

Diversidad bacteriana en raíces de maíz híbrido convencional y genéticamente modificado

Bacterial diversity in roots of conventional and genetically modified hybrid maize

Vital López L, MA Cruz Hernández, S Fernández Dávila, A Mendoza Herrera

Resumen. La superficie sembrada de los cultivos genéticamente modificados (GM) se ha incrementado año tras año y por primera vez en 2012, los países en desarrollo sembraron una mayor superficie que los países industrializados. Por otro lado, se ha postulado que la planta es quien ejerce la selección de los microorganismos por medio de la composición de los exudados radicales creando condiciones específicas que a su vez regulan el control de huéspedes que conforman la estructura microbiana propia de cada planta. En este trabajo se analizó si la introducción de plantas de maíz transgénico con tolerancia a herbicida tendría un impacto en las estructuras microbianas que habitan en la rizosfera y el rizoplaneo con respecto a plantas de maíz híbrido convencional. Se determinaron las poblaciones bacterianas (UFC/g) empleando diferentes medios semi-selectivos. Por medio de la secuenciación del gen 16S ADN ribosomal, se identificaron los géneros bacterianos aislados de la rizosfera y rizoplaneo. A pesar de que se encontraron pequeñas diferencias entre las poblaciones bacterianas, los resultados indicaron que no hay una variación drástica en las poblaciones de microorganismos que interactúan en la raíz de un maíz híbrido convencional con respecto a un maíz genéticamente modificado. Sin embargo, se identificaron bacterias que solo se encontraban en el maíz genéticamente modificado, *Chryseobacterium* sp. (4,39%) y *Micrococcus* sp. (3,72%), y en el maíz convencional *Sphingobium* sp. (13,17%) y *Microbacterium* sp. (14,81%).

Palabras clave: Diversidad bacteriana; Maíz híbrido; Genéticamente modificado; Rizosfera.

Abstract. Cultivated surfaces of genetically modified (GM) crops increased year by year, becoming in 2012 more extensive in developed than in industrialized countries. Furthermore, it has been postulated that the plant is which leads to the selection of the microorganisms on its root exudates, creating specific conditions which in turn regulate the specific microbial structure of each plant. In this study, our main objective was to examine whether the introduction of transgenic maize herbicide-tolerant plants will impact the microbial structures that inhabit at the rhizosphere and rhizoplane with respect to conventional hybrid maize plants. Bacterial populations were determined (CFU/g) using four different semi-selective media. The bacterial genera isolated from the rhizoplane and rhizosphere were identified by sequencing its 16S ribosomal DNA. Although minor differences were found in bacterial populations, our results indicated that there was not a strong change of the microorganisms populations that interact at the rhizosphere of an either conventional hybrid or genetically modified maize. However, we found some bacteria that were only isolated in the either genetically modified [*Chryseobacterium* sp. (4.39%) and *Micrococcus* sp. (3.72%)] or conventional maize [*Sphingobium* sp. (13.17%) and *Microbacterium* sp. (14.81%)].

Keywords: Bacterial diversity; Hybrid maize; Genetically modified; Rhizosphere.

INTRODUCCIÓN

La producción del maíz (*Zea mays*) se ve afectada por factores bióticos (ejemplo: plagas y enfermedades) y abióticos (ejemplo: sequía, pH del suelo), aspectos que generan la necesidad de incrementar la producción de este cultivo (SIAP-SAGARPA, 2007; SFA-SAGARPA, 2011). Es por ello que las técnicas de ingeniería genética extienden las posibilidades de desarrollar cultivos con propiedades mejoradas (ejemplo: el aumento y mejoramiento de la calidad de la productividad agrícola) a través del conocimiento de los genes implicados en la susceptibilidad a las enfermedades e insectos, entre otros (Guo et al., 2013).

Se ha postulado que la planta, por medio de los exudados radicales, ejerce la selección de los microorganismos que habitan en la rizosfera. La rizosfera está definida como el volumen de suelo adyacente a las raíces de la planta que forma un microhábitat densamente poblado (Hartmann et al., 2008). La rizosfera es química, física y biológicamente compleja, diversa y en ella ocurren interacciones dinámicas entre las raíces de la planta, y la (micro) biota y condiciones fisicoquímicas del suelo (Hartmann et al., 2008). En la rizosfera, las bacterias son los microorganismos más abundantes (Antoun y Prévost, 2005). El rizoplano es la superficie externa inmediata de las raíces de la planta junto con las partículas de suelo que se adhieren estrechamente y las comunidades microbianas, actinomicetos y hongos (Singh y Mukerji, 2006).

Los microorganismos de la rizosfera son esenciales porque juegan un papel muy importante en la metabolización o transformación de los nutrimentos de las plantas y pueden producir fitohormonas las cuales son importantes para el desarrollo de la planta. Dentro de éstos microorganismos se encuentran las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), y de éstas las más estudiadas son las rizobacterias. Éstas fueron definidas como de vida libre, colonizando la rizosfera, rizoplano (superficie de la raíz) y filosfera que bajo algunas condiciones, benefician a las plantas incrementando su crecimiento y productividad (Bashan y de-Bashan, 2005; Hani y Prévost, 2005). Cabe mencionar que la rizosfera alberga microorganismos de interés agrícola tales como simbioses; dentro de estos microorganismos se encuentra *A. brasilense* que es una bacteria promotora del crecimiento vegetal principalmente en gramíneas como sorgo y maíz.

Existen muchos estudios sobre el maíz genéticamente modificado (GM) con resistencia a insectos (genes cry) (Miethling et al., 2009, Mulder et al., 2006). Sin embargo, existen pocos estudios sobre los efectos que un maíz genéticamente modificado puede ejercer en las comunidades microbianas que habitan en su rizosfera y rizoplano (Hart et al., 2009).

La estructura microbiana está influenciada por diferentes factores, incluyendo el genotipo y la salud de la planta, y condiciones ambientales (Aira et al., 2010). Un cambio genético en los cultivos podría dar lugar a modificaciones en (1) exu-

dados radicales, (2) morfología de la raíz, y (3) liberación de sustancias antimicrobianas. Como resultado, se podría producir efectos potenciales en la diversidad estructural y funcional de la rizosfera. Debido a esto, las plantas genéticamente modificadas (GM) han sido consideradas un modelo de estudio muy interesante (Schmalenberger y Tebbe, 2002). Cualquier impacto que las plantas genéticamente modificadas tengan en la dinámica de la rizosfera y la comunidad microbiana en el interior de la raíz puede tener efectos positivos, negativos o neutrales. Se pueden crear así condiciones específicas en las comunidades bacterianas (Berg y Smalla, 2009) que puedan tener efecto sobre el crecimiento y la salud vegetal, y en la sostenibilidad de los ecosistemas (Dunfield y Germida, 2004). En algunos estudios las plantas GM alteran la composición de las comunidades (Oger et al., 1997). Lottmann y colaboradores (2000) encontraron que las estructuras de las comunidades de la rizosfera de las plantas transgénicas de papa inoculadas no fueron alteradas significativamente; es decir que no hubo un efecto negativo de ambas cepas antagonistas asociadas a la planta en la rizo- y geocalosfera en un experimento de campo. Así mismo, Dunfield y Germida (2001) analizaron las diferencias entre las comunidades microbianas asociadas a la rizosfera de las plantas GM con respecto a una variedad convencional. El análisis indicó que hubo variación en las comunidades microbianas asociadas (1) en ambas variedades de canola y (2) a la temporada del año. Los cambios en la estructura microbiana asociada con plantas GM fueron temporales (invierno) y no persistieron en la próxima temporada en el campo. Es decir, la composición y la diversidad funcional, y la comunidad microbiana, fueron influenciadas por la variedad de la planta. Recientemente, Kapur et al. (2010) evaluaron la diversidad microbiana cultivable y no cultivable en suelos de algodón Bt y no Bt para determinar las consecuencias ecológicas de la siembra del algodón GM. Los resultados demostraron que las estructuras de las comunidades microbianas se mantuvieron estables en cuanto a la riqueza de la diversidad en los estudios de campo. Sólo se observaron pocas variaciones dentro de la estructura de la comunidad microbiana, demostrando que el cultivo transgénico no las afectó negativamente. Estos resultados indicaron claramente la posibilidad de la aplicación ecológica segura de los cultivos GM como el algodón Bt.

Actualmente los cultivos GM se están empleando tanto en países en desarrollo como en países industrializados. Aún más, ya existen los permisos para la evaluación en pruebas experimentales y piloto en campo del maíz GM; entre ellos, aquellos eventos con resistencia a herbicidas en varias regiones de México (CIBIOGEM, 2014). Por lo tanto surge la pregunta ¿la introducción de cultivos transgénicos en los ecosistemas agrícolas causarán un impacto en las estructuras microbianas que habitan en la raíz? En este trabajo se analizó la comunidad bacteriana aislada de las rizosfera y rizoplano del maíz híbrido convencional (30P49) y de un maíz genéticamente modificado con resistencia al herbicida glufosinato.

La hipótesis de trabajo fue que las plantas de maíz transgénico y aquellas de maíz convencional tienen similares poblaciones de bacterias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico. En este trabajo se utilizaron plantas de maíz híbrido convencional (30P49) y de un material genéticamente modificado (experimental, no comercial) con resistencia al herbicida glufosinato (transformado con el gen *pat* que condifica para una *L*-phosphinothricin, syn. glufosinato, inactivando la transacetilasa).

Muestreo del suelo. Para la siembras de las semillas, las muestras de suelo siempre se tomaron de un mismo lote de 1 ha, con modalidad riego donde siempre se cultiva el maíz localizado en Río Bravo, Tam. Mex. Las coordenadas geográficas del sitio de muestreo fueron 25° 58' 54" Norte, 98° 5' 25" Oeste. Se colectaron 4 sub-muestras de suelo en diferentes puntos del lote a una profundidad de 15 a 25 cm (Griffiths et al., 2006) y se mezclaron homogéneamente. Posteriormente, el suelo se tamizó usando con un tamiz de 5 mm de diámetro.

El suelo presentó las siguientes características fisicoquímicas: pH = 8; conductividad eléctrica; 1,38 dS/m; materia orgánica 0,675%; K extraíble 894 ppm; N-NO₃ 27,15 ppm; P 10,2 ppm; Clase Textural: Arcilla-arenosa. Para cada tipo de maíz (tratamiento) se sembraron cuatro macetas de 2,8 L con dos semillas cada una. Las macetas se colocaron bajo condiciones de invernadero hasta la etapa vegetativa V6. Esto permitió trabajar conforme a la ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente modificados de México (Ley DOF, 2005). Dicha ley regula las actividades de utilización confinada, liberación experimental, piloto, comercial, importación y exportación de organismos genéticamente modificados. Su propósito es prevenir, evitar o reducir los posibles riesgos que estas actividades pudieran ocasionar a la salud humana, medio ambiente y la diversidad biológica, animal y vegetal.

Colecta de la rizosfera y rizoplano. Cuando las plantas se encontraban en etapa vegetativa V6 se colectaron 8 plantas individuales de cada tipo de maíz. Las plantas se sacaron cuidadosamente para evitar daño en las raíces y se colocaron en bolsas de plástico etiquetadas y llevadas inmediatamente al laboratorio. Para colectar la rizosfera y rizoplano, se realizaron muestras compuestas, formadas por las raíces de dos plantas del mismo tipo de maíz (Convencional o Transgénico). Esto nos dió un total de 4 muestras compuestas, considerando a cada una de ellas, como una réplica de cada tratamiento. Éstas réplicas fueron destinadas para el aislamiento de los microorganismos en medios de cultivo semi-selectivos de la rizosfera y rizoplano. Las raíces se cortaron y colocaron en agua estéril para eliminar grandes cantidades de suelo (Schmalenberger y Tebbe, 2002). Se consideró rizosfera al suelo circundante a

la raíz todavía unido después del lavado, y rizoplano al suelo firmemente adherido a la raíz (Brusetti et al., 2004). Estas réplicas se colocaron individualmente en tubos falcon estériles y almacenados a -20 °C hasta el procesamiento biológico. Las muestras de rizoplano se tomaron de la siguiente manera: primero se eliminó el exceso de suelo unido a la raíz con una espátula estéril. Después, se pesó un gramo de raíz que contenía suelo íntimamente adherido a la misma (Brusetti et al., 2004).

Medios de cultivos utilizados para aislamiento. Para este trabajo se utilizaron cuatro medios de cultivos semi-selectivos: (1) Rojo Congo (Acido Málico 5g/L; K₂HPO₄ 0,5 g/L; NaCl 0,1 g/L; MgSO₄ x 7H₂O 0,2 g/L; Extracto de Levadura 0,4 g/L; KOH 2,4 g/L; Agar-Agar 15 g/L; 2 mL de colorante rojo congo equivalente a 5 µg/mL) de acuerdo a Rodríguez-Cáceres et al. (1982) con algunas modificaciones; (2) Triptona extracto de levadura agar o TY (Tryptona 5 g/L, Extracto de Levadura 3 g/L, Agar-Agar 15g/L) (Watson et al., 2001; Beringer, 1974); (3) AZ agar (Extracto de levadura 0,2 g/L; Ácido Azelaico 2 g/L; K₂HPO₄ 0,4 g/L; KH₂PO₄ 0,4 g/L; MgSO₄ x 7H₂O 0,2 g/L; Agar-Agar 15 g/L) basado en Estrada de los Santos et al. (2011) con algunas modificaciones, y (4) Ashby (Sacarosa 5 g/L; KH₂PO₄ 1 g/L; MgSO₄ x 7H₂O 0,2 g/L; FeSO₄ x 7 H₂O 0,005 g/L; NaCl 0;02 g/L; CaCl₂ 0,2 g/L; Agar-Agar 15 g/L) (Martínez, 2003; Jiménez, 2007).

El pH en todos los medios de cultivo se ajustó a 8,0 utilizando KOH o HCl concentrado dependiendo del pH observado. Se emplearon estos medios de cultivo debido a que los mismos han sido utilizados para aislar Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal. El medio Rojo Congo es normalmente utilizado para aislar al género *Azospirillum* sp., el medio AZ para el género *Burkholderia* sp., el medio Ashby para el género *Azotobacter* sp. y el medio TY es un medio rico usualmente para cultivar *Rhizobium* sp. (Caballero-Mellado et al., 1992; Bashan et al., 2004; Córdova-Bautista et al., 2009; Estrada de los Santos et al., 2011).

Análisis microbiológico. La evaluación de la densidad de las diferentes poblaciones bacterianas presentes en la rizosfera y rizoplano se realizó por el método de conteo viable de células por siembra en superficie (Córdova-Bautista et-al., 2009). Para esto, se pesó un gramo de suelo de la rizósfera que se colocó en un tubo Falcon de 50 mL conteniendo 10 mL de solución salina (NaCl al 0,85%). Se agitó vigorosamente con un agitador vortex (Daigger Vortex Genie 2^o) posteriormente se llevaron a cabo diluciones seriadas hasta 10⁻⁴. Las muestras del rizoplano se colocaron en 10 mL de solución salina mezclando vigorosamente para que las bacterias adheridas se desprendieran y así posteriormente realizar diluciones decimales seriadas hasta 10⁻³. Finalmente, se sembraron 0,1 mL de cada dilución provenientes de la rizósfera o del rizoplano, en cajas Petri conteniendo los medios de cultivo por el duplicado. Las placas se incubaron a 30 °C durante 72 h. Para la deter-

minación de la abundancia de las células viables primero se clasificaron de acuerdo a su morfología macroscópica (forma de colonia, color, tamaño, bordes, etc) (Córdova-Bautista et al., 2009); posteriormente se realizó el conteo de todas las unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en cada medio de cultivo. Las cepas aisladas se almacenaron a 4 °C hasta el análisis molecular.

Análisis estadístico de las poblaciones de bacterias aisladas de rizósfera y rizoplano. Una vez determinada la densidad de las células viables (UFC) en cada uno de los medios de cultivo mencionados anteriormente se realizó la comparación de las poblaciones aisladas mediante pruebas de *t* de Student para muestras independientes ($\alpha=0,05$). Esto se analizó luego de verificar que se cumplieran los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianzas mediante las respectivas pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Levin (Tomás-Sábado, 2010). Los análisis se realizaron mediante el paquete software STATISTICA versión 8.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

Purificación de las bacterias. Las colonias fueron purificadas a través de estría cruzada sobre el medio de cultivo sólido hasta obtener colonias individuales repitiendo este procedimiento hasta obtener colonias puras (Córdova-Bautista et al., 2009) para su posterior identificación molecular.

Identificación molecular de los aislamientos bacterianos de la rizósfera y rizoplano. Con el propósito de agrupar los aislamientos puros, esto se hizo en base a su perfil de restricción, mediante la técnica de Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción acoplado a la PCR (PCR-RFLP) (Pérez et al., 2011). El producto de PCR se digirió con la enzima restricción *Alu* I de acuerdo a las condiciones del fabricante New England Biolabs® Inc. Aquellos aislamientos que mostraron un mismo patrón de restricción formaron un solo grupo, y por lo tanto, sólo se secuenciaron, por triplicado, aquellos representantes que mostraron perfiles de restricción diferentes del 16S rDNA, y así definir a que género de bacteria correspondía cada uno de los aislamientos puros.

De los aislamientos seleccionados por su perfil de restricción, se extrajo su DNA genómico mediante el estuche comercial de Promega Wizard Genomic DNA® para la identificación molecular de los aislamientos. La concentración y calidad del DNA se obtuvo de acuerdo a los valores arrojados por un espectrofotómetro de luz UV a 260/280 nm de longitud de onda. Posteriormente se amplificó el gen 16S ADN ribosomal a partir del ADN genómico extraído de los aislamientos puros mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los oligonucleótidos universales 27f (GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1495r (CTACGGCTACCTTGTACGA) obteniendo un producto de 1500 pb (Grifoni et al., 1995). Se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: (1) Buffer taq 1X, MgCl₂ 1,5mM; Oligonu-

cleotidos 0,05 µM; Taq Polimerasa 1U, y 100 ng de gDNA, y (2) un programa de un ciclo a 95 °C por 5 min; 35 ciclos a 95 °C por 1 min, 60 °C por 1 min, y 72 °C por 90 seg, y un ciclo a 72 °C por 10 min. Se utilizó a la cepa tipo AZ181 de *Azospirillum* sp. como control positivo, y el control negativo sin ADN. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient®).

Análisis de las secuencias. Los productos de PCR se purificaron, previamente a la secuenciación, con EXOSAP IT (USB® products Affymetrix, Inc.) Posteriormente, estos productos se prepararon con el estuche comercial Byg-Dye Terminator 3.1 Cycle Sequencing para la secuenciación, la que se realizó en un secuenciador ABI Prisma [(Applied Biosystem ABI 3130 (Foster City, CA. USA)], y las secuencias se analizaron en el portal de NCBI/Blast BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

RESULTADOS

Poblaciones bacterianas a nivel de la rizósfera y rizoplano. A nivel de la rizósfera, se observan los promedios obtenidos a partir del conteo de las células viables aislados en los medios semiselectivos, ya sea del maíz híbrido convencional y genéticamente modificado, expresados en UFC/g o como Log UFC/g (datos transformados logarítmicamente, para aquellos conteos que no pasaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza). No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) entre las poblaciones bacterianas aisladas a partir del maíz convencional con respecto al GM según la prueba *t* de Student aplicada a las densidades de las poblaciones bacterianas aisladas en el medio AZ, Rojo Congo, TY. Sin embargo, en el medio Ashby se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre las poblaciones bacterianas cuantificadas del maíz convencional con respecto al GM (Tabla 1). Respecto al rizoplano, la prueba *t* de Student no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) entre las poblaciones bacterianas aisladas en los medios Ashby, Rojo Congo y TY del maíz convencional con respecto al GM. Sin embargo, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre las poblaciones bacterianas del maíz convencional con respecto al GM en el medio AZ (Tabla 2).

Identificación molecular de los aislamientos bacterianos de la rizósfera. En la Figura 1 se muestran los principales géneros bacterianos aislados, de acuerdo al medio de cultivo fueron: **A**) medio Ashby: *Sphingobium* sp. (48,48%-HC), *Microbacterium* sp. (51,52%-HC) y *Bacillus* sp. (100%-GM). **B**) medio Az: *Bacillus* sp. (68,97%-HC y 62,26%-GM), *Brevundimonas* sp. (5,17%-HC y 13,21%-GM), *Brevibacterium* sp. (25,86%-HC) y *Chryseobacterium*

Tabla 1. Poblaciones de aislamientos de bacterias de la rizosfera de acuerdo al medio de cultivo y tipo de maíz.**Table 1.** Isolated bacteria populations from the rhizosphere according to the culture medium and the type of maize.

| Origen | Maíz | Medio de cultivo | Abundancia de los microorganismos | t de Student | Desviación típica |
|-----------|------|------------------|-----------------------------------|--------------|------------------------|
| Rizosfera | HC | TY | 5,15 Log UFC/g | NS | 0,3759 |
| Rizosfera | GM | TY | 4,98 Log UFC/g | | 0,7945 |
| Rizosfera | HC | Rojo Congo | 5,23 Log UFC/g | NS | 0,5829 |
| Rizosfera | GM | Rojo Congo | 5,77 Log UFC/g | | 0,6660 |
| Rizosfera | HC | Ashby | 4,71 x 10 ⁵ UFC/g | * | 3,35 x 10 ⁵ |
| Rizosfera | GM | Ashby | 1,03 x 10 ⁶ UFC/g | | 5,67 x 10 ⁵ |
| Rizosfera | HC | AZ | 8,70 x 10 ⁵ UFC/g | NS | 4,81 x 10 ⁵ |
| Rizosfera | GM | AZ | 1,33 x 10 ⁶ UFC/g | | 4,92 x 10 ⁵ |

* Hay diferencias significativas ($p < 0,05$); NS= No hay diferencias significativas ($p > 0,05$); HC= Híbrido convencional; GM= Genéticamente modificado; TY= Triptona Extracto de levadura; RC= Rojo Congo; UFC= Unidad formadora de colonia.

Tabla 2. Poblaciones de aislamientos de bacterias del Rizoplano de acuerdo al medio de cultivo y tipo de maíz.**Table 2.** Isolated bacteria populations from the rizoplano according to the culture medium and the type of maize.

| Origen | Maíz | Medio de cultivo | Abundancia de los microorganismos | t de Student | Desviación típica |
|-----------|------|------------------|-----------------------------------|--------------|------------------------|
| Rizoplano | HC | TY | 5,37 Log UFC/g | NS | 0,6926 |
| Rizoplano | GM | TY | 5,23 Log UFC/g | | 0,7907 |
| Rizoplano | HC | Rojo Congo | 1,21 x 10 ⁶ UFC/g | NS | 9,26 x 10 ⁵ |
| Rizoplano | GM | Rojo Congo | 1,06 x 10 ⁶ UFC/g | | 1,13 x 10 ⁶ |
| Rizoplano | HC | Ashby | 3,20 x 10 ⁶ UFC/g | NS | 5,83 x 10 ⁵ |
| Rizoplano | GM | Ashby | 2,32 x 10 ⁶ UFC/g | | 1,55 x 10 ⁶ |
| Rizoplano | HC | AZ | 3,76 x 10 ⁵ UFC/g | * | 3,12 x 10 ⁵ |
| Rizoplano | GM | AZ | 4,38 x 10 ⁶ UFC/g | | 1,23 x 10 ⁶ |

* Hay diferencias significativas ($p < 0,05$); NS= No hay diferencias significativas ($p > 0,05$); HC= Híbrido convencional; GM= Genéticamente modificado; TY= Triptona Extracto de levadura; RC= Rojo Congo; UFC= Unidad formadora de colonia.

sp. (24,53%-GM). **C)** medio rojo Congo: *Brevibacterium* sp. (82,49%-HC y 62,84%-GM), *Bacillus* sp. (14,12%-HC y 26,86%-GM), *Micrococcus* sp. (8,09%-GM), *Pseudomonas* sp. (3,39%-HC) y *Sinorhizobium* sp. (2,21%-GM). Finalmente **D)** medio TY: *Agrococcus* sp. (28,42%-HC y 3,75%-GM), *Arthrobacter* sp. (16,39%-HC y 86,46%-GM), *Sphingobacterium* sp. (15,30%-HC y 3,75%-GM), *Bacillus* sp. (34,43%-HC y 5,76%-GM), *Microbacterium* sp. (5,46%-HC) y *Serratia* sp. (0,29%-GM).

Al agrupar las bacterias aisladas exclusivamente de la rizosfera se encontró que los géneros *Arthrobacter* sp., *Sphingobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Agrococcus* sp., *Brevibacterium* sp. y *Brevundimonas* sp. se encontraban en ambos tipos de maíz. Los géneros únicamente hallados en el maíz convencional fueron *Pseudomonas* sp., *Sphingobium* sp. y *Microbacterium* sp.

Los géneros determinados exclusivamente en la rizósfera del maíz GM fueron *Serratia* sp., *Micrococcus* sp., *Sinorhizobium* sp. y *Chryseobacterium* sp. Asimismo, a nivel rizósfera los géneros con mayor abundancia tanto en el maíz convencional como en el GM fueron *Brevibacterium* sp., y *Bacillus* sp.

Al agrupar las bacterias aisladas del rizoplano, los géneros *Chryseobacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Enterobacter* sp., *Rhizobium* sp., *Achromobacter* sp., *Acidovorax* sp. y *Xanthomonas* sp. se encontraron tanto en el maíz convencional como en el GM. Los géneros *Bacillus* sp., *Cupriavidus* sp. y *Acinetobacter* sp solo se encontraron en el maíz convencional. Los géneros propios del maíz GM fueron *Serratia* sp. y *Pseudomonas* sp., y los géneros con mayor abundancia tanto en el maíz convencional como en el GM fueron *Chryseobacterium* sp. y *Rhizobium* sp.

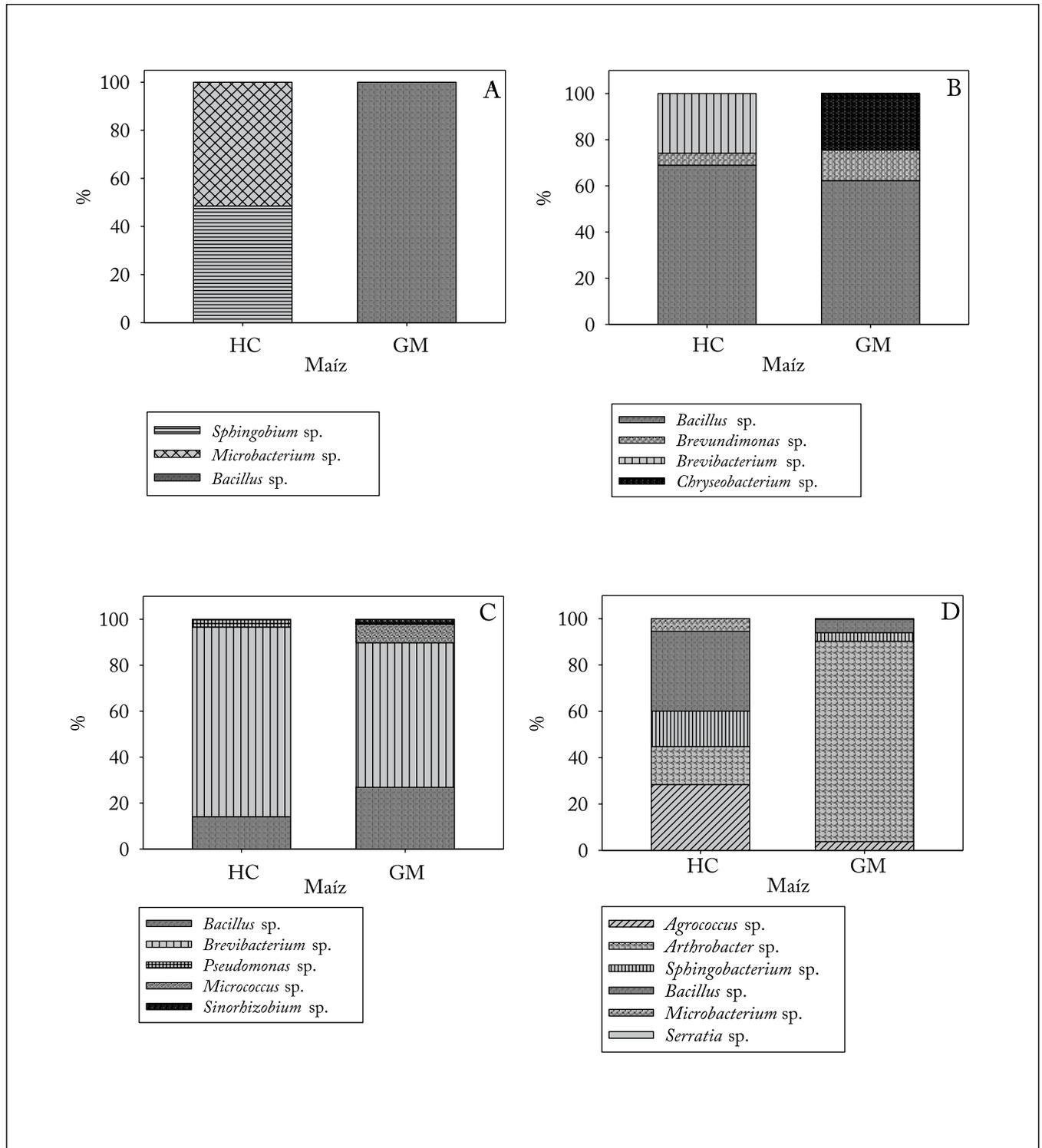


Fig. 1. Distribución relativa de los géneros de bacterias identificados de la rizósfera, a partir de las secuencias del gen 16S DNA ribosomal. (A) Medio Ashby, (B) Medio Az, (C) Medio Rojo Congo, (D) Medio TY.

Fig. 1. Relative distribution of the identified bacterial genera in the rhizosphere, from DNA sequences of the 16S ribosomal gene. (A) Medium Ashby, (B) Medium AZ, (C) Medium Congo Red, (D) TY Medium.

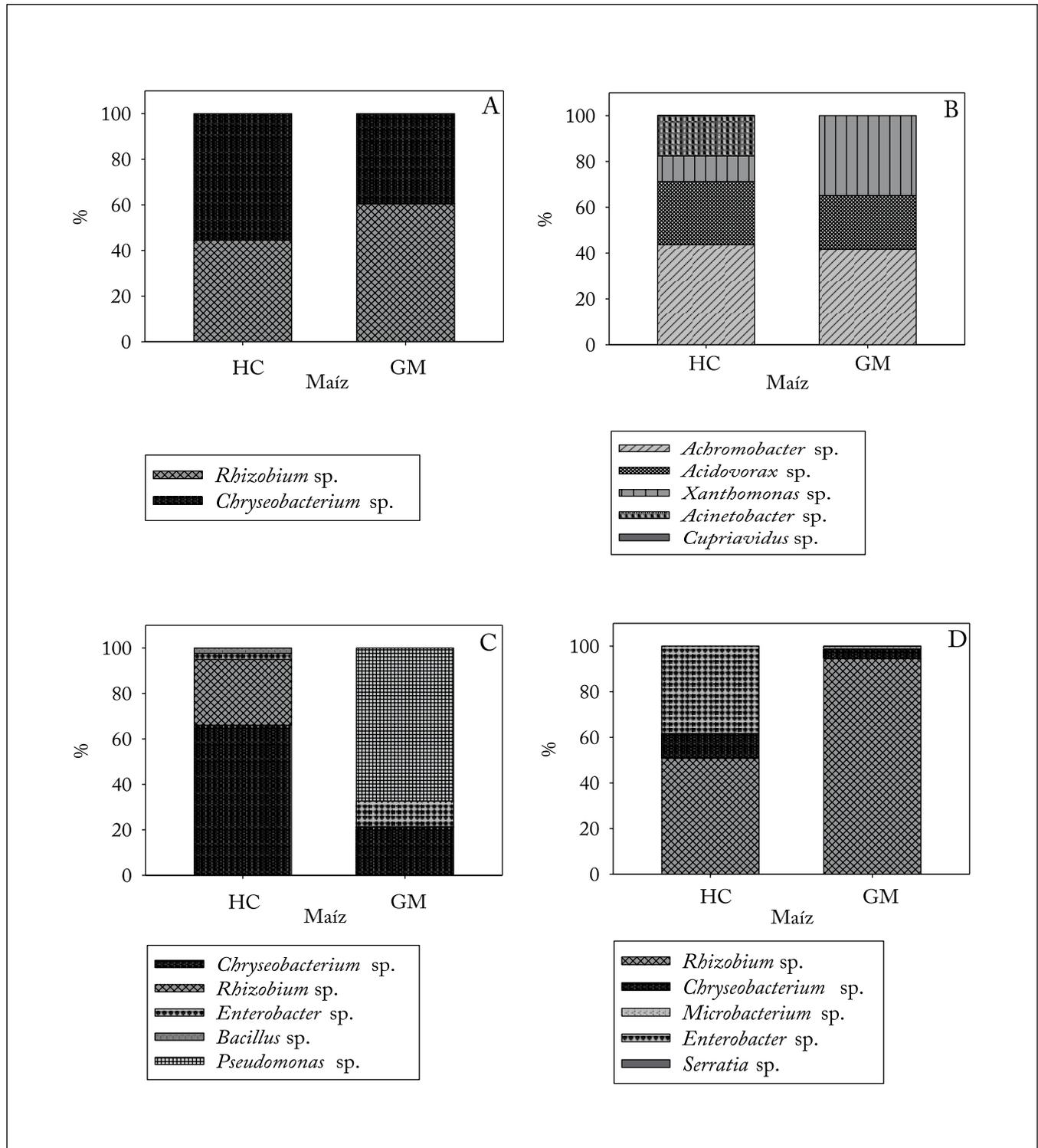


Fig. 2. Distribución relativa de los géneros de bacterias identificados del rizoplaneo, a partir de las secuencias del gen 16S DNA ribosomal. (A) Medio Ashby, (B) Medio Az, (C) Medio Rojo Congo, (D) Medio TY.

Fig. 2. Relative distribution of the identified bacterial genera in the rizoplaneo, from DNA sequences of the 16S ribosomal gene. (A) Medium Ashby, (B) Medium AZ, (C) Medium Congo Red, (D) TY Medium.

Identificación molecular de los aislamientos bacterianos del rizoplano. Los géneros mayormente aislados en el medio Ashby fueron *Rhizobium* sp. (44,53%-HC y 60,48%-GM) y *Chryseobacterium* sp. (55,47%-HC y 39,52%-GM). A partir del medio Az se aislaron los géneros *Achromobacter* sp. (43,59%-HC y 41,71%-GM), *Acidovorax* sp. (27,64%-HC y 23,43%-GM), *Xanthomonas* sp. (11,16%-HC y 34,86%-GM), *Acinetobacter* sp. (17,54%-HC) y *Cupriavidus* sp. (0,05%-HC). En el medio rojo Congo los géneros aislados fueron *Chryseobacterium* sp. (66,05%-HC y 21,27%-GM), *Rhizobium* sp. (28,90%-HC y 0,13%-HC), *Enterobacter* sp. (2,68%-HC y 11,31%-GM), *Bacillus* sp. (2,37%-HC) y *Pseudomonas* sp. (67,29%-GM). En el medio TY se aislaron los géneros *Rhizobium* sp. (50,86%-HC y 94,51%-GM), *Chryseobacterium* sp. (10,68%-HC y 4,33%-GM), *Microbacterium* sp. (0,16%-HC y 1,04%-GM), *Enterobacter* sp. (38,30%-HC) y *Serratia* sp. (0,12%-GM) (Fig. 2).

DISCUSIÓN

El medio de cultivo Ashby no lleva una fuente de nitrógeno. Por lo tanto, el hecho de que se aislaran poblaciones estadísticamente diferentes entre un maíz convencional con respecto al GM nos indicaría que las bacterias diazotroficas son más abundantes en el cultivo GM con respecto al convencional. Además, las diferencias podrían deberse a dos aspectos importantes: el primero sería la especificidad de la planta a las comunidades microbianas en la rizosfera y rizoplano en ambos tipos de maíz (Germida et al., 1998; Grayston et al., 1998). Es decir, la planta está restringiendo o dirigiendo el desarrollo de los microorganismos atraídos por sus exudados radicales, como una forma de mantener el control de las bacterias con las que interactúan, formando las condiciones selectivas de los organismos de la rizósfera como lo postulan Hartmann et al. (2008). En el segundo aspecto, habría que considerar también el efecto del nicho, es decir los tipos de bacterias que habitan en la rizósfera en comparación al tipo de bacterias que habitan en el rizoplano, ya que éstos (rizósfera y rizoplano) constituyen condiciones muy particulares, adecuadas para ciertos tipos de bacterias. El hecho de encontrar diferencias en los otros medios podría reforzar lo dicho anteriormente. Saxena y Stotzky (2001) tampoco encontraron diferencias estadísticas entre las unidades formadoras de colonia de las bacterias cultivadas (incluyendo actinomicetos) de la rizósfera del suelo de maíz Bt y no-Bt. Dunfield y Germida (2001) no observaron diferencias estadísticas significativas entre las poblaciones bacterianas al interior de la raíz de canola GM (tolerancia a herbicida).

En estudios previos, el conteo de UFC se ha realizado en un solo medio de cultivo o en placas BIOLOG para cuantificar las bacterias de la rizósfera o al interior de la raíz (Dunfield y Germida, 2001). También se han estimado dichas UFC usando el medio de cultivo para bacterias SEA (Saxena y Stotzky, 2001). Este es un estudio más completo en el aná-

lisis de las poblaciones bacterianas (UFC -1 de suelo) debido a que se empleó más de un tipo de medio semi-selectivo, los cuales han sido usados normalmente para aislar géneros tales como *Azospirillum* (Rojo Congo), *Rhizobium* (TY), *Azotobacter* (Ashby) y *Burkholderia* (Az). Sin embargo, se podrían aislar otros géneros pertenecientes a grupos bacterianos tales como alfa-proteobacteria, actinobacterias como se observará más adelante en los resultados de la identificación molecular.

Varios de los géneros identificados corresponden a bacterias reportadas con secuencias de organismos microbianos hallados en ambientes extremos (ártico, suelos alcalinos, etc.) o en suelos agrícolas pobres. Esto nos podría dar un indicio de la naturaleza del hábitat ya que estos suelos presentan características donde podría existir una amplia gama de bacterias diferentes. Estos resultados coinciden con los informados por Berg y Smalla (2009), quienes postulan que son varios los factores bióticos y abióticos que influyen en la estructura y diversidad funcional de las comunidades bacterianas, por ejemplo el tipo de suelo. Estos géneros también han sido aislados de la rizósfera y rizoplano de plantas de trigo, cítricos, lechuga y cacahuate; así como endófitas en raíces de soja, y semillas de tomate y arroz. Además, existe una concordancia con lo reportado por Fierer y Jackson (2006), quienes mencionan que la biogeografía microbiana es controlada principalmente por variables edáficas, especialmente el pH. El pH del suelo usado en la realización de este estudio fue alcalino.

Dentro de los principales géneros aislados tanto en la rizósfera del maíz convencional como en el maíz GM, el género con mayor abundancia fue *Bacillus* sp. Este género ha sido aislado del suelo de la rizósfera en soja (Wahyudi et al., 2011) y variedades de *Jatropha*, con la capacidad de resistencia a la sequía bajo el sistema de la raíz dedicada a la agricultura del desierto (Marasco et al., 2012). Además, se ha empleado como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo., en jitomate (Lagunas-Lagunas et al., 2001). Asimismo, este género es conocido por su capacidad de solubilizar fosfatos, como rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR) en plantas de trigo así como control biológico de enfermedades fúngicas tales como en pimiento (Lagunas-Lagunas et al., 2001). El otro género en abundancia fue *Brevibacterium* sp., el cual ha sido aislado en suelos sin potencial agrícola como el desierto y el ártico (Collins, 2006; Ambardar y Vakhlu, 2013). Además, a este género se lo ha considerado también como una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (Donmez et al., 2011). De las bacterias asociadas a la rizósfera del maíz GM se destacó *Serratia* sp. Esta bacteria se ha encontrado tanto en la rizósfera como en el rizoplano del maíz GM; es una bacteria endófitas asociada a la raíz de cacahuate y muestra capacidad inhibitoria contra algunos hongos que producen aflatoxinas (Wang et al., 2013).

Por otro lado, *Chryseobacterium* sp., fue el género más abundante aislado del rizoplano en el maíz convencional. Este género se ha asociado a la superficie radical de papa (Rashid et al., 2011) y también ha sido aislado de la rizósfera de *Crocus sativus*

(Ambardar y Vakhlu, 2013). Además, se lo ha hallado como endófito en raíces de soja, y ha sido aislado de suelos alcalinos y forestales (Li y Zhu, 2012) así como de la lechuga, cacahuete y cítricos (Trivedi et al., 2011). Aún más, es considerada una bacteria benéfica y con propiedades promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). El género *Rhizobium* sp., ha sido aislado de suelos donde se cultivan leguminosas; es capaz de disolver formas insolubles de fosfatos (Richardson et al., 2009; Bhattacharyya y Jha, 2012), y controla patógenos como resultado de la producción de antibióticos (Naveed et al., 2008). Además, ha sido aislado de nódulos de chícharos y es productor de AIA (Ahemad y Khan, 2012). También posee resistencia al arsénico (Jérémy et al., 2013). *Achromobacter* sp., es una PGPR que ha sido aislada de la rizósfera de tomate (Yang et al., 2009). Finalmente, el género *Cupriavidus* sp., se ha encontrado en suelos agrícolas con pH alcalino (Estrada de los Santos et al., 2011).

Corrales et al. (2007) y Aira et al. (2010) informaron que el genotipo de la planta de maíz modifica la estructura de las comunidades microbianas en la rizósfera debido a diferencias en sus exudados radicales. Conjuntamente, éstos crean un nicho específico que influye en que microorganismos la colonizarán, alterando de este modo la composición y la diversidad estructural de bacterias que habitan este nicho ecológico (Dohrmann y Tebbe, 2005; Singh y Mukerji, 2006). Sin embargo, Oliver et al. (2008) mencionaron que no existen diferencias significativas en la variabilidad de especies bacterianas que habitan en la rizósfera y rizoplano del maíz convencional con respecto al GM. En nuestro trabajo también observamos que los géneros en mayor abundancia en el maíz convencional y GM se encontraron en ambos tipos de maíz a nivel rizósfera. Estos géneros fueron *Brevibacterium* sp. (31,44% en convencional y 28,87% en GM) y *Bacillus* sp. (29,05% en convencional y 48,58% en GM). Estos resultados concuerdan con lo informado por Kapur et al. (2010) quienes, mediante pruebas bioquímicas, morfológicas y FAMES, encontraron que la mayoría de las colonias bacterianas pertenecieron al género *Bacillus* sp., en muestras de plantas de raíces de algodón Bt y no-Bt. El género *Bacillus* sp., también ha sido aislado del suelo de la rizósfera de nódulos de raíces en la raíz de soja, y como endófito en las semillas de tomate y en el arroz. Además este género es conocido por su capacidad de solubilizar fosfatos, como rizobacteria promotora del crecimiento vegetal y como control biológico de enfermedades fúngicas (Lottmann et al., 1999). El otro género en abundancia fue *Brevibacterium* sp., que ha sido aislado de suelos sin potencial agrícola, como el desierto y el ártico. A su vez, a este género se lo considera como una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (Lottmann et al., 1999).

El género *Rhizobium* sp., bacteria nodulante y fijadora de nitrógeno en leguminosas, fue el más abundante en el rizoplano de ambos tipos de maíz. Su presencia en el lote estudiado nos podría dar una idea de que en ese lote se sembraba previamente alguna leguminosa. Si consideramos el papel

que juegan en la raíz las diversas bacterias aisladas nos indicarían concordancias con lo reportado por Lottmann et al. (1999). Estos autores indicaron que no hay diferencias estadísticas en las funciones de las bacterias simbióticas encontradas en ambos tipos de cultivo. Whipps (2001) y Hartmann et al. (2008) también mencionaron que la modificación genética (GM) de la planta de maíz no ejerce cambios en las poblaciones bacterianas debido a que los géneros aislados de la rizósfera y rizoplano concuerdan, y varias de ellas son consideradas simbióticas o promotoras del crecimiento vegetal (Bashan et al., 2008).

A pesar de que solo entre 0,1 al 10% del total de las bacterias presentes en el suelo y en la rizosfera son aislables en medios de cultivo artificiales la técnica de dilución decimal en placa todavía se sigue utilizando. Esto se debe a que sigue siendo uno de los métodos más confiables en este tipo de estudios (Berg y Smalla, 2009). Sin embargo, este método posee limitaciones, y podría influenciar la diversidad aparente de las comunidades microbianas (Kirk et al., 2004). Por este motivo se utilizaron cuatro medios diferentes de cultivo para los aislamientos en este estudio.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados demostraron de una manera global que las poblaciones de bacterias que se encuentran en la rizósfera y el rizoplano de los maíces híbrido convencional y genéticamente modificado fueron similares. Sin embargo, hay que mencionar que hubo algunos géneros de bacterias que solo estuvieron presentes en el híbrido convencional o en el genéticamente modificado. Sin embargo no hubo diferencias significativas a nivel poblacional entre ambos tipos de maíz. Es decir, el maíz GM no afectó a las poblaciones de bacterias con las que interactuó. Sin embargo, habría que considerar que los ensayos se realizaron en macetas conteniendo suelo de campos donde se cultiva solo maíz y no directamente en campo. Esto es debido a que la ley de bioseguridad de México prohíbe la siembra de maíz OGM a cielo abierto.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo financiero de este trabajo mediante el proyecto SIP-20131773. Al CONACyT por la beca otorgada a Lourdes Vital (Beca: 260759).

REFERENCIAS

- Ahemad, M. y M.S. Khan (2012). Ecological assessment of biotoxicity of pesticides towards plant growth promoting activities of pea (*Pisum sativum*)-specific *Rhizobium* sp. strain MRP1. *Emirates Journal of Food Agriculture* 24: 334-343.

- Aira, M., M. Gómez-Brandón, C. Lazcano, E. Bååth y Domínguez (2010). Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 2276-2281.
- Ambardar, S. y J. Vakhlu (2013). Plant growth promoting bacteria from *Crocus sativus* rhizosphere. *World Journal of Microbiology Biotechnology* 209: 2271-2279.
- Antoun, H. y D. Prévost (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. En: Siddiqui, Z.A. (Ed.), pp. 1-38. PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Bashan, Y., G. Holguin y L.E. de-Bashan (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology* 50: 521-577.
- Bashan, Y. y L.E. de-Bashan (2005). Bacteria/plant growth-promotion. En: Hillel D. (Ed.), pp.103-115. Encyclopedia of soils in the environment. Elsevier, Oxford, UK.
- Bashan, Y., M.E. Puente, L.E. de-Bashan y J.P. Hernandez (2008). Environmental uses of plant growth-promoting bacteria. En: Ait Barka, E. y C. Clément (Eds.), pp 69-93..Plant-Microbe Interactions. Research Signpost, Trivandrum, Kerala, India (Chapter 4).
- Bhattacharyya, P.N. y D.K. Jha (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal Microbiology Biotechnology* 28:1327-1350.
- Berg, G. y K. Smalla (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* 68: 1-13.
- Beringer, J.E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology* 84: 188-198.
- Caballero-Mellado, J., M.G. Carcaño-Montiel y M.A. Mascarúa-Esparza (1992). Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. *Symbiosis* 13: 243-253.
- CIBIOGEM (2014). Monitoreo, Inspección y vigilancia: Actividades de monitoreo y vigilancia de la presencia de organismos genéticamente modificados en territorio mexicano. Disponible en: <http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/monitoreo>
- Collins, M. D. (2006). The Genus *Brevibacterium*. *Prokaryotes* 3: 1013-1019.
- Córdova-Bautista, Y., M.C. Rivera-Cruz, R. Ferrera-Cerrato, J.J. Obrador-Olán y V. Córdova-Ávalos (2009). Detección de bacterias benéficas en suelo con banano (Musa AAA Simmonds) cultivar 'Gran enano' y su potencial para integrar un biofertilizante. *Universidad y Ciencia* 25: 253-265.
- Corrales, I., M. Amenó, C. Poschenrieder y J. Barceló (2007). Phosphorus efficiency and root exudates in two contrasting tropical maize varieties. *Journal of Plant Nutrition* 30: 887-900.
- Dohrmann, A.B. y C.C. Tebbe (2005). Effect of Elevated Tropospheric Ozone on the Structure of Bacterial Communities Inhabiting the Rhizosphere of Herbaceous Plants Native to Germany. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 127750-7758.
- Dunfield, K.E. y J.J. Germida (2001). Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brassica napus*. *FEMS Microbiology Ecology* 38: 1-9.
- Dunfield, K.E. y J.J. Germida (2004). Impact of genetically modified crops on soil- and plant-associated microbial communities. *Journal of Environmental Quality* 33: 806-815.
- Estrada de los Santos P., N.B. Vacaseydel, N.B. Martínez-Aguilar, M.A. Cruz-Hernández, A. Mendoza-Herrera y J. Caballero-Mellado (2011). *Cupriavidus* and *Burkholderia* species associated with Agricultural Plants that grow in alkaline soils. *The Journal of Microbiology* 49: 867-976.
- Fierer, N. y R.B. Jackson (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 626-631.
- Germida, J.J., S.D. Sicilian, J. Renato de Freitas y A.M. Seib (1998). Diversity of root-associated bacteria associated with fieldgrown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology Ecology* 26: 43-50.
- Grayston, S.J., S. Wang, C.D. Campbell y A.C. Edwards (1998). Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 369-378.
- Griffiths, B.S., S. Caul, J. Thompson, A.N.E. Birch, C. Scrimgeour, J. Cortet, A. Foggo, C.A. Hackett y P. Henning Krogh (2006). Soil microbial and faunal community responses to Bt maize and insecticide in two soils. *Journal of Environmental Quality* 35: 734-741.
- Grifoni, A., M. Bazzicalupo, C. Di Serio, S. Fancelli y R. Fani (1995). Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of the 16S ADNr and of the histidine operon. *FEMS Microbiology Letter* 127: 85-91.
- Guo, M., M.A. Rupe, J. Wei, C. Winkler, M. Goncalves-Butruille, B.P. Weers, S.F. Cerwick, J.A. Dieter, K.E. Duncan, R.J. Howard, Z. Hou, C.M. Löffler, M. Cooper y C.R. Simmonds (2013). Maize *ARGOS 1* (*ZAR1*) transgenic alleles increase hybrid maize yield. *Journal of Experimental Botany* 1-12.
- Hani, A. y D. Prevost (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. En: Z.A. Siddiqui (Ed.). PGPR: Biocontrol and Biofertilization. 597 p.
- Harley, J.L. y J.S. Waid (1955). A method of studying active mycelia on living roots and other surfaces in the soil. *Transactions of the British Mycological Society* 38: 104-118.
- Hart, M.M., R.J. Powell, R.H. Gulden, K.E. Dunfield, K.P. Pauls, J.C. Swanton, N.J. Klironomos, P.M. Antunex, M.A. Koch y J.T. Trevors (2009). Separating the effect of crop from herbicide on soil microbial communities in glyphosate-resistant corn. *Pedobiología* 52: 253-262.
- Hartmann, A., M. Schmid, D. van-Tuinen y G. Berg (2008). Plant-driven selection of microbes. Springer Science. *Plant and Soil* 321: 235-257.
- Jérémy, A., F. Arsène-Ploetze, V. Barbe, C. Brochier-Armanet, J. Cleiss-Arnold, J.Y. Coppée, M.A. Dillies, L. Geist, A. Joublin, S. Koehler, F. Lassalle, M. Marchal, C. Médigue, D. Muller, X. Nesme, F. Plewniak, C. Proux, M.H. Ramírez-Bahena, C. Schenowitz, O. Sismeiro, D. Vallenet, J.M. Santini y N.P. Bertin (2013). Life in an arsenic-containing gold mine: genome and physiology of the autotrophic arsenite-oxidizing bacterium *Rhizobium* sp. NT-26. *Genome Biology and Evolution* 5: 934-953.
- Jiménez, D. (2007). Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* spp., mediante el análisis de restricción del ADN ribosomal 16S. Trabajo de grado previo a la obtención del título de Microbiólogo Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. 86 p.
- Kapur, M., R. Bhatia, G. Pandey, J. Pandey, D. Paul y R.K. Jain (2010). A case study for assessment of microbial community dynamics in genetically modified Bt cotton crop fields. *Current Microbiology* 61: 118-124.

- Kirk, J.L., A.B. Beaudette, M. Hart, P. Moutoglis, J.N. Klironomos, H. Lee y J.T. Trevors (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 58: 169-188.
- Lagunas-Lagunas, J., E. Zavaleta-Mejía, S. Osada-Kawasoe y S. Aranda-Ocampo (2001). *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Revista Mexicana de Fitopatología* 19: 57-65.
- Ley DOF (2005). Ley de bioseguridad de organismos genéticamente modificados. Disponible en: http://www.conacyt.gob.mx/ElConacyt/Documentos%20Normatividad/Ley_BOGM.pdf. Fecha de consulta: Julio 2013.
- Li, Z. y H. Zhu (2012). *Chryseobacterium vietnamense* sp. nov., isolated from forest soil. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 62: 827-31.
- Lottmann, J., H. Heuer, K. Smalla y G. Berg (1999). Influence of transgenic T4-lysozyme-producing potato plants on potentially beneficial plant-associated bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 29: 365-377.
- Lottmann, J., H. Heuer, J. De Vries, A. Mahn, K. Düring, W. Wackernagel, K. Smalla y G. Berg (2000). Establishment of introduced antagonistic bacteria in the rhizosphere of transgenic potatoes and their effect on the bacterial community. *FEMS Microbiology Ecology* 33: 41-49.
- Marasch, R., E. Rolli, B. Ettoumi, G. Vigani, F. Mappeli, S. Borin, A.F. Abou-Hadid, U.A. El-Behairy, C. Sorlini, A. Cherif, G. Zocchi y D. Daffonchio (2012). A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming. *PLoS One* 7: 1-14.
- Martínez, (2003). Manual de laboratorio: Microbiología ambiental. Primera edición. CEJA. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá. 180 p.
- Miethling-Graff, R., S. Dockhorn y C.C. Tebbe (2009). Release of the recombinant Cry3Bb1 protein of Bt maize MON88017 into field soil and detection of effects on the diversity of rhizosphere bacteria. *European Journal of Soil Biology* 46: 41-48.
- Mulder, C., M. Wouterse, M. Raubuch, W. Roelofs y M. Rutgers (2006). Can transgenic maize affect soil microbial communities? *PLoS Computational Biology* 2: e128. 1165-1172.
- Naveed, M., Z.A. Zahir, M. Khalid, H.N. Asghar, M.J. Akhatr y M. Arshad (2008). Rhizobacteria containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat under fertilized conditions. *Pakistan Journal of Botany* 40: 1231-1241.
- Oger, P., A. Petit y Y. Dessaux (1997). Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment. *Nature-Biotechnology* 15: 369-372.
- Oliver, K.L., R.C. Hamelin y W.E. Hintz (2008). Effects of Transgenic Hybrid Aspen Overexpressing Polyphenol Oxidase on Rhizosphere Diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 5340-5348.
- Pérez Castañeda, L.M., M.A. Cruz Hernández y A. Mendoza Herrera (2011). Variabilidad genética de aislamientos no-típicos de *Azospirillum brasilense* por análisis PCR-RFLP del ADN 16S ribosomal. *Phyton, International Journal of Experimental Botany* 80: 27-34.
- Rashid, R., T. Morohoshi, N. Someya y T. Ikeda (2011). Degradation of N-acylhomoserine lactone quorum sensing signaling molecules by potato root surface-associated *Chryseobacterium* strains. *Microbes Environmental* 26: 144-148.
- Richardson, A.E., J.M. Baréa, A.M. McNeill y C. Prigent-Combaret (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant soil* 321: 305-339.
- Rodríguez-Cáceres, E.A. (1982). Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 990.
- Saxena, D. y G. Stotzky (2001). *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1225-1230.
- SIAP-SAGARPA (2007). Situación Actual y Perspectivas del Maíz en México 1996 - 2012. México, D.F. 208 p.
- SFA SAGARPA (2011). Perspectivas de largo plazo para el sector agropecuario de México 2011-2020. Pp.10-15.
- Singh, G. y K.G. Mukerji (2006). Root Exudates as Determinant of Rhizospheric Microbial Biodiversity. En: K.G. Mukerji, C. Manoharachary y J. Singh (Eds.). *Microbial Activity in the Rhizosphere*. Springer- Soil Biology. Verlag Berlin Heidelberg 2006.7.
- Schmalenberger, A. y C.C. Tebbe (2002). Bacterial community composition in the rhizosphere of a transgenic, herbicide-resistant maize (*Zea mays*) and comparison to its non-transgenic cultivar Bosphore. *FEMS Microbiology Ecology* 40: 29-37.
- Tomás-Sábado, J. (2010). Fundamentos de bioestadística y análisis de datos para enfermería. En: Trivium Enfermería. Universidad Autónoma de Barcelona. pp. 82-92. Vol. 2: 146 p. Búsqueda en línea: http://books.google.com.mx/books?id=MHgap8IN124C&hl=es&source=gbs_navlinks_s.
- Trivedi, P., T. Spann y N. Wang (2011). Isolation and characterization of beneficial bacteria associated with citrus roots in Florida. *Microbial Ecology* 62: 324-336.
- Wahyudi, A.T., R.P. Astuti, A. Widayati, A. Meryandini y A.A. Nawangsih (2011). Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* 3: 34-40.
- Wang, K., P.S. Yan, Q.L. Ding, Q.X. Wu, Z.B. Wang y J. Peng (2013). Diversity of culturable root-associated/endophytic bacteria and their chitinolytic and aflatoxin inhibition activity of peanut plant in China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29: 1-10.
- Watson, R.J., R. Heys, T. Martin y M. Savard (2001). *Sinorhizobium meliloti* cells require Biotin and either Cobalt or Methionine for Growth. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3767-3770.
- Whipps, J.M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52: 487-511.
- www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/sistema-nacional-de-informacion/estadisticas
- Yang, J., Kloeppe, J. W. y C.-M. Ryu (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*. 14(1):1-4