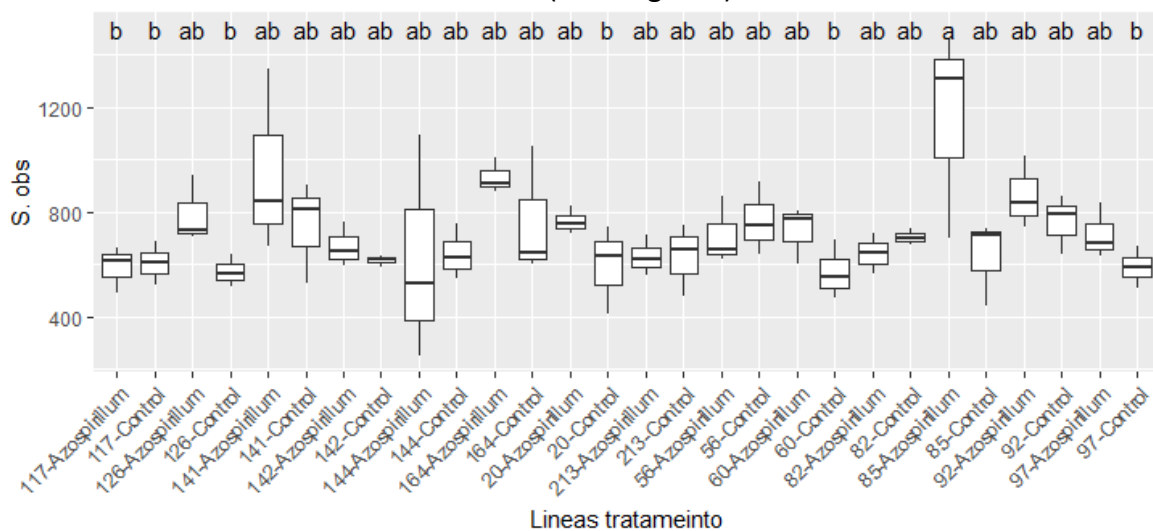
**Figura 8.** Índice de diversidad alfa de Chao1 (Silva).



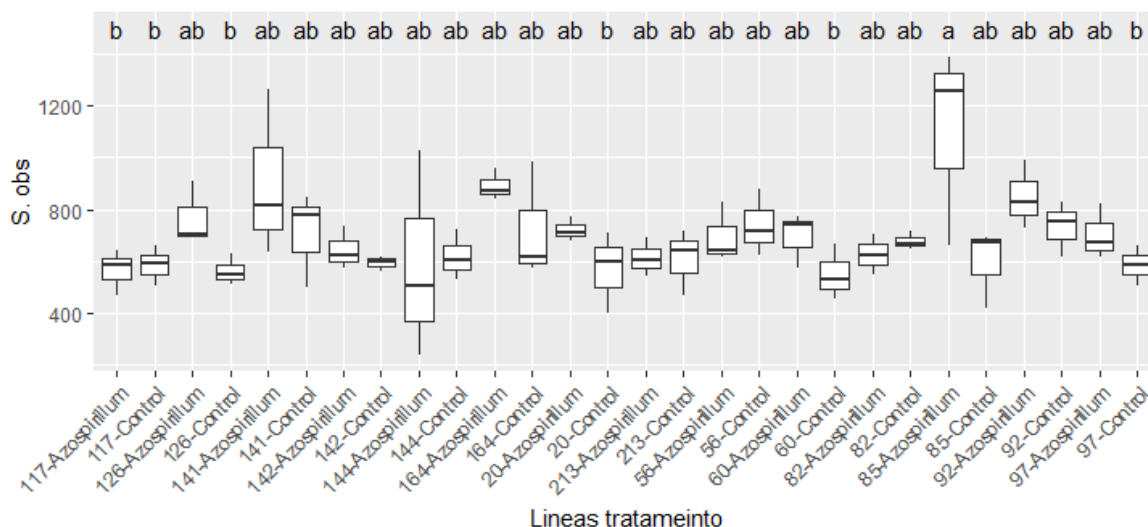
**Figura 9.** Índice de diversidad alfa de Chao1 (rdp).



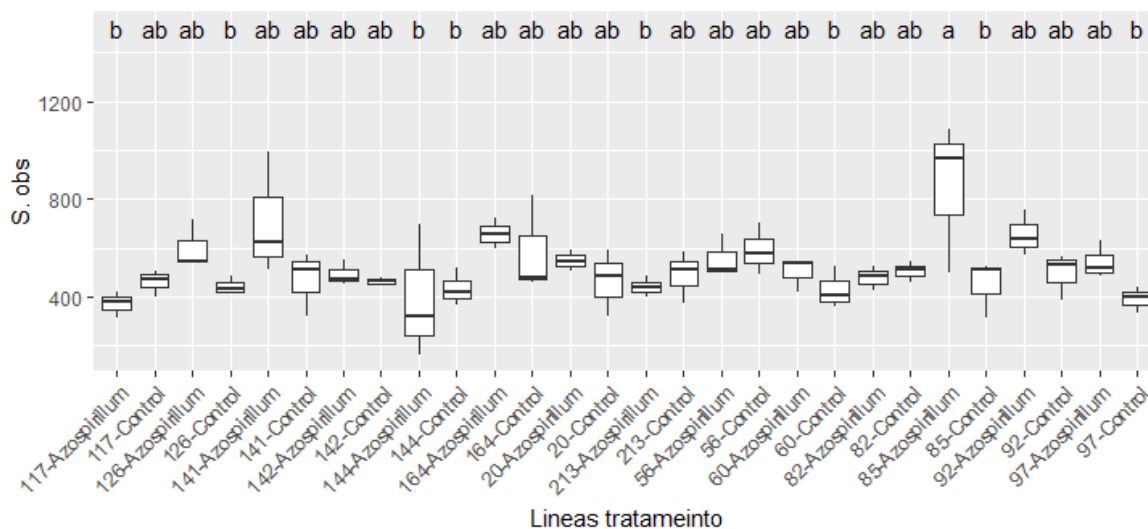
**Figura 10.** Índice de diversidad alfa de Chao1 (Green-genes).



**Figura 11.** Índice de diversidad alfa de especies observadas (Silva).



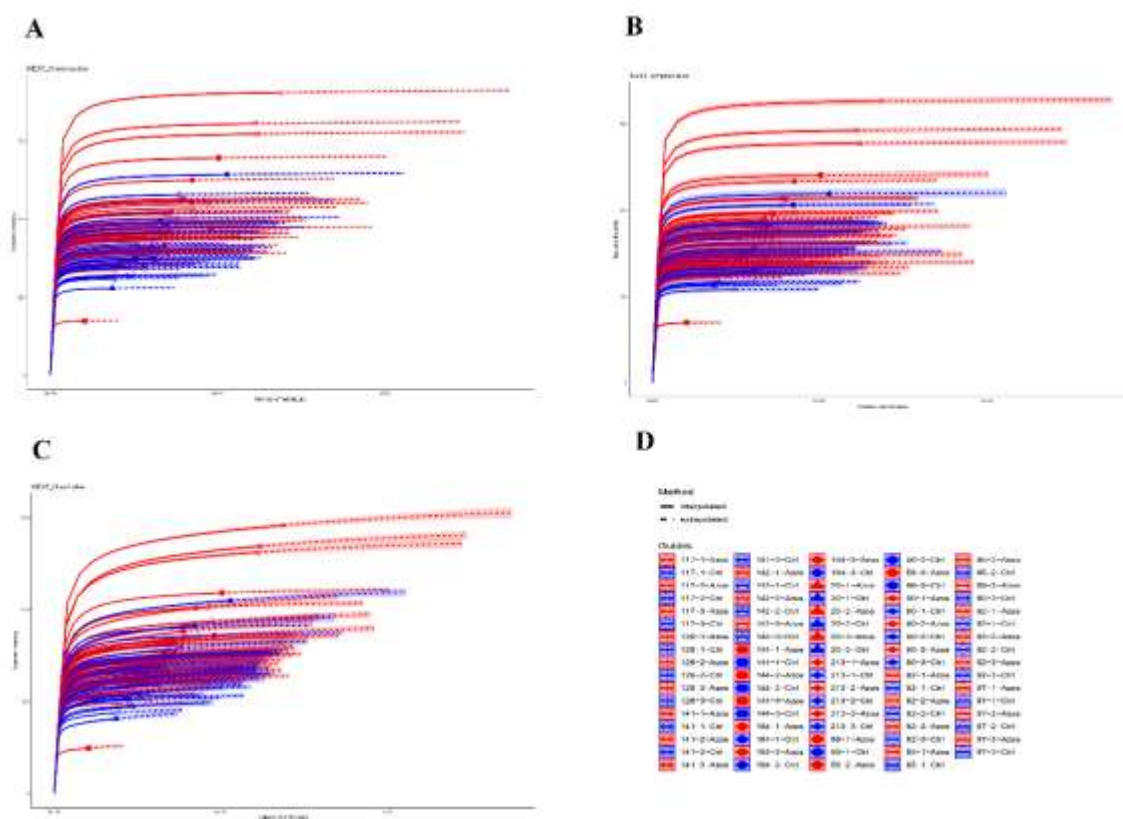
**Figura 12.** Índice de diversidad alfa de especies observadas (rdp).



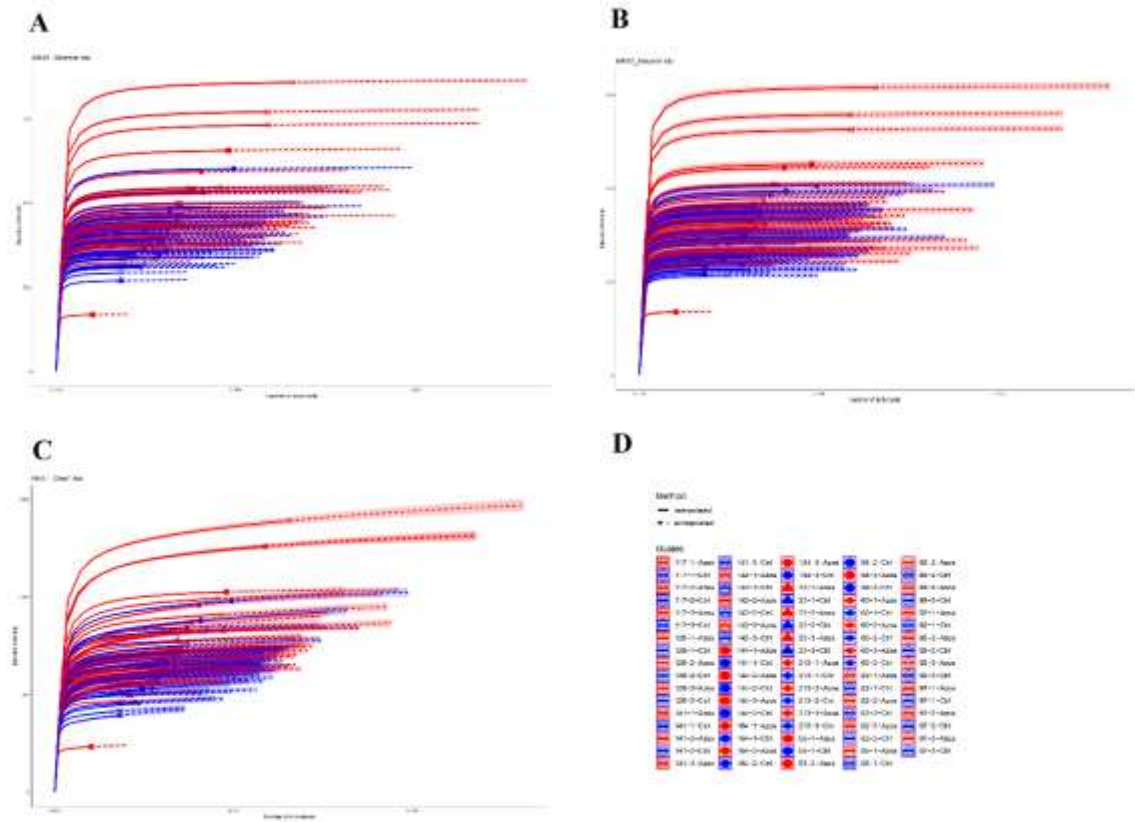
**Figura 13.** Índice de diversidad alfa de especies observadas (Green-genes).

### 7.3 Análisis de curvas de rarefacción

El análisis de las curvas de rarefacción para las tres bases de datos (Fig. 14-16) con los tres índices de estimación de diversidad alfa (Shannon, Simpson y Chao1), indicó que el esfuerzo de secuenciación fue adecuado ya que para todas las curvas se alcanzó la saturación de la curva antes de entrar a la extrapolación de la curva. Se puede observar también que parte las muestras control (Azul) y las muestras tratamiento (rojo) presentaron un solapamiento moderado, lo que indica que hay diferencias que no son muy marcadas entre los tratamientos.

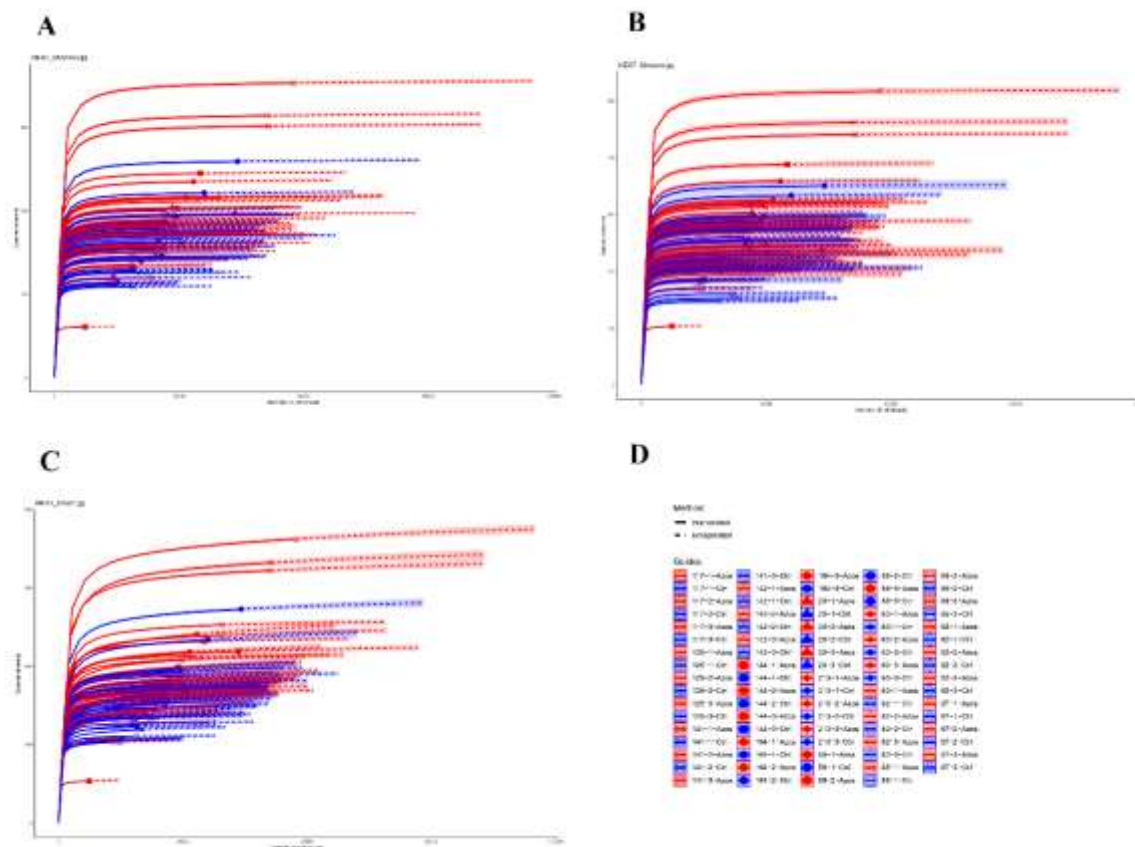


**Figura 14.** Curvas de rarefacción (Silva). (A) Estimaciones del índice de Shannon, (B) Estimaciones del índice de Simpson, (C) Estimaciones del índice de Chao1 mediante curvas de muestreo de rarefacción interpolación y extrapolación, (D) leyenda de las muestras.



**Figura 15.** Curvas de rarefacción (rdp). (A) Estimaciones del índice de Shannon, (B) Estimaciones del índice de Simpson, (C) Estimaciones del índice de Chao1 mediante curvas de muestreo de rarefacción interpolación y extrapolación, (D) leyenda de las muestras.





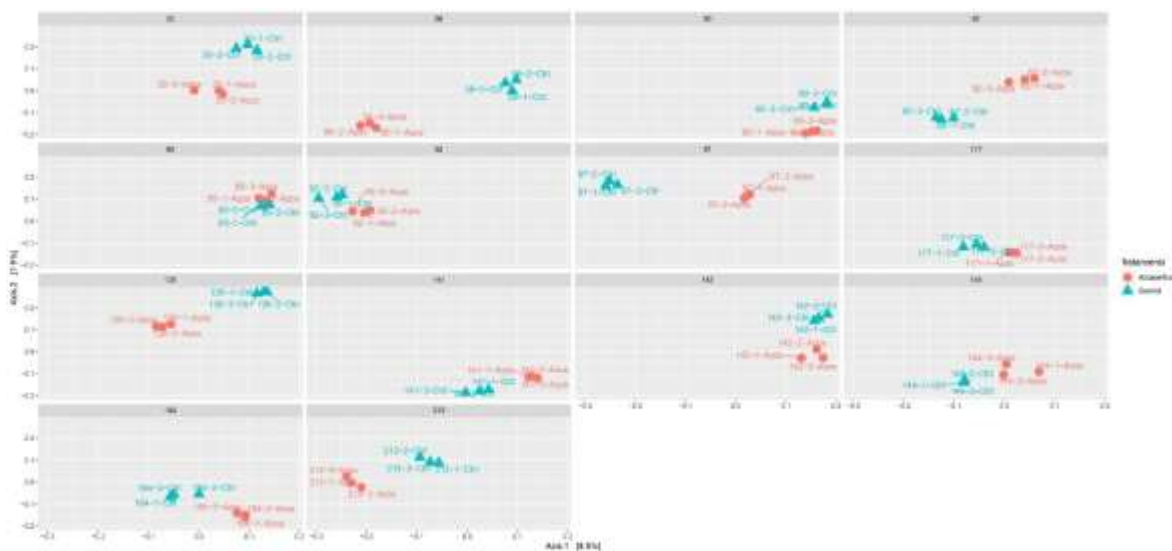
**Figura 16.** Curvas de rarefacción (Green-genes) (A) Estimaciones del índice de Shannon, (B) Estimaciones del índice de Simpson, (C) Estimaciones del índice de Chao1 mediante curvas de muestreo de rarefacción interpolación y extrapolación, (D) leyenda de las muestras.

#### 7.4 Índice de diversidad beta

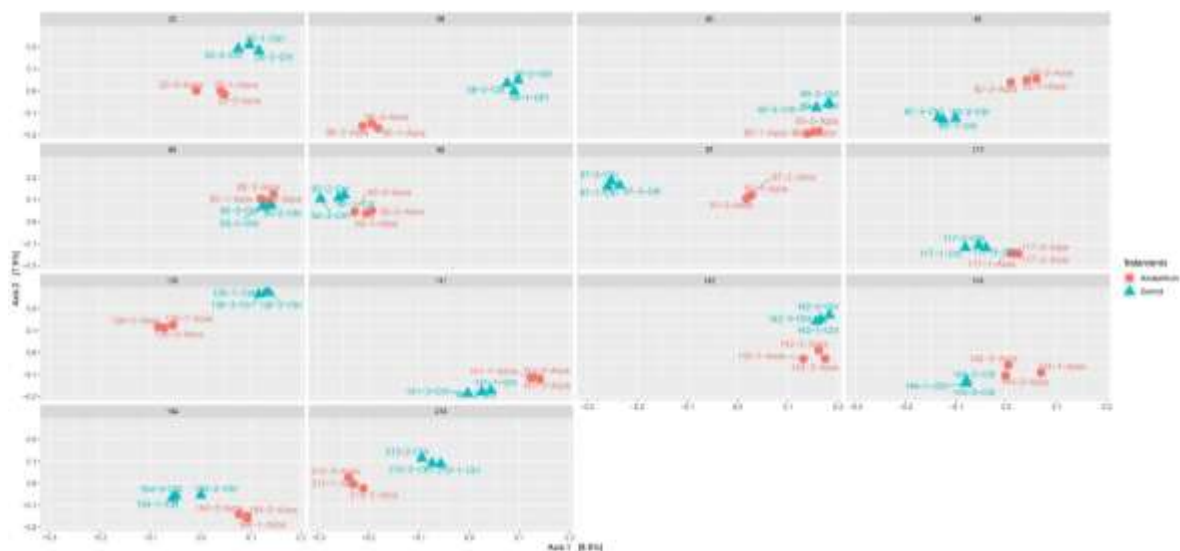
Los análisis de diversidad beta se emplean para realizar comparaciones entre muestras, para determinar diferencias entre las comunidades las cuales están basadas en las distancias filogenéticas, en las distancias de Bray-Curtis y las distancias de Unifrac. En nuestro análisis empleamos las distancias de Bray-Curtis junto con el modelo de ordenamiento de Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) y el modelo de Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS). Se estableció que para las tres bases de datos empleadas se generaron resultados similares entre sí (Fig. 17-22), en donde dio como resultado que no hubo agrupamiento generados en la variable productividad. Solamente se generaron agrupaciones para la variable de tratamiento.

Se realizó un análisis de varianza permutacional (PERMANOVA) para medir la respuesta de las variables de estudio en el diseño experimental. En donde los resultados sugieren, usando las tres bases de datos, que las tres variables (tratamiento, productividad y líneas) tuvieron un efecto sobre la disimilitud entre las comunidades (Tabla 2, 3 y 4).

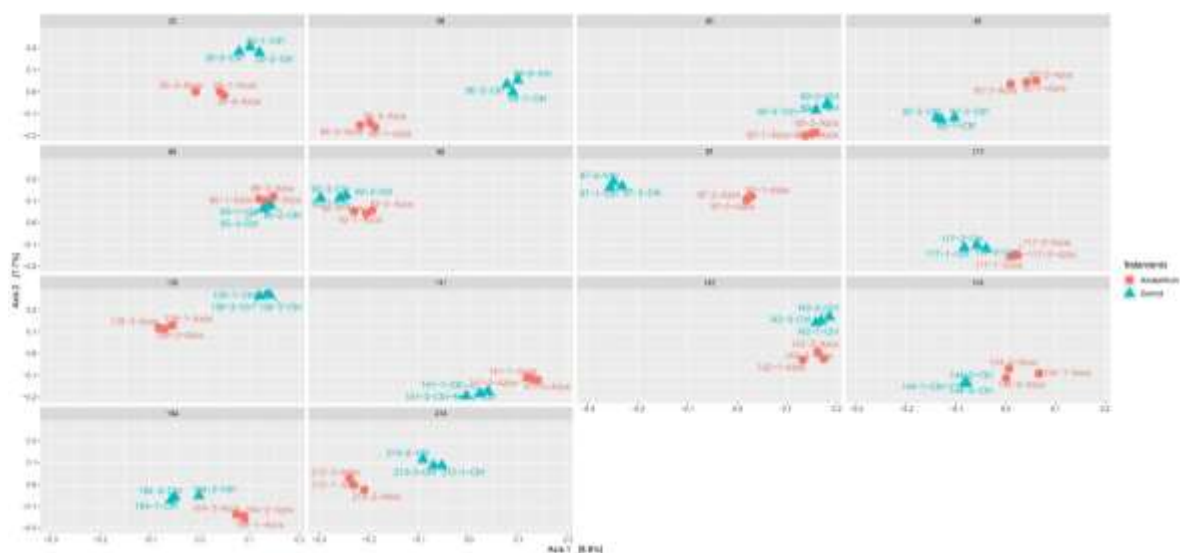
Se realizó un análisis de similitud (ANOSIM) para establecer si no existía una diferencia entre los conjuntos de comunidades de las muestras a partir de una distancia de Bray-Curtis. A partir de los conjuntos inferidos de la base de datos Silva se analizaron las variables Tratamiento ( $R=0.07$ ,  $P=0.001$ ), Productividad ( $R=0.073$ ,  $P=0.003$ ) y Líneas ( $R=0.576$ ,  $P=0.001$ ). También a partir de los conjuntos inferidos de la base de datos rdp se analizaron las variables Tratamiento ( $R=0.069$ ,  $P=0.002$ ), Productividad ( $R=0.075$ ,  $P=0.001$ ) y Líneas ( $R=0.582$ ,  $P=0.001$ ). Y a partir de los conjuntos inferidos de la base de datos Green-genes se analizaron las variables Tratamiento ( $R=0.071$ ,  $P=0.003$ ), Productividad ( $R=0.065$ ,  $P=0.002$ ) y Líneas ( $R=0.574$ ,  $P=0.001$ ). Se encontró que los conjuntos de las muestras no son similares basados en las tres variables de estudio.



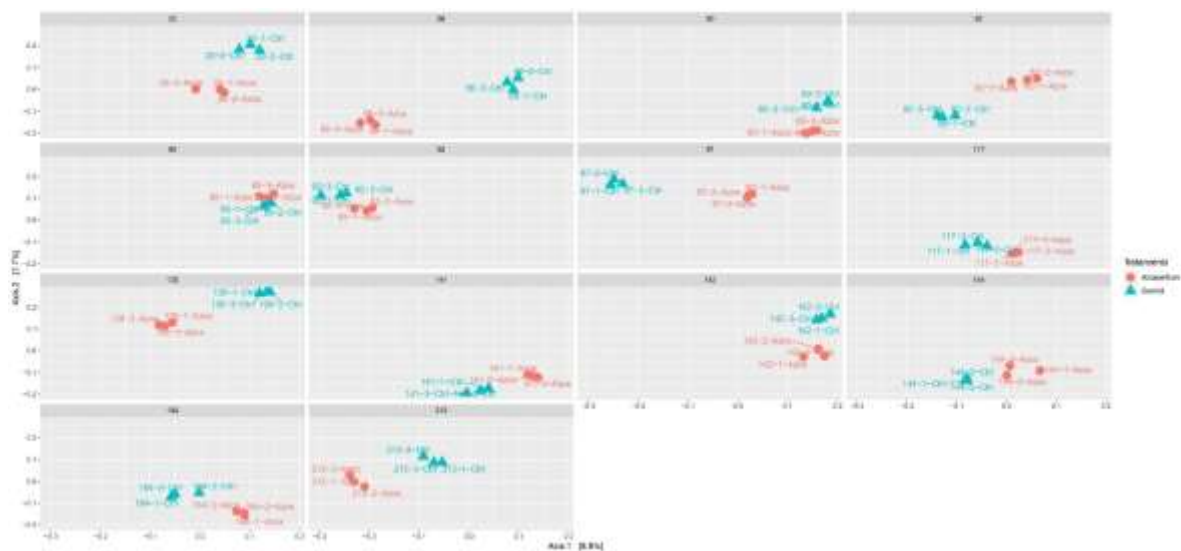
**Figura 17.** Gráfico de PCoA (Silva). Ordenación por Coordenadas Principales (PCoA) mediante distancias de Bray-Curtis. En color rojo se muestran las muestras con tratamiento (Azos) y en color verde se muestran las muestras control (Ctrl).



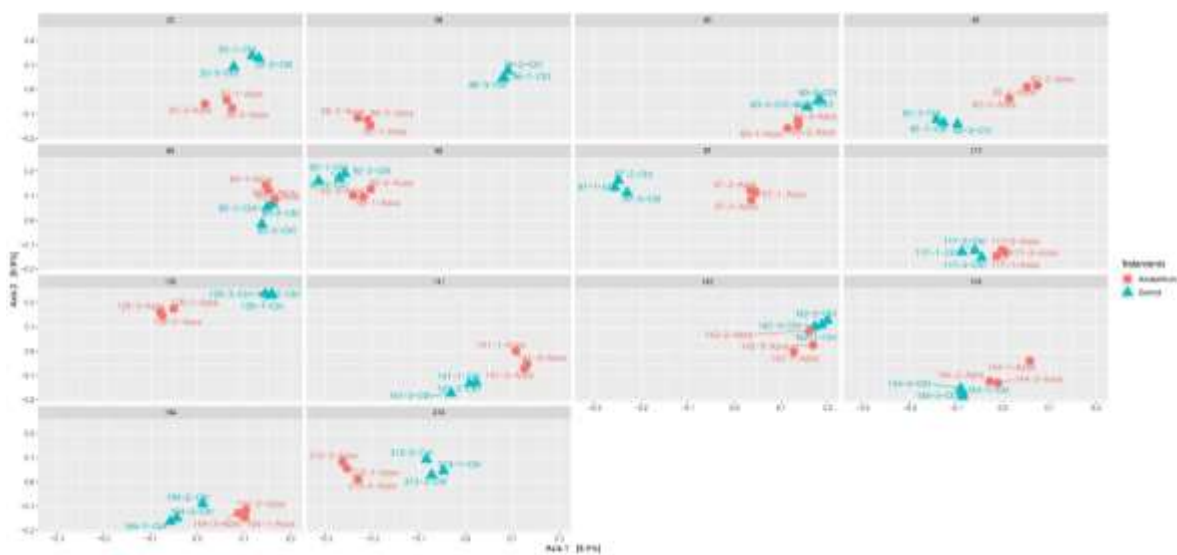
**Figura 18.** Gráfico de NMDS (Silva). Escalamiento Multidimensional No Metrico (NMDS) mediante distancias de Bray-Curtis. En color rojo se muestran las muestras con tratamiento (Azos) y en color verde se muestran las muestras control (Ctrl).



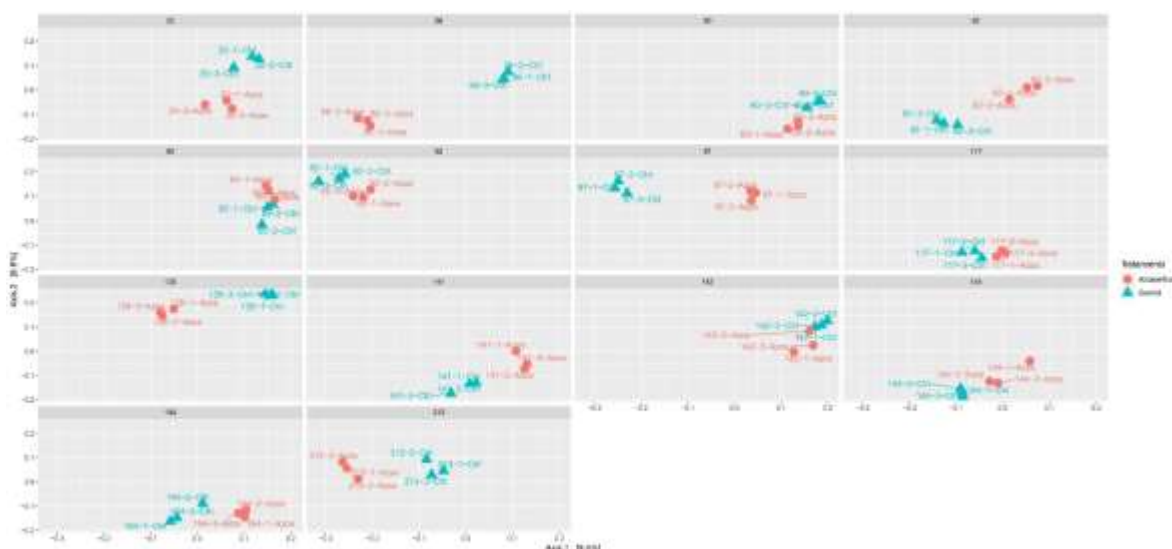
**Figura 19.** Gráfico de PCoA (rdp). Ordenación por Coordenadas Principales (PCoA) mediante distancias de Bray-Curtis. En color rojo se muestran las muestras con tratamiento (Azos) y en color verde se muestran las muestras control (Ctrl).



**Figura 20.** Gráfico de NMDS (rdp). Escalamiento Multidimensional No Metrico (NMDS) mediante distancias de Bray-Curtis. En color rojo se muestran las muestras con tratamiento (Azos) y en color verde se muestran las muestras control (Ctrl).



**Figura 21.** Gráfico de PCoA (Green-genes). Ordenación por Coordenadas Principales (PCoA) mediante distancias de Bray-Curtis. En color rojo se muestran las muestras con tratamiento (Azos) y en color verde se muestran las muestras control (Ctrl).



**Figura 22.** Gráfico de NMDS (Green-genes). Escalamiento Multidimensional No Metrico (NMDS) mediante distancias de Bray-Curtis. En color rojo se muestran las muestras con tratamiento (Azos) y en color verde se muestran las muestras control (Ctrl).

**Tabla 2.** Prueba de PERMANOVA (Silva). Prueba PERMANOVA realizada con la matriz de distancia de Bray-Curtis con las muestras inferidas de la base de datos de Silva y su relación con las variables medidas en el estudio.

Variable	F model	R <sup>2</sup>	Pr(>F)	P
Tratamiento	2.296	0.02724	0.001	***
Productividad	2.1922	0.02604	0.001	***
Líneas	2.659	0.33057	0.001	***

**Tabla 3.** Prueba de PERMANOVA (rdp). Prueba PERMANOVA realizada con la matriz de distancia de Bray-Curtis con las muestras inferidas de la base de datos de rdp y su relación con las variables medidas en el estudio.

Variable	F model	R <sup>2</sup>	Pr(>F)	P
Tratamiento	2.3396	0.02774	0.001	***
Productividad	2.2367	0.02655	0.001	***
Líneas	2.7307	0.33649	0.001	***

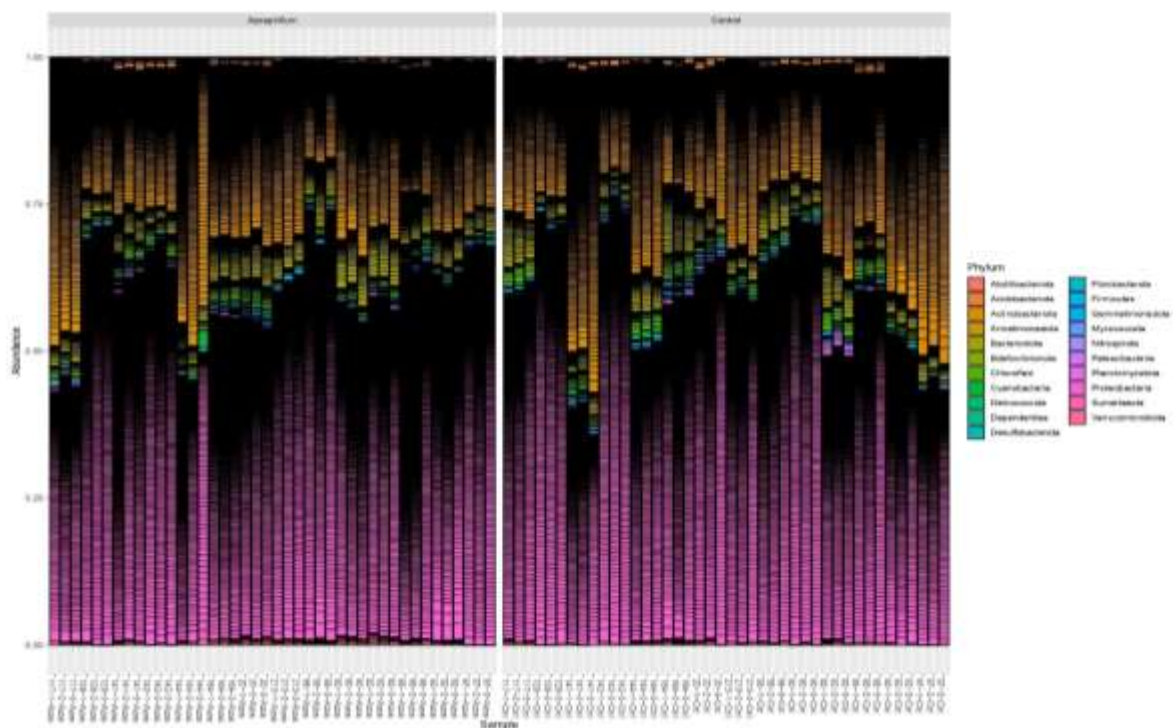
**Tabla 4.** Prueba de PERMANOVA (Green-genes). Prueba PERMANOVA realizada con la matriz de distancia de Bray-Curtis con las muestras inferidas de la base de datos de Green-genes y su relación con las variables medidas en el estudio.

Variable	F model	R <sup>2</sup>	Pr(>F)	P
Tratamiento	2.2488	0.02669	0.001	***
Productividad	2.1035	0.02501	0.001	***
Líneas	2.6848	0.33271	0.001	***

### 7.5 Estructura y composición de las comunidades bacterianas

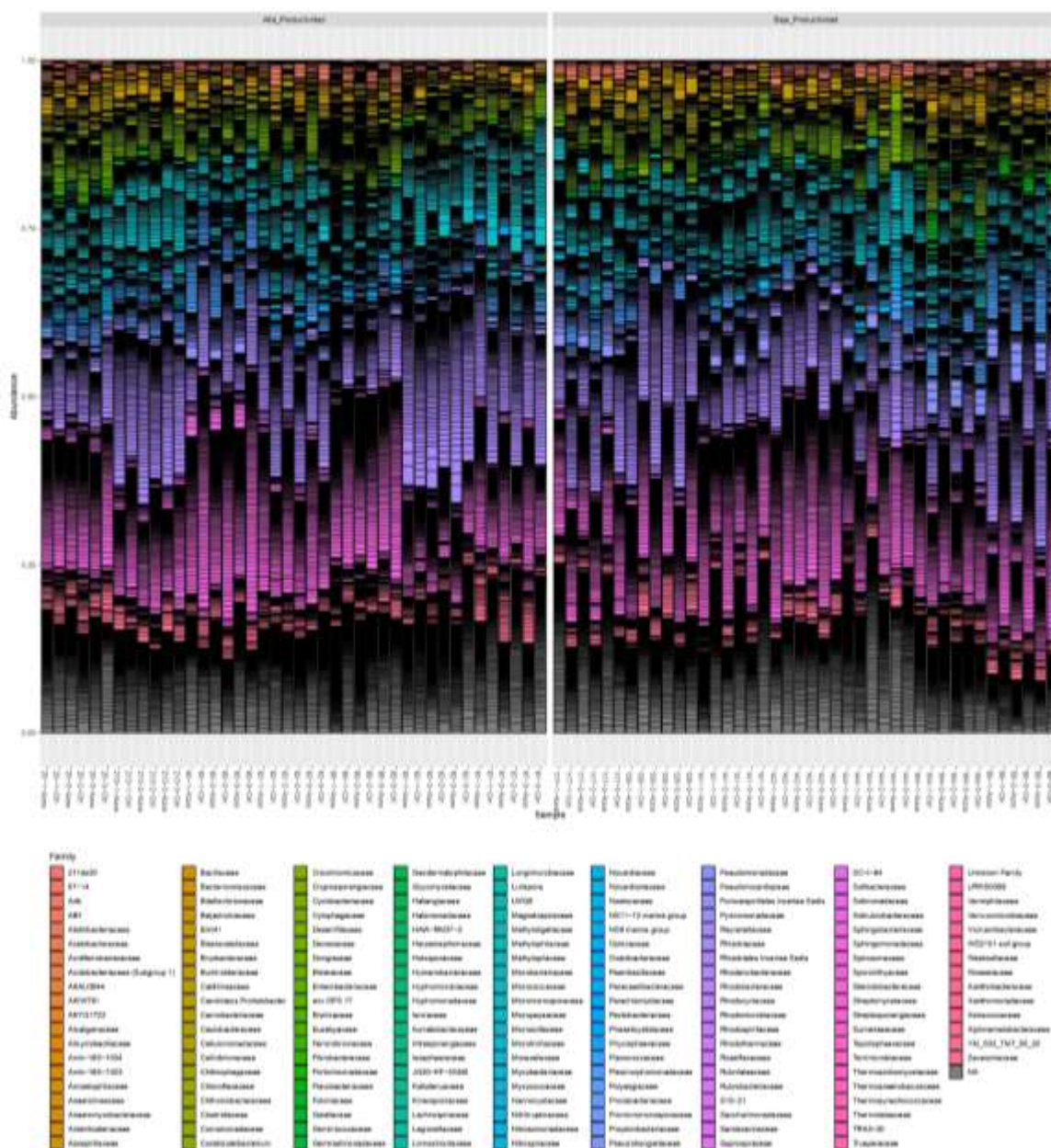
En el análisis de estructura de comunidad microbiana con la base de datos de Silva se asignaron los reads a un total de 21 Phyla y 174 familias. En la base de rdp se asignaron un total de 17 Phyla y 166 familias, y en la base de datos de Green-genes se asignaron un total de 21 Phyla y 125 familias. En las tres bases de datos el Phylum más representativo en todas las muestras fue *Proteobacteria*, seguido por *Actinobacteria*, *Bacteriodota*, *Chloroflexi* y *Firmicutes* que fueron los Phyla más abundantes con respecto a los demás (Fig. 23-28).

La composición y la estructura de la comunidad microbiana se ve alterada en las muestras que fueron inoculadas, siendo que el porcentaje de abundancia relativa de las Phyla cambio en presencia de *A. brasilense* en comparación con su control. Al analizar las muestras desde la perspectiva de la variable de productividad, no hay una tendencia de cambio clara en cuanto a los porcentajes de abundancia de las Phyla.



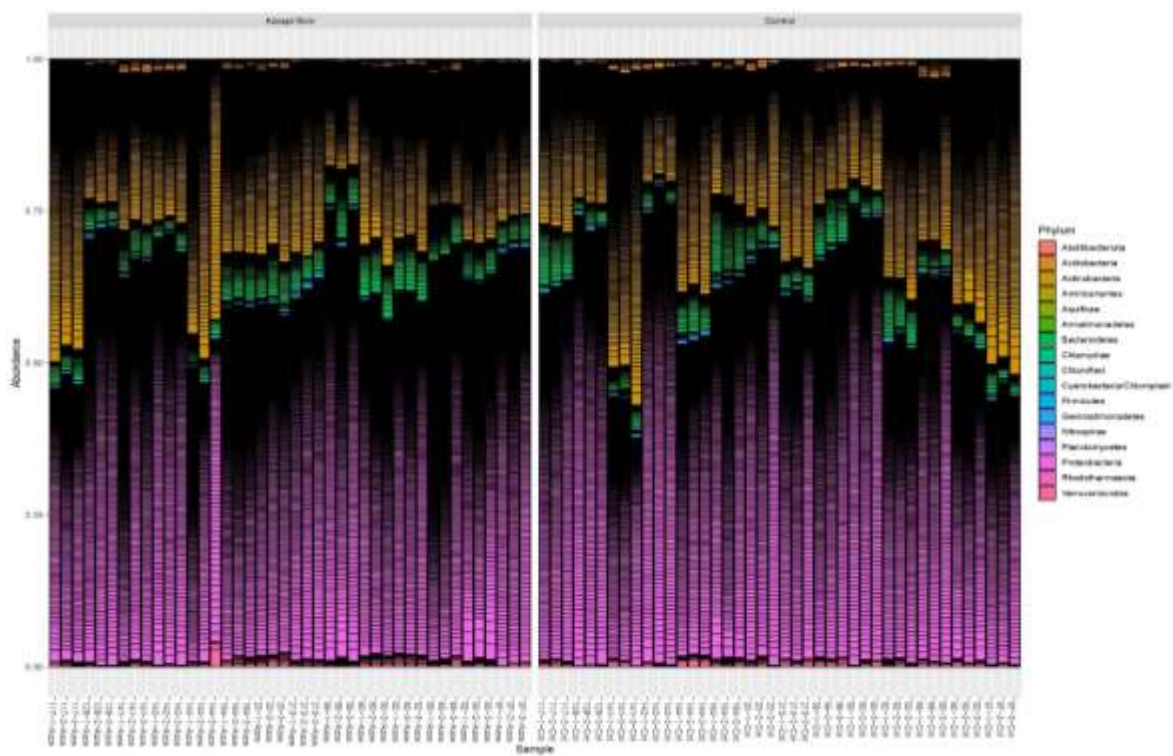
**Figura 23.** Abundancia relativa a nivel de Phylum (Silva). Las barras muestran la abundancia relativa porcentual de ASVs asignadas a cada Phylum.





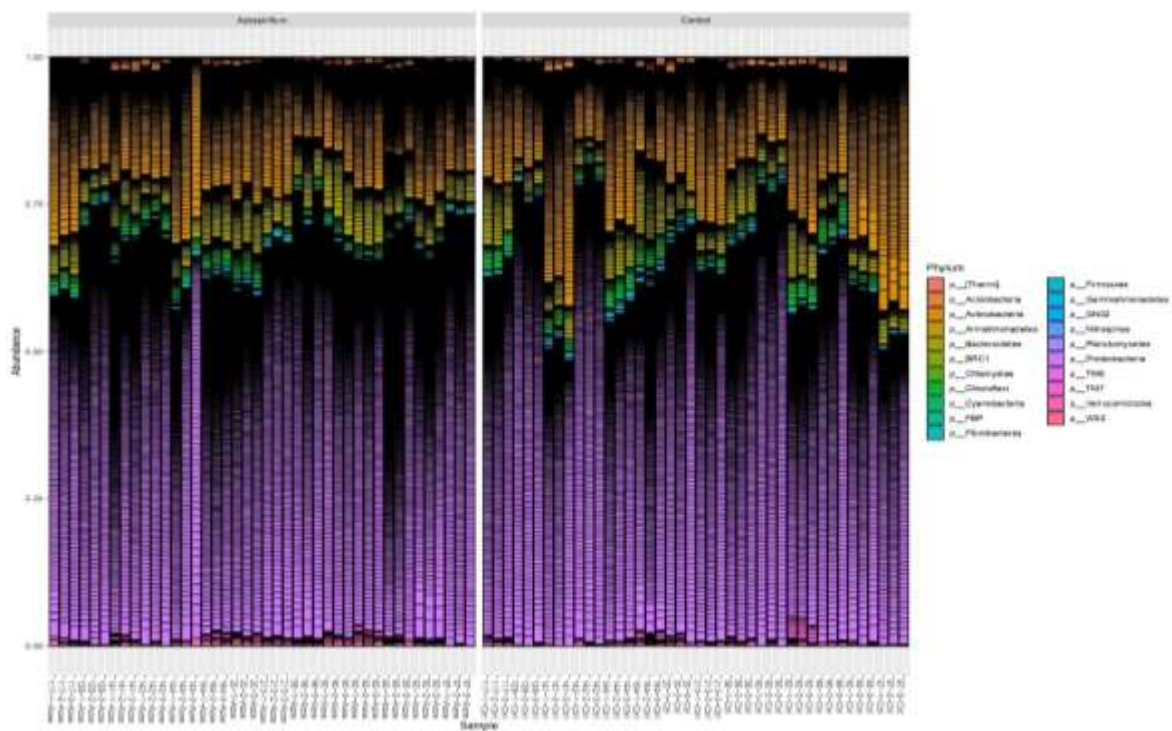
**Figura 24.** Abundancia relativa a nivel de Familia (Silva). Las barras muestran la abundancia relativa porcentual de ASVs asignadas a cada Familia.





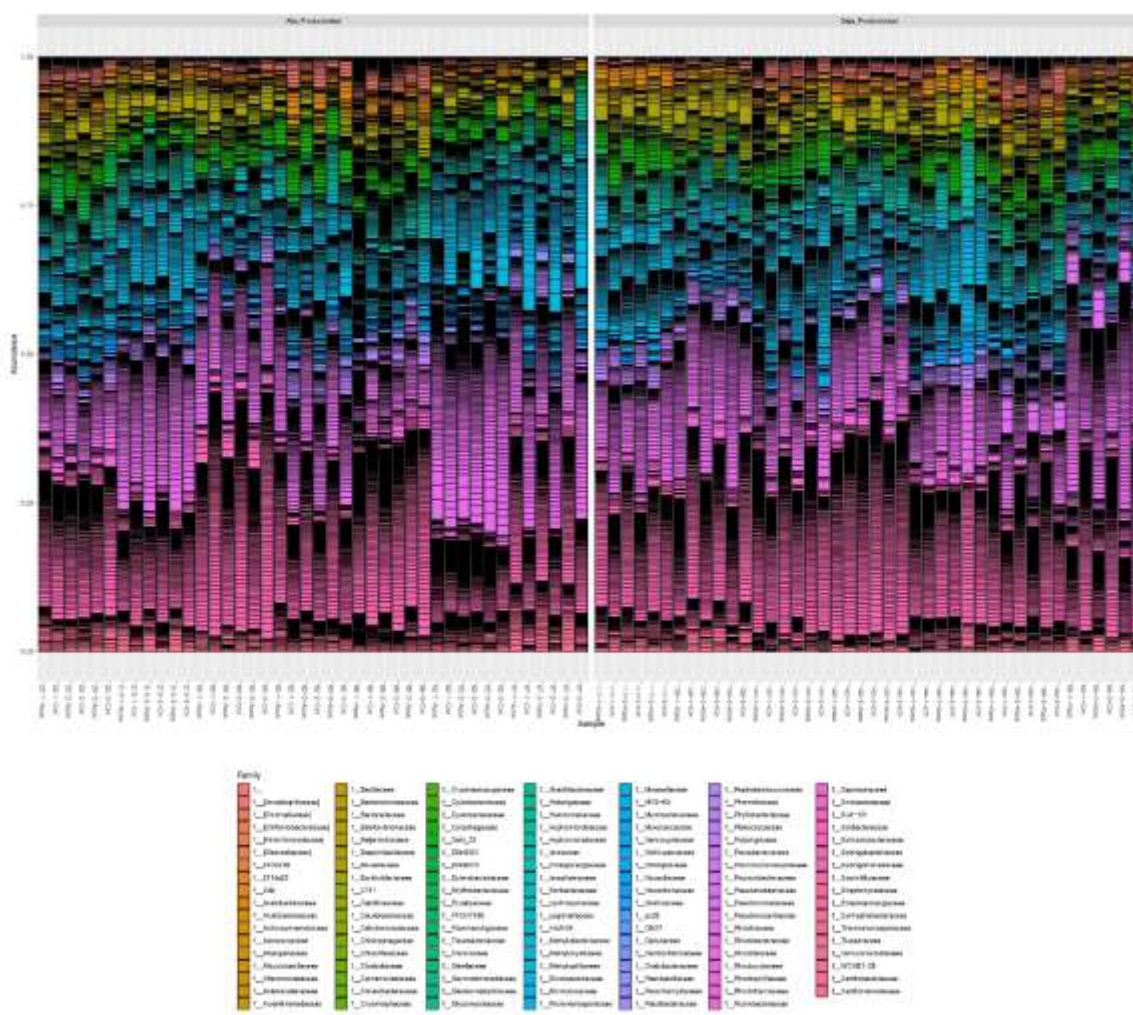
**Figura 25.** Abundancia relativa a nivel de Phylum (rdp). Las barras muestran la abundancia relativa porcentual de ASVs asignadas a cada Phylum.





**Figura 27.** Abundancia relativa a nivel de Phylum (Green-genes). Las barras muestran la abundancia relativa porcentual de ASVs asignadas a cada Phylum.



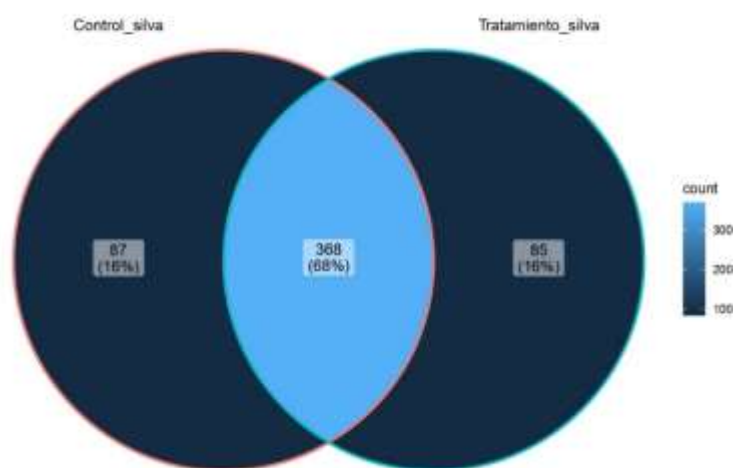


**Figura 28.** Abundancia relativa a nivel de Familia (Green-genes). Las barras muestran la abundancia relativa porcentual de ASVs asignadas a cada Familia.

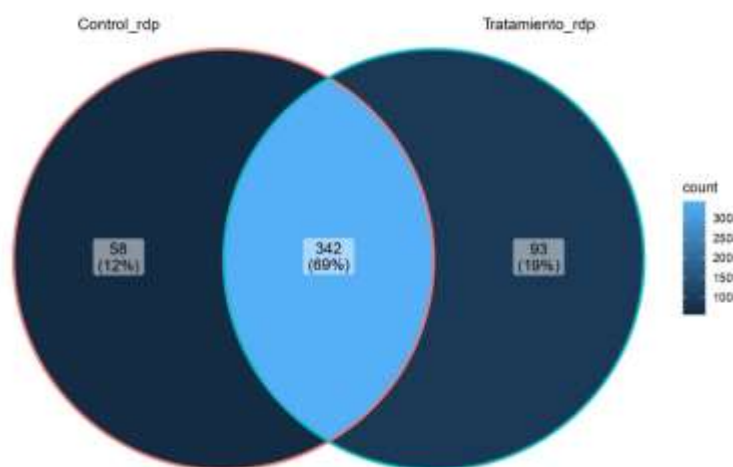
## 7.6 Análisis de Diagramas de Venn

Para determinar que OTUs son específicos para el tratamiento, control, y que OTUs son comunes a ambas condiciones en las muestras de raíces de trigo, se empleó el análisis de conjuntos o Diagramas de Venn. Las muestras inferidas con la base de datos Silva (Fig. 29) demostró que un 68% (368 OTUs únicos) de los ASVs se compartían entre las muestras control y con tratamiento. Mientras que un 16% (87 OTUs únicos) de los ASVs eran exclusivos de las muestras control y otro 16% (85 OTUs únicos) de los ASVs eran exclusivos de las muestras con tratamiento. Las muestras inferidas con la base de datos rdp (Fig. 30) demostró que un 69% (342 OTUs únicos) de los ASVs se compartían entre las muestras control y con tratamiento. Mientras que un 12% (58 OTUs únicos) de los ASVs eran exclusivos de las muestras control y

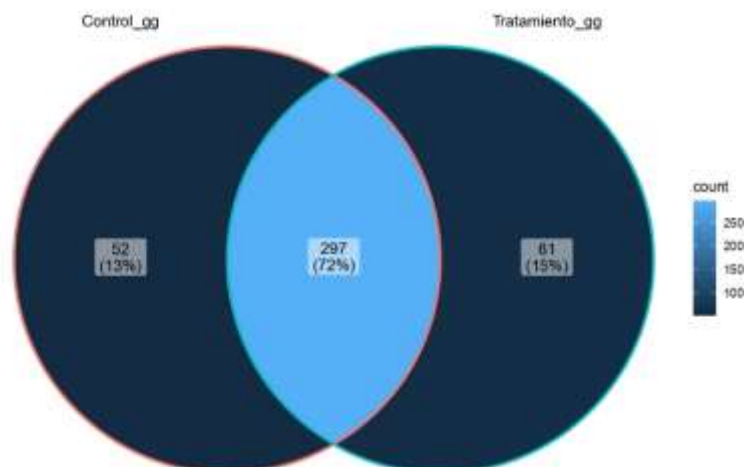
otro 19% (93 OTUs únicos) de los ASVs eran exclusivos de las muestras con tratamiento. Las muestras inferidas con la base de datos Green-genes (Fig. 31) demostró que un 72% (298 OTUs únicos) de los ASVs se compartían entre las muestras control y con tratamiento. Mientras que un 13% (52 OTUs únicos) de los ASVs eran exclusivos de las muestras control y otro 15% (61 OTUs únicos) de los ASVs eran exclusivos de las muestras con tratamiento. Estos resultados fueron similares entre las 3 bases de datos empleadas.



**Figura 29.** Diagrama de Venn (Silva). ASVs compartidos entre las muestras control y tratamiento.



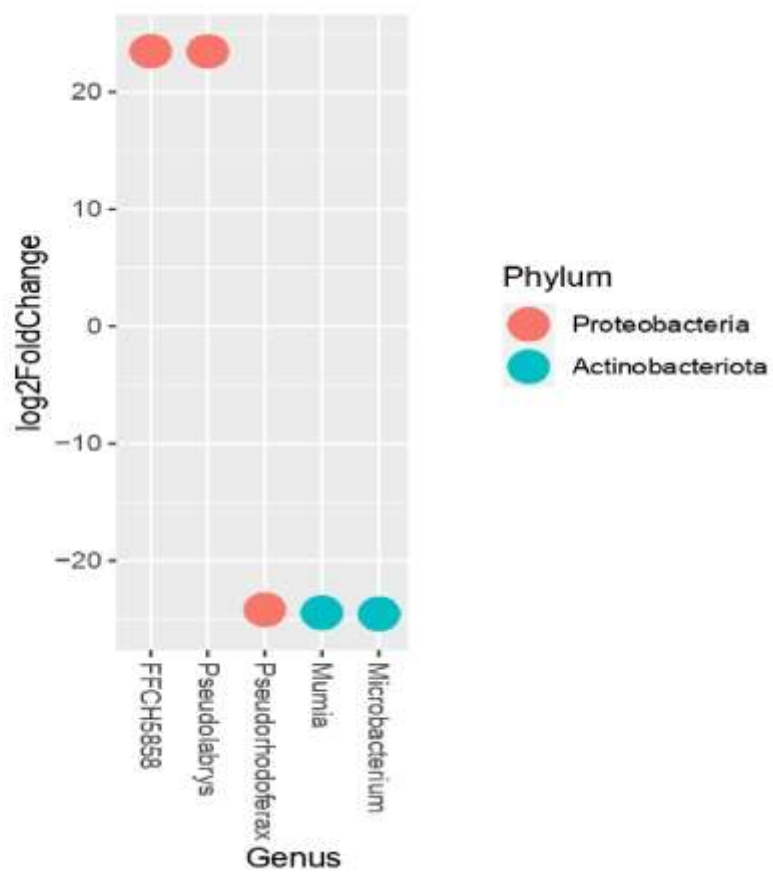
**Figura 30.** Diagrama de Venn (rdp). ASVs compartidos entre las muestras control y tratamiento.



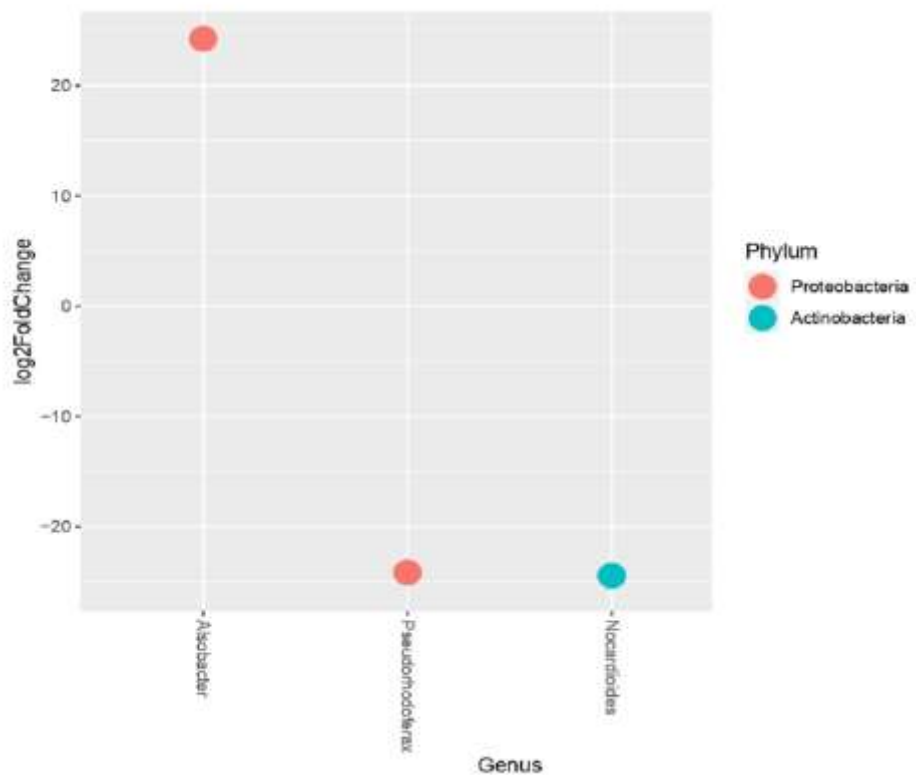
**Figura 31.** Diagrama de Venn (Green-genes). ASVs compartidos entre las muestras control y tratamiento.

### 7.7 Análisis de OTUs diferencialmente abundantes (DAOTUS)

Se procedió a analizar los ASV, asignados a sus correspondientes OTUs, que presentaron diferencias de abundancia de OTUs estadísticamente significativas de las raíces de trigo para la variable tratamiento, con las tres bases de datos (Silva, RDP, Green-genes) usando el algoritmo de análisis de Deseq2. Para el análisis de DAOTUS con la base de datos Silva se determinó el enriquecimiento de *Pseudolabrys* y FFCH5858, y un empobrecimiento de *Pseudorhodosferax*, *Mumia* y *Microbacterium* (Fig. 32). Para el análisis de con la base de datos rdp se encontró que hubo un enriquecimiento de *Alsobacter*, y un empobrecimiento de *Pseudorhodosferax* y *Nocardioides* (Fig. 33). Por último, con la base de datos de Green-genes se encontró que hubo un enriquecimiento de *Rhodoplanes*, y un empobrecimiento de *Acidovorax*, *Pimelobacter*, *Microbacterium* y *Pleomorphomonas* (Fig. 34).

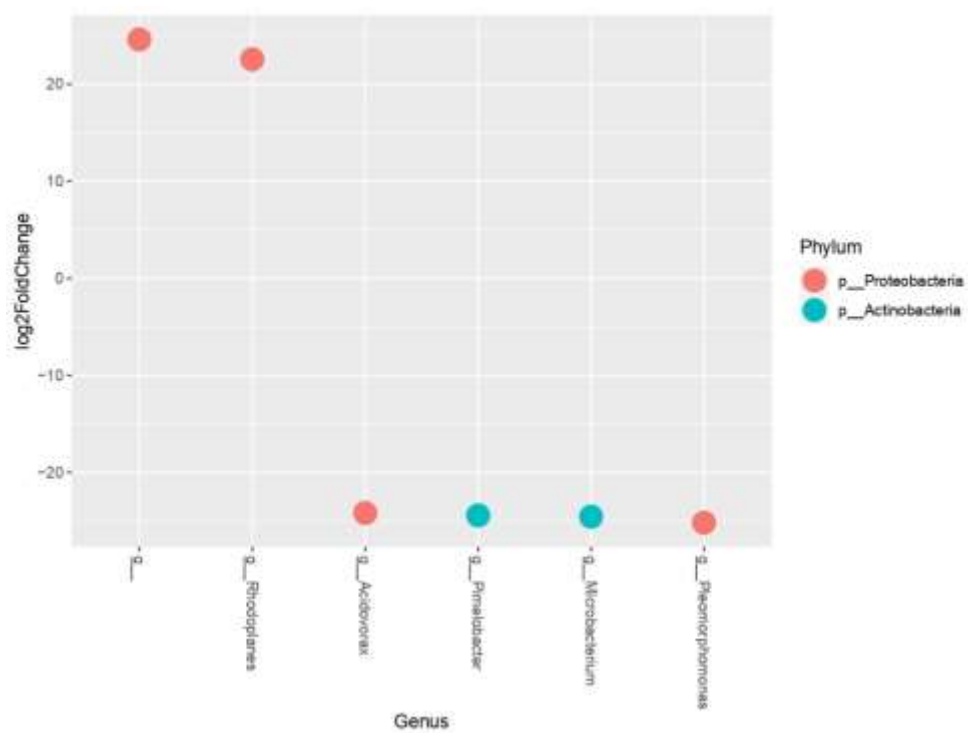


**Figura 32.** Grafica de DAOTUs (Silva). ASVs diferencialmente abundantes basados en la variable tratamiento.



**Figura 33.** Grafica de DAOTUs (rdp). ASVs diferencialmente abundantes basados en la variable tratamiento.





**Figura 34.** Grafica de DAOTUs (Green-genes). ASVs diferencialmente abundantes basados en la variable tratamiento.

## 8. DISCUSIÓN

El presente trabajo fue dirigido al análisis de las comunidades microbianas asociadas a las raíces de distintas líneas de trigo (14 en total) de una población para mapeo SynOpDH, las cuales fueron inoculadas con la bacteria *A. brasilense* como PGPR. El uso de esta población para mapeo se relaciona con la adhesión diferencial de *A. brasilense* por las raíces de las plantas de trigo de dicha población (Díaz De León *et al.*, 2015). Por ende, este trabajo tiene la finalidad de estudiar la estructura de las comunidades microbianas asociadas a las raíces de las líneas de trigo mencionadas, en campo, y determinar si estas se ven influenciadas por las variables de estudio utilizadas, como son tratamiento, productividad y líneas. Además, determinar si existe alguna relación entre los posibles cambios de las comunidades microbianas con los niveles de producción que al final se pueden relacionar con los niveles de adhesión de *Azospirillum* al trigo.

Los índices de alfa diversidad analizados (Chao1, Shannon) tuvieron diferencias significativas con la variable tratamiento, para las líneas analizadas, pero no así con la variable productividad. Este resultado indica que el tratamiento con *A. brasilense* generaba cambio en la riqueza y abundancia de las especies u OTUs. Al analizar el índice de Shannon con las tres bases de datos se generaron valores entre 5.5 y 6.5, lo que indica una alta diversidad de especies dentro de las muestras; siendo que a partir de 5 en adelante (>5) ya se consideran muestras con alta riqueza de especies. Las diferencias estadísticamente significativas fueron entre las líneas 85 y 144, las cuales corresponden a líneas de alta y baja productividad, respectivamente. Con el índice de Simpson se encontraron valores cercanos al 1 en las tres bases de datos, lo que indica que la muestra está predominantemente constituida por bacterias. Por último, el índice de Chao1 que es un indicador de la diversidad de las especies u OTUs en las muestras, se obtuvieron valores entre 400 a 1600, lo cual indica que las muestras están compuestas por muchas especies y son comunidades complejas. Además, se determinaron diferencias entre las líneas de alta (líneas 60, 85 y 97) y baja productividad (línea 126) al utilizar las tres bases de datos, lo que indica que las diferencias estadísticas entre las líneas y la productividad son robustas (Kim *et al.*, 2017; Thukral, 2017).

Los análisis de interpolación (o rarefacción) y extrapolación de curvas de muestreo ayudan a determinar si el esfuerzo de secuenciación adecuado para que el tamaño de los “reads” generados en una librería o muestra no influya en los análisis, así como determinar la diversidad, riqueza y homogeneidad que hay entre las muestras analizadas. Asimismo, las curvas de interpolación y extrapolación están constituidas por dos zonas: interpolación (líneas continuas) que indican el número de especies u OTUs generados con la secuenciación, y la zona de extrapolación que corresponde al doble de reads y al número de especies u OTUs que se podrían obtener (Kim *et al.*, 2017; He y Biswas, 2019). Por lo cual, al realizar las curvas de interpolación y extrapolación se utilizaron las métricas de los índices de Chao1, Shannon y Simpson con las tres bases de datos. Para los tres índices de diversidad y con el uso de las tres bases de datos, las curvas de interpolación y extrapolación alcanzaron su aplanamiento antes de entrar en la zona de extrapolación (Fig. 14-16), lo que indica la saturación de especies u OTUs que pueden ser identificados y, aunque se aumente el esfuerzo de secuenciación no aumentará significativamente el número de especies u OTUs que podamos detectar. Por lo cual el esfuerzo de secuenciación para las muestras fue el adecuado y el tamaño o la cantidad de “reads” generados en cada librería o muestra no es un factor que influya en los análisis posteriores. Otro punto para destacar es que las muestras al ser graficadas con base al tratamiento aparentemente mostraron que hay un solapamiento y solo algunas de las muestras pueden separarse lo suficiente de sus controles, lo que nos indica lo complejo del modelo de estudio. Las muestras que se separaron de sus controles corresponden a las líneas que presentaron diferencias estadísticamente significativas con los análisis de alfa diversidad previamente realizados.

Con relación a las estructuras de las comunidades microbianas asociadas a las raíces de las plantas de las distintas líneas de trigo, las tres bases de datos a nivel de Phylum indican que las comunidades microbianas están constituidas principalmente por el Phylum *Proteobacteria*, seguido de *Actinobacteria*, *Bacteroidota*, *Chloroflexi* y *Firmicutes*. La composición encontrada es similar a la descrita en trabajos previos sobre comunidades microbianas asociadas a trigo (Velázquez-Sepúlveda *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2019, 2022; Dai *et al.*, 2020; Kavamura *et al.*, 2021; Cangioli *et al.*, 2022). Las variables de tratamiento, productividad y líneas tuvieron un

efecto sobre las comunidades microbianas. Aunque la inoculación de *A. brasilense* en la muestra fue la que tuvo un efecto más evidente.

El phylum *Proteobacteria* estuvo conformado principalmente por la Clase *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*. Entre *Alphaproteobacterias* se determinó la presencia de *Rhodobacterales* que comprenden bacterias púrpuras no sulfurosas, en particular miembros de la Familia *Rhodobacteraceae*. Dentro de las *Gammaproteobacterias* se determinó la presencia del Orden *Pseudomonadales* representados por la Familia por las *Pseudomonadaceae*, las cuales están directamente relacionadas con bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Las *Proteobacterias* poseen un gran número de funciones metabólicas relacionadas directamente a los ciclos del carbono, nitrógeno y azufre (Kersters *et al.*, 2006). El Phylum *Actinobacteria* fue representado principalmente por la Clase de *Actinobacteria*. a nivel de Orden fue representado por *Frankiales*, *Glycomycetales*, *Micrococcales* y sobre todo por *Streptomycetales*, y a nivel de Género por *Streptomyces*. Este Phylum bacteriano se caracteriza por estar presente en suelos terrestres ligados particularmente a la descomposición de materia orgánica y se han destacado por la producción de moléculas bioactivas con capacidad antimicrobiana, razón por la cual han sido ampliamente estudiados (Lawson, 2018).

El Phylum *Bacteroidota* es uno de los más representativos y asociados a trigo y otras plantas. La Clase más representada de este Phylum es *Bacteroidia*, a nivel de Orden fue representada por *Bacteroidales*, a nivel de familia fue representado por *Bacteriovoracaceae*. Este Phylum está ligado a procesos de descomposición de materia orgánica en los suelos y, a su vez relacionados al ciclo del carbono. El Phylum *Chloroflexi* está poco relacionado con su asociación a las plantas del trigo. En nuestras muestras fue representado a nivel de Clase por *Chloroflexia*, *Anaerolineae* y *Dehalococcoidia*. A nivel de Orden fue representado por *Chloroflexales* y a nivel de Familia fue representado por *Chloroflexaceae*. Este es un Phylum poco estudiado realmente, pero se atribuyen sus actividades metabólicas a los ciclos del carbono y azufre, encargados principalmente de la degradación de proteínas, aminoácidos y ácidos grasos (Hanada, 2014). Por último, el Phylum *Firmicutes*, el cual es uno de los más asociados a comunidades microbianas de trigo y otras plantas. A nivel de Clase fue representado por *Bacilli* y *Clostridia*, a

nivel de Orden fue representado por *Bacillales*, *Lactobacillales* y *Clostridiales*, a nivel de Familia fue representado por *Alicyclobacillaceae*, *Bacillaceae* y *Clostridiaceae*. Las *Firmicutes* representan a todas las enterobacterias Gram positivas (Ludwig *et al.*, 2015).

En este estudio se emplearon las distancias filogenéticas de las muestras, las cuales se estimaron mediante la matriz de distancias de Bray-Curtis, y se emplearon los modelos de ordenamiento de PCoA y NMDS para las tres bases de datos con el objetivo de llevar a cabo los análisis de beta diversidad o establecer el comportamiento de los agrupamientos de las comunidades microbianas asociadas a las distintas líneas de trigo en el tratamiento aplicado. El análisis de PERMANOVA para las variables analizadas indicó que en efecto todas influyen en agrupación de las muestras, ya que se determinó un efecto de distribución de datos estadísticamente significativo para las tres variables evaluadas (Tablas 2-4) (Anderson, 2017). Además, al emplear la prueba de ANOSIM se determinó que con las tres bases de datos de estudio los conjuntos de las muestras no son similares basados en la variable tratamiento, productividad y líneas.

El análisis de conjuntos mediante los diagramas de Venn fue generado a partir de la creación de conjuntos basados en la variable tratamiento para establecer la relación que guardaban las muestras control y las muestras tratadas con *A. brasilense*. En este caso los ASV eran compartidos entre ambas condiciones y algunos fueron exclusivos para cada condición (Fig. 29-31). Se determinó con las tres bases de datos que el tratamiento con *A. brasilense* generaba un cambio en la estructura y composición microbiana de la rizosfera de las líneas de trigo. Además, el análisis de OTUs diferencialmente abundantes (DAOTUs) indicó diferencias sutiles con las tres bases de datos, así como concordancias. Por ejemplo, se destaca que *Pseudorhodosferax* y *Microbacterium* se empobrecieron con la inoculación de *A. brasilense* (Fig. 32-34).

Por último, el uso de las tres bases de datos fue de gran ayuda para confirmar y establecer la confiabilidad y robustez de los datos, así como de los análisis realizados. Puesto que, al utilizar tres bases de datos distintas, como lo fueron Silva, rdp y Green-genes se obtuvieron resultados muy similares; lo que indica que los datos de secuenciación obtenidos de las muestras de raíz de

trigo son robustos y con mucho peso estadístico para obtener una reproductibilidad y concordancia con las bases de datos utilizadas. Es de destacar que la base de datos Green-genes no se ha actualizado desde el 2013.

## 9. CONCLUSIONES

En presente trabajo se inocularon 100 líneas de trigo de la población para mapeo en campo, de las cuales se seleccionaron 14 líneas, tomando como criterio las de mayor y menor productividad, para el análisis de las comunidades microbianas asociadas. El análisis de comunidades microbianas de la población para mapeo de trigo inoculado con *A. brasilense* presentó cambios en la estructura y composición de las comunidades microbianas asociadas. La estructura y composición microbiana estuvo mayormente representada por el Phylum *Proteobacteria*, seguido de *Actinobacteria*, *Bacteroidota*, *Chloroflexi* y *Firmicutes*. En donde las variables de estudio tratamiento, productividad y líneas de trigo tuvieron un efecto en la composición microbiana de las raíces de trigo. Sin embargo, la variable tratamiento fue la variable que tuvo un efecto más evidente sobre la misma. Así mismo, la inoculación con *A. brasilense* generó ASVs exclusivos en la composición microbiana de las muestras. Con esto podemos determinar que la inoculación con *A. brasilense* generó cambios complejos en la estructura de las comunidades microbianas tanto en las líneas de alta y baja productividad.

La importancia de estos estudios radica en la información generada que puede ser empleada por lo mejoradores de trigo, así como en la creación de inóculos bacterianos de *A. brasilense* que sean más específicos con la variedad de cultivo de trigo empleado. Se espera que estos trabajos ayuden a determinar y medir el efecto de la inoculación de esta bacteria y otras bacterias promotoras del crecimiento vegetal en distintas variedades de trigo y como impactan en las comunidades microbianas asociadas al trigo.

Por último, sería interesante establecer la dinámica de la composición de la estructura microbiana desde la germinación hasta la producción de grano en trigo, inoculados con *A. brasilense*. Esto debido a que al igual que en este trabajo, como en otros trabajos la información publicada se ha enfocado principalmente a las etapas finales de los experimentos.

## 10. LITERATURA CITADA

- Alori, E.T., Glick, B.R. y Babalola, O.O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN): 1-8. doi: 10.3389/fmicb.2017.00971.
- Ameen, A. y Raza, S. (2018). Green Revolution: A Review. *International Journal of Advances in Scientific Research*, 3(12): 129. doi: 10.7439/ijasr.v3i12.4410.
- Anderson, M.J. (2017). Permutational Multivariate Analysis of Variance ( PERMANOVA ) . *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*, : 1-15. doi: 10.1002/9781118445112.stat07841.
- Backer, R., Rokem, J.S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S. y Smith, D.L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 871(October): 1-17. doi: 10.3389/fpls.2018.01473.
- Barbieri, P. y Galli, E. (1993). Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. *Research in Microbiology*, 144(1): 69-75. doi: 10.1016/0923-2508(93)90216-O.
- Barbieri, P., Zanelli, T., Galli, E. y Zanetti, G. (1986). Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. *FEMS Microbiology Letters*, 36(1): 87-90. doi: 10.1111/j.1574-6968.1986.tb01672.x.
- Bashan, Y. y de-Bashan, L.E. (2010). How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth-A Critical Assessment. En: *Advances in Agronomy*. Academic Press, London. pp. 77-136. ISBN: 9780123810311. ISSN: 0065-2113.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A. y Holmes, S.P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7): 581-583. doi: 10.1038/nmeth.3869.
- Cangioli, L., Mancini, M., Napoli, M., Fagorzi, C., Orlandini, S., Vaccaro, F. y Mengoni, A. (2022). Differential Response of Wheat Rhizosphere Bacterial Community to Plant Variety and Fertilization. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7). doi: 10.3390/ijms23073616.
- Castro-Sowinski, S., Herschkovitz, Y., Okon, Y. y Jurkevitch, E. (2007). Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 276(1): 1-11. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00878.x.
- Chandini., Kumar, R., Kumar, R. y Prakash, O. (2019). The impact of chemical fertilizers on our environment and ecosystem. En: *Research Trends in Environmental Sciences*. Akinik Publications, Delhi. pp. 69-86.
- Chen, J., Sharifi, R., Khan, M.S.S., Islam, F., Bhat, J.A., Kui, L. y Majeed, A. (2022). Wheat Microbiome: Structure, Dynamics, and Role in Improving Performance Under Stress Environments. *Frontiers in Microbiology*, 12(January): 1-15. doi: 10.3389/fmicb.2021.821546.
- Chen, S., Waghmode, T.R., Sun, R., Kuramae, E.E., Hu, C. y Liu, B. (2019). Root-associated microbiomes of wheat under the combined effect of plant development and nitrogen fertilization. *Microbiome*, 7(1): 1-13. doi: 10.1186/s40168-019-0750-2.
- Choudhary, D.K., Prakash, A. y Johri, B.N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: Mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47(4): 289-297. doi: 10.1007/s12088-



007-0054-2.

- Dai, Y., Yang, F., Zhang, L., Xu, Z., Fan, X., Tian, Y. y Wang, T. (2020). Wheat-associated microbiota and their correlation with stripe rust reaction. *Journal of Applied Microbiology*, 128(2): 544-555. doi: 10.1111/jam.14486.
- de-Bashan, L.E., Holguin, G., Glick, B.R. y Bashan, Y. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. En: *Microbiología Agrícola, hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo*. Trillas, México. pp. 170-224.
- Díaz De León, J.L., Castellanos, T., Ling, J., Rojas-Hernández, A. y Röder, M.S. (2015). Quantitative trait loci underlying the adhesion of *Azospirillum brasilense* cells to wheat roots. *Euphytica*, 204(1): 81-90. doi: 10.1007/s10681-014-1334-7.
- Döbereiner, J. (1988). Isolation and identification of root associated diazotrophs. *Plant and Soil*, 110(2): 207-212. doi: 10.1007/BF02226800.
- Domingues Duarte, C.F., Cecato, U., Biserra, T.T., Mamédio, D. y Galbeiro, S. (2020). *Azospirillum* spp. In grasses and forages. Review. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 11(1): 223-240. doi: 10.22319/RMCP.V11I1.4951.
- FAO. (2022). Perspectivas de cosechas y situación alimentaria. Informe trimestral mundial N°1. FAO, Roma. ISBN: 978-92-5-136300-3.
- Flachs, A. (2016). Green Revolution. En: *Encyclopedia of Food and Agricultural Ethics*. Springer, Dordrecht. pp. 1-7. ISBN: 978-94-007-6167-4. doi: [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6167-4\\_567-1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6167-4_567-1).
- García De Salamone, I.E., Döbereiner, J., Urquiaga, S. y Boddey, R.M. (1996). Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the 15N isotope dilution technique. *Biology and Fertility of Soils*, 23(3): 249-256. doi: 10.1007/BF00335952.
- García De Salomone, I. y Döbereiner, J. (1996). Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biology and Fertility of Soils*, 21(3): 193-196. doi: 10.1007/s003740050048.
- Hanada, S. (2014). The Phylum *Chloroflexi*, the Family *Chloroflexaceae*, and the Related Phototrophic Families *Oscillochloridaceae* and *Roseiflexaceae*. En: *The Prokaryotes - Other Major Lineages of Bacteria and the Archaea*. Springer, Berlin. pp. 515-532. ISBN: 978-3-642-38954-2.
- Harari, A., Kigel, J. y Okon, Y. (1988). Involvement of IAA in the interaction between *Azospirillum brasilense* and *Panicum miliaceum* roots. *Plant and Soil*, 110(2): 275-282. doi: 10.1007/BF02226808.
- He, D. y Biswas, S.R. (2019). Negative relationship between interspecies spatial association and trait dissimilarity. *Oikos*, 128(5): 659-667. doi: 10.1111/oik.05876.
- Kapulnik, Y., Okon, Y. y Henis, Y. (1985). Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Canadian Journal of Microbiology*, 31(10): 881-887. doi: 10.1139/m85-165.
- Kavamura, V.N., Mendes, R., Bargaz, A. y Mauchline, T.H. (2021). Defining the wheat microbiome: Towards microbiome-facilitated crop production. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19: 1200-1213. doi: 10.1016/j.csbj.2021.01.045.
- Kerstens, K., De Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P. y Stackebrandt, E. (2006). Introduction to the *Proteobacteria*. En: *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. Springer, New York. pp. 3-37. ISBN: 0387307451.

- Kim, B.R., Shin, J., Guevarra, R.B., Lee, J.H., Kim, D.W., Seol, K.H., Lee, J.H., Kim, H.B. y Isaacson, R.E. (2017). Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(12): 2089-2093. doi: 10.4014/jmb.1709.09027.
- Krasilnikov, P., Taboada, M.A. y Amanullah. (2022). Fertilizer Use, Soil Health and Agricultural Sustainability. *Agriculture (Switzerland)*, 12(4): 16-20. doi: 10.3390/agriculture12040462.
- Lawson, P.A. (2018). The Phylum *Actinobacteria*. En: *The Bifidobacteria and Related Organisms*. Academic Press, London. pp. 1-8. ISBN: 9780128050606.
- Ludwig, W., Schleifer, K. y Whitman, W.B. (2015). Revised Road Map to the Phylum *Firmicutes*. En: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, New York. pp. 1-16. doi: 10.1002/9781118960608.bm00025.
- Mawarda, P.C., Le Roux, X., Dirk van Elsas, J. y Salles, J.F. (2020). Deliberate introduction of invisible invaders: A critical appraisal of the impact of microbial inoculants on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 148: 107874. doi: 10.1016/j.soilbio.2020.107874.
- Moss, B. (2008). Water pollution by agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1491): 659-666. doi: 10.1098/rstb.2007.2176.
- Olanrewaju, O.S., Glick, B.R. y Babalola, O.O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11): 1-16. doi: 10.1007/s11274-017-2364-9.
- Pieterse, C.M.J., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C.M. y Bakker, P.A.H.M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1): 347-375. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102340.
- Prashar, P., Kapoor, N. y Sachdeva, S. (2014). Rhizosphere: Its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 13(1): 63-77. doi: 10.1007/s11157-013-9317-z.
- Reinhold, B., Hurek, T. y Fendrik, I. (1985). Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. *Journal of Bacteriology*, 162(1): 190-195. doi: 10.1128/jb.162.1.190-195.1985.
- Rojas, A., Castellanos, T. y Díaz De León, J. (2013). Genetic variation in wheat for *Azospirillum brasilense* to adhere to the seedling root. *Cereal Research Communications*, 41(2): 275-283. doi: 10.1556/CRC.2013.0008.
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 431-449. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231.
- Shewry, P.R. y Hey, S.J. (2015). The contribution of wheat to human diet and health. *Food and Energy Security*, 4(3): 178-202. doi: 10.1002/FES3.64.
- Spaepen, S., Dobbelaere, S., Croonenborghs, A. y Vanderleyden, J. (2008). Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant and Soil*, 312(1-2): 15-23. doi: 10.1007/s11104-008-9560-1.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. y Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4): 425-448. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x.
- Saubidet, M.I. y Barneix, A.J. (1998). Growth stimulation and nitrogen supply to wheat plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Journal of Plant Nutrition*, 21(12): 2565-2577. doi: 10.1080/01904169809365588.
- Tadesse, W., Amri, A., Ogbonnaya, F.C., Sanchez-Garcia, M., Sohail, Q. y Baum, M. (2015).

- Wheat. En: Genetic and genomic resources for grain cereals improvement. Academic Press, London. pp. 81-124. ISBN: 9780128020371.
- Tarrand, J.J., Krieg, N.R. y Dobereiner, J. (1978). A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, 24(8): 967-980. doi: 10.1139/m78-160.
- Thukral, A.K. (2017). A review on measurement of Alpha diversity in biology. *Agricultural Research Journal*, 54(1): 1-10. doi: 10.5958/2395-146x.2017.00001.1.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. y Pieterse, C.M.J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 453-483. doi: 10.1146/annurev.phyto.36.1.453.
- Velázquez-Sepúlveda, I., Orozco-Mosqueda, M.C., Prieto-Barajas, C.M. y Santoyo, G. (2012). Bacterial diversity associated with the rhizosphere of wheat plants (*Triticum aestivum*): Toward a metagenomic analysis. *Phyton*, 81: 81-87. doi: 10.32604/phyton.2012.81.081.
- Youseif, S.H., Abd El-Megeed, F.H., Humm, E.A., Maymon, M., Mohamed, A.H., Saleh, S.A. y Hirsch, A.M. (2021). Comparative Analysis of the Cultured and Total Bacterial Community in the Wheat Rhizosphere Microbiome Using Culture-Dependent and Culture-Independent Approaches. *Microbiology Spectrum*, 9(2). doi: 10.1128/spectrum.00678-21.