

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**



**EFEECTO EN LA DIVERSIDAD BACTERIANA ASOCIADA A LA RIZOSFERA DE UN  
ALGODÓN TRANSGÉNICO CON RESPECTO A UNO CONVENCIONAL**

**TESIS  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR  
EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

**P R E S E N T A:**

**M. en C. LOURDES VITAL LÓPEZ**

**DIRECTORES DE TESIS:**

**D. en C. ALBERTO MENDOZA HERRERA  
D. en C. CYNTHIA ORDAZ PICHARDO**

REYNOSA, TAMPS

JUNIO, 2018

	<b>Pág.</b>
LISTA DE FIGURAS .....	5
LISTA DE TABLAS .....	12
DEDICATORIA .....	13
AGRADECIMIENTOS .....	17
ABREVIATURAS .....	19
RESUMEN .....	20
ABSTRACT.....	21
1. INTRODUCCIÓN.....	22
2. ANTECEDENTES.....	23
<b>2.1 Producción de algodón en México y en el mundo</b> .....	23
<b>2.2 Adopción en el mundo de cultivos biotecnológicos</b> .....	24
<b>2.3 Composición de las comunidades bacterianas</b> .....	27
3. JUSTIFICACIÓN .....	31
4. HIPÓTESIS.....	32
5. OBJETIVOS.....	32
<b>5.1 Objetivo general</b> .....	32
<b>5.2 Objetivos específicos</b> .....	32
6. METODOLOGÍA .....	33
<b>6.1 Diseño experimental y muestreo del suelo</b> .....	33
<b>6.2 Determinación de las propiedades fisicoquímicos del suelo</b> .....	33
<b>6. 3 Material biológico</b> .....	34
<b>6.3 Determinación de las comunidades bacterianas empleando secuenciación masiva de próxima generación (NGS, Next Generation Sequencing)</b> .....	37
<b>6.3.1 Extracción de ADN metagenómico</b> .....	37
<b>6.3.4 Análisis bioinformático</b> .....	40
<b>6.3.4.1 Análisis taxonómico y filogenético</b> .....	40
<b>6.3.4.2 Alfa diversidad</b> .....	41
<b>6.3.4.3 Beta diversidad</b> .....	41
<b>6.3.4.4 Comparación de categorías mediante análisis discriminante lineal junto con el tamaño del efecto (Lefse, Linear discriminant analysis effect size)</b> .....	42
<b>6.4 Caracterización de los componentes de los exudados radiculares</b> .....	42
<b>6.4.1 Lavado y limpieza del material biológico</b> .....	42

6.4.2	Trasplante de las plántulas de algodón convencional (variedad FM-989) y transgénico (FM9250GL y FM1740) y colecta de los exudados radiculares .....	43
6.4.3	Cromatografía en capa fina (CCF).....	44
6.4.4	Preparación de la muestra para Resonancia Magnética Nuclear (RMN) .....	46
7.	RESULTADOS .....	47
7.1	Análisis de las propiedades fisicoquímicas del suelo. ....	47
7.2	Extracción de ADN metagenómico de las muestras colectadas en la siembra del año 2015 y 2016 .....	49
7.3	Amplificación del gen 16S ADN ribosomal de las muestras colectadas en la siembra del año 2015 y 2016 .....	53
7.4	Amplificación de la región hipervariable V3 (PCR anidada) de las muestras colectadas en la siembra del año 2015 y 2016 .....	59
7.5	Muestras de suelo antes de la siembra (Bulk Soil, BS) .....	65
7.5.1	Abundancia relativa (BS).....	65
7.5.2	Alfa diversidad (BS). ....	65
7.5.3	Beta diversidad (BS).....	65
7.6	Análisis de la secuenciación de las muestras derivadas de la rizosfera del año 2015 .....	69
7.6.1	Secuenciación .....	69
7.6.2	Abundancia relativa .....	70
7.6.3	Alfa diversidad (análisis de rarefacción) .....	72
7.6.4	Beta diversidad.....	74
7.7	Análisis de la secuenciación de las muestras derivadas de la rizosfera del año 2015 y 2016 .....	75
7.7.1	Abundancia relativa de las muestras colectadas durante la etapa vegetativa y floración (2015 y 2016).....	76
7.7.2	Distribución de las comunidades bacteriana de las muestras de suelo (Bulk soil, BS) y de la rizosfera colectadas durante la etapa vegetativa y floración en el año 2015 y 2016 .....	87
7.7.3	Alfa diversidad de las muestras de suelo (Bulk soil, BS) y de la rizosfera colectadas durante la etapa vegetativa y floración en el año 2015 y 2016.....	89
7.7.3.1	Especies observadas .....	89
7.7.3.2	Estimador de Chao1 .....	90
7.7.3.3	Índice de Shannon.....	90
7.7.3.4	Índice de Simpson .....	91
7.7.4	Beta diversidad de las muestras de suelo (Bulk soil, BS) y de la rizosfera colectadas durante la etapa vegetativa y floración en el año 2015 y 2016.....	94

<b>7.7.5 Análisis estadístico: comparación de categorías para identificar los biomarcadores metagenómicos</b> .....	98
<b>7.8 Cromatografía en Capa Fina (TLC)</b> .....	105
<b>7.9 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)</b> .....	114
8. DISCUSIÓN .....	119
9. CONCLUSIONES .....	123
10. REFERENCIAS.....	125
11. APÉNDICE .....	131

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Superficie mundial de cultivos biotecnológicos, millones de hectáreas (1996-2016) .	25
<b>Figura 2.</b> Área mundial de los cultivos biotecnológicos, 1996-2016 por cultivo (Millón de hectáreas, Millón de Acres) .....	26
<b>Figura 3.</b> Tasa de adopción global (%) de los principales cultivos biotecnológicos (Millón de hectáreas, Millón de Acres) .....	26
<b>Figura 4.</b> Factores que influyen las comunidades microbianas y el modelo de ¿cómo las comunidades fueron seleccionadas del suelo? .....	27
<b>Figura 5.</b> La rizosfera es la zona marcada del suelo (pocos milímetros de ancho) que rodea y está influenciada por las raíces de las plantas .....	28
<b>Figura 6.</b> Esquema del diseño experimental .....	35
<b>Figura 7.</b> Siembra en el campo experimental .....	35
<b>Figura 8.</b> Etapas de colecta durante la temporada 2015 .....	36
<b>Figura 9.</b> Etapas de colecta durante la temporada 2016 .....	37
<b>Figura 10.</b> ADN metagenómico obtenido de las muestras de suelo antes de la siembra. M= Marcador ADN Lambda. T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27).....	49
<b>Figura 11.</b> ADN metagenómico obtenido de las muestras de rizosfera de las plantas de algodón en la etapa vegetativa. M= Marcador ADN Lambda. T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27) .....	50
<b>Figura 12.</b> ADN metagenómico obtenido de las muestras de rizosfera de las plantas de algodón en la etapa floración. M= Marcador ADN Lambda. T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27) .....	50
<b>Figura 13.</b> ADN metagenómico obtenido de las muestras de rizosfera de las plantas de algodón en la etapa cosecha. M= Marcador ADN Lambda. T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27) .....	51
<b>Figura 14.</b> ADN metagenómico obtenido de las muestras de rizosfera colectadas durante la etapa vegetativa 2016. M= Marcador ADN Lambda. T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27). .....	51

<b>Figura 15.</b> ADN metagenómico obtenido de las muestras de rizosfera de las plantas de algodón en la etapa floración. M= Marcador ADN Lambda. T1=algodón convencional (1-9), T2=algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=algodón transgénico 2 (carril 19-27) .....	52
<b>Figura 16.</b> Amplificación del gen 16S ADN ribosomal de las muestras del suelo antes de la siembra 2015. M= Marcador Hyperladder™ I, CP= Control positivo (Cepa <i>Sphingobium</i> sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27) .....	53
<b>Figura 17.</b> Amplificación del gen 16S ADN ribosomal de la rizosfera de las algodón convencional y transgénico de la etapa vegetativa del 2015. M= Marcador Hyperladder™ I, CP= Control positivo (Cepa <i>Sphingobium</i> sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27) .....	54
<b>Figura 18.</b> Amplificación del gen 16S ADN ribosomal de la rizosfera de las algodón convencional y transgénico de la etapa floración del 2015. M= Marcador Hyperladder™ I, CP= Control positivo (Cepa <i>Sphingobium</i> sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27) .....	55
<b>Figura 19.</b> Amplificación del gen 16S ADN ribosomal de la rizosfera de las algodón convencional y transgénico de la etapa cosecha del 2015. M= Marcador Hyperladder™ I, CP= Control positivo (Cepa <i>Sphingobium</i> sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27) .....	56
<b>Figura 20.</b> Amplificación del gen 16S ADN ribosomal de las muestras de rizosfera colectadas durante la etapa vegetativa del 2016. M= Marcador Hyperladder™ I, CP= Control positivo (Cepa <i>Sphingobium</i> sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27) .....	57
<b>Figura 21.</b> Amplificación del gen 16S ADN ribosomal de la rizosfera de las algodón convencional y transgénico de la etapa floración del 2016. M= Marcador Hyperladder™ I, CP= Control positivo (Cepa <i>Sphingobium</i> sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27) .....	58

**Figura 22.** Amplificación de la región hipervariable V3 del gen 16S ADN ribosomal derivado de las muestras de suelo. M1=Marcador de ADN lambda, M2=BenchTop de Promega, CP= Control positivo (Cepa *Sphingobium* sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27) ..... 59

**Figura 23.** Amplificación de la región hipervariable V3 del gen 16S ADN ribosomal derivado de la rizosfera de las algodón convencional y transgénico de la etapa vegetativa. M= BenchTop de Promega, CP= Control positivo (Cepa *Sphingobium* sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27)..... 60

**Figura 24.** Amplificación de la región hipervariable V3 del gen 16S ADN ribosomal derivado de la rizosfera de las algodón convencional y transgénico de la etapa floración. M= BenchTop de Promega, CP= Control positivo (Cepa *Sphingobium* sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27)..... 61

**Figura 25.** Amplificación de la región hipervariable V3 del gen 16S ADN ribosomal derivado de la rizosfera de las algodón convencional y transgénico de la etapa cosecha. M= BenchTop de Promega, CP= Control positivo (Cepa *Sphingobium* sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27)..... 62

**Figura 26.** Amplificación de la región hipervariable V3 del gen 16S ADN ribosomal derivado de las muestras de rizosfera colectadas durante la etapa vegetativa del 2016. M= Marcador BenchTop de Promega, CP= Control positivo (Cepa *Sphingobium* sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27)..... 63

**Figura 27.** Amplificación de la región hipervariable V3 del gen 16S ADN ribosomal derivado de las muestras de rizosfera colectadas durante la etapa floración del 2016. M= Marcador BenchTop de Promega, CP= Control positivo (Cepa *Sphingobium* sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27)..... 64

<b>Figura 28.</b> Abundancia relativa representada en porcentaje derivado de las muestras de suelo. BS1 (muestra de suelo 1), BS2 (muestra de suelo 2) y BS3 (muestra de suelo 3). (A) Nivel taxonómico Phyla y (B) nivel taxonómico Familias.....	67
<b>Figura 29.</b> Alfa diversidad de las muestras de suelo (BS1, BS2 y BS3). El número de especies observadas, índice de Shannon, índice de Simpson y Chao1 de cada muestra .....	68
<b>Figura 30.</b> Gráfico Heatmap que muestra los OTUs más abundantes y el método de agrupamiento fue en base a la abundancia relativa. La figura muestra en color representando la muestra de suelo 1 (BS1), 2 (BS2) y 3 (BS3) agrupadas en el eje vertical y el género al que pertenecen el eje horizontal de acuerdo a su abundancia. Los rangos de la abundancia relativa van de 1.4 a 15.8 en color de intensidad de naranja (baja abundancia) a rojo (alta abundancia) .	69
<b>Figura 31.</b> Abundancia relativa representada en porcentaje derivado de las muestras de suelo y rizosfera determinadas mediante la plataforma A) MG-RAST y B) QIIME. T1=algodón convencional, T2=Algodón transgénico 1 y GM2=Algodón transgénico 2. BS= Suelo antes de la siembra, VS=Etapa vegetativa (Vegetativa stage), FS= Etapa de floración (Flowering stage) y HS=Etapa de cosecha (Harvest stage) .....	71
<b>Figura 32.</b> Análisis de Alfa diversidad calculados mediante la plataforma QIIME. A) Índice de diversidad de Shannon y B) Índice de Simpson. T1=Algodón convencional, T2=Algodón transgénico 1 y GM2=Algodón transgénico 2. BS= Suelo antes de la siembra, VS=Etapa vegetativa (Vegetativa stage), FS= Etapa de floración (Flowering stage) y HS=Etapa de cosecha (Harvest stage) .....	73
<b>Figura 33.</b> Análisis de componentes coordinados (PCoA) empleando la plataforma QIIME. T1=Algodón convencional, T2=Algodón transgénico 1 y GM2=Algodón transgénico 2. BS= Suelo antes de la siembra, VS=Etapa vegetativa (Vegetativa stage), FS= Etapa de floración (Flowering stage) y HS=Etapa de cosecha (Harvest stage) .....	74
<b>Figura 34.</b> Abundancia relativa representada en porcentaje derivado de las muestras de suelo y rizosfera colectadas en la etapa vegetativa 2015 y 2016. BS= Suelo (inicio de la siembra), T1= Convencional, T1= Transgénico 1 y T2=Transgénico 2. Cada barra representa la media de las abundancias relativas por triplicado. A) Phylum y B) Familia.....	81
<b>Figura 35.</b> Abundancia relativa representada en porcentaje derivado de las muestras de suelo y rizosfera colectadas en la etapa vegetativa 2015 y 2016. BS= Before sowing (inicio de la siembra), CONV= Convencional, GM1= Transgénico 1 y GM2=Transgénico 2. Cada barra	



representa la media de las abundancias relativas por triplicado. A 15 géneros de mayor abundancia; B los próximos 11 géneros (<3.0%) ..... 83

**Figura 36.** El árbol filogenético fue calculado utilizando el método neighbor-joining y la relación entre las muestras fueron determinadas con la distancia de Bray Curtis y el método de agrupamiento completo. El gráfico Heatmap se generó empleando un script R y ordenó abundancia relativas arriba de 1 %. La intensidad de la abundancia relativa oscila en el rango de -1 a 3 en la escala Z score (ésta indicando las desviaciones estándar de un valor de abundancia representada en media). BS= Before sowing (inicio de la siembra), T1= Convencional, T2= Transgénico 1 y T3=Transgénico 2 ..... 88

**Figura 37.** Especies observadas e índice de Chao1. T1= Convencional, T2= Transgénico 1 y T3=Transgénico 2. BS=Before sowing (antes de la siembra), VS=Vegetative stage (etapa vegetative) y FS=Flowering stage (etapa de floración) durante el 15 (año 2015) y 16 (año 2016) ..... 93

**Figura 38.** Índice de Shannon e índice de Simpson. T1= Convencional, T2= Transgénico 1 y T3=Transgénico 2. BS=Before sowing (antes de la siembra), VS=vegetative stage (etapa vegetative) y FS=Flowering stage (etapa de floración) durante el 15 (año 2015) y 16 (año 2016) ..... 94

**Figura 39.** Análisis de Coordenadas Principales (PcoA) unweighted de las comunidades rizobacterianas identificadas durante la etapa vegetativa y floración durante dos años de siembra (2015-2016). T1= Convencional, T2= Transgénico 1 y T3=Transgénico 2. BS=Suelo (antes de la siembra), VS=Vegetative stage (etapa vegetative) y FS=Flowering stage (etapa de floración) .. 95

**Figura 40.** Análisis de Coordenadas Principales (PcoA) weighted de las comunidades rizobacterianas identificadas durante la etapa vegetativa y floración durante dos años de siembra (2015-2016). T1= Convencional, T2= Transgénico 1 y T3=Transgénico 2. BS=Suelo (antes de la siembra), VS=Vegetative stage (etapa vegetative) y FS=Flowering stage (etapa de floración) .. 96

**Figura 41.** Árbol de Agrupamiento jerárquico de las comunidades rizobacterianas durante la etapa vegetativa y floración durante dos años de siembra (2015-2016). T1= Convencional, T2= Transgénico 1 y T3=Transgénico 2. BS=Suelo (antes de la siembra), VS=Vegetative stage (etapa vegetative) y FS=Flowering stage (etapa de floración) ..... 97

<b>Figura 42.</b> Análisis Lefse empleando el análisis discriminante lineal (LDA, Linear Discriminant analysis) a nivel de género. Suelo (BS), Algodón convencional (T1) y Transgénico (T2 y T3) durante la etapa vegetativa del año 2015 .....	100
<b>Figura 43.</b> Análisis Lefse empleando el análisis discriminante lineal (LDA, Linear Discriminant analysis) a nivel de género. Suelo (soil), Algodón convencional (T1) y Transgénico (T2 y T3) durante la etapa vegetativa del año 2016 .....	101
<b>Figura 44.</b> Análisis Lefse empleando el análisis discriminante lineal (LDA, Linear Discriminant analysis) a nivel de género. Suelo (soil), Algodón convencional (T1) y Transgénico (T2 y T3) durante la etapa de floración del año 2015 .....	103
<b>Figura 45.</b> Análisis Lefse empleando el análisis discriminante lineal (LDA, Linear Discriminant analysis) a nivel de género. Suelo (soil), Algodón convencional (T1) y Transgénico (T2 y T3) durante la etapa de floración del año 2016 .....	104
<b>Figura 46.</b> CCF de los de azúcares a utilizar como estándares. Empleando una fase móvil CH <sub>3</sub> CN (acetonitrilo): H <sub>2</sub> O (85:15, v/v) .....	105
<b>Figura 47.</b> CCF de los exudados radiculares de algodón Convencional (T1), Transgénico 1 (T2) y Transgénico 2 (T3) colectados a los 7, 10, 14, 23 y 41 días de crecimiento. Empleando una fase móvil CH <sub>3</sub> CN (Acetonitrilo): Metanol: H <sub>2</sub> O (6:3:1). Revelando con A) Yodo y B) Molish. Control=H1 y H1/2 (medio Hoagland) .....	106
<b>Figura 48.</b> CCF de los exudados radiculares del algodón Convencional (T1), Transgénico 1 (T2) y Transgénico 2 (T3) colectados a los 7, 10, 14, 23 y 41 días de crecimiento. Empleando una fase móvil CH <sub>3</sub> CN (Acetonitrilo): Metanol: H <sub>2</sub> O (6:3:1 v/v/v) y reveladores A) Dragendorff, B) NaOH y C) FeCl <sub>3</sub> . Control=H1 y H1/2 (medio Hoagland) .....	107
<b>Figura 49.</b> CCF de los exudados radiculares del algodón Convencional (T1), Transgénico 1 (T2) y Transgénico 2 (T3) colectados a los 7, 10, 14, 23 y 41 días de crecimiento. Empleando una fase móvil CH <sub>3</sub> CN (Acetonitrilo): Metanol: H <sub>2</sub> O (6:3:1 v/v/v) y reveladores A) Folin-Ciocalteu, B) Baljet y C) 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) .....	108
<b>Figura 50.</b> TLC de los exudados radiculares de algodón Convencional (T1), Transgénico 1 (T2) y Transgénico 2 (T3) colectados a los 7, 10, 14, 23 y 41 días de crecimiento. Empleando una fase móvil de Hexano. Reveladores A) Salkowski y B) Rosenthaler (Vainillina) .....	109

<b>Figura 51.</b> CCF de los exudados radiculares de algodón Convencional (T1), Transgénico 1 (T2) y Transgénico 2 (T3) colectados a los 7, 10, 14, 23 y 41 días de crecimiento. Empleando una fase móvil de Hexano. Reveladores A) NH <sub>4</sub> OH (Hidróxido de amonio) y B) Ehrlich .....	110
<b>Figura 52.</b> TLC de los exudados radiculares de algodón transgénico 1 (T2) colectados a 41 días de crecimiento. Empleando una fase móvil CH <sub>3</sub> CN (Acetonitrilo): H <sub>2</sub> O (85:15, v/v) y revelador de Molish. ....	111
<b>Figura 53.</b> CCF de los exudados radiculares de algodón Convencional (T1), Transgénico 1 (T2) colectado a los 42 días de crecimiento (7 días en agua desionizada). Empleando una fase móvil CH <sub>3</sub> CN (Acetonitrilo): H <sub>2</sub> O (85:15, v/v).....	112
<b>Figura 54.</b> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear <sup>1</sup> H de los exudados radiculares del algodón Convencional (T1) crecidos en 42 días en medio Hoagland (previamente desalinizados). Región 0 ppm (TSP referencia interna) y región del agua (5.16–4.70) ppm. Región 0 ppm (TSP referencia interna) y región del agua (5.16–4.70) ppm.....	114
<b>Figura 55.</b> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear <sup>1</sup> H de los exudados radiculares del algodón Convencional (T1), Transgénico 1 (T2) y Transgénico 2 (T3). Convencional (línea en rojo), transgénico 1 (línea en verde) y transgénico 2 (línea en azul). Región 0 ppm (TSP referencia interna) y región del agua (5.16–4.70) ppm.....	115
<b>Figura 56.</b> Análisis del espectro empleando la plataforma Chenomx a partir del exudado radicular del algodón convencional (T1). A. Compuestos nitrogenados. B. Carbohidratos. C Acetoacetato.....	117
<b>Figura 57.</b> Análisis de Componentes principales de los exudados radiculares del algodón Convencional (T1), Transgénico 1 (T2) y Transgénico 2 (T3) colectados a los 42 días de crecimiento.....	118

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Producción y rendimiento del algodón hueso en México.....	23
<b>Tabla 2.</b> Suministro mundial de algodón, el uso y el comercio .....	24
<b>Tabla 3.</b> Condiciones para la amplificación del gen 16S ADN ribosomal .....	38
<b>Tabla 4.</b> Reactivos y concentraciones empleadas en la amplificación del gen 16S ADNr.....	38
<b>Tabla 5.</b> Condiciones para la amplificación la región hipervariable V3 del gen 16S ADNr.....	39
<b>Tabla 6.</b> Reactivos y concentraciones empleadas la amplificación la región hipervariable V3 del gen 16S ADNr.....	39
<b>Tabla 7.</b> Lista de oligonucleótidos forward y reverse .....	40
<b>Tabla 8.</b> Composición del medio Hoaglands .....	44
<b>Tabla 9.</b> Reveladores específicos para determinar los grupos químicos en los exudados radiculares .....	45
<b>Tabla 10.</b> Propiedades fisicoquímicas de las muestras de suelo colectadas durante la siembra 2015 y 2016.....	48
<b>Tabla 11.</b> Secuencias obtenidas de la rizosfera durante la temporada de siembra 2015.....	70
<b>Tabla 12.</b> Secuencias obtenidas de la rizosfera durante la temporada de siembra 2015 y 2016..	75
<b>Tabla 13.</b> Resultados de las pruebas y grupos químicos encontrados en cada uno de los exudados radiculares .....	113

## DEDICATORIA

Le dedico esta tesis al Doctor Alberto Mendoza quien fue mi director de tesis de maestría (2011-2013) y de Doctorado (2014 hasta el 21 de Diciembre del 2017). Él, me enseñó a amar la ciencia, específicamente a las bacterias que habitan en la rizosfera de las plantas. Así fue como supe que en el suelo existen bacterias buenas (Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal) y malas (Fito patógenas).



El doctor me platicó acerca de una en particular, *Azospirillum brasilense*. Pude darme cuenta que esta bacteria fue una de las preferidas del Doctor pues trabajó muchos años con esta cepa muy interesante y versátil. Durante mi maestría, el Doctor me asesoró y aconsejó en todos los experimentos por medio de dibujos ilustrativos puesto que mi perfil es ingeniero químico y no tenía muchas nociones de la biología molecular. Le agradezco la paciencia que me tuvo y el creer que podía incursionar en el área de la Biotecnología. Asimismo, el Doctor me envió al CIBNOR con sus amigos a quienes tanto apreciaba a la Dra. Luz de-Bashan y al Dr. Yoav Bashan. En el laboratorio de Microbiología Ambiental, aprendí a trabajar en equipo, la estadística como una herramienta importante de trabajo y obtuve la amistad de varios integrantes del mismo. “La Paz hermosa” como el Dr. decía fue un lugar importante para Él y le agradezco me haya concedido el honor de conocer la ciudad y a los amigos que tanto apreció.



Posteriormente, fue y será mi director de tesis de Doctorado. En esta parte de mi vida fue un gran reto puesto hubo retos de aprendizaje tanto en la vida personal como profesional. El Doctor siempre fue una persona sonriente y le encantaba decirnos que nos tenía una noticia: “les tengo una buena y una mala, cual quieren primero?” aunque todas eran malas jejeje.

Siempre se sonreía, pues era casi siempre una casualidad que me enviara de estancias de investigación días previos a mi cumpleaños. Siempre podías confiar en Él para decir lo que pensabas, te daba el respaldo y la orientación que necesitabas para realizar todo e incluso cuando me decía se está desviando del objetivo.



Se convirtió en un amigo y hasta le llegué a decir que Él era como un padre para mí, pues siempre fue un soporte en todo y me impulsaba a seguir logrando más metas día con día. Jamás olvidaré las frases que utilizaba para resolver todos los problemas y que todo en esta vida es fácil de realizar (“Peccata minuta” y “Piece of cake”) y que cuando ya no había remedio pero para todo era necesario un plan B y terminaba diciéndome “Such is live”. O la frase de cuando eran muchas actividades que realizar en este proyecto me decías “una cosa a la vez”.



Además, cuando era fin de semestre y nos evaluabas en los seminarios, nos decías “este fin de semana juega mi equipo, Rayados del Monterrey y espero que gane porque si no voy a ponerme la capa del Diablo, es decir voy a ser muy preguntón en todo”.



Como olvidar, las conversaciones de camino hacia el campo experimental, giraban en torno a su familia que Él tanto amaba y de la cual siempre estaba pendiente. En estos últimos meses, me preguntaste acerca de que voy a hacer después del día de mi graduación de Doctorado porque es necesario saber qué harás el día de mañana. Tus últimas palabras dos días antes de tu partida, hablaste conmigo y me dijiste que terminara todos los pendientes y que me encargara de finalizar todo cuanto habíamos trabajado.



Así lo haré, fuiste mi mentor que consideré siempre como un **Papá** pues siempre estuviste allí en todo momento cuando necesité de tu ayuda y soporte. Agradezco todas sus enseñanzas, porque creíste en mí y que podría lograr convertirme en un buen investigador, aunque falta mucho para que suceda.



*Quiero decir, que tu partida súbita no fue fácil principalmente en tan sólo pensar que el día de mi examen no llegarás...así también no ha sido nada fácil cuando paso por tu cubículo y ya no estás allí para aconsejarme en las correcciones de la tesis y presentación para ese gran día!. En ese día yo pensaré que estás de estancia o una de tus viajes para no sentir tanto tu ausencia, aunque sé que ya no me preguntarás “¿Que va a hacer después de su examen de grado?, claro después de haberse tomado unas copas de vino?, lo cual yo te respondería “le voy a cumplir mi palabra el Postdoctorado en el extranjero del que siempre hablábamos!”.*

*Siento un gran compromiso en cumplir las metas y sueños que un día platicamos pues usted me dijo en Skype´s session last ones:*

[24/11/2016 10:12:16 a. m.] Alberto Mendoza Herrera: lo se Lulu, si bien es cierto que lo hago por el Lab también mucho por ud para que tenga oportunidades de irse al USA :) . No la corro pero para ud seria muy gratificante

[24/11/2016 10:14:33 a. m.] Alberto Mendoza Herrera: en fin es parte del show.....

[24/11/2016 10:14:55 a. m.] Alberto Mendoza Herrera: por otro lado Lulu ud se ha ganado todo esto y ya vera le ira super.

[24/11/2016 03:47:26 p. m.] Alberto Mendoza Herrera: ok, suerte Lulu



## AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional por brindarme la oportunidad de pertenecer en esta etapa de mi vida. En especial, al Centro de Biotecnología Genómica (CBG-IPN) por darme las herramientas necesarias para desarrollarme profesionalmente y ser mi segundo hogar durante estos años.

Mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada que me permitió lograr obtener este grado académico.

Al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI-IPN) por las becas otorgadas.

A todos los integrantes del Laboratorio Interacción Planta Microorganismo que colaboraron de manera sinérgica y mutua como soporte en esta tesis. En especial al Dr. Alberto Mendoza Herrera por haber sido como un Padre para mí en la ciencia, el soporte en la dirección de este trabajo, dejar que mis ideas fluyeran, por su paciencia y enseñanzas que me permitieron crecer personalmente y profesionalmente. Porque cuando tuve problemas incluso personales, siempre estuvo allí para darme respaldo y consejos en todo momento. Por eso y muchas razones más te estaré siempre agradecida.

A la Dra. Cynthia Ordaz Pichardo por haber sido una doctora muy paciente conmigo, apoyándome en todo y le agradezco toda la confianza que depositó en mí. Gracias por todas sus enseñanzas y mucha paciencia para conmigo sobre todo después de la pérdida de mi director de tesis.

A los integrantes del Laboratorio de Biotecnología industrial por todo el apoyo moral e incluso de material en reactivos que proporcionaron en esta tesis. En especial al Dr. José Narváez Zapata apoyo moral y profesional en esta tesis principalmente después de la partida de mi mentor, a lo cual aludo muchas gracias por todo y haberme escuchado cuando más necesité de un apoyo moral en la toma de decisiones hacia mi futuro profesional. Gracias por tenerme paciencia pues

después de la pérdida de mi Mentor, la productividad académica bajó pues perdí mi dirección, pero siempre estuviste allí para escucharme y apurarme sin presión.

A los integrantes del Laboratorio de Biología Celular y Producto naturales de la ENMYH en especial a Sergio, Daniel, David, Ricardo y al Dr. Jorge Cornejo por sus ideas y apoyo en este trabajo de Tesis.

Al Dr. Jaime García Mena del departamento de Genética y Biología molecular por su apoyo y soporte principalmente en la secuenciación masiva y su pronta colaboración en esta tesis. Además de sus integrantes Alberto Piña, Selvasankar y Otoniel por su apoyo en este trabajo doctoral.

A Nayelli Villalón y al Dr. Gerardo Zepeda del Laboratorio de Química Orgánica de la ENCB por todo su apoyo en este trabajo de tesis, gracias por su paciencia e interés en los momentos más difíciles de este proyecto.

A Ángel Salazar del Laboratorio de tejido vegetal quien me apoyara moralmente, con ideas y en espacio del Laboratorio para realizar los experimentos de este trabajo de tesis.

A mi amado esposo Rafael Rodríguez Martínez por todo su amor durante nuestros 7 años de matrimonio y que nunca me permitió rendirme. Gracias “mi vida” por estar ahí siempre creyendo en mí y sintiéndote orgulloso de cada logro obtenido. Gracias por recordándome que todo lo que me propongo lo logro pero sólo depende de Dios y de mí fuerza de voluntad, mi esfuerzo y dedicación para que suceda.

A mis amigos que siempre estuvieron allí para mí en todo momento difícil y tiempos de alegría. Gracias a ustedes que creyeron que podría lograrlo y decirme cada día que yo puedo lograr aún cosas mayores.

Y a todos los que de alguna manera contribuyeron en este trabajo.

Thank you very much!

## ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
μL	Microlitros
mL	Mililitro
P	Fósforo
N	Nitrógeno
NO <sub>3</sub>	Nitrato
K	Potasio
mM	Milimolar
μM	Micromolar
X	Número de veces
U/ μL	Unidades por microlitro
ng/μL	Nanogramos por microlitro
min	Minuto
s	Segundo
g	Gramo
sp.	Especie
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNr	Ácido Desoxirribonucleico ribosomal
ADNg	Ácido Desoxirribonucleico genómico
dNTP	Deoxinucleósido Trifosfato
x g	Fuerza Centrífuga Relativa (FCR)
Pb	Pares de base
NaCl	Cloruro de sodio
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa

## RESUMEN

Las plantas genéticamente modificadas o transgénicas se desarrollaron para mejorar sus características agronómicas tales como la Resistencia a insecto y tolerancia a herbicidas. Sin embargo, algunos investigadores hacen hincapié en demostrar la seguridad del medio ambiente antes de la comercialización de los OGMs porque estas plantas pueden liberar proteínas derivadas de la modificación genética a través de los exudados radiculares. Por lo tanto, generando condiciones que afectan a las interacciones complejas y delicadas de las comunidades microbianas a nivel de la rizosfera. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la composición y estructura de las comunidades rizobacterias con el fin de determinar si la diversidad bacteriana que habitan en la rizosfera de una variedad no transgénica difiere con respecto a la variedad transgénica de algodón y la caracterización los exudados radiculares del algodón convencional y transgénico. Se identificó la estructura de las comunidades rizobacterianas empleando la plataforma de MG-RAST y QIIME. Se colectó suelo antes de la siembra y rizosfera de las plantas de algodón no modificado (T1, convencional), genéticamente modificado 1 (T2, evento de la tolerancia al herbicida) y genéticamente modificado 2 (T3, evento de la tolerancia al herbicida y resistencia al insecto) colectadas durante la etapa vegetativa, de floración y cosecha durante un periodo de cultivo de dos años consecutivos (2015 al 2016). En primer lugar, se encontró que la asignación taxonómica fue más exacta con la plataforma QIIME, la cual a nivel de las familias asignadas fueron más que cuando se evaluó con MG-RAST. Los cambios de las comunidades rizobacterianas más notorios transcurrieron durante la etapa vegetativa y floración durante el año 2015. Luego, el análisis taxonómico indicó que en los suelos albergaron una mayor diversidad que en la rizosfera colectada durante el año 2015 y 2016. Además, en el año 2015, las comunidades bacterianas fueron similares entre los genotipos de algodón T1, T2 y T3. Sin embargo, en el año 2016 se empezaron a observar cambios en la diversidad entre las plantas de algodón convencional y transgénicos. Particularmente, se identificaron los OTUs de las Phormidiaceae la cual incrementó en el T3 (prácticamente éstas no fueron detectadas en la colecta de la etapa vegetativa del año 2015). El análisis del Espectro de Resonancia Magnética Nuclear y la cromatografía en capa fina mostró que los exudados de la raíz (azúcares y carbohidratos) estaban altamente representados en el genéticamente modificado que en el convencional. Concluimos que el aumento en la concentración de metabolitos (ppm) en estos exudados de raíz podría ser responsable del aumento en la diversidad bacteriana alrededor de la rizosfera de algodón transgénico.

## ABSTRACT

Genetically modified plants or transgenic were generated to mainly improve agronomic traits such as insect resistance and/or herbicide tolerance. Researchers argue that environmental safety must be demonstrated before using GMOs because these plants are able of releasing proteins derived from modified genes at their roots exudates. Therefore, could generate conditions that affect the complex and delicate interactions within the microbial soil communities at rhizosphere level. The main objective was to characterize the structure of bacterial communities that inhabiting in the rhizosphere derived from transgenic and conventional cotton over a two year cultivation period and characterize root exudates derived from conventional and transgenic cotton. We identified the structure of rhizobacterial communities by using MG-RAST (MetaGenome Rapid Annotation using Subsystem Technology) and QIIME (Quantitative Insights into Microbial Ecology) platform. Firstly, it was found that taxonomic assignment was more accurate with QIIME which, at family level, assigned a significantly higher number in comparison with MG-RAST. Then, soil before sowing and rhizosphere soil derived from non-modified (T1, conventional), genetically modified 1 (T2, herbicide tolerance trait) and genetically modified 2 (T3, herbicide tolerance and insect resistant trait) cotton plants were collected at vegetative, flowering and harvest stage across two years of cultivation period (2015-2016). The changes of the most notorious rhizobacterial communities occurred during the vegetative stage and flowering during 2015. The taxonomic analysis indicated that the soils harbored high diversity than rhizosphere collected at 2015 and 2016 year. Also, in 2015 year, bacterial communities were similar between T1, T2 and T3. However, in 2016 we observed changes in diversity between non modified and genetically modified cotton. Shannon and Simpson diversity indexes were higher in Transgenic than non-modified cotton genotypes. Particularly, it was identified some Phormidiaceae OTUs which increased in T3 (practically they were undetected in vegetative 2015 collection). Nuclear Magnetic Resonance Spectrum and Thin Layer Chromatography analysis showed that root exudates (sugars and carbohydrates) were highly represented genetically modified than in the conventional. We concluded that the increase in the metabolite concentration (ppm) in these root exudates could be responsible for the increase in the bacterial diversity around the rhizosphere of transgenic cotton.

# 1. INTRODUCCIÓN

El algodón tiene un gran impacto en la agroindustria (SAGARPA, 2017). México fue el decimotercer productor mundial con un volumen de 487,914 toneladas en el 2016 y la producción de este cultivo satisface 80% los requerimientos nacionales. En el comercio mundial, las transacciones de fibra se han incrementado, especialmente en países como Estados Unidos, España y Arabia Saudita, que se ubican entre los 10 principales importadores de este cultivo. Actualmente, México cubre 0.74% del total de las importaciones de Estados Unidos (SAGARPA, 2017). La producción del algodón se ve afectada por factores bióticos como lepidópteros, pulgones, araña roja, mosquita blanca, maleza, y abióticos como la sequía, propiedades fisicoquímicas del suelo, el clima entre otros. Para lo cual, las plantas transgénicas se han desarrollado con el objetivo de resolver diversos problemas tales como la tolerancia a factores ambientales, el aumento en la calidad nutricional de los cultivos, la productividad, resistencia a plagas y a enfermedades.

Dentro de los principales cultivos transgénicos se encuentran soya, maíz, *algodón* y canola, mismos que poseen eventos tales como la tolerancia a herbicida, resistencia a insecto o ambos eventos. Esta nueva tecnología es considerada como un instrumento alternativo para modificar y mejorar los cultivos; particularmente en el caso del algodón donde las pérdidas por insectos y malezas son altamente significativas. Sin embargo, algunos investigadores hacen hincapié en la importancia de demostrar la seguridad del ambiente antes de la comercialización de los Organismos Genéticamente Modificados, es por ello que las plantas genéticamente modificadas son un sistema modelo de estudio debido a que éste tipo de plantas podrían liberar exudados modificados y generar condiciones selectivas así como efectos negativos en las estructuras de las comunidades microbianas que habitan en la rizosfera de las mismas. Aunado a esto, las comunidades rizobacterianas son un elemento fundamental e importante en la calidad del suelo ya que afectan la fertilidad del mismo e influyen directamente en el crecimiento, nutrición y salud de la planta puesto que estas comunidades juegan un papel muy importante como el ciclo del nitrógeno, el metabolismo o la movilización de nutrientes entre otros. Es por ello que el objetivo de este trabajo es evaluar si la estructura de las comunidades microbianas que se establecen en la rizosfera del algodón transgénico es diferente con respecto a una variedad no transgénica

(convencional) y si estas modificaciones depende de la calidad y/o cantidad de exudados radiculares.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Producción de algodón en México y en el mundo

El algodón es la planta textil de fibra suave más importante del mundo. La especie del algodón que se cultiva en nuestro país es *Gossypium hirsutum* L., ésta es originaria de México y América Central (SFA-SAGARPA, 2011). La importancia de este cultivo destaca en lo económico, socioeconómico, comercial, alimenticio-medicinal e industrial. La producción de este cultivo se ve afectada por diversos factores bióticos y abióticos. En México existen los 8 estados productores de algodón son: Chihuahua, Baja California, Coahuila, Región Lagunera, Durango, Sonora, Tamaulipas y Sinaloa. Durante el año 2015 la producción anual alcanzó 625,723 toneladas con un rendimiento de cultivo de 4.34 ton/ha mientras que en el año 2016 fue de 489,548 toneladas con un rendimiento de cultivo de 4.52 ton/ha. En el año 2017 la producción anual alcanzó las 888,195 Toneladas (SIAP-SAGARPA, 2017) y el rendimiento de cultivo fue de 4.545 (ver Tabla 1).

**Tabla 1.** Producción y rendimiento del algodón hueso en México

Ubicación	Producción obtenida (Ton)	Rendimiento de cultivo obtenido (ton/ha)
<b>Chihuahua</b>	672,747	4.622
<b>Baja California</b>	100,472	4.874
<b>Coahuila</b>	69,411	4.501
<b>Tamaulipas</b>	22,972	3.112
<b>Durango</b>	14,398	4.738
<b>Sonora</b>	8,195	2.409
<b>Total</b>	888,195	4.545

Por otra parte, de acuerdo al reporte de la USDA (United States Department of Agriculture) 2018, Foreign Agricultural Service, los principales productores a nivel mundial son: India, China, Estados Unidos, Pakistán, Brasil, Australia, Turquía, entre otros (Tabla 2).

**Tabla 2.** Suministro mundial de algodón, el uso y el comercio (1000 MT).

	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17	Feb 2017/18
<b>Production</b>					
India	6,750	6,423	5,639	5,879	6,205
China	7,131	6,532	4,790	4,953	5,987
United States	2,811	3,553	2,806	3,738	4,630
Pakistan	2,068	2,308	1,524	1,676	1,785
Brazil	1,742	1,524	1,285	1,524	1,742
Australia	893	501	621	882	958
Turkey	501	697	577	697	871
Other	4,313	4,397	3,704	3,903	4,248
<b>Total</b>	<b>26,207</b>	<b>25,934</b>	<b>20,946</b>	<b>23,252</b>	<b>26,426</b>

A mediados de la década de 1990, la producción en México desapareció prácticamente debido al ataque de plagas. Es por ello que a partir del año 1996, el gobierno mexicano y de otros países como Estados Unidos aprobó la introducción de biotecnología en el cultivo de algodón, por lo que inició la siembra con semillas genéticamente modificadas. Cabe mencionar que los principales países productores del algodón genéticamente modificado o biotecnológico son: India, Estados Unidos, China y Pakistán (USDA, 2018).

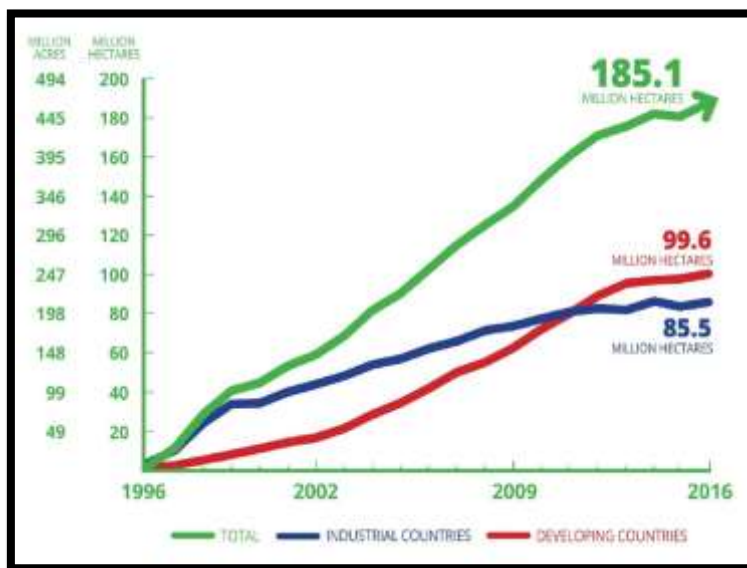
## 2.2 Adopción en el mundo de cultivos biotecnológicos

A nivel mundial, la superficie sembrada de plantas transgénicas, genéticamente modificadas (GM) continua incrementándose. Las plantas GM que primero se aprobaron fueron algodón, arroz y maíz para las pruebas de investigación y comercialización durante la mitad de los 1990s. La principal ventaja de estos cultivos son menos dañinos para el medio ambiente debido a la reducción gradual de la cantidad de insecticidas aplicados y que mejoran la productividad agrícola (Clive, 2013). Según la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), el uso de semillas GM en los cultivos de algodón reduce significativamente el volumen del agua requerido para el riego. El algodón GM puede aumentar la productividad y la



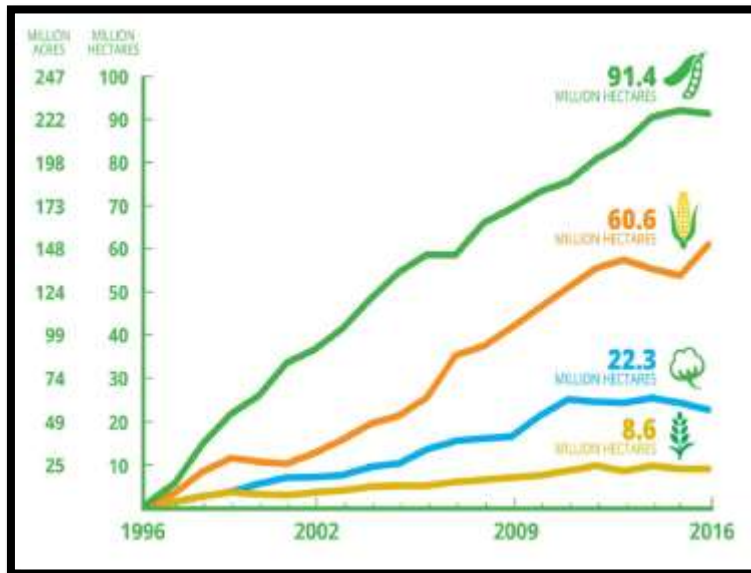
renta notablemente y, por tanto, pueden ser un motor de crecimiento económico rural que contribuya a mejorar las condiciones de vida de los agricultores.

Tal como se observa en la figura 1, la superficie sembrada de estos cultivos sigue incrementándose año tras año desde el inicio de su comercialización (1996-2016). El año 2016 fue el 20° año de comercialización de cultivos biotecnológicos. De 1996 a 2018, se ha incrementado el crecimiento tras 20 años consecutivos (ver figura 1) y aproximadamente 185.1 millones de hectáreas de estos cultivos se sembraron a nivel mundial el último año (Clive, 2016). Actualmente, la distribución de la superficie sembrada de estos cultivos se concentra principalmente en los países en desarrollo (19 países=54% de la superficie sembrada) en comparación con los países industrializados (7 países=46% de la superficie sembrada).

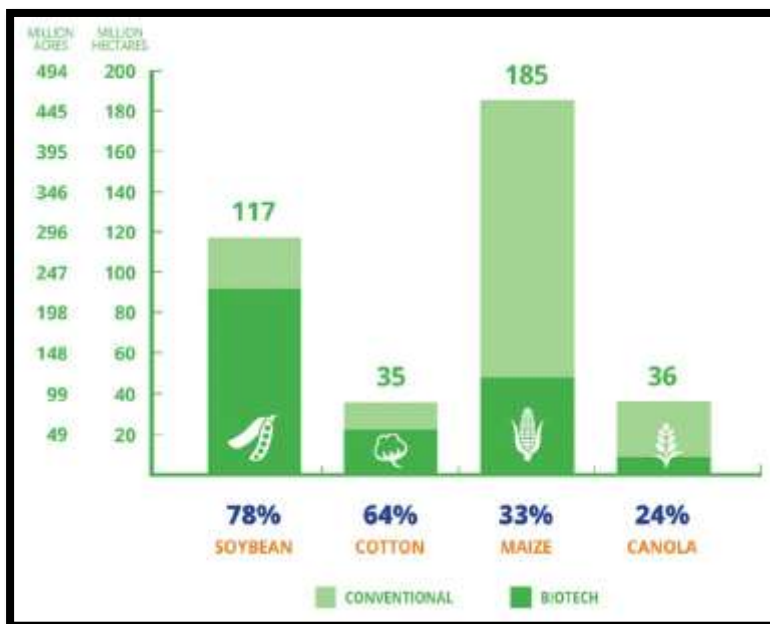


**Figura 1.** Superficie mundial de cultivos biotecnológicos, millones de hectáreas (1996-2016)

Dentro de los principales cultivos biotecnológicos a nivel mundial destacan la soya le sigue el maíz, el algodón y la canola (ver Figura 2). En la Figura 3 se observa la tasa de adopción global en porcentaje de los principales cultivos biotecnológicos, es importante resaltar que del 100% del algodón que se siembra, el 64% corresponde al GM.



**Figura 2.** Área mundial de los cultivos biotecnológicos, 1996-2016 por cultivo (Millón de hectáreas, Millón de Acres)

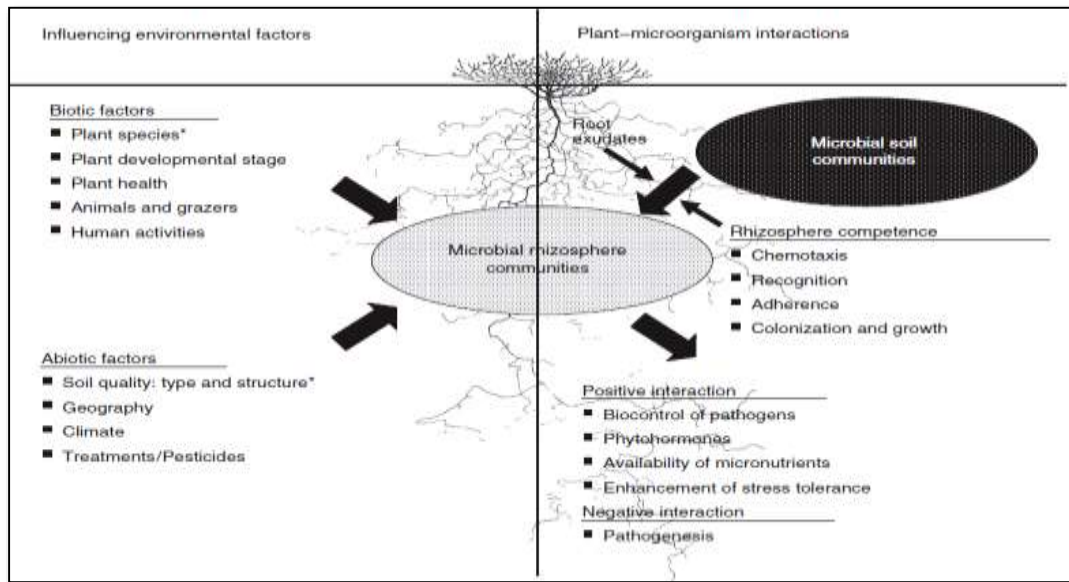


**Figura 3.** Tasa de adopción global (%) de los principales cultivos biotecnológicos (Millón de hectáreas, Millón de Acres)

En México se sembró cerca de 0.1 millones de hectáreas entre el algodón y la soya. El algodón transgénico se ha sembrado en México desde 1996 año en que se establecieron 896.8 ha en Tamaulipas, correspondiendo a un 0.3% de la superficie sembrada a nivel nacional. El porcentaje de algodón transgénico llegó a 60.6% de la superficie sembrada en México en el año 2004. Sin embargo, una preocupación importante de la introducción de cultivos transgénicos en los ecosistemas agrícolas son cuestionamientos de los posibles efectos ecológicos de estos cultivos en las comunidades microbianas del suelo, en particular los microbios de la rizosfera debido a su proximidad íntima en la raíz (Fang *et al.*, 2005; Mulder *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2011).

### 2.3 Composición de las comunidades bacterianas

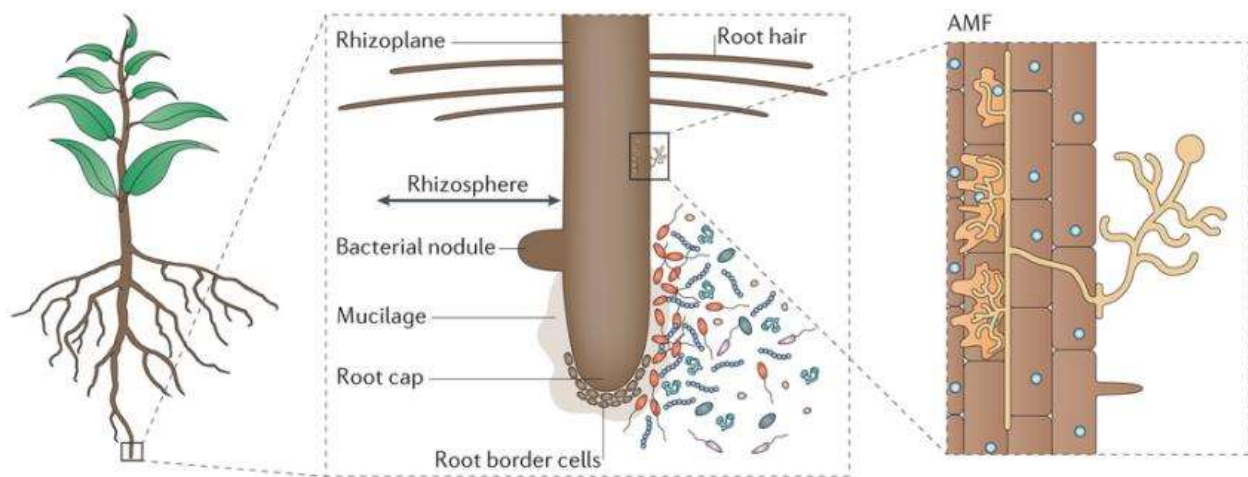
Existen diversos factores abióticos (propiedades fisicoquímicas del suelo, geografía, clima entre otros), bióticos (especie vegetal, desarrollo de la planta, salud de la planta, animales, entre otros) asumiendo una influencia en la diversidad estructural y funcional de las comunidades microbianas que habitan en la rizosfera (Berg and Smalla, 2009; Gomes *et al.*, 2001; Mansouri *et al.*, 2002) ver Figura 4.



**Figura 4.** Factores que influyen las comunidades microbianas y el modelo de ¿cómo las comunidades fueron seleccionadas del suelo?

Estudios han indicado que la especie vegetal, etapa de desarrollo de la planta y el tipo de suelo son los principales factores que determinan la composición de las comunidades rizobacterianas (Berg and Smalla, 2009; Dohrmann and Tebbe, 2005; Fang *et al.*, 2005; Schmalenberger and Tebbe, 2002). Muchos estudios han postulado que la composición de los exudados radiculares varía de una planta a otra y que afecta la abundancia relativa de los microorganismos en las inmediaciones de la raíz y el crecimiento en la estructura de las comunidades bacterianas del suelo y la rizosfera (Aira *et al.*, 2010).

Las raíces de las plantas ejercen un efecto en la rizosfera a través de la rizodeposición de exudados específicos, así que estos afectarán de manera específica a las comunidades microbianas (Bais *et al.*, 2006). La rizosfera es la zona estrecha del suelo que rodea y está influenciado por las raíces de la planta, alberga una gran cantidad de microorganismos e invertebrados y es considerada como una de las interfaces más dinámicas de la Tierra, ver Figura 5 (Philippot *et al.*, 2013).



**Figura 5.** La rizosfera es la zona marcada del suelo (pocos milímetros de ancho) que rodea y está influenciada por las raíces de las plantas

Por este motivo, las plantas transgénicas podrían cambiar el ambiente del suelo y los consorcios bacterianos de manera cualitativa y cuantitativamente a nivel de la rizosfera debido a la liberación de una composición alterada de exudados de las raíces (Philippot *et al.*, 2013). En consecuencia, las raíces de las plantas transgénicas dirigirán a una selección de las comunidades microbianas de

manera distinta en la rizosfera (Dunfield and Germida, 2003; Hartmann *et al.*, 2009). En este contexto, se ha demostrado que la especie vegetal puede seleccionar de manera específica su propia comunidad (Dohrmann and Tebbe, 2005) o incluso a nivel de cultivo (genotipo) sembrados en el mismo tipo de suelo (Schmalenberger and Tebbe, 2002). Además, se han encontrado efectos específicos del cultivo en algunos estudios donde la composición bacteriana así como de hongos asociados a raíz ha sido alterada (Castaldini *et al.*, 2005; Oger, 1997; Oliver *et al.*, 2008). En un estudio realizado en campo por Dunfield and Germida (2001) con el objetivo de identificar las diferencias entre las comunidades microbianas asociadas a la rizosfera de las plantas genéticamente modificada con respecto a la variedad convencional y a su vez, determinar si las diferencias eran permanentes o dependen de la presencia de la planta en el suelo. El análisis de componente principal indicó que hubo una variación en las comunidades microbianas asociadas entre ambas variedades o cultivos de canola y la temporada de crecimiento. Los cambios en la estructura microbiana asociada a plantas modificadas genéticamente fueron temporales (durante el invierno) y no persistió en la próxima temporada de campo. Es decir, la composición y la diversidad funcional y la comunidad microbiana fueron influenciadas por la variedad de la planta.

Así mismo, en un estudio de campo, se evaluaron plantas de maíz resistente al glufosinato y los resultados demostraron que la modificación genética de la planta no afectó a la composición de las comunidades bacterianas (Schmalenberger and Tebbe, 2002). Hart y colaboradores (2009) demostraron que este cultivo (maíz resistencia al herbicida glifosato) no afectó a las comunidades fúngicas o desnitrificantes de la rizosfera. En otro estudio realizado por Oliver y colaboradores (2008) evaluaron los efectos potenciales del árbol transgénico aspen (que sobre expresa un gen *polifenol oxidasa*) revelando que se detectaron pocas diferencias entre las comunidades bacterianas y fúngicas asociadas a la rizosfera de los árboles transgénicos y no transgénicos.

Sin embargo, otros estudios han demostrado que no existen daños perjudiciales por la expresión de las endotoxinas Cry liberadas a través de los exudados radiculares de las plantas transgénicas tal como Kapur y colaboradores (2010) evaluaron la diversidad microbiana cultivable y no cultivable en suelos de algodón GM (expresa una endotoxina Cry codificada por el gen de *Bacillus thuringiensis*) y convencional para determinar las consecuencias ecológicas de la aplicación del algodón GM. Los resultados demuestran que las estructuras de las comunidades microbianas se

mantuvieron estables en cuanto a la riqueza de la diversidad y el filotipo uniforme en los estudios de ensayos de campo. Sólo se observaron unas pocas variaciones dentro de la estructura de la comunidad microbiana demostrando que el cultivo transgénico no las afectó las comunidades microbianas. Estos resultados indicaron claramente la posibilidad de la aplicación ecológica segura de los cultivos GM como el algodón Bt.

Es necesario mencionar que en nuestro país existen muy pocos estudios de este tipo para lo cual se realizó un estudio bajo condiciones de invernadero para analizar 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 rizoplano con respecto a una planta de maíz híbrida convencional, encontrando como resultado se encontraron pequeñas diferencias entre las poblaciones bacterianas, revelando que no hay una variación drástica en las poblaciones de microorganismos que interaccionan en la raíz de un maíz híbrido convencional con respecto a un maíz genéticamente modificado. Además se identificaron géneros bacterianos específicos para cada tipo de cultivo (Vital López *et al.*, 2015). A pesar del número de estudios ya realizados, se necesita investigación adicional para diferenciar claramente el efecto en la modificación genética (genotipo de la planta) a partir de algodón transgénico, el cual podría afectar a las comunidades rizobacterianas más que otros factores como el tipo de suelo o etapa vegetativa de la planta bajo condiciones de campo.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

A la fecha existen diversos cuestionamientos acerca de los efectos ambientales que las plantas transgénicas pueden provocar en las estructuras de las comunidades bacterianas que habitan en la rizosfera de estos tipos de cultivos y sus posibles implicaciones que pudieran afectar las interacciones planta-microorganismo. Además, existen muy pocos estudios acerca de la estimación del impacto ecológico que las plantas transgénicas, en este caso, el algodón pudiera generar en la estructura, composición y dinámicas de las comunidades bacterianas con la que se asocia.

Asimismo, este es un estudio pionero en nuestro país donde se evalúan los posibles impactos en las comunidades rizobacterianas del algodón transgénico con respecto a uno convencional. De esta manera, los resultados pueden contribuir a resolver este tipo de interrogantes.

## **4. HIPÓTESIS**

Debido a la modificación genética del algodón estos cultivos liberan exudados que alteran al suelo creando condiciones selectivas que afectan las estructuras de las comunidades de las rizobacterias.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Caracterizar la composición y estructura de las comunidades de las rizobacterias y determinar si la diversidad bacteriana que se establece en la rizosfera de una variedad no transgénica (convencional) difieren con respecto a la variedad transgénica de algodón.

### **5.2 Objetivos específicos**

1. Determinar la composición y estructura de las comunidades bacterianas de la rizosfera del algodón transgénico y convencional empleando la secuenciación masiva NGS (Next Generation Sequencing) en base al gen 16S rRNA a partir del ADN metagenómico de la rizosfera en dos años consecutivos de siembra.
2. Caracterizar los componentes de los exudados radiculares liberados por las plantas de algodón (convencional y transgénico) bajo condiciones *in vitro*.



## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1 Diseño experimental y muestreo del suelo**

El estudio se llevó a cabo en Marzo del 2015 en un lote del campo experimental del INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) en Río Bravo, Tamaulipas, México. Las coordenadas geográficas del sitio de muestreo fueron latitud 25° 96' 40" Norte, longitud 98° 01' 85" Oeste. El diseño experimental utilizado fue bloques al azar (ver Figura 6) en un área total de 150 m<sup>2</sup>, así un total de seis bloques al azar (dos bloques por cada variedad de algodón) fueron formados. De ellos se colectaron muestras de suelo antes de la siembra (BS, before sowing) en tres puntos a una profundidad de 30 cm por cada bloque para evaluar las comunidades microbianas que habitan en el suelo al inicio o antes de la siembra ver Figura 7. Las muestras se etiquetaron con las siguientes claves: Algodón convencional FM989 (BS1), transgénico FM1740 B2RF (BS2) y transgénico FM9250 GL cotton (BS3). Las muestras de suelo se colocaron en bolsas de plástico y se transportaron al laboratorio e inmediatamente se almacenaron en refrigeración a 4 °C. Las muestras de suelo se combinaron en muestras compuestas. Posteriormente, se homogeneizaron y cribaron con una malla de 3 mm.

### **6.2 Determinación de las propiedades fisicoquímicos del suelo**

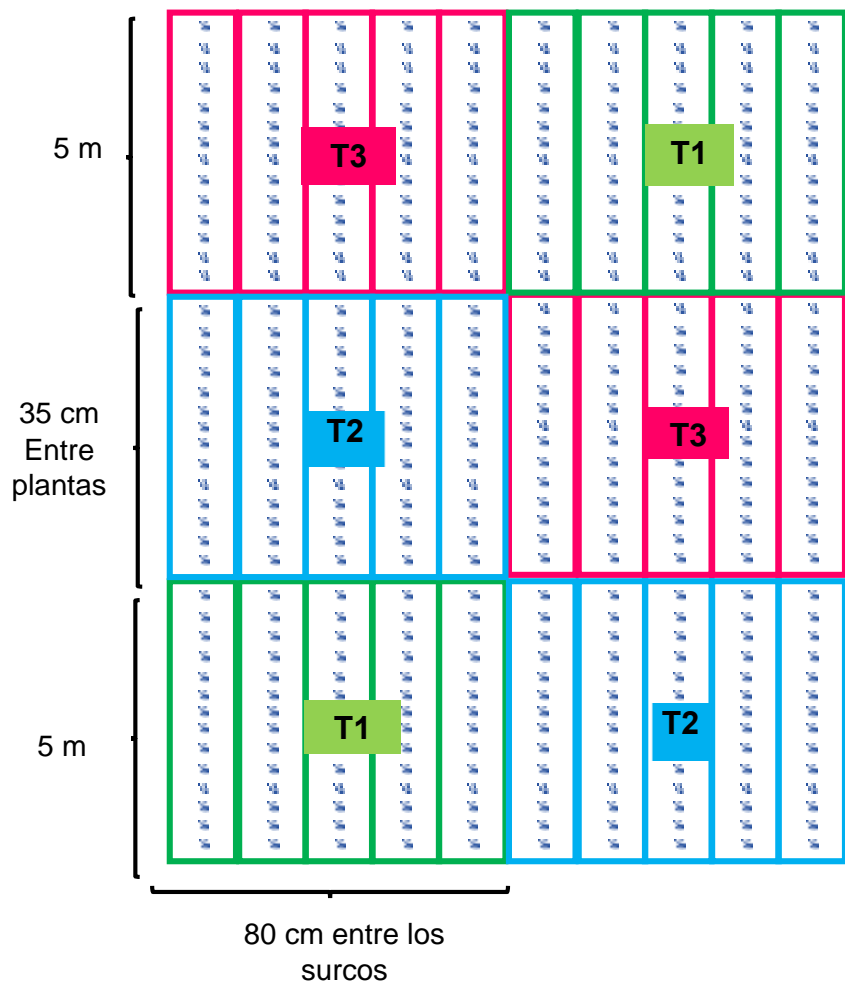
Por otro lado, se determinaron las propiedades fisicoquímica del suelo en el laboratorio del campo experimental Rio Bravo en el Instituto Nacional (INIFAP) Rio bravo, Tamaulipas. El pH se midió en solución acuosa (1:2), la materia orgánica (MO) se evaluó a partir del total del carbono inorgánico por el método de Dicromato de Potasio (método de Walkely and Black), la conductividad eléctrica (CE) se midió utilizando el potenciómetro en pasta saturada; la disponibilidad del nitrógeno inorgánico (NO<sub>3</sub>-N) usando el método de ácido salicílico, la disponibilidad de P se obtuvo mediante el método de Olsen, la textura por el método de Bouyocos, la disponibilidad de Fe mediante el método de DTPA, el K total fue extraído por el método de acetato de amonio y los cationes solubles (Na<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>+1</sup>, K<sup>+1</sup>) fueron medidos empleando el espectrofotómetro de absorción atómica en pasta saturada.

### 6. 3 Material biológico

En este trabajo se utilizaron semillas de: **A)** Algodón convencional (T1, variedad FM989), **B)** Algodón transgénico 1 (T2, variedad FM9250 GL: algodón Glytol®+ LibertyLink®) con capacidad de resistencia al herbicida Glifosato (gen 2mEPSPS, codifica la proteína EPSPS)) y Glufosinato (gen bar-codifica la proteína PAT) y **C)** Algodón transgénico 2 (T3, variedad FM1740 B2RF, Bollgard II + Roundup Ready Flex®) con capacidad de resistencia a insecto (genes y proteínas, Cry1Ac y Cry2Ab) y tolerancia al herbicida glifosato (gen y proteína, CP4 EPSPS). Las semillas de las tres variedades de algodón se sembraron bajo las mismas condiciones de temperatura, propiedades fisicoquímicas del suelo y climatología. Finalmente, se obtuvo un total de 70 plantas por bloque.

Posteriormente, se llevó a cabo la colección de la rizosfera de las plantas de algodón (convencional y transgénico) durante dos temporadas de siembra durante el año 2015 y 2016. La colecta de la rizosfera se llevó a cabo en la etapa vegetativa (42 días de crecimiento), floración (76 días de crecimiento y cosecha (120 días de crecimiento) durante el año 2015 (ver Figura 8). Se colectaron por nueve plantas individuales de cada genotipo de algodón y se realizaron tres muestras compuestas (cada muestra compuesta incluyó tres plantas individuales). Las muestras de la rizosfera se dividieron para el análisis metagenómico y fisicoquímicos (Vital *et al.*, 2017).

Además se realizó la detección de las proteínas derivadas de la modificación genética (PAT, Cry1Ac y Cry2Ab) en las hojas y raíces de las plantas de algodón empleando la prueba de Inmunostrip del estuche comercial QuickStix™ de acuerdo a las condiciones del fabricante (ENVIROLOGIX®), los resultados del mismo se agregaron en el Apéndice 1. Posteriormente, a partir de los resultados obtenidos en el año 2015, se decidió realizar colectas de rizosfera en la etapa vegetativa y floración durante el año 2016 (ver Figura 9).



**Figura 6.** Esquema del diseño experimental



**Figura 7.** Siembra en el campo experimental

A) Antes de la siembra



B) Etapa vegetativa



C) Etapa de floración



D) Cosecha



**Figura 8.** Etapas de colecta durante la temporada 2015

### A) Etapa vegetativa



### B) Etapa de floración



**Figura 9.** Etapas de colecta durante la temporada 2016

## 6.3 Determinación de las comunidades bacterianas empleando secuenciación masiva de próxima generación (NGS, Next Generation Sequencing)

### 6.3.1 Extracción de ADN metagenómico

Se llevó a cabo la extracción de ADN metagenómico empleando el estuche comercial de PowerSoil Max DNA isolation kit (MO Bio) de acuerdo a las condiciones del fabricante (Promega). Se cuantificó la cantidad del DNA empleando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®) y la calidad del mismo empleando una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

### 6.3.2 Amplificación por PCR del gen 16S ADN ribosomal

A partir del ADN metagenómico obtenido se realizó la amplificación del gen 16S ADNr utilizando los oligonucleótidos universales 27f (GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1495r (CTACGGCTACCTTGTACGA) obteniendo un producto de 1500 pb (Grifoni *et al.*, 1995) de acuerdo a las condiciones de reacción mostradas en la Tabla 3 y de termociclado en la Tabla 4.

**Tabla 3.** Condiciones para la amplificación del gen 16S ADN ribosomal

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclo
95	5	1
95	1	35
60	1	
72	1:30	
72	10	1
4	indefinido	1

**Tabla 4.** Reactivos y concentraciones empleadas en la amplificación del gen 16S ADNr

Reactivo	Concentración inicial (stock)	Concentración final
Buffer Taq Go Taq®	5X	1X
Magnesio	-	1.5mM
dNTP's	10 mM	0.2 mM
Iniciador 27F	5 µM	0.05 µM
Iniciador 1495R	5 µM	0.05 µM
ADN polimerasa Go Taq®	5 U/µL	1.25 U/µL
Agua mili Q estéril		-
ADN genómico/metagenómico	50 ng/µL	
Volumen total		25 µL

### 6.3.3 Preparación de la librería metagenómica y secuenciación

Posteriormente, se llevó a cabo la PCR anidada para amplificar la región hipervariable V3 del gen 16S ADN ribosomal a partir del producto de PCR anteriormente obtenido (Wuyts, 2002). De acuerdo a las condiciones mostradas en la tabla 5 y de termociclado en la tabla 6. Las secuencias de los oligonucleótidos forward y reverse se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 5.** Condiciones para la amplificación la región hipervariable V3 del gen 16S ADNr

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclo
95	5	1
95	30 s	25
60	30 s	
72	45 s	
72	10 min	1
4	indefinido	1

**Tabla 6.** Reactivos y concentraciones empleadas la amplificación la región hipervariable V3 del gen 16S ADNr

Reactivo	Concentración inicial (stock)	Concentración final
<b>Buffer Go Taq®</b>	5X	1X
<b>Magnesio</b>	-	1.5mM
<b>dNTP's</b>	10 mM	0.2 mM
<b>Iniciador BC</b>	10 µM	0.4 µM
<b>Iniciador REV_trP1</b>	10 µM	0.4 µM
<b>ADN polimerasa Go taq®</b>	5 U/µL	1.25 U/µL
<b>Agua mili Q estéril</b>		-
<b>ADN metagenómico</b>	50 ng/µL	
<b>Volumen total</b>		25 µL

Una vez obtenidos los fragmentos de PCR de un tamaño aproximado de 252 pb se llevó a cabo la purificación de los productos de PCR empleando un gel sistematizado E-Gel® SizeSelect™ de acuerdo a las instrucciones del estuche comercial. La concentración del ADN de cada librería se cuantificó mediante el equipo de Bioanalyzer de Agilent Technologies. Posteriormente, la librería se diluyó a una concentración final de 22 pM. La reacción de la PCR de emulsión se llevó a cabo empleando el instrumento Ion OneTouch™ 2 y el estuche comercial de Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Template Kit-200 (Life Technologies) de acuerdo a las instrucciones del estuche comercial. Se realizó enriquecimiento del templado con esferas Ion (Ion Sphere Particles, ISPs) empleando el equipo de Ion OneTouch™ ES. Finalmente, la secuenciación se llevó a cabo utilizando un chip Ion 314 Chip Kit v2 y la plataforma de Ion Torrent PGM™ (Life Technologies).

**Tabla 7.** Lista de oligonucleótidos forward y reverse

Nombre	Secuencia
F_BC1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATACGGRAGGCAGCAG
F_BC2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATACGGRAGGCAGCAG
F_BC3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATACGGRAGGCAGCAG
F_BC4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACCAAGATCGATACGGRAGGCAGCAG
F_BC5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGAAGGAACGATACGGRAGGCAGCAG
F_BC6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGCAAGTTCGATACGGRAGGCAGCAG
F_BC7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGTGATTCGATACGGRAGGCAGCAG
F_BC8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGATAACGATACGGRAGGCAGCAG
F_BC9	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGAGCGGAACGATACGGRAGGCAGCAG
F_BC10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGACCGAACGATACGGRAGGCAGCAG
F_BC11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTCGAATCGATACGGRAGGCAGCAG
F_BC12	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAGGTGGTTCGATACGGRAGGCAGCAG
F_BC13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAACGGACGATACGGRAGGCAGCAG
F_BC14	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGGAGTGTTCGATACGGRAGGCAGCAG
F_BC15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAGAGGTCGATACGGRAGGCAGCAG
F_BC16	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGGATGACGATACGGRAGGCAGCAG
F_BC17	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTATTCGTCGATACGGRAGGCAGCAG
F_BC18	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGGCAATTGCGATACGGRAGGCAGCAG
F_BC19	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTAGTCGGACGATACGGRAGGCAGCAG
F_BC20	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGATCCATCGATACGGRAGGCAGCAG
Rev_trP1	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATATTACCGCGGCTGCTGGC

### 6.3.4 Análisis bioinformático

#### 6.3.4.1 Análisis taxonómico y filogenético

El análisis de las secuencias metagenómicas incluyó la filtración de lecturas empleando el software Ion Torrent PGM en base a sus secuencias Barcode. Todas las lecturas o secuencias crudas se procesaron con Trimmomatic para eliminar las etiquetas Barcode, el oligonucleótido (Quality Score, QS >20). Posteriormente, las secuencias fueron depositadas en el Genbank del NCBI. (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias se cargaron como SRA (Sequence Read Archive) y se etiquetaron como SRP119795 y SRP100208.



Por otro lado, las secuencias se analizaron empleando dos plataformas: MG-RAST (Metagenomics RAST server) y QUIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology). En lo que respecta a MG-RAST (Meyer *et al.*, 2008) se realizó en línea, subiendo las secuencias al servidor <https://www.mg-rast.org/>. Mientras que el análisis en QUIIME implicó el uso de comandos o scripts (Caporaso *et al.*, 2010). Se utilizó el enfoque Open reference para la asignación de la Unidad Taxonómica Operacional (Operational Taxonomic Unit, OTU) a un 97% de similitud empleando el algoritmo de USEARCH (Edgar, 2010). El alineamiento de las secuencias se realizaron contra la base de datos Greengenes (DeSantis *et al.*, 2006).

#### **6.3.4.2 Alfa diversidad**

Se estimó la alfa diversidad que incluyó el número de las especies observadas (OTUs), riqueza bacteriana con el estimador Chao1, la diversidad de especies con el índice de Shannon y Simpson. Además, el Heatmap se obtuvo mediante el software en scripts R para la abundancia relativa de los primeros 20 géneros más abundantes. Los dendrogramas fueron obtenidos utilizando el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, pares de grupos no ponderados usando la media aritmética) con un umbral de agrupamiento de 0.75.

#### **6.3.4.3 Beta diversidad**

Se calculó la beta diversidad para la comparación entre las muestras mediante Jackknifed Unweighted Pair Group Method con el método UPGMA, el agrupamiento UPGMA se realizó de 10 matrices de distancia Jackknifed Weighted UniFrac reproducidas y/o generadas por cada tipo de muestra.

Para visualizar los resultados, un gráfico de Escalamiento Multidimensional No Métrico (Nonmetric Multidimensional Scaling, NMDS) basado en distancias de Bray-Curtis con R. Bray-Curtis proporciona una medida de las diferencias en la composición de la comunidad entre las muestras basada en el conteo del OTU, independiente de la asignación taxonómica.

#### **6.3.4.4 Comparación de categorías mediante análisis discriminante lineal junto con el tamaño del efecto (Lefse, Linear discriminant analysis effect size)**

Lefse es una herramienta para identificar biomarcadores entre dos muestras o más grupos utilizando las abundancias relativas. Se visualizó mediante un histograma de bacterias más abundantes en las muestras de la rizosfera de algodón convencional y transgénico clasificados por el LDA score (linear discriminant analysis).

### **6.4 Caracterización de los componentes de los exudados radiculares**

Los experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones de hidroponía *in vitro* y axénicas.

#### **6.4.1 Lavado y limpieza del material biológico**

Se lavaron las semillas con agua potable y posteriormente se decantó. Se agregó la solución Tween 20 al 2%, manteniendo en agitación constante con un agitador magnético durante 10 min (para no dañar a las semillas) y eliminó el Tween 20. Se adicionó la solución de Hipoclorito de sodio al 10%, se mantuvo en agitación durante 10 min y posteriormente se eliminó. Posteriormente, las semillas se lavaron con etanol 95% durante 5 min y se eliminó el etanol por completo. Las semillas se lavaron por 3 veces con agua destilada estéril (tiempos con agitación). Se sembraron de 3 a 4 semillas de algodón (total=50) en cajas Petri con medio PDA (Papa Dextrosa Agar) y se incubaron a 30 °C durante aproximadamente 3 días. Se seleccionaron aquellas que tenían un tamaño de radícula similar (2 cm) y libres de hongos y/o bacterias.

#### **6.4.2 Trasplante de las plántulas de algodón convencional (variedad FM-989) y transgénico (FM9250GL y FM1740) y colecta de los exudados radiculares**

Se trasplantaron las plántulas a un sistema hidropónico conteniendo medio de Hoaglands. Este sistema consistió en tubos de ensayo (20 x 3.5 cm) empleando como soporte una malla de plástico inerte que permita el desarrollo de las plántulas (volumen de 40 mL) a 25 °C durante 14 h luz y 10 h de oscuridad. Tal como se observa en la Tabla 8, en ella se muestra la composición del medio Hoagland.

Las raíces se lavaron con agua desionizada estéril, se cambió el medio Hoaglands de cada planta cada 3 días y posteriormente se colectaron los exudados en el medio Hoaglands en tubos falcón (25 mL) de manera individual, así éste proceso hasta los 42 días de crecimiento (4 réplicas por cada colecta). Por otro lado, se seleccionaron 4 réplicas individuales de cada variedad de algodón y en lugar de agregar medio Hoaglands nuevo se dejaron en agua desionizada estéril durante 24 horas y posteriormente se colectaron los exudados en tubos falcón (25 mL). Cada colección se mantuvo por separado y se realizó una revisión de cada una de las réplicas individuales ya sea crecidas en medio Hoaglands o agua desionizada. Para lo cual, se colocó en medio PDA una alícuota de 100 µL para corroborar si éstas no estaban contaminadas por hongos y/o bacterias. Las muestras contaminadas se descartaron. Luego se filtraron los exudados de manera individual para eliminar las células muertas de las raíces de las plantas empleando un filtro de tamaño de poro 0.45µm. Posteriormente, se liofilizó (Lyophilizer Free Zone Modelo 77540 LABCONCO) al vacío bajo las siguientes condiciones: -48 °C a 56 x 10<sup>-3</sup> Mbar durante 3 días. Una vez obtenido el producto liofilizado se almacenó en viales eppendorf a -20 °C hasta su uso.

Se obtuvieron 30 a 40 mg de liofilizado por cada réplica (n=5 réplicas, de cada genotipo de planta de algodón). Por lo tanto, se obtuvieron exudados radiculares en medio Hoaglands sin eliminación de sales y liofilizado disuelto en agua desionizada estéril con eliminación de sales (desalinización). Finalmente, la caracterización de los exudados radiculares se realizó mediante la técnica de Cromatografía en capa fina (CCF) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

**Tabla 8.** Composición del medio Hoaglands

Componente	mL
<b><u>Macronutrientes</u></b>	
1M KNO <sub>3</sub>	5
1M CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2
Hierro (Sprint 138 quelato de hierro)	1.5
Fe·EDTA	3.5
1M MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	2
1M NH <sub>4</sub> Cl	1
1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
<b><u>Micronutrientes</u></b>	
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1
ZnCl <sub>2</sub>	1
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1
NaMoO·2H <sub>2</sub> O	1

### 6.4.3 Cromatografía en capa fina (CCF)

A partir del producto liofilizado de cada genotipo de la planta, se disolvió 1 mg del exudado liofilizado en 1 mL de metanol. Se aplicó el extracto en una fase estacionaria sólida (TLC sílica gel 60 F254, Merck). Se llevó a cabo la estandarización de la fase móvil (eluyente) y se encontró que la mejor combinación fue CH<sub>3</sub>CN (acetonitrilo): CH<sub>3</sub>OH (metanol): H<sub>2</sub>O (agua) en una proporción de 6:3:1 (v/v/v) (Robyt, 2000) y para saponinas-esteroles Hexano.

Las muestras se colocaron en el punto de origen de corrida en la placa de sílica-gel con un capilar, la muestra se dejó secar y posteriormente, la placa se colocó en posición vertical en una cámara de cromatografía de 20 x 20 cm (CAMAG, Switzerland) conteniendo 20 mL de la fase móvil respectiva. Se asperjó el revelador químico empleando el TLC sprayer (Merck KGaA).

Antes de correr la muestra en la placa por capilaridad, el sistema se saturó durante 10 minutos y posteriormente, la cámara se cerró. Las placas se secaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y se realizó la comprobación de la separación de los componentes mediante el uso de reveladores químicos generales tales como Yodo y Luz UV. Por otro lado se utilizaron reveladores específicos como se muestra en la tabla 9.

**Tabla 9.** Reveladores específicos para determinar los grupos químicos en los exudados radiculares

<b>Reveladores</b>	<b>Grupos químicos</b>
Prueba de Dragendorff	Alcaloides
Reacción de hidróxido de sodio (NaOH)	Flavonoides
Reacción con Cloruro Férrico (FeCl <sub>3</sub> )	Taninos
Reactivo de Folin-Ciocalteu	Ácidos fenólicos
2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH)	Grupos aldehídos y cetonas
Prueba de Ehrlich	Grupo furano
Prueba de hidróxido de amonio (NH <sub>4</sub> OH)	Grupos furano de Cumarinas y antraquinonas
Prueba de Baljet	Glicósidos cariotónicos

#### **6.4.4 Preparación de la muestra para Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

Se resuspendieron 30 mg del producto liofilizado en 0.45 mL de agua desionizada (concentración final=66 mg/mL). Se centrifugó a 8000 rpm durante 20 min. Posteriormente, el sobrenadante (0.3 mL) se transfirieron a un tubo de RMN de 5mm con 0.2 mL de agua deuterada D<sub>2</sub>O (99.9% deuterado, Cambridge Isotope Laboratories) conteniendo 10 mM of TSP (3-(Trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3-d<sub>4</sub> acid sodium salt, 98 atom% D; Sigma Aldrich). TSP fue establecido a  $\delta = 0$  ppm y se utilizó como la referencia interna (Villalón-López *et al.*, 2018).

El análisis se llevó a cabo en un equipo de Resonancia Magnética Nuclear RMN <sup>1</sup>H de una dimensión (1D) a 500 MHz en el equipo Varian Agilent. Post procesamiento de los datos de RMN, los espectros fueron procesados y analizados utilizando el software de Chenomx®(Canada), el cual se utilizó para la identificación de los componentes del exudado. Además, antes de realizar el análisis estadístico se eliminó la region del agua, se empleó un análisis de componentes principales PCA para examinar la variación de la composición de los exudados radiculares entre cada genotipo. Finalmente, se eliminó la señal que da la primera separación en el primer PCA para ver cuál es el otro componente que hace que los exudados sean diferentes.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1 Análisis de las propiedades fisicoquímicas del suelo.**

En la Tabla 10 se observan los resultados obtenidos de las colectas del suelo durante la dos temporadas de siembra (2015 y 2016) mostrando una textura de suelo franco. El pH fue medianamente alcalino. La materia orgánica y la conductividad eléctrica fueron similares entre los muestras en el mismo año de colecta. Sin embargo se encontraron diferencias al comparar la composición fisicoquímica en las muestras del suelo, es decir estos cambios variaron dependiendo la temporada de siembra.

**Tabla 10.** Propiedades fisicoquímicas de las muestras de suelo colectadas durante la siembra 2015 y 2016

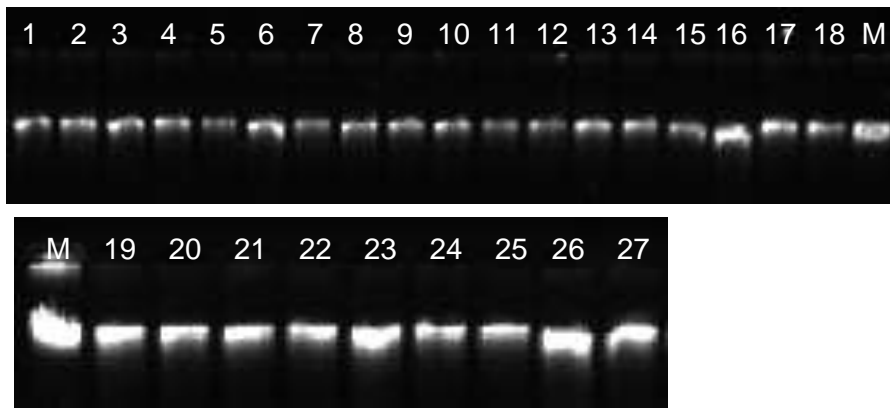
Muestra	MO (%)	K extraíble (ppm)	pH	CE (dS/m)	N-NO3 (ppm)	Olsen-P (ppm)	Fe (ppm)	Precipitación promedio (mm)	Temperatura promedio (°C)
BS1	1.92	1946	7.69	1.44	31.75	28.8	0.513	81.1	20.4
BS2	0.92	1666	7.95	1.73	31.92	29.7	0.586		
BS3	1.84	1326	8.02	1.22	23.9	26.7	0.593		
T1VS_2015	2.05	1230	7.69	1.36	19.1	24	0.450	92.23	26.92
T2VS_2015	2.19	1274	7.81	1.40	18.05	23.5	0.477		
T3VS_2015	2.00	1250	7.93	1.16	17	21	0.490		
T1FS_2015	1.71	1231	7.32	1.05	17.05	21.5	0.419		
T2FS_2015	2.09	1294	7.5	1.16	16.05	20.4	0.420		
T3FS_2015	1.9	1286	7.67	0.98	15.5	19.5	0.481		
T1VS_2016	1.82	827	7.30	1.60	15.1	21.0	1.244		
T2VS_2016	1.77	809	7.60	1.67	14.5	20.2	1.281		
T3VS_2016	1.84	790	7.79	1.30	13.1	23.2	1.028		
T1FS_2016	1.26	787	7.22	1.49	13.8	19.7	1.141		
T2FS_2016	1.18	763	7.23	1.60	12.35	19.9	1.377		
T3FS_2016	1.31	769	7.11	1.31	11.6	17.3	1.326		

Los datos son mostrados en promedio (n=3).



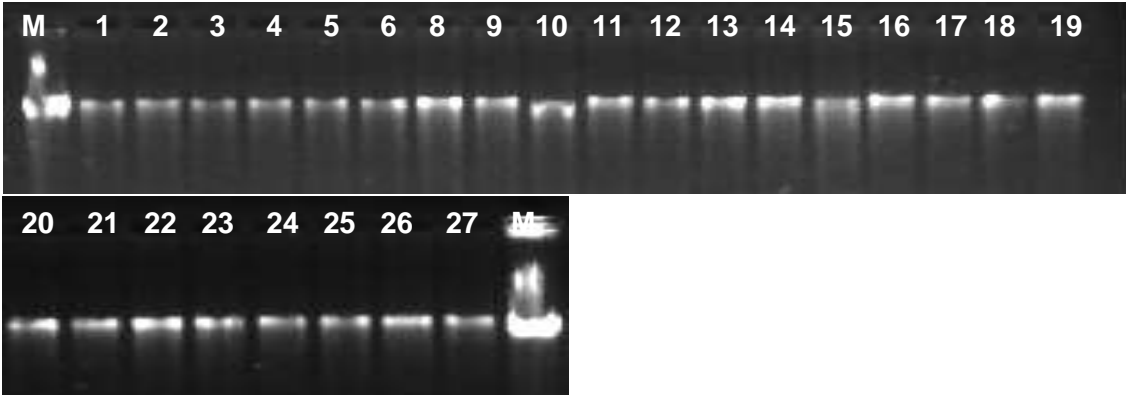
## 7.2 Extracción de ADN metagenómico de las muestras colectadas en la siembra del año 2015 y 2016

Para determinar la calidad y cantidad del ADN metagenómico extraído a partir de las muestras del suelo y rizosfera se visualizaron en un gel de agarosa al 1% durante 65 min a 90 V empleando como marcador de peso molecular ADN Lambda de Promega. Como se puede observar en la Figura 10, 11, 12, 13, 14 y 15 cada carril enumerado corresponde a las muestras de ADN metagenómico. Las muestras de suelo mostraron una concentración de 30 a 100 ng/ $\mu$ L (ver Figura 10).



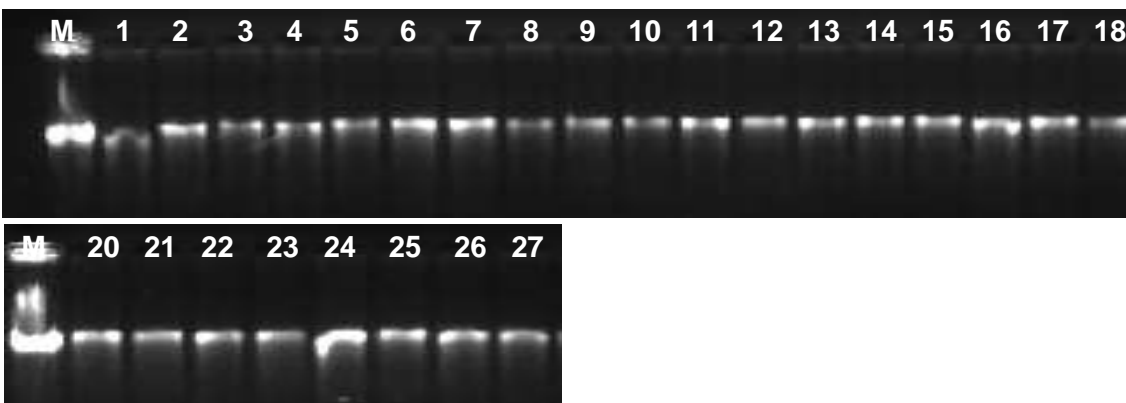
**Figura 10.** ADN metagenómico obtenido de las muestras de suelo antes de la siembra. M= Marcador ADN Lambda. T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27)

Las muestras de rizosfera colectadas en la etapa vegetativa mostraron concentraciones de 50 a 160 ng/ $\mu$ L (ver figura 11).



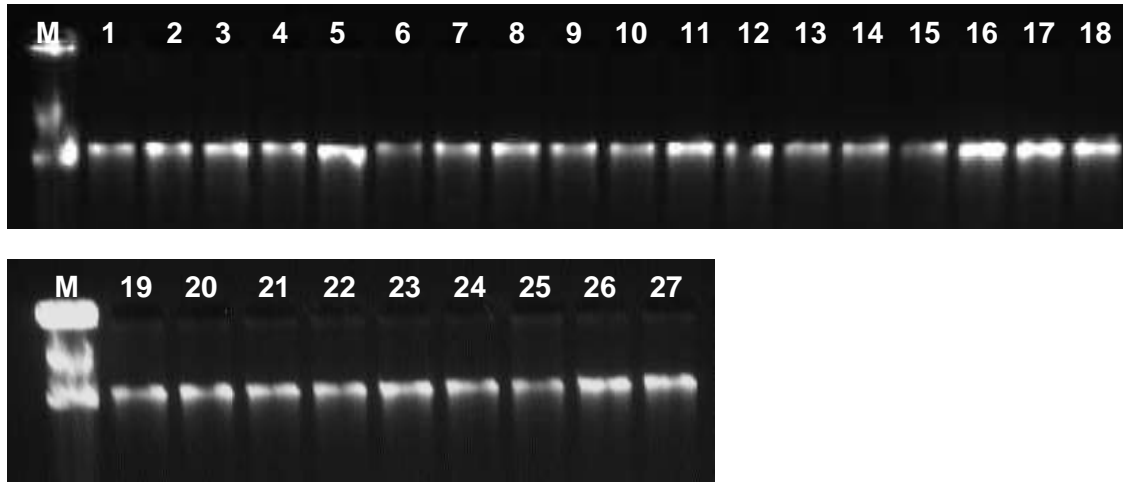
**Figura 11.** ADN metagenómico obtenido de las muestras de rizosfera de las plantas de algodón en la etapa vegetativa. M= Marcador ADN Lambda. T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27)

Las muestras de rizosfera colectadas en la etapa floración mostraron concentraciones de 50 a 163 ng/ $\mu$ L (ver Figura 12).



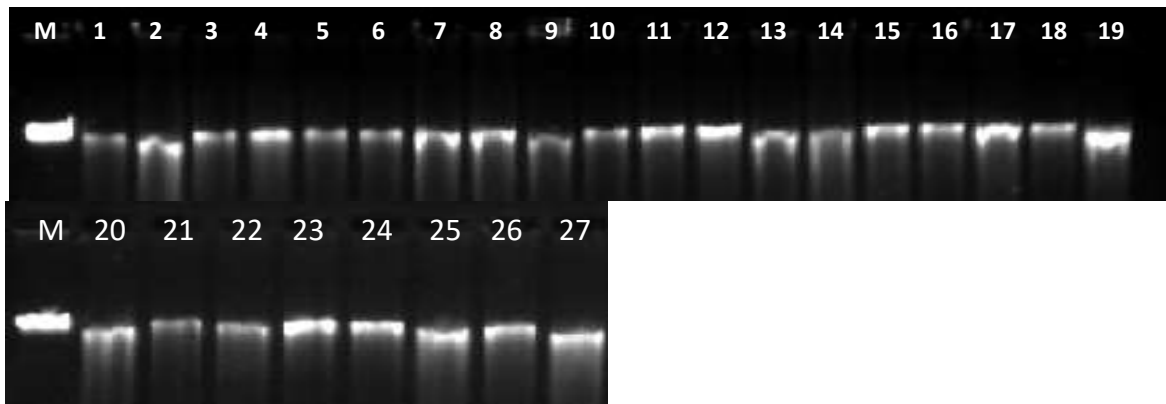
**Figura 12.** ADN metagenómico obtenido de las muestras de rizosfera de las plantas de algodón en la etapa floración. M= Marcador ADN Lambda. T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27)

Las muestras de rizosfera colectadas en la etapa floración mostraron concentraciones de 40 a 140 ng/ $\mu$ L (ver Figura 13).



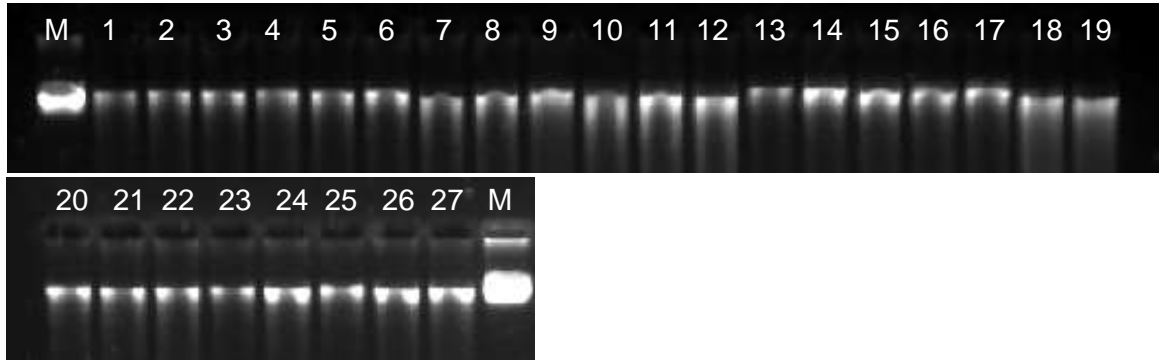
**Figura 13.** ADN metagenómico obtenido de las muestras de rizosfera de las plantas de algodón en la etapa cosecha. M= Marcador ADN Lambda. T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27)

Las muestras de la rizosfera colectada en la etapa vegetativa del 2016 mostraron una concentración de 50 a 100 ng/ $\mu$ L (ver Figura 14).



**Figura 14.** ADN metagenómico obtenido de las muestras de rizosfera colectadas durante la etapa vegetativa 2016. M= Marcador ADN Lambda. T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27).

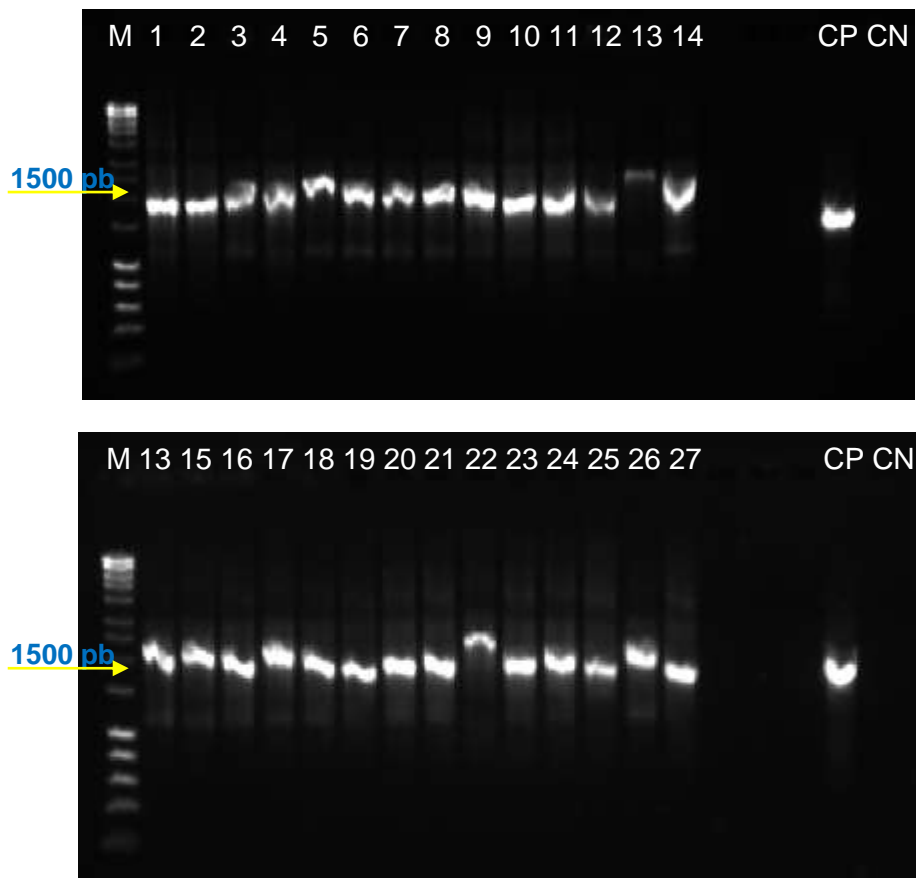
Las muestras de rizosfera colectadas en la etapa floración mostraron concentraciones de 20 a 50 ng/ $\mu$ L (ver Figura 15).



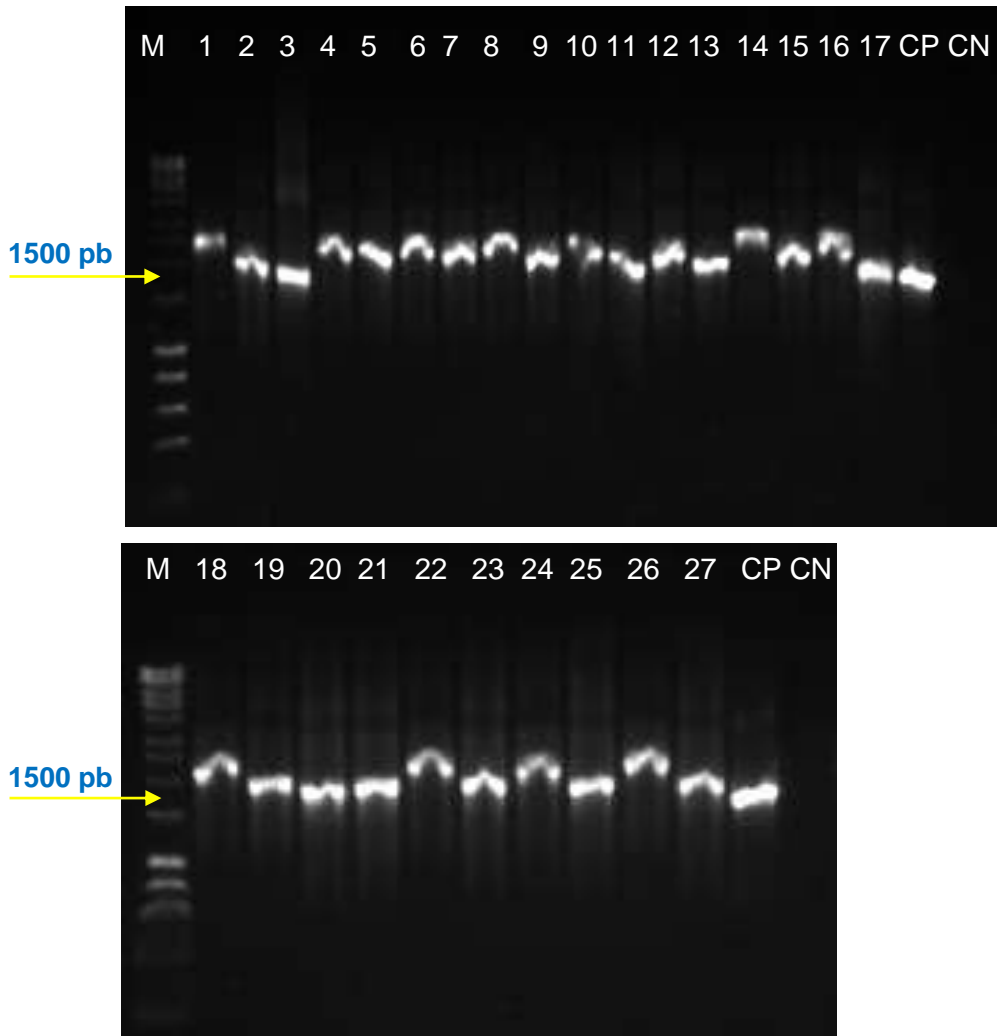
**Figura 15.** ADN metagenómico obtenido de las muestras de rizosfera de las plantas de algodón en la etapa floración. M= Marcador ADN Lambda. T1=algodón convencional (1-9), T2=algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=algodón transgénico 2 (carril 19-27)

### 7.3 Amplificación del gen 16S ADN ribosomal de las muestras colectadas en la siembra del año 2015 y 2016

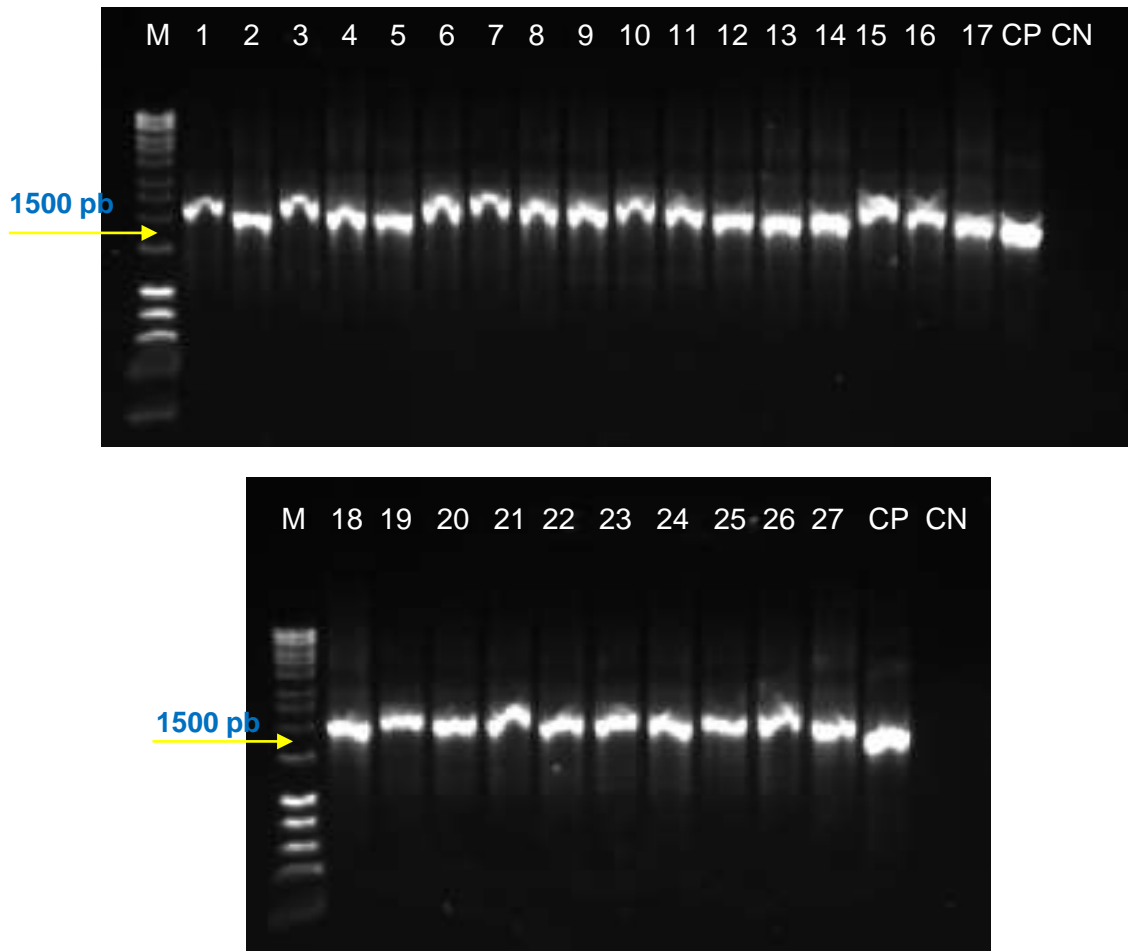
A partir del ADN metagenómico obtenido anteriormente del suelo y la rizosfera colectada durante la etapa vegetativa, floración y cosecha del año 2015 y 2016. Se realizó la amplificación del gen 16S ADNr obteniendo un fragmento de 1500 pb, estos se visualizaron en geles de agarosa al 1% durante 85 min a 90 V utilizando como marcador Hyperladder™ I (BIOLINE). Tal como se observa en las Figuras 16, 17, 18, 19, 20 y 21.



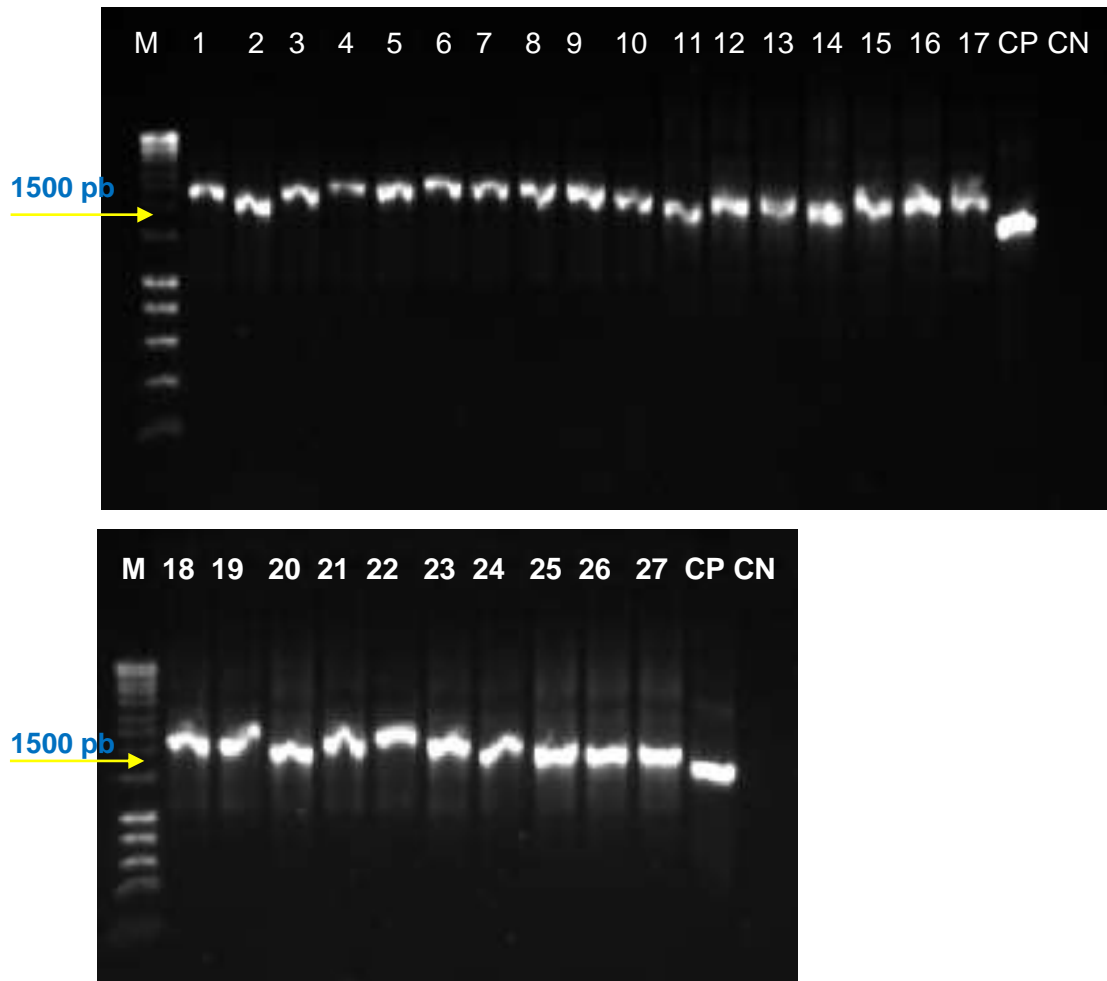
**Figura 16.** Amplificación del gen 16S ADN ribosomal de las muestras del suelo antes de la siembra 2015. M= Marcador Hyperladder™ I, CP= Control positivo (Cepa *Sphingobium* sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27)



**Figura 17.** Amplificación del gen 16S ADN ribosomal de la rizosfera de las algodón convencional y transgénico de la etapa vegetativa del 2015. M= Marcador Hyperladder™ I, CP= Control positivo (Cepa *Sphingobium* sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27)

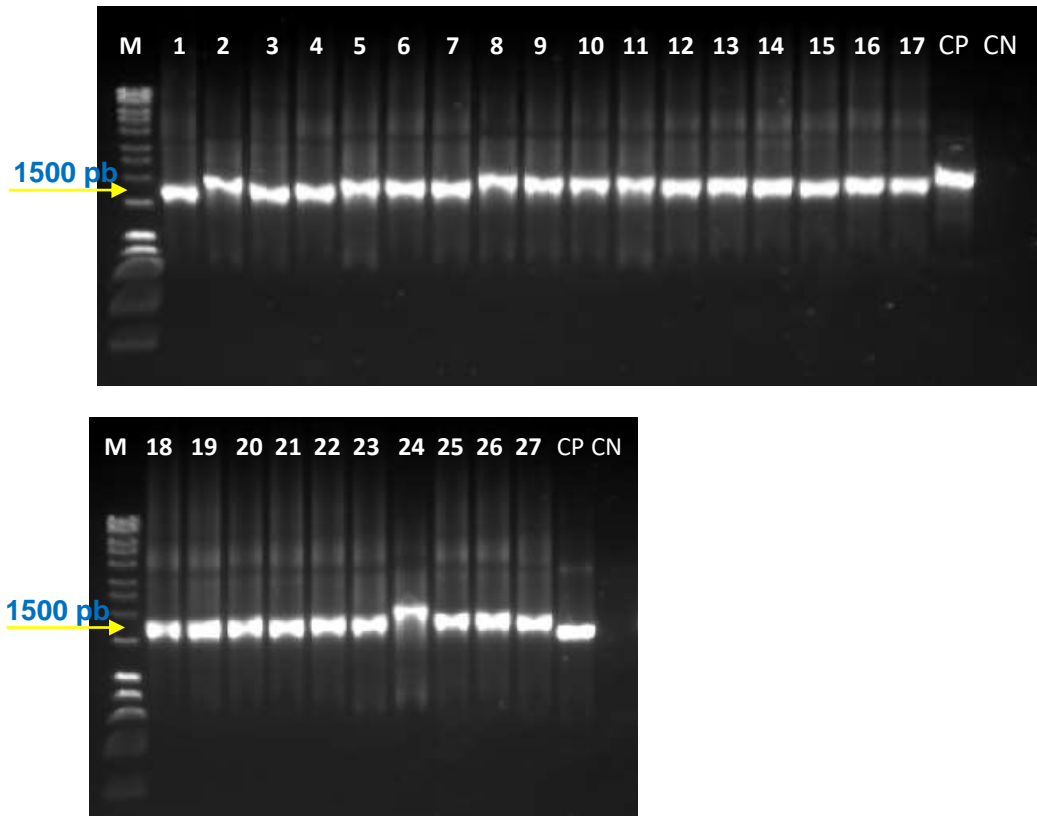


**Figura 18.** Amplificación del gen 16S ADN ribosomal de la rizosfera de las algodón convencional y transgénico de la etapa floración del 2015. M= Marcador Hyperladder™ I, CP= Control positivo (Cepa *Sphingobium* sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27)

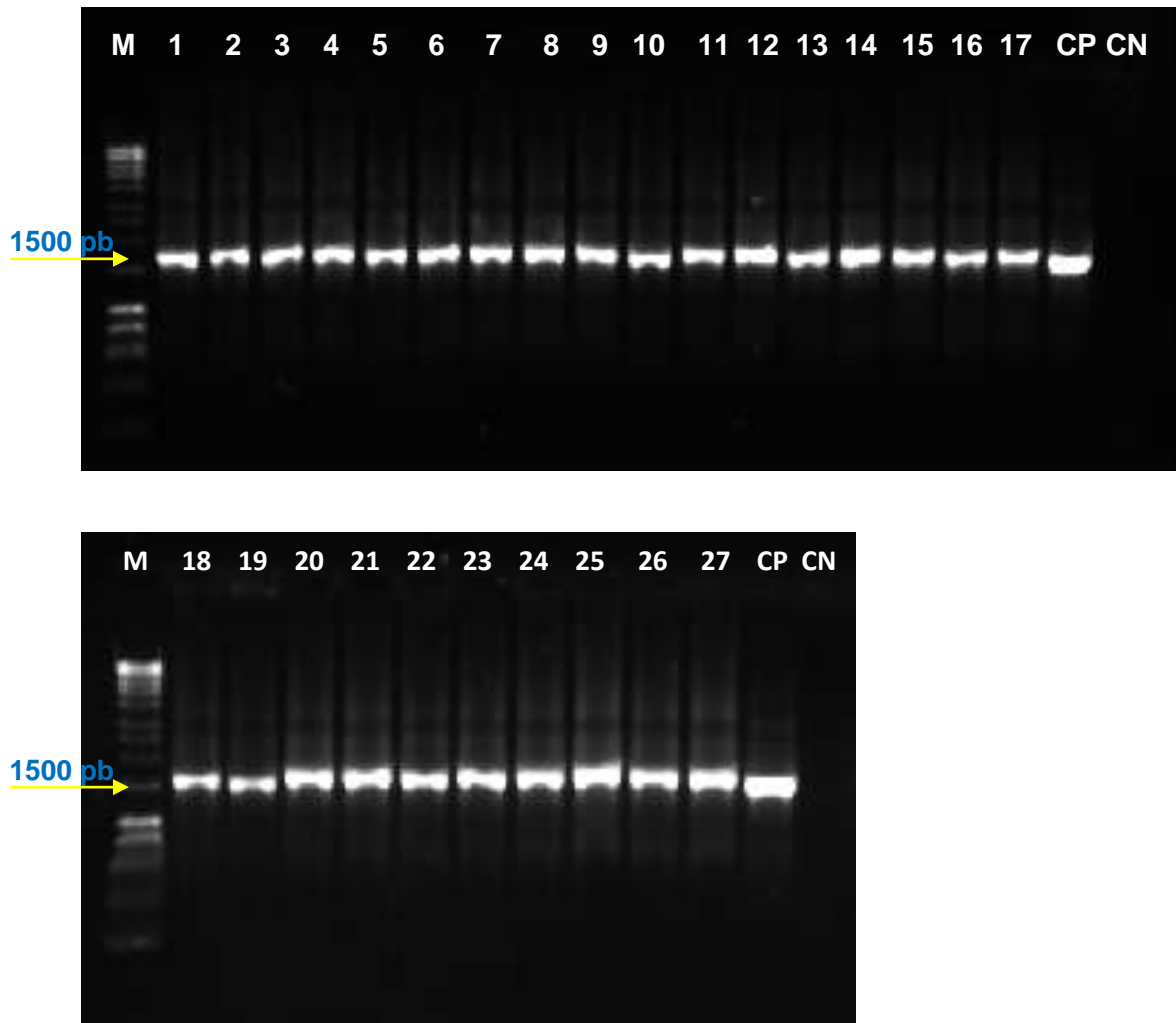


**Figura 19.** Amplificación del gen 16S ADN ribosomal de la rizosfera de las algodón convencional y transgénico de la etapa cosecha del 2015. M= Marcador Hyperladder™ I, CP= Control positivo (Cepa *Sphingobium* sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27)





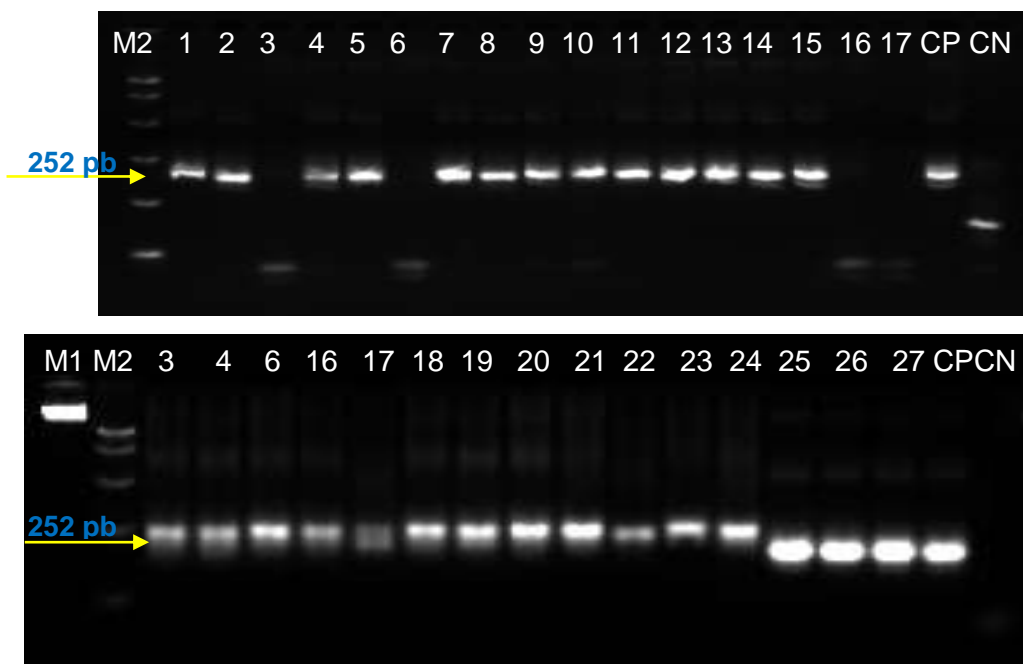
**Figura 20.** Amplificación del gen 16S ADN ribosomal de las muestras de rizosfera colectadas durante la etapa vegetativa del 2016. M= Marcador Hyperladder™ I, CP= Control positivo (Cepa *Sphingobium* sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27)



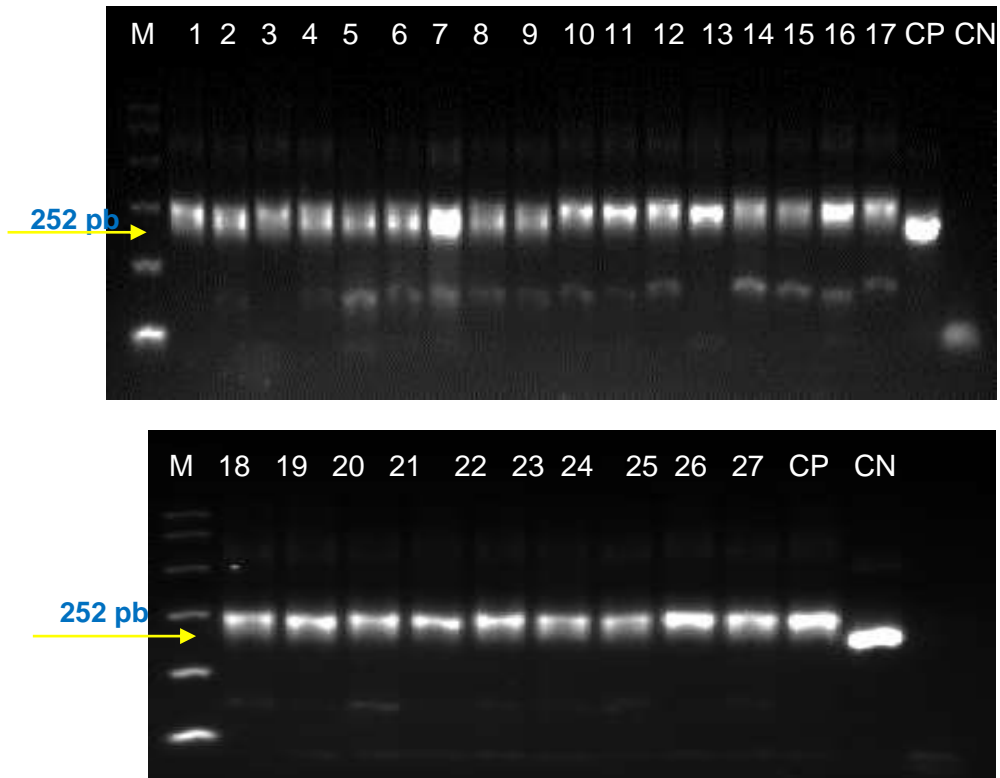
**Figura 21.** Amplificación del gen 16S ADN ribosomal de la rizosfera de las algodón convencional y transgénico de la etapa floración del 2016. M= Marcador Hyperladder™ I, CP= Control positivo (Cepa *Sphingobium* sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27)

#### 7.4 Amplificación de la región hipervariable V3 (PCR anidada) de las muestras colectadas en la siembra del año 2015 y 2016

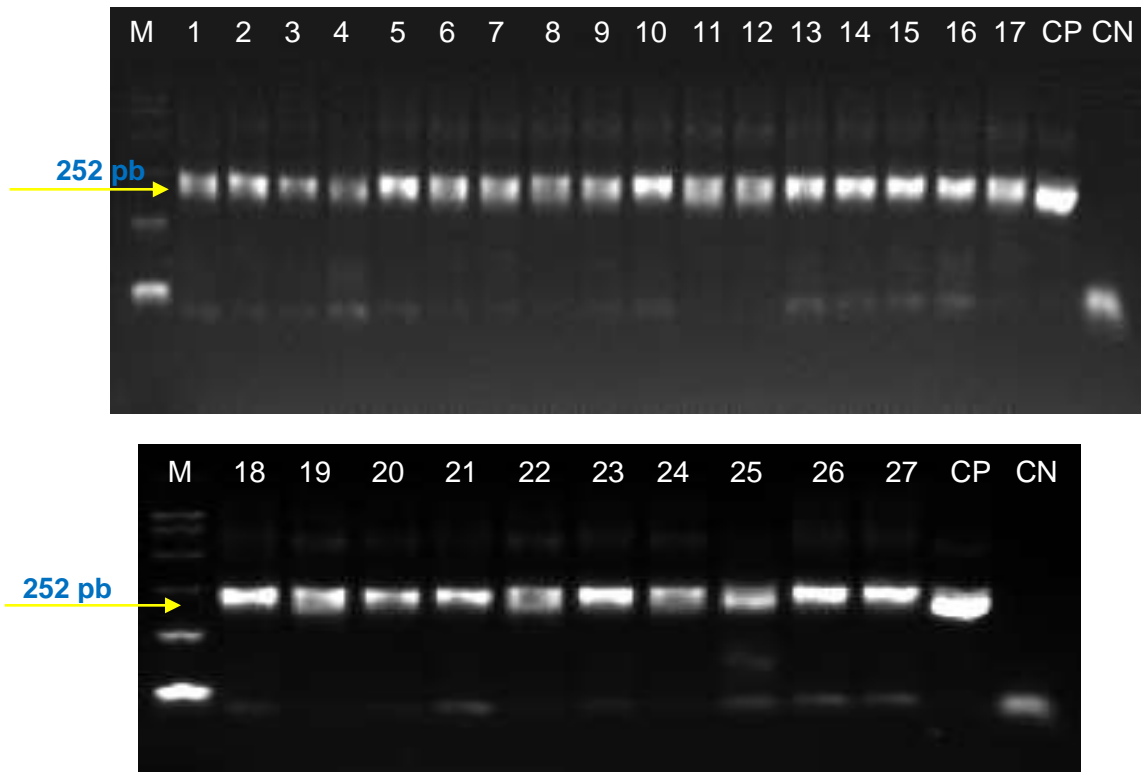
A partir del gen 16S ADNr obtenido en la PCR anterior (1500 pb) se amplifica la región V3 localizado en este gen obteniendo un fragmento de 252 pb, estos productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 3% durante 110 min a 90 V utilizando como marcadores DNA Lambda de Promega y Benchtop de Promega. Tal como se observa en las Figuras 22, 23, 24, 25, 26 y 27.



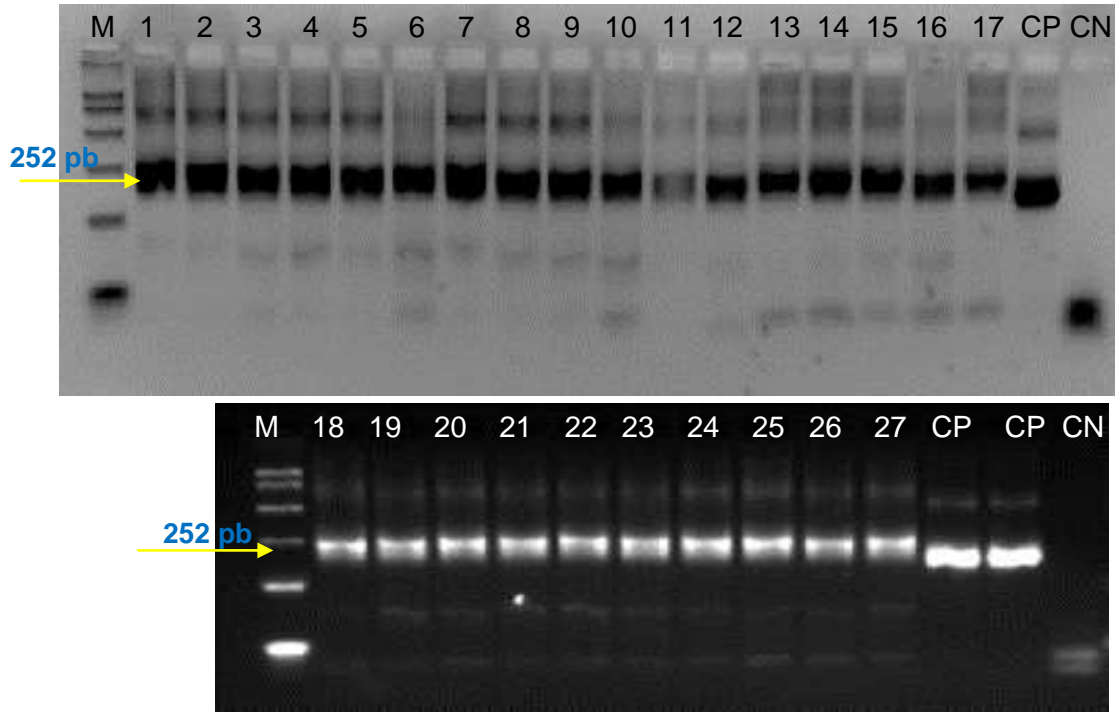
**Figura 22.** Amplificación de la región hipervariable V3 del gen 16S ADN ribosomal derivado de las muestras de suelo. M1=Marcador de ADN lambda, M2=BenchTop de Promega, CP= Control positivo (Cepa *Sphingobium* sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27)



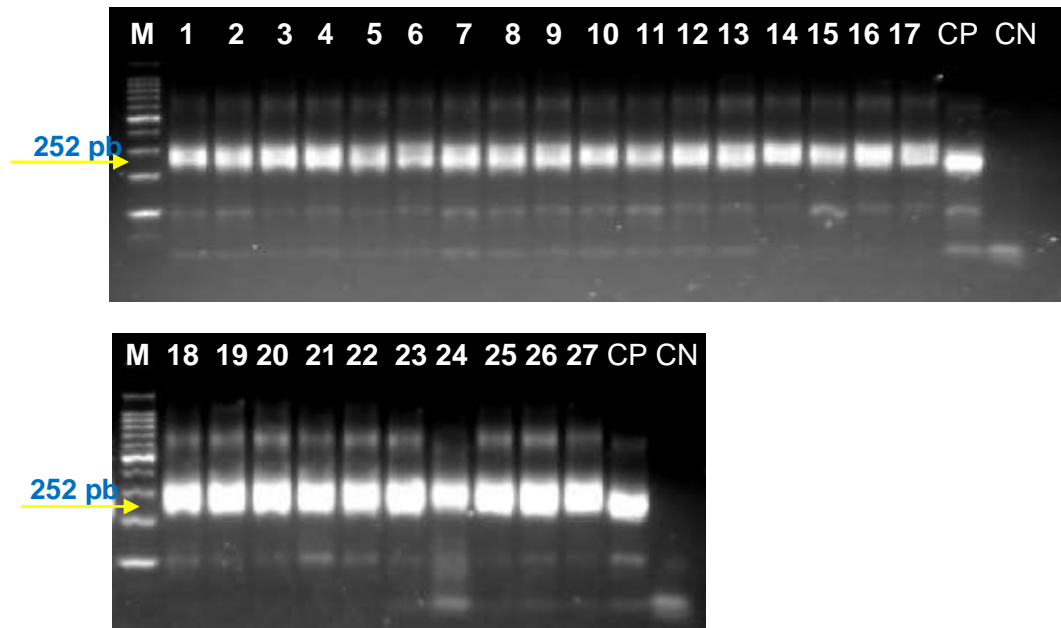
**Figura 23.** Amplificación de la región hipervariable V3 del gen 16S ADN ribosomal derivado de la rizosfera de las algodón convencional y transgénico de la etapa vegetativa. M= BenchTop de Promega, CP= Control positivo (Cepa *Sphingobium* sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27)



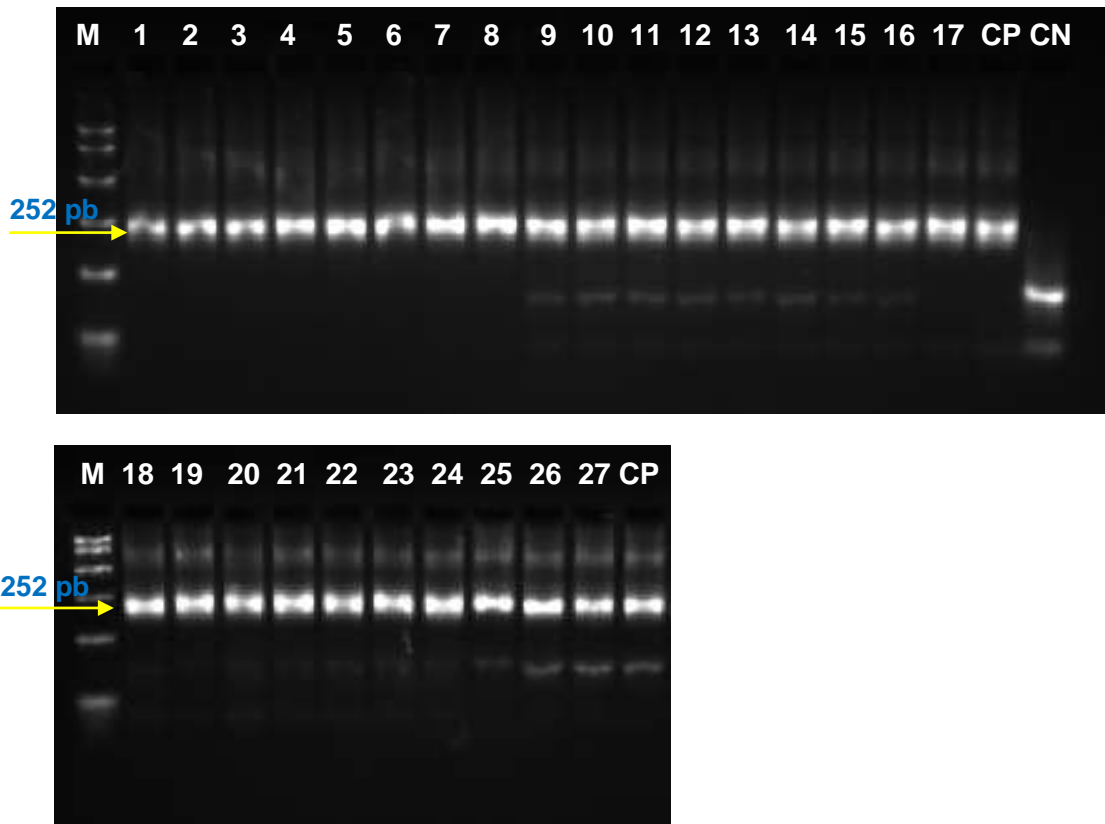
**Figura 24.** Amplificación de la región hipervariable V3 del gen 16S ADN ribosomal derivado de la rizosfera de las algodón convencional y transgénico de la etapa floración. M= BenchTop de Promega, CP= Control positivo (Cepa *Sphingobium* sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27)



**Figura 25.** Amplificación de la región hipervariable V3 del gen 16S ADN ribosomal derivado de la rizosfera de las algodón convencional y transgénico de la etapa cosecha. M= BenchTop de Promega, CP= Control positivo (Cepa *Sphingobium* sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27)



**Figura 26.** Amplificación de la región hipervariable V3 del gen 16S ADN ribosomal derivado de las muestras de rizosfera colectadas durante la etapa vegetativa del 2016. M= Marcador BenchTop de Promega, CP= Control positivo (Cepa *Sphingobium* sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27)



**Figura 27.** Amplificación de la región hipervariable V3 del gen 16S ADN ribosomal derivado de las muestras de rizosfera colectadas durante la etapa floración del 2016. M= Marcador BenchTop de Promega, CP= Control positivo (Cepa *Sphingobium* sp.) y CN= Control negativo (Sin ADN). T1=Algodón convencional (carril 1-9), T2=Algodón transgénico 1 (carril 10-18) y T3=Algodón transgénico 2 (carril 19-27)



## **7.5 Muestras de suelo antes de la siembra (Bulk Soil, BS)**

### **7.5.1 Abundancia relativa (BS)**

A partir de las muestras de suelo (BS) se obtuvieron un total de 136,796 secuencias limpias con un control de calidad (Quality score, QS=30). Los phyla más abundantes fueron: Proteobacteria (BS1 = 31.96%, BS2 = 38.62%, BS3=38.85%), Firmicutes (BS1=19.52%, BS2=11.39%, BS3=11.05%), Acidobacteria (BS1=12.64%, BS2=12.55%, BS3=12.98%), Actinobacteria (BS1=13.34%, BS2=10.33%, BS3=11.10%), Gemmatimonadetes (BS1=12.70%, BS2=16.46%, BS3=16.25%) y Bacteroidetes (BS1=4.94%, BS2=6.61%, BS3=5.43%) (figura 28A). La abundancia relativa de los principales familias fue similar en todas las muestras de los suelos donde Bacillaceae (BS1=16.13%, BS2=9.37%, BS3=8.97%) fue la más representada seguido por Chitinophagaceae (BS1=3.86%, BS2=5.43%, BS3 =4.44%) y Rhodospirillaceae (BS1=4.90%, BS2=4.94%, BS3=6.30%) (Figura 28B).

### **7.5.2 Alfa diversidad (BS).**

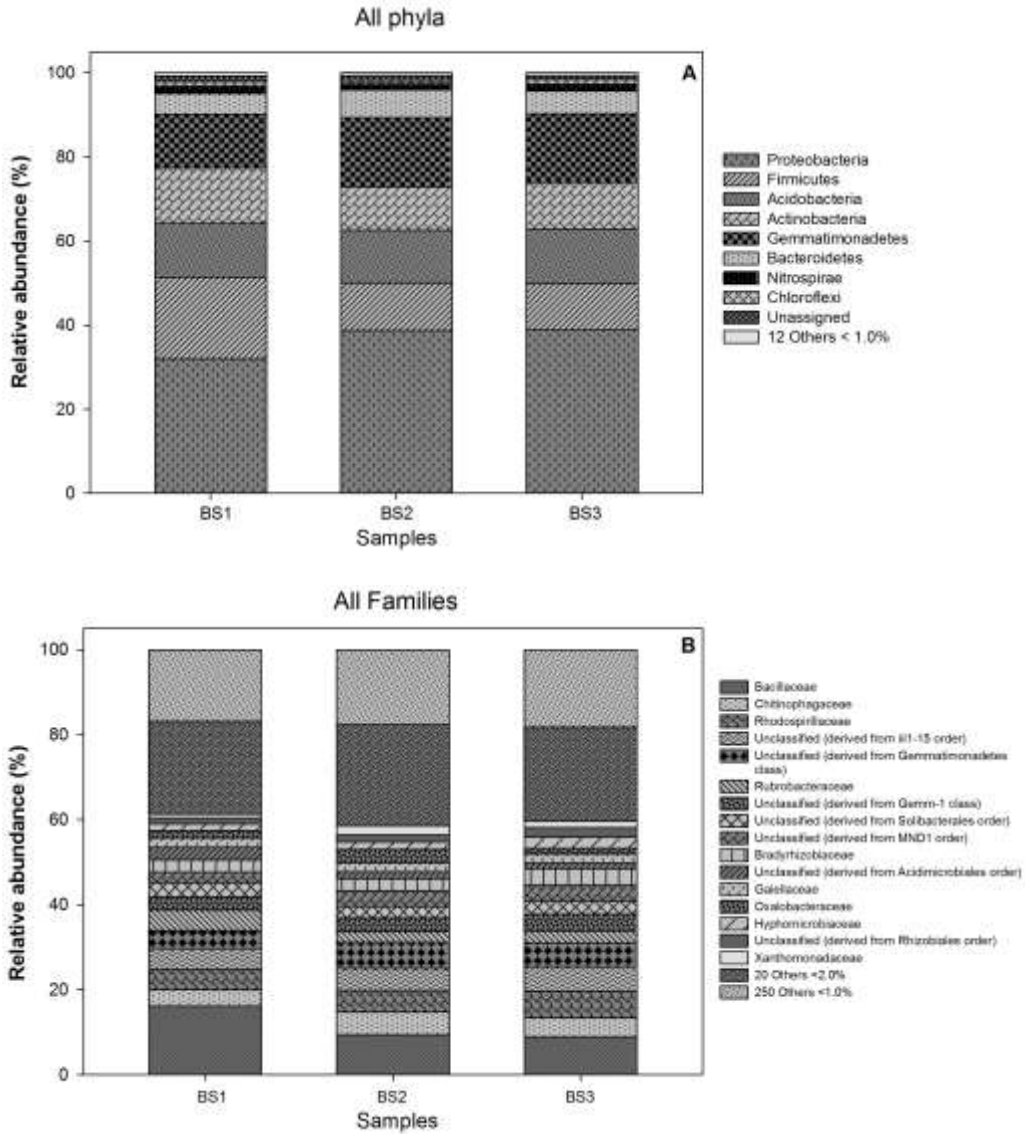
El número de especies observadas fue 6312, 6772 y 5540 para BS1, BS2 y BS3, respectivamente (ver figura 29). Las muestras de suelo mostraron un gran número de especies esperadas mediante Chao1 (promedio  $\pm$  SE), BS1=8215.696 $\pm$ 101.625, BS2=8591.013 $\pm$ 95.965, BS3=7660.995 $\pm$ 116.960 (Figura 29). El índice de Shannon demostró que el suelo fue diverso en bacterias BS1=7.26, BS2=7.44 y BS3=7.23. El índice de Simpson mostró valores altos de dominancia para el BS1=0.9969, BS2=0.9978 y BS3=0.9972 y están distribuidos equivalentemente y algunas especies dominan estos suelos (Figura 29).

### **7.5.3 Beta diversidad (BS).**

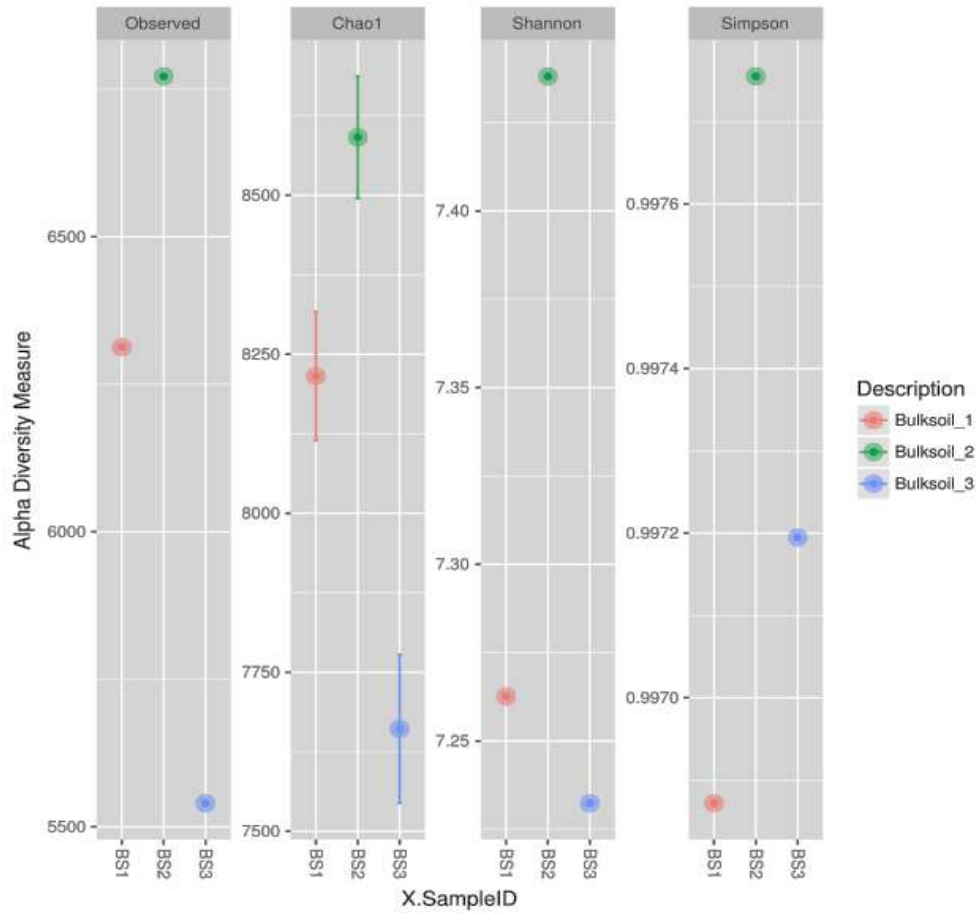
Cuando se compararon las comunidades bacterianas a nivel de género, el agrupamiento jerárquico de los perfiles bacterianos (eje vertical) mostró que las muestras BS3 y BS2 tienen un 100% de similitud relacionada filogenéticamente entre ellas. La BS1 se agrupó en una rama separada del árbol y reveló que las comunidades bacterianas del suelo S1 fueron cercanas al 60%

de similitud con BS2 y BS3. El género *Bacillus* sp. fue el más abundante en las muestras de suelo con una abundancia relativa similar entre ellas (BS1=15.84%; BS2=9.17%; BS3=8.78%) seguido de no clasificado Gemmatimonadetes, iii-15, Rhodospirillaceae, Gemm-1, Solibacterales, Rubrobacteraceae, MND1, Flavisolibacter, Acidimicrobiales, Gaiellaceae, Rhizobiales, Chitinophagaceae y Gemm-5 (Figura 30).

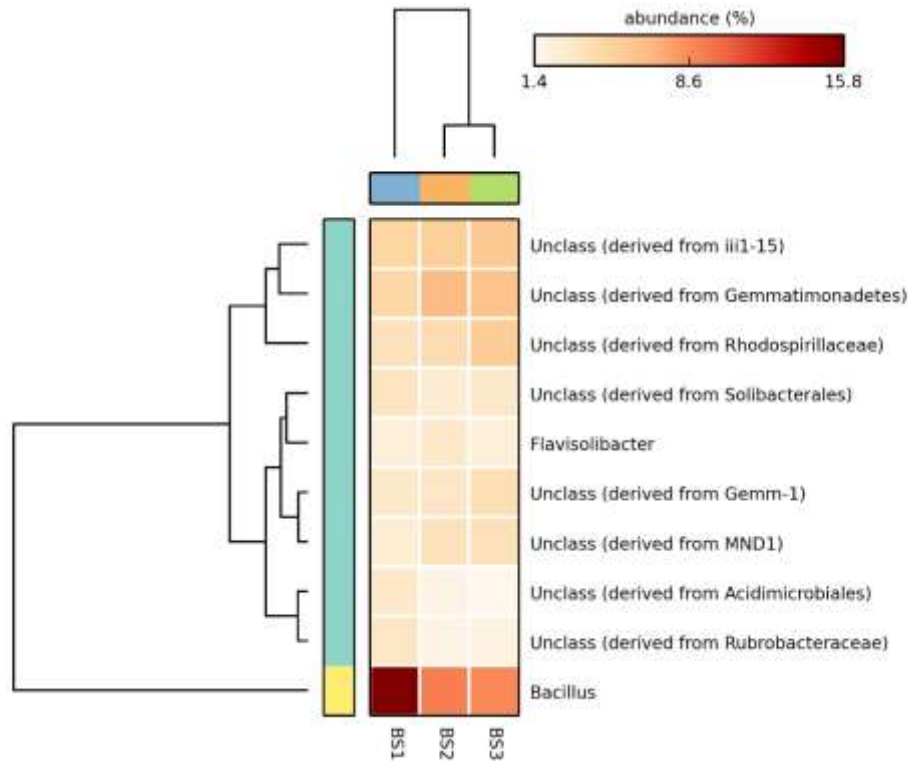
Estos suelos semiáridos comparten una riqueza de especies, abundancia y diversidad similar. Dichos datos son valiosos debido a que este estudio representa un amplio conocimiento antes de la siembra y una primera revisión de las comunidades bacterianas de un suelo libre de OGMs ubicado en el noreste de México para discernir el posible impacto del algodón transgénico en la comunidad bacteriana asociada a su rizosfera.



**Figura 28.** Abundancia relativa representada en porcentaje derivado de las muestras de suelo. BS1 (muestra de suelo 1), BS2 (muestra de suelo 2) y BS3 (muestra de suelo 3). (A) Nivel taxonómico Phyla y (B) nivel taxonómico Familias



**Figura 29.** Alfa diversidad de las muestras de suelo (BS1, BS2 y BS3). El número de especies observadas, índice de Shannon, índice de Simpson y Chao1 de cada muestra



**Figura 30.** Gráfico Heatmap que muestra los OTUs más abundantes y el método de agrupamiento fue en base a la abundancia relativa. La figura muestra en color representando la muestra de suelo 1 (BS1), 2 (BS2) y 3 (BS3) agrupadas en el eje vertical y el género al que pertenecen el eje horizontal de acuerdo a su abundancia. Los rangos de la abundancia relativa van de 1.4 a 15.8 en color de intensidad de naranja (baja abundancia) a rojo (alta abundancia)

## 7.6 Análisis de la secuenciación de las muestras derivadas de la rizosfera del año 2015

### 7.6.1 Secuenciación

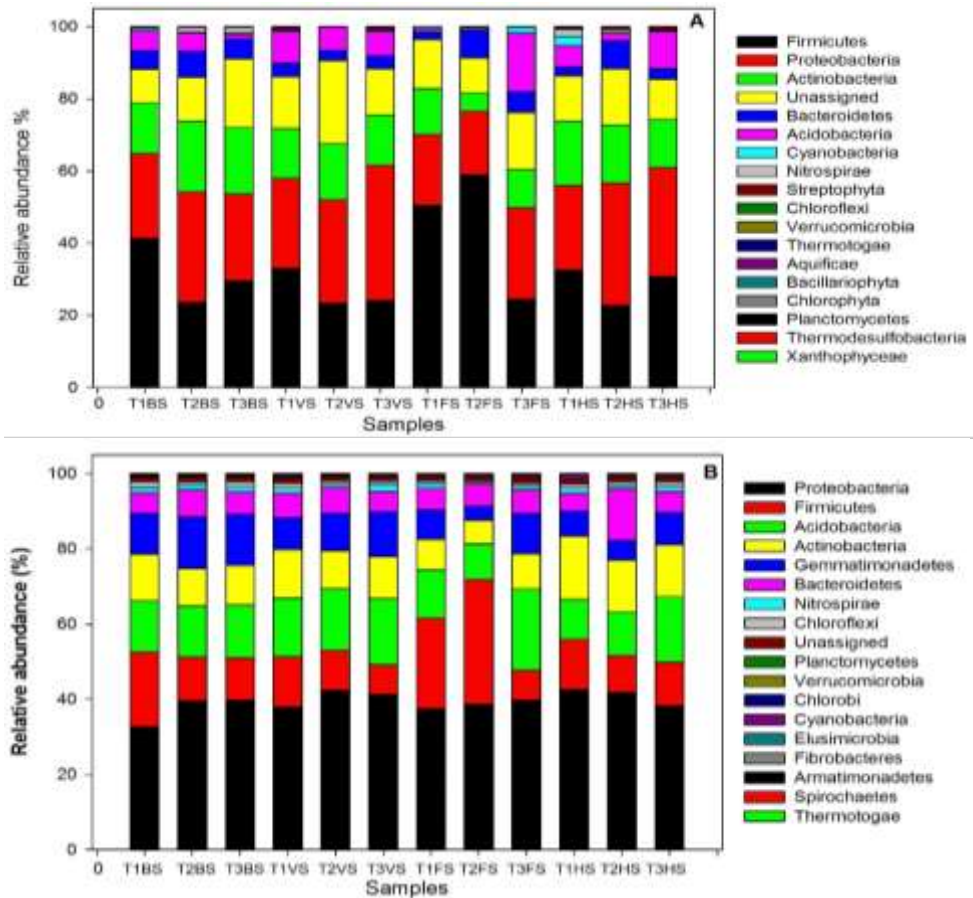
En la Tabla 11 se observa la lista de las muestras derivadas del suelo (BS1, BS2 y BS3), de la rizosfera de las plantas de algodón convencional (T1), transgenico 1 (T2) y 2 (T3) colectadas en las diferentes etapas fenológicas vegetativa (VS), floración (FS) y cosecha (HS) del año 2015. Además, el rango de secuencias osciló de 2155 a 50845 dependiendo de la etapa fenológica.

**Tabla 11.** Secuencias obtenidas de la rizosfera durante la temporada de siembra 2015

Muestra	Origen	Secuencias QS=30	Secuencias en crudo
BS1	Suelo	47530	77,379
BS2		50845	86,355
BS3		38421	58,371
T1VS	Algodón convencional	13078	42,183
T2VS	Algodón transgénico 1	2155	7102
T3VS	Algodón transgénico 2	3157	9,087
T1FS	Algodón convencional	4749	12,888
T2FS	Algodón transgénico 1	3947	13704
T3FS	Algodón transgénico 2	4794	11,706
T1HS	Algodón convencional	19607	59755
T2HS	Algodón transgénico 1	12146	35719
T3HS	Algodón transgénico 2	12086	39980

### 7.6.2 Abundancia relativa

Durante la temporada del año 2015, se colectaron muestras de la rizosfera del algodón convencional (T1), transgénico 1 (T2) y transgénico 2 (T3). Se analizaron las secuencias empleando la plataforma de MG-RAST y QIIME. El resultado de la abundancia relativa se muestra en la figura 31. Empleando la plataforma de MG-RAST y QIIME se encontró que los phylum más abundantes asociados a la rizosfera de los 3 genotipos de algodón y suelo fueron proteobacteria, firmicutes, acidobacteria y actinobacteria, mientras que los menos abundantes fueron gemmatimonadetes, bacteroidetes, chloroflexi, planctomycetes. Sin embargo, al utilizar la plataforma MG-RAST identificó un gran porcentaje de bacterias no asignadas (unassigned). Por lo tanto, QIIME fue la mejor plataforma para el análisis de secuencias del gen 16S DNA ribosomal.



**Figura 31.** Abundancia relativa representada en porcentaje derivado de las muestras de suelo y rizosfera determinadas mediante la plataforma A) MG-RAST y B) QIIME. T1=algodón convencional, T2=Algodón transgénico 1 y GM2=Algodón transgénico 2. BS= Suelo antes de la siembra, VS=Etapa vegetativa (Vegetativa stage), FS= Etapa de floración (Flowering stage) y HS=Etapa de cosecha (Harvest stage)

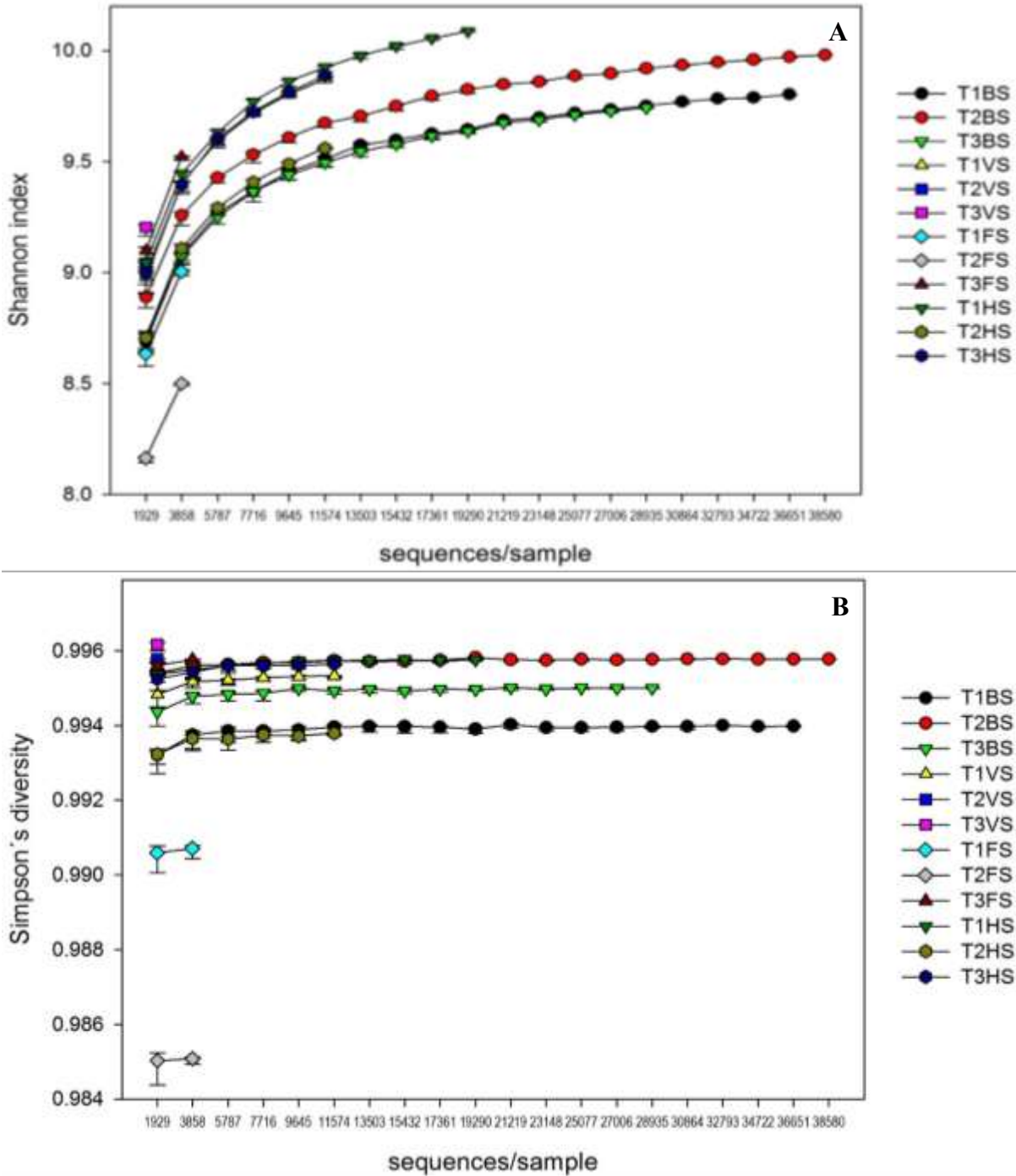
### **7.6.3 Alfa diversidad (análisis de rarefacción)**

En la figura 32A se muestra el índice de diversidad de Shannon, éste índice nos indica Grado de homogeneidad de la distribución y depende de la uniformidad de las abundancias de los OTUs presentes en la muestra, éste se calculó a un 97% de similitud y se calcularon un total de 50 de réplicas a una profundidad de 39000 secuencias seleccionadas al azar de cada muestra. Se encontró uniformidad de la abundancia a partir de las 19000 secuencias/muestra, puesto que tiende a ser éste estacionario.

En la figura 32B se muestra el índice de diversidad de Simpson, éste índice mide la fuerza de dominancia, porque su peso es hacia la abundancia de las especies más comunes y varía inversamente con la diversidad de especies. De acuerdo a índice de Simpson un valor 0 y 1 nos indica que no hay diversidad y un valor arriba de 1 una diversidad infinita, observando en las muestras de este estudio una diversidad limitada o baja.

En este primer análisis de las secuencias nos permitió observar que el número de secuencias obtenidas era muy bajas con respecto al número de especies estimadas con el parámetro de Chao1 en muestras tales como las de la rizosfera de algodón, puesto que las curvas no se estacionaron sino que se quedaron de manera exponencial.

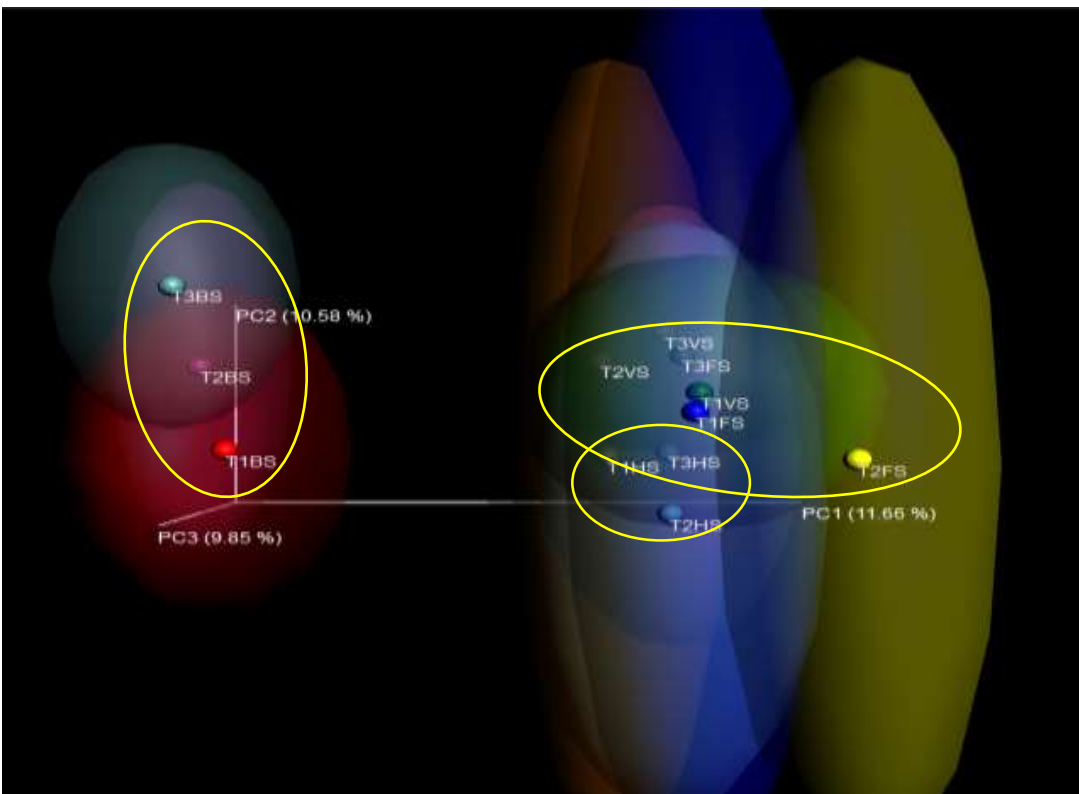




**Figura 32.** Análisis de Alfa diversidad calculados mediante la plataforma QIIME. A) Índice de diversidad de Shannon y B) Índice de Simpson. T1=Algodón convencional, T2=Algodón transgénico 1 y GM2=Algodón transgénico 2. BS= Suelo antes de la siembra, VS=Etapa vegetativa (Vegetativa stage), FS= Etapa de floración (Flowering stage) y HS=Etapa de cosecha (Harvest stage)

#### 7.6.4 Beta diversidad

Se calculó la beta diversidad para la comparación entre las muestras mediante Jackknifed weighted Pair Group Method con el método UPGMA, este análisis nos indicó que las tres muestras de suelo se agruparon en un solo clúster tal como se observa en la Figura 33. Mientras las muestras derivadas de la rizosfera colectadas a las diferentes etapas fenológicas de crecimiento se localizaron en el componente 1. Sin embargo, podemos observar que esta se agrupó en subgrupos dependiendo de la etapa fenológica, independientemente del genotipo de la planta. Es importante mencionar que durante la etapa fenológica vegetativa y la floración se observó variaciones en las comunidades bacterianas. Por lo tanto, se decidió evaluar a las comunidades bacterianas de estas etapas fenológicas durante dos años consecutivos de siembra en campo.



**Figura 33.** Análisis de componentes coordinados (PCoA) empleando la plataforma QIIME. T1=Algodón convencional, T2=Algodón transgénico 1 y GM2=Algodón transgénico 2. BS= Suelo antes de la siembra, VS=Etapa vegetativa (Vegetativa stage), FS= Etapa de floración (Flowering stage) y HS=Etapa de cosecha (Harvest stage)

## 7.7 Análisis de la secuenciación de las muestras derivadas de la rizosfera del año 2015 y 2016

La calidad va a dictar cuantas lecturas vamos a utilizar en el análisis. En la Tabla 12 se observa la lista de las muestras derivadas del suelo, de la rizosfera de las plantas de algodón convencional (T1), transgénico 1 (T2) y 2 (T3) colectadas en las diferentes etapas fenológicas vegetativa y floración. Además, el rango de secuencias osciló de 5768 a 50845 dependiendo de la etapa fenológica.

**Tabla 12.** Secuencias obtenidas de la rizosfera durante la temporada de siembra 2015 y 2016

Muestra	Origen	Etapas fenológica	Secuencias en crudo	Secuencias QS=30
BS1	Suelo	Antes de la siembra (Before sowing)	77379	47530 (61.42%)
BS2	Suelo		86355	50845 (58.88%)
BS3	Suelo		58371	38421 (65.82%)
T1VS.1.15	Algodón convencional	Etapa vegetativa (Vegetative 2015)	29575	17780 (60.12%)
T1VS.2.15			10164	5843 (57.49%)
T1VS.3.15			10637	6512 (61.22%)
T2VS.1.15	Algodón transgénico 1		11061	6845 (61.88%)
T2VS.2.15			11923	7185 (60.26%)
T2VS.3.15			13157	8662 (65.84%)
T3VS.1.15	Algodón transgénico 2		16514	9459 (57.28%)
T3VS.2.15			12291	7807 (63.52%)
T3VS.3.15			9601	5768 (60.08%)
T1VS.1.16	Algodón convencional	Etapa vegetativa (Vegetative 2016)	16591	10103 (60.89%)
T1VS.2.16			18179	10513 (57.83%)
T1VS.3.16			18071	10476 (57.97%)
T2VS.1.16	Algodón transgénico 1		12442	7743 (62.23%)
T2VS.2.16			26226	14586 (55.62%)
T2VS.3.16			32974	18083 (54.84%)
T3VS.1.16	Algodón transgénico 2		27498	16900 (61.46%)
T3VS.2.16			30876	17461 (56.55%)
T3VS.3.16			16813	11817 (70.28%)
T1FS.1.15			69901	53940 (77.17%)

<b>T1FS.2.15</b>	Algodón	Etapa floración (Flowering 2015)	58819	44764 (76.10%)
<b>T1FS.3.15</b>	convencional		67832	53451 (78.80%)
<b>T2FS.1.15</b>	Algodón transgénico 1		23253	18767 (80.71%)
<b>T2FS.2.15</b>			69574	54273 (78.01%)
<b>T2FS.3.15</b>			43383	34380 (79.25%)
<b>T3FS.1.15</b>	Algodón transgénico 2		36670	28176 (76.84%)
<b>T3FS.2.15</b>			58077	44912 (77.33%)
<b>T3FS.3.15</b>			55926	41116 (73.52%)
<b>T1FS.1.16</b>	Algodón convencional		Etapa floración (Flowering 2016)	55783
<b>T1FS.2.16</b>		46984		36671 (78.05%)
<b>T1FS.3.16</b>		48194		37225 (77.24%)
<b>T2FS.1.16</b>	Algodón transgénico 1	61285		46316 (75.57%)
<b>T2FS.2.16</b>		71265		52398 (73.53%)
<b>T2FS.3.16</b>		43006		32569 (75.73%)
<b>T3FS.1.16</b>	Algodón transgénico 2	98440		78776 (80.02%)
<b>T3FS.2.16</b>		50910		38419 (75.46%)
<b>T3FS.3.16</b>		58113		46199 (79.50%)

### 7. 7. 1 Abundancia relativa de las muestras colectadas durante la etapa vegetativa y floración (2015 y 2016)

Se identificaron un total de 15 phylum en el suelo y 21 phylum diferentes en la rizosfera del algodón convencional (T1) y transgénicos (T2 y T3). A nivel de familia se identificaron un total de 392 familias diferentes en las muestras de suelo y rizosfera del algodón convencional (T1) y transgénicos (T2 y T3).

En la Figura 34 se observa la abundancia relativa en porcentaje de los primeros 9 phylum y de las 14 familias identificadas en cada uno de los genotipos de plantas de algodón derivados de las muestras de suelo (BS= antes de la siembra) y la rizosfera colectadas en la etapa vegetativa y floración (vegetative, flowering) de la durante el año 2015 y 2016.

En la Figura 34A, en la rizosfera del algodón convencional (T1) y los transgénicos (T2 y T3) colectada en la etapa vegetativa del año 2015 mostró una abundancia relativa uniforme a nivel de

phylum. Los phyla fueron Proteobacteria (T1=60%, T2=64.4 y T3=62.4%) seguido de Acidobacteria (T1=15.5%, T2=14.1% y T3=16.0%), Actinobacteria (T1=12.6%, T2=10.6% y T3=9.0%), Gemmatimonadetes (T1=4.2%, T2=4.0% y T3=5.1%), Firmicutes (T1=2.1%, T2=2.3% y T3=1.8%), Bacteroidetes (T1=1.3%, T2=1.3% y T3=1.9%), Chloroflexi (T1=1.7%, T2=1.4% y T3=1.5%), Cianobacterias (T1=1.5%, T2=0.9% y T3=1.1%) y Nitrospirae (T1=0.4%, T2=0.4% y 0.5%).

En este mismo año, en la rizosfera del algodón convencional (T1) y los transgénicos (T2 y T3) colectada en la etapa de floración mostró una abundancia relativa uniforme a nivel phyla. Sin embargo, se observaron variaciones en las proporciones de la abundancia relativa puesto que se incrementó en el phylum Acidobacteria y en el Acidobacteria se disminuyó en el algodón transgénico 2 (T3). Los phyla fueron Proteobacteria (T1=57.4%, T2=58.5 y T3=52.8%) seguido de Acidobacteria (T1=10.4%, T2=8.8% y T3=21.6%), Firmicutes (T1=11.8%, T2=10.8% y T3=2.5%), Actinobacteria (T1=8.4%, T2=10.9% y T3=8.0%), Gemmatimonadetes (T1=4.5%, T2=4.1% y T3=7.5%), Bacteroidetes (T1=4.8%, T2=4.1% y T3=3.8%), Chloroflexi (T1=0.9%, T2=0.8% y T3=1.2%), Cianobacterias (T1=0.6%, T2=1.2% y T3=1.2%) y Nitrospirae (T1=0.7%, T2=0.5% y 0.7%).

Por otro lado, en la rizosfera del algodón convencional (T1) y los transgénicos (T2 y T3) colectada en la etapa vegetativa del año 2016 mostró una abundancia relativa uniforme en algunos phylum debido a que se observaron variaciones en la proporción de la rizosfera del algodón T3 pues ésta se disminuyó en el phylum Proteobacteria y se incrementó en el phylum Cianobacteria. Los phyla fueron Proteobacteria (T1=77.0%, T2=74.5% y T3=66.1%) seguido de Acidobacteria (T1=7.0%, T2=7.5% y T3=7.4%), Actinobacteria (T1=4.9%, T2=5.7% y T3=7.4%), Firmicutes (T1=5.7%, T2=3.5% y T3=5.2%), Cianobacteria (T1=1.8%, T2=2.8% y T3=10.1%), Bacteroidetes (T1=0.9%, T2=2.9% y T3=1.3%), Gemmatimonadetes (T1=1.5%, T2=1.5% y T3=1.2%), Chloroflexi (T1=0.7%, T2=1.0% y T3=0.9%), y Nitrospirae (T1=0.1%, T2=0.2% y 0.1%).

En este mismo año en la rizosfera del algodón convencional (T1) y los transgénicos (T2 y T3) colectada en la etapa de floración 2016 mostró una abundancia relativa uniforme excepto en la

rizosfera del algodón transgénico 1 y 2 (T2 y T3), ya que se observó en la rizosfera del algodón transgénico (T3) un incremento en la proporción del phylum Proteobacteria y Cyanobacteria, mientras que hubo una disminución del phylum Firmicutes. Además, en la rizosfera del algodón transgénico (T2) mostró una disminución en el phylum Actinobacteria. Los phyla fueron Firmicutes (T1=62.6%, T2=65.5% y T3=47.9%), Proteobacteria (T1=25.1%, T2=23.1% y T3=36.3%) seguido de Acidobacteria (T1=2.3%, T2=3.5% y T3=2.9%), Actinobacteria (T1=6.1%, T2=3.8% y T3=7.5%), Gemmatimonadetes (T1=1.5%, T2=1.8% y T3=1.8%), Bacteroidetes (T1=0.9%, T2=1.2% y T3=0.7%), Cyanobacteria (T1=0.7%, T2=0.4% y T3=2.1%), Chloroflexi (T1=0.3%, T2=0.3% y T3=0.4%), y Nitrospirae (T1=0.1%, T2=0.1% y T3=0.1%).

Además, se determinó la abundancia relativa a nivel de familias como se observa en la Figura 33B. La rizosfera del algodón convencional (T1) y los transgénicos (T2 y T3) colectada en la etapa vegetativa del año 2015 mostró una abundancia relativa uniforme a nivel de familia. Las familias fueron principalmente Rhodospirillaceae (T1=14.7%, T2=13.7% y T3=14.5%), no clasificado derivado de Solibacterales (T1=11.7%, T2=10.8% y T3=11.9%), no clasificado derivado de Rhizobiales (T1=9.0%, T2=9.4% y T3=8.0%), no clasificado derivado de Acidimicrobiales (T1=9.4%, T2=7.1% y T3=5.4%). En menor abundancia relativa fueron Hyphomicrobiaceae (T1=4.6%, T2=5.7% y T3=6.4%), no clasificado derivado de Sphingomonadales (T1=4.4%, T2=5.8% y T3=5.6%), Bradyrhizobiaceae (T1=3.7%, T2=5.3% y T3=6.1%), Sphingomonadaceae (T1=3.3%, T2=4.4% y T3=3.5%), Rhizobiaceae (T1=3.5%, T2=3.4% y T3=1.5%), no clasificado derivado de Gemmatimonadetes (T1=1.4%, T2=1.4% y T3=2.0%), Bacillaceae (T1=1.7%, T2=1.6% y T3=1.3%), Chitinophagaceae (T1=1.0%, T2=1.0% y T3=1.4%), no clasificado derivado de iii-15 (T1=0.7%, T2=0.7% y T3=1.1%) y Phormidiaceae (T1=0.3%, T2=0.3% y T3=0.3%).

También, en la rizosfera del algodón convencional (T1) y los transgénicos (T2 y T3) colectada en la etapa floración del año 2015 mostró una abundancia relativa uniforme a nivel de familia a excepción en la rizosfera del algodón transgénico 2 (T3), ya que se observó un incremento en la proporción de la familia Unclassified derived from Solibacterales, mientras que hubo una disminución en las familias Bacillaceae, no clasificado derivado de Rhizobiales, Rhizobiaceae y no clasificado derivado de Acidimicrobiales. Las principales familias fueron Rhodospirillaceae

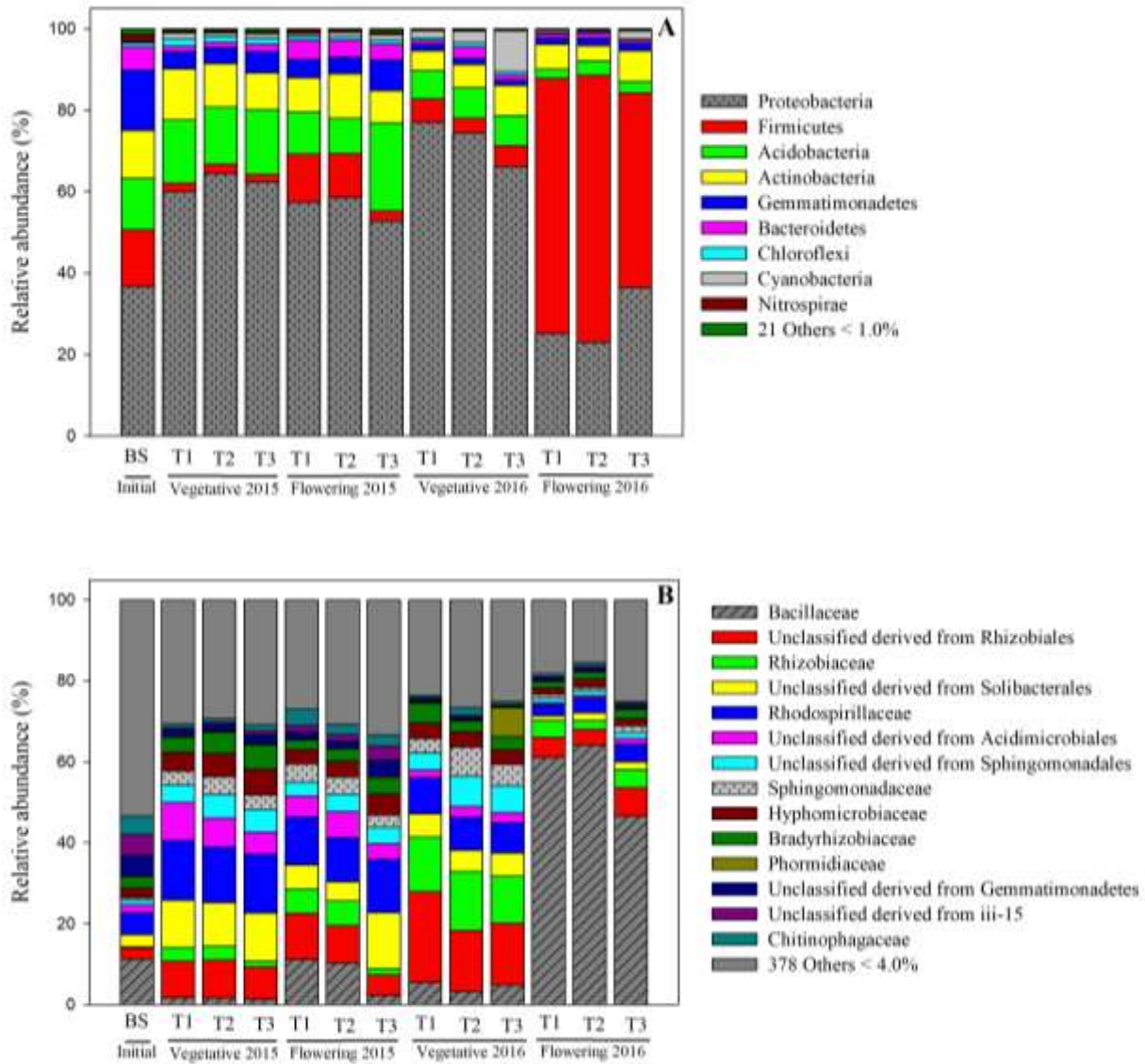
(T1=11.9%, T2=10.9% y T3=13.1%), Bacillaceae (T1=11.0%, T2=10.3% y T3=2.2%), no clasificado derivado de Rhizobiales (T1=11.5%, T2=9.2% y T3=5.1%), no clasificado derivado de Solibacterales (T1=5.9%, T2=4.8% y T3=13.8%). En menor abundancia relativa fueron Rhizobiaceae (T1=6.1%, T2=6.1% y T3=1.6%), no clasificado derivado de Acidimicrobiales (T1=5.1%, T2=6.4% y T3=3.9%), Hyphomicrobiaceae (T1=3.5%, T2=4.0% y T3=5.2%), no clasificado derivado de Sphingomonadales (T1=3.5%, T2=4.4% y T3=4.0%), Sphingomonadaceae (T1=4.5%, T2=4.2% y T3=3.0%), Bradyrhizobiaceae (T1=2.5%, T2=3.0% y T3=3.9%), Chitinophagaceae (T1=4.0%, T2=2.5% y T3=2.8%), no clasificado derivado de Gemmatimonadetes (T1=1.7%, T2=1.7% y T3=4.0%), no clasificado derivado de iii-15 (T1=1.6%, T2=1.6% y T3=3.4%) y Phormidiaceae (T1=0.1%, T2=0.2% y T3=0.6%).

Por otro lado, en la rizosfera del algodón convencional (T1) y los transgénicos (T2 y T3) colectada en la etapa vegetativa del año 2016 mostró una abundancia relativa uniforme excepto en la rizosfera del algodón transgénico 2 (T3), ya que se observó un incremento de siete veces en la proporción de la familia Phormidiaceae comparado con T1 y T2. Las principales familias fueron no clasificado derivado de Rhizobiales (T1=22.5%, T2=15.0% y T3=15.2%), Rhizobiaceae (T1=13.5%, T2=14.7% y T3=11.7%), Rhodospirillaceae (T1=8.9%, T2=8.1% y T3=7.4%), no clasificado derivado de Sphingomonadales (T1=4.3%, T2=7.5% y T3=6.6%), no clasificado derivado de Solibacterales (T1=5.7%, T2=5.2% y T3=5.7%), Sphingomonadaceae (T1=3.5%, T2=7.2% y T3=5.3%). En menor abundancia relativa fueron Bacillaceae (T1=5.4%, T2=3.2% y T3=4.8%) seguido de Bradyrhizobiaceae (T1=4.9%, T2=2.8% y T3=3.2%), Hyphomicrobiaceae (T1=3.9%, T2=3.8% y T3=3.6%), no clasificado derivado de Acidimicrobiales (T1=1.9%, T2=2.7% y T3=2.6%), Chitinophagaceae (T1=0.7%, T2=1.8% y T3=0.8%), no clasificado derivado de Gemmatimonadetes (T1=0.5%, T2=0.5% y T3=0.4%), no clasificado derivado de iii-15 (T1=0.3%, T2=0.6% y T3=0.3%) y Phormidiaceae (T1=0.3%, T2=0.2% y T3=7.2%).

Finalmente, la rizosfera del algodón convencional (T1) y los transgénicos (T2 y T3) colectada en la etapa de floración 2016 mostró una abundancia relativa uniforme. Aunque se observaron algunas variaciones en la disminución en las familias Bacillaceae en la rizosfera del algodón transgénico 2 (T3), no clasificado derivado de Rhizobiales asociada a la rizosfera del transgénico 1 (T2) y Rhodospirillaceae en la rizosfera del algodón convencional (T1). Aquí sucedió un

fenómeno interesante pues la familia Bacillaceae fue la más abundante en la rizosfera de los tres genotipos de algodón en comparación con las diferentes etapas de crecimiento en los dos años consecutivos de siembra (ver Figura 34B). Las principales familias fueron Bacillaceae (T1=61.1%, T2=64.2% y T3=46.5%) seguido del no clasificado derivado de Rhizobiales (T1=5.0%, T2=3.8% y T3=7.0%), Rhizobiaceae (T1=4.1%, T2=2.2% y T3=4.6%) y Rhodospirillaceae (T1=2.8%, T2=3.5% y T3=4.4%). En menor abundancia, la familia Bradyrhizobiaceae (T1=1.5%, T2=1.8% y T3=2.4%), no clasificado derivado de Solibacterales (T1=1.1%, T2=2.0% y T3=1.8%), Hyphomicrobiaceae (T1=1.5%, T2=2.0% y T3=1.8%), Sphingomonadaceae (T1=1.0%, T2=1.0% y T3=1.7%), no clasificado derivado de Sphingomonadales (T1=1.1%, T2=1.2% y T3=1.5%), no clasificado derivado de Gemmatimonadetes (T1=0.7%, T2=0.7% y T3=0.6%), Chitinophagaceae (T1=0.7%, T2=0.9% y T3=0.5%), no clasificado derivado de Acidimicrobiales (T1=0.6%, T2=0.5% y T3=1.3%), no clasificado derivado de iii-15 (T1=0.5%, T2=0.7% y T3=0.5%) y Phormidiaceae (T1=0.1%, T2=0.1% y T3=0.2%).



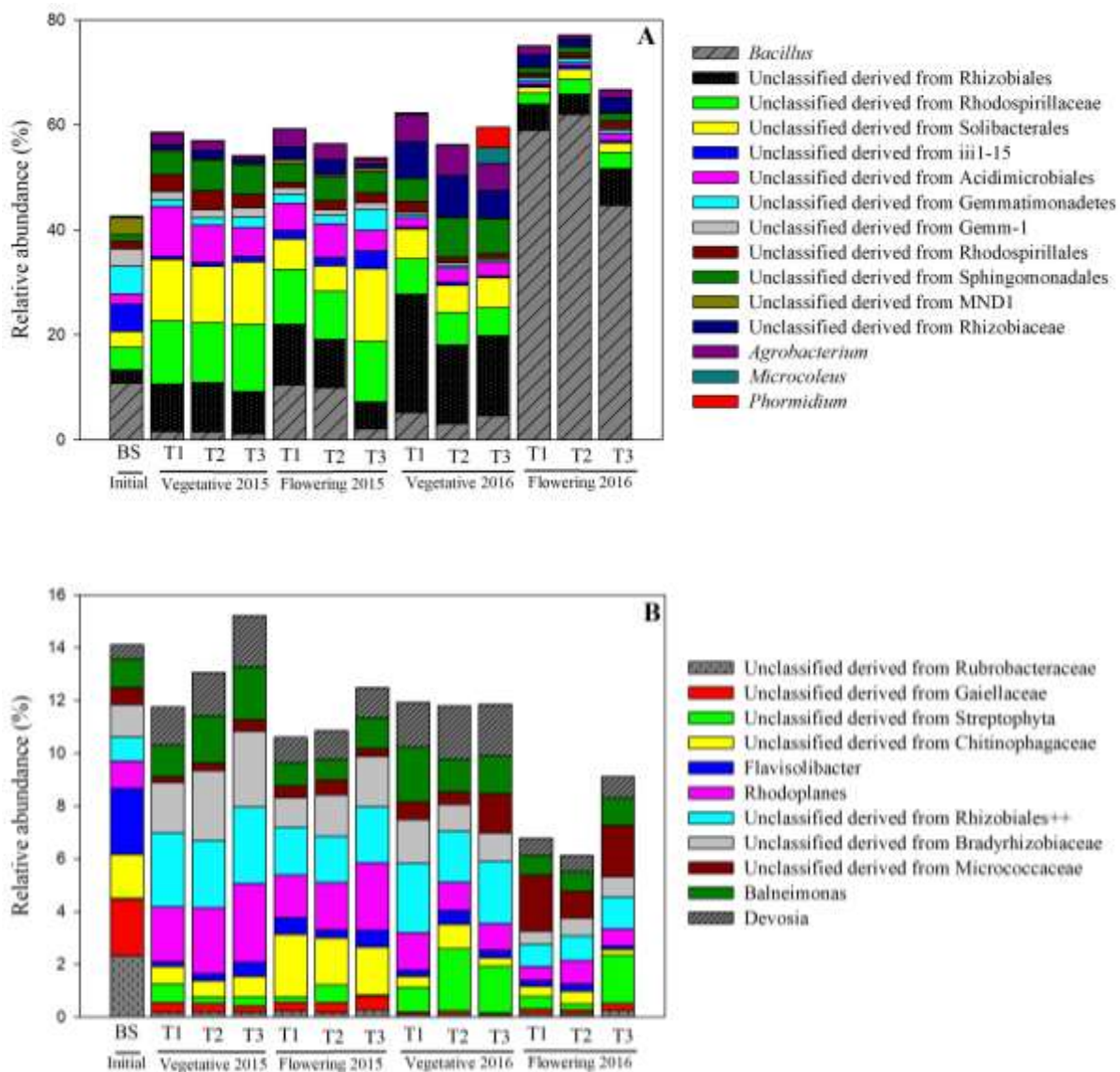


**Figura 34.** Abundancia relativa representada en porcentaje derivado de las muestras de suelo y rizosfera colectadas en la etapa vegetativa 2015 y 2016. BS= Suelo (inicio de la siembra), T1= Convencional, T1= Transgénico 1 y T2=Transgénico 2. Cada barra representa la media de las abundancias relativas por triplicado. **A)** Phylum y **B)** Familia

Se determinó la abundancia relativa a nivel de género como se observó en la figura 34 y éstos fueron 667 géneros diferentes. En la Figura 34 se observan los primeros 26 géneros más abundantes en el suelo y la rizosfera de los tres genotipos de algodón (T1, T2 y T3). Dentro de los primeros 15 géneros en el suelo (BS) destacaron *Bacillus* (10.7%) seguido de Unclassified derived from Gemmatimonadetes (5.2%) y no clasificado derivado de iii-15 (5.2%) (Ver Figura 35).

Además, la rizosfera del algodón convencional (T1) y los transgénicos (T2 y T3) colectada en la etapa vegetativa del año 2015 mostró una abundancia relativa uniforme a nivel de género (ver Figura 35). Dentro de los primeros 15 géneros dominantes fueron no clasificado derivado de Rhodospirillaceae (T1=12.0%, T2=11.4% y T3=12.8%), no clasificado derivado de Solibacterales (T1=11.7%, T2=10.8% y T3=11.9%), no clasificado derivado de Rhizobiales (T1=9.0%, T2=9.4% y T3=8.0%), no clasificado derivado de Acidimicrobiales (T1=9.4%, T2=7.1% y T3=5.4%), no clasificado derivado de Sphingomonadales (T1=4.4%, T2=5.8% y T3=5.6%), no clasificado derivado de Rhodospirillales (T1=3.2%, T2=3.6% y T3=2.6%), *Agrobacterium* (T1=2.1%, T2=1.7% y T3=0.5%), no clasificado derivado de Gemmatimonadetes (T1=1.4%, T2=1.4% y T3=2.0%), no clasificado derivado de Gemm-1 (T1=1.5%, T2=1.5% y T3=1.8%), *Bacillus* (T1=1.6%, T2=1.5% y T3=1.2%), no clasificado derivado de Rhizobiaceae (T1=1.0%, T2=1.6% y T3=0.8%), no clasificado derivado de iii1-15 (T1=0.7%, T2=0.7% y T3=1.1%), no clasificado derivado de MND1 (T1=0.4%, T2=0.3% y T3=0.3%), *Phormidium* (T1=0.1%, T2=0.2% y 0.1%), *Microcoleus* (T1=0.1%, T2=0.03% y T3=0.1%).

Mientras que los siguientes 11 géneros con abundancias menores del 3.0% fueron Unclassified derived from Rhizobiales++ (T1=2.8%, T2=2.5% y T3=2.9%), *Rhodoplanes* (T1=2.1%, T2=2.5% y T3=3.0%), Unclassified derived from Bradyrhizobiaceae (T1=1.9%, T2=2.6% y T3=2.9%), *Balneimonas* (T1=1.2%, T2=1.8% y T3=2.0%), *Devosia* (T1=1.5%, T2=1.6% y T3=1.9%), Unclassified derived from Chitinophagaceae (T1=0.7%, T2=0.6% y T3=0.8%), Unclassified derived from Streptophyta (T1=0.7%, T2=0.2% y T3=0.3%), *Flavisolibacter* (T1=0.2%, T2=0.3% y T3=0.5%), Unclassified derived from Gaiellaceae (T1=0.4%, T2=0.3% y T3=0.2%), Unclassified derived from Micrococcaceae (T1=0.2%, T2=0.3% y T3=0.4%) y Unclassified derived from Rubrobacteraceae (T1=0.2%, T2=0.2% y T3=0.2%) ver Figura 35B.



**Figura 35.** Abundancia relativa representada en porcentaje derivado de las muestras de suelo y rizosfera colectadas en la etapa vegetativa 2015 y 2016. BS= Before sowing (inicio de la siembra), CONV= Convencional, GM1= Transgénico 1 y GM2=Transgénico 2. Cada barra representa la media de las abundancias relativas por triplicado. **A** 15 géneros de mayor abundancia; **B** los próximos 11 géneros (<3.0%)

Además, la rizosfera del algodón convencional (T1) y los transgénicos (T2 y T3) colectada en la etapa floración del año 2015 mostró una abundancia relativa uniforme a nivel de género excepto en la rizosfera del algodón transgénico (T3) debido a que mostró una disminución en la proporción de los géneros *Bacillus*, no clasificado derivado de Rhizobiales, no clasificado derivado de Acidimicrobiales y *Agrobacterium*. Por otro lado, el algodón transgénico (T3) mostró un aumento en la abundancia relativa en no clasificado derivado de Rhodospirillaceae, iii1-15 y Gemmatimonadetes (ver Figura 35).

De acuerdo a la Figura 35A, los primeros 15 géneros dominantes fueron no clasificado derivado de Rhodospirillaceae (T1=10.4%, T2=9.2% y T3=11.5%), no clasificado derivado de Rhizobiales (T1=11.5%, T2=9.2% y T3=5.1%), no clasificado derivado de Solibacterales (T1=5.9%, T2=4.8% y T3=13.8%), *Bacillus* (T1=10.5%, T2=9.9% y T3=2.1%), no clasificado derivado de Acidimicrobiales (T1=5.1%, T2=6.4% y T3=3.9%), no clasificado derivado de Sphingomonadales (T1=3.5%, T2=4.4% y T3=4.0%), *Agrobacterium* (T1=3.4%, T2=2.9% y T3=0.8%), no clasificado derivado de iii1-15 (T1=1.6%, T2=1.6% y T3=3.4%), no clasificado derivado de Rhizobiaceae (T1=2.4%, T2=2.9% y T3=0.7%), no clasificado derivado de Gemmatimonadetes (T1=1.7%, T2=1.7% y T3=4.0%), no clasificado derivado de Rhodospirillales (T1=1.0%, T2=1.7% y T3=1.8%), no clasificado derivado de Gemm-1 (T1=1.3%, T2=1.0% y T3=1.3%), no clasificado derivado de MND1 (T1=0.9%, T2=0.5% y T3=0.8%), *Phormidium* (T1=0.1%, T2=0.1% y 0.3%) y *Microcoleus* (T1=0.015%, T2=0.03% y T3=0.1%).

Mientras que los siguientes 11 géneros con abundancias menores del 3.0% fueron no clasificado derivado de Chitinophagaceae (T1=2.4%, T2=1.8% y T3=1.8%), *Rhodoplanes* (T1=1.6%, T2=1.8% y T3=2.6%), no clasificado derivado de Rhizobiales++ (T1=1.8%, T2=1.8% y T3=2.1%), no clasificado derivado de Bradyrhizobiaceae (T1=1.1%, T2=1.6% y T3=1.9%), *Devosia* (T1=1.0%, T2=1.1% y T3=1.1%), *Balneimonas* (T1=0.9%, T2=0.8% y T3=1.2%), *Flavisolibacter* (T1=0.6%, T2=0.3% y T3=0.6%), no clasificado derivado de Micrococcaceae (T1=0.4%, T2=0.6% y T3=0.3%), no clasificado derivado de Streptophyta (T1=0.2%, T2=0.7% y T3=0.1%), no clasificado derivado de Gaiellaceae (T1=0.3%, T2=0.4% y T3=0.5%) y no clasificado derivado de Rubrobacteraceae (T1=0.2%, T2=0.2% y T3=0.3%) ver Figura 35B.

En la rizosfera del algodón convencional (T1) y los transgénicos (T2 y T3) colectada en la etapa vegetativa del año 2016 mostró una abundancia relativa uniforme a nivel de género excepto que se observaron variaciones en las comunidades rizobacterianas del algodón convencional (T1) y transgénico (T3) (ver figura 35). En la rizosfera del algodón T1 se observó un incremento en la proporción de los géneros Unclassified derived from Rhizobiales y una disminución en la proporción de los géneros no clasificado derivado de Sphingomonadales y Streptophyta. Mientras que en la rizosfera del algodón T3 se incrementó la proporción de los géneros *Microcoleus*, *Phormidium* y no clasificado derivado de Micrococcaceae.

Dentro de los primeros 15 géneros dominantes fueron Unclassified derived from Rhizobiales (T1=22.5%, T2=15.0% y T3=15.2%), no clasificado derivado de Rhizobiaceae (T1=6.9%, T2=7.9% y T3=5.4%), no clasificado derivado de Sphingomonadales (T1=4.3%, T2=7.5% y T3=6.6%), no clasificado derivado de Rhodospirillaceae (T1=6.8%, T2=6.1% y T3=5.3%), no clasificado derivado de Solibacterales (T1=5.7%, T2=5.2% y T3=5.7%), *Agrobacterium* (T1=5.2%, T2=5.8% y T3=5.1%), *Bacillus* (T1=5.2%, T2=3.1% y T3=4.6%), no clasificado derivado de Acidimicrobiales (T1=1.9%, T2=2.7% y T3=2.6%), no clasificado derivado de Rhodospirillales (T1=2.1%, T2=1.0% y T3=0.9%), *Microcoleus* (T1=0.1%, T2=0.1% y T3=3.0%), *Phormidium* (T1=0.2%, T2=0.1% y T3=3.9%), no clasificado derivado de Gemm-1 (T1=0.5%, T2=0.6% y T3=0.4%), no clasificado derivado de Gemmatimonadetes (T1=0.5%, T2=0.5% y T3=0.4%), no clasificado derivado de iii1-15 (T1=0.3%, T2=0.6% y T3=0.3%) y no clasificado derivado de MND1 (T1=0.1%, T2=0.1% y T3=0.1%) ver Figura 35A.

Mientras que los siguientes 11 géneros con abundancias menores del 3.0% fueron no clasificado derivado de Rhizobiales++ (T1=2.6%, T2=1.9% y T3=2.3%), no clasificado derivado de Streptophyta (T1=0.9%, T2=2.4% y T3=1.8%), *Devosia* (T1=1.7%, T2=2.0% y T3=2.0%), *Balneimonas* (T1=2.1%, T2=1.2% y T3=1.4%), no clasificado derivado de Bradyrhizobiaceae (T1=1.7%, T2=1.0% y T3=1.1%), *Rhodoplanes* (T1=1.4%, T2=1.1% y T3=1.0%), no clasificado derivado de Micrococcaceae (T1=0.7%, T2=0.5% y T3=1.5%), no clasificado derivado de Chitinophagaceae (T1=0.4%, T2=0.9% y T3=0.3%), *Flavisolibacter* (T1=0.2%, T2=0.5% y T3=0.3%), no clasificado derivado de Rubrobacteraceae (T1=0.1%, T2=0.1% y T3=0.1%) y no clasificado derivado de Gaiellaceae (T1=0.1%, T2=0.1% y T3=0.1%) ver Figura 35B.

La rizosfera del algodón convencional (T1) y los transgénicos (T2 y T3) colectada en la etapa floración del año 2016 mostró una abundancia relativa uniforme a nivel de género excepto que se observaron variaciones en las comunidades rizobacterianas de los algodones transgénicos (T2 y T3) (ver Figura 35). La proporción del género *Agrobacterium* fue menor en la rizosfera del algodón T2 en comparación a los algodones T1 y T3. Asimismo, el género *Bacillus* fue menor en la rizosfera del algodón transgénico T3 en comparación a los algodones T1 y T2. Sin embargo, este género fue el más abundante en los tres genotipos de algodón.

Dentro de los primeros 15 géneros dominantes fueron *Bacillus* (T1=58.9%, T2=62.0% y T3=44.6%), no clasificado derivado de Rhizobiales (T1=5.0%, T2=3.8% y T3=7.0%), no clasificado derivado de Rhodospirillaceae (T1=2.1%, T2=2.8% y T3=3.1%), no clasificado derivado de Rhizobiaceae (T1=2.3%, T2=1.3% y T3=2.7%), no clasificado derivado de Solibacterales (T1=1.1%, T2=2.0% y T3=1.8%), no clasificado derivado de Sphingomonadales (T1=1.1%, T2=1.2% y T3=1.5%), *Agrobacterium* (T1=1.6%, T2=0.7% y T3=1.4%), no clasificado derivado de Acidimicrobiales (T1=0.6%, T2=0.5% y T3=1.3%), no clasificado derivado de Rhodospirillales (T1=0.7%, T2=0.8% y T3=1.3%), no clasificado derivado de Gemmatimonadetes (T1=0.7%, T2=0.7% y T3=0.6%), no clasificado derivado de iii1-15 (T1=0.5%, T2=0.7% y T3=0.5%), no clasificado derivado de Gemm-1 (T1=0.3%, T2=0.3% y T3=0.4%), no clasificado derivado de MND1 (T1=0.2%, T2=0.2% y T3=0.3%), *Microcoleus* (T1=0.04%, T2=0.02% y T3=0.1%) y *Phormidium* (T1=0.05%, T2=0.04% y T3=0.1%) ver Figura 35A.

Mientras que los siguientes 11 géneros con abundancias menores del 3.0% fueron no clasificado derivado de Micrococcaceae (T1=2.1%, T2=1.0% y T3=1.9%), no clasificado derivado de Streptophyta (T1=0.5%, T2=0.2% y T3=1.8%), *Rhodoplanes* (T1=0.5%, T2=0.9% y T3=0.6%), no clasificado derivado de Chitinophagaceae (T1=0.4%, T2=0.5% y T3=0.2%), no clasificado derivado Gaiellaceae (T1=0.2%, T2=0.1% y T3=0.3%), no clasificado derivado de Rubrobacteraceae (T1=0.1%, T2=0.1% y T3=0.3%), *Flavisolibacter* (T1=0.2%, T2=0.3% y T3=0.1%), no clasificado derivado de Rhizobiales++ (T1=0.8%, T2=0.9% y T3=1.2%), no clasificado derivado de Bradyrhizobiaceae (T1=0.5%, T2=0.7% y T3=0.8%), *Balneimonas* (T1=0.7%, T2=0.8% y T3=1.0%) y *Devosia* (T1=0.7%, T2=0.6% y T3=0.8%) ver Figura 35B.

### **7.7.2 Distribución de las comunidades bacteriana de las muestras de suelo (Bulk soil, BS) y de la rizosfera colectadas durante la etapa vegetativa y floración en el año 2015 y 2016**

De acuerdo a la Figura 36, el resultado del árbol filogenético mostró que de los 20 principales géneros pertenecen al phylum Proteobacteria, Acidobacteria, Cyanobacterias, Gemmatimonadetes, Firmicutes y Actinobacteria. Este Heatmap muestra los valores de abundancia más cercanos o alejados respecto a las media de cada abundancia relativa por cada género identificado en las muestras de suelo o rizosfera de los tres genotipos de algodón convencional (T1) y transgénico (T2 y T3).

Además, las comunidades del suelo y rizobacterianas se agruparon en dos grupos principales I y II. El primer grupo (I) se subdividió en dos subgrupos A y B, el subgrupo A albergó a las comunidades bacterianas del suelo y el subgrupo B a las comunidades de la rizosfera de las plantas de algodón convencional y transgénico colectadas durante la etapa de floración del año 2016.

Por otro lado, el segundo grupo (II) se subdividió en subgrupos C y D. El subgrupo C incluyó a las comunidades asociadas a la rizosfera de algodón transgénico y convencional colectadas durante la etapa de floración del año 2015. Mientras que el subgrupo D albergó a las comunidades bacterianas que habitan en la rizosfera derivadas del algodón convencional y transgénico colectados en la etapa vegetativa (subgrupo D1) y de la etapa de la floración (subgrupo D2) del año 2015.

Es importante mencionar que dentro de cada subgrupo estos se agruparon a las muestras de la rizosfera del algodón convencional (T1) y transgénico (T2 y T3) sin importar la modificación genética durante todas las etapas fenológicas y temporada de siembra 2015 o 2016.





### **7. 7. 3 Alfa diversidad de las muestras de suelo (Bulk soil, BS) y de la rizosfera colectadas durante la etapa vegetativa y floración en el año 2015 y 2016**

#### **7.7.3.1 Especies observadas**

En la Figura 37 se muestra el número de especies observadas y el índice de Chao1. En las muestras de suelo el número de especies observadas e índice de Chao1 fue mayor que en la rizosfera. En las muestras de suelo el número de especies observadas fue una media de 7045. Mientras que en la rizosfera se identificaron entre 1451 hasta 6232 de especies observadas. El número de especies observadas para las muestras de suelo (15\_01\_BS) fueron de 7228, 7699 y 6208.

Por otro lado, en la rizosfera colectada durante la etapa vegetativa 2015 para el algodón convencional (15\_02\_VS\_T1) fueron de 3059, 1451 y 1542. Para el algodón transgénico 1 (15\_02\_VS\_T2) fueron de 1589, 1663 y 1894. Además en el algodón transgénico 2 (15\_02\_VS\_T3) se albergó 2022, 1851 y 1476 de especies observadas. En este mismo año en la rizosfera de algodón colectada durante la etapa de floración se identificó en el convencional (15\_03\_FS\_T1) 5595, 4532 y 6502 especies observadas. Para el algodón transgénico 1 (15\_03\_FS\_T2) fueron de 2885, 6184 y 4597. Finalmente, para el algodón transgénico 2 (15\_03\_FS\_T3) fueron de 4095, 5915 y 5560.

Durante la siembra del año 2016 en la rizosfera colectada durante la etapa vegetativa 2016 para el algodón convencional (16\_04\_VS\_T1) fueron 1467, 1936 y 2074. Para el algodón transgénico 1 (16\_04\_VS\_T2) fueron 1518, 2844 y 5337. Además, para el algodón transgénico 2 (16\_04\_VS\_T3) fueron 2730, 2502 y 1956 de especies observadas. En este mismo año durante la etapa de floración en el algodón convencional (16\_05\_FS\_T1) se determinaron 4187, 3462 y 3214. Para el algodón transgénico 1 (16\_05\_FS\_T2) fueron 3729, 4551 y 3204. Finalmente, para el algodón transgénico 2 (16\_05\_FS\_T3) fueron 6232, 4229 y 4507.

### **7.7.3.2 Estimador de Chao1**

Como se observa en la Figura 37, el suelo (15\_01\_BS) mostró un gran número de especies esperadas mediante Chao1 y éstas fueron 11760, 12363 y 10205. Por otro lado, en la rizosfera colectada durante la etapa vegetativa 2015 para el algodón convencional (15\_02\_VS\_T1) fueron de 7776, 4545 y 4459. También, en la rizosfera del algodón transgénico 1 (15\_02\_VS\_T2) fueron de 4187, 4786 y 5669. Mientras que en la del algodón transgénico 2 (15\_02\_VS\_T3) fueron de 5639, 5306 y 4078. Durante este mismo año durante la etapa de floración, en la rizosfera del algodón convencional (15\_03\_FS\_T1) fueron de 11464, 8883 y 11598. Además, en el algodón transgénico 1 (15\_03\_FS\_T2) fueron de 6708, 12315 y 9190. Finalmente en la rizosfera del algodón transgénico 2 (15\_03\_FS\_T3) fueron de 9331, 10857 y 10209.

Durante la siembra del año 2016 en la rizosfera colectada durante la etapa vegetativa 2016 para el algodón convencional (16\_04\_VS\_T1) fueron de 3662, 5728 y 5367. Para el algodón transgénico 1 (16\_04\_VS\_T2) fueron de 4246, 6581 y 10425. Asimismo, en la rizosfera del algodón transgénico 2 (16\_04\_VS\_T3) fueron de 6847, 5652 y 4743. En este año, durante la etapa de floración en la rizosfera del algodón convencional (16\_05\_FS\_T1) fueron 8801, 7365 y 7105. Mientras que para el algodón transgénico 1 (16\_05\_FS\_T2) fueron de 8065, 9015 y 7074. Finalmente, en la rizosfera del algodón transgénico 2 (16\_05\_FS\_T3) fueron de 11731, 8799 y 9356 (ver Figura 39).

### **7.7.3.3 Índice de Shannon**

En la Figura 38 se muestra el índice de diversidad de Shannon, es el número de especies (riqueza) respecto al total de los individuos. Además, nos indica grado de homogeneidad de la distribución y depende de la uniformidad de las abundancias de los OTUs presentes en cada muestra. Éste se calculó a un 97% de similitud. Un valor de 0.5 y 5 es una diversidad normal, menos de 2 se considera baja diversidad y mayor de 3 alta diversidad.

Como se observa en la Figura 38, el índice de Shannon demostró que el suelo fue diverso en bacterias mostrando valores de 7.35, 7.49 y 7.29.

Mientras que en la rizosfera colectada durante la etapa vegetativa 2015, el algodón convencional (15\_02\_VS\_T1) mostró un índice de Shannon 6.14, 5.86 y 5.89. La rizosfera del algodón transgénico 1 (15\_02\_VS\_T2) los valores fueron de 5.90, 5.93 y 5.95. Posteriormente, en la rizosfera del algodón transgénico 2 (15\_02\_VS\_T3) los valores del índice fueron de 6.04, 6.04 y 5.95. Durante este mismo año en la etapa de floración, para el algodón convencional (15\_03\_FS\_T1) el índice fue de 5.91, 5.68 y 6.46. Además, para el algodón transgénico 1 (15\_03\_FS\_T2) fueron de 5.90, 6.22 y 6.18. Por último, para el algodón transgénico 2 (15\_03\_FS\_T3) fueron de 6.20, 6.63 y 6.65.

Durante la siembra del año 2016 en la rizosfera colectada durante la etapa vegetativa 2016 para el algodón convencional (16\_04\_VS\_T1) fueron 4.82, 5.48 y 5.80. Por otro lado, en la rizosfera del algodón transgénico 1 (16\_04\_VS\_T2) fueron 5.44, 5.66 y 5.73. Posteriormente, en la rizosfera del algodón transgénico 2 (16\_04\_VS\_T3) fueron 5.78, 5.55 y 5.50. Además, durante este mismo año en la etapa de floración, para el algodón convencional (16\_05\_FS\_T1) los índices fueron de 4.89, 4.59 y 4.33. Mientras que los índices para el algodón transgénico 1 (16\_05\_FS\_T2) fueron 4.30, 4.72 y 4.51. Finalmente, en la rizosfera del algodón transgénico 2 (16\_05\_FS\_T3) los índices fueron 5.21, 5.28 y 5.27.

#### **7.7.3.4 Índice de Simpson**

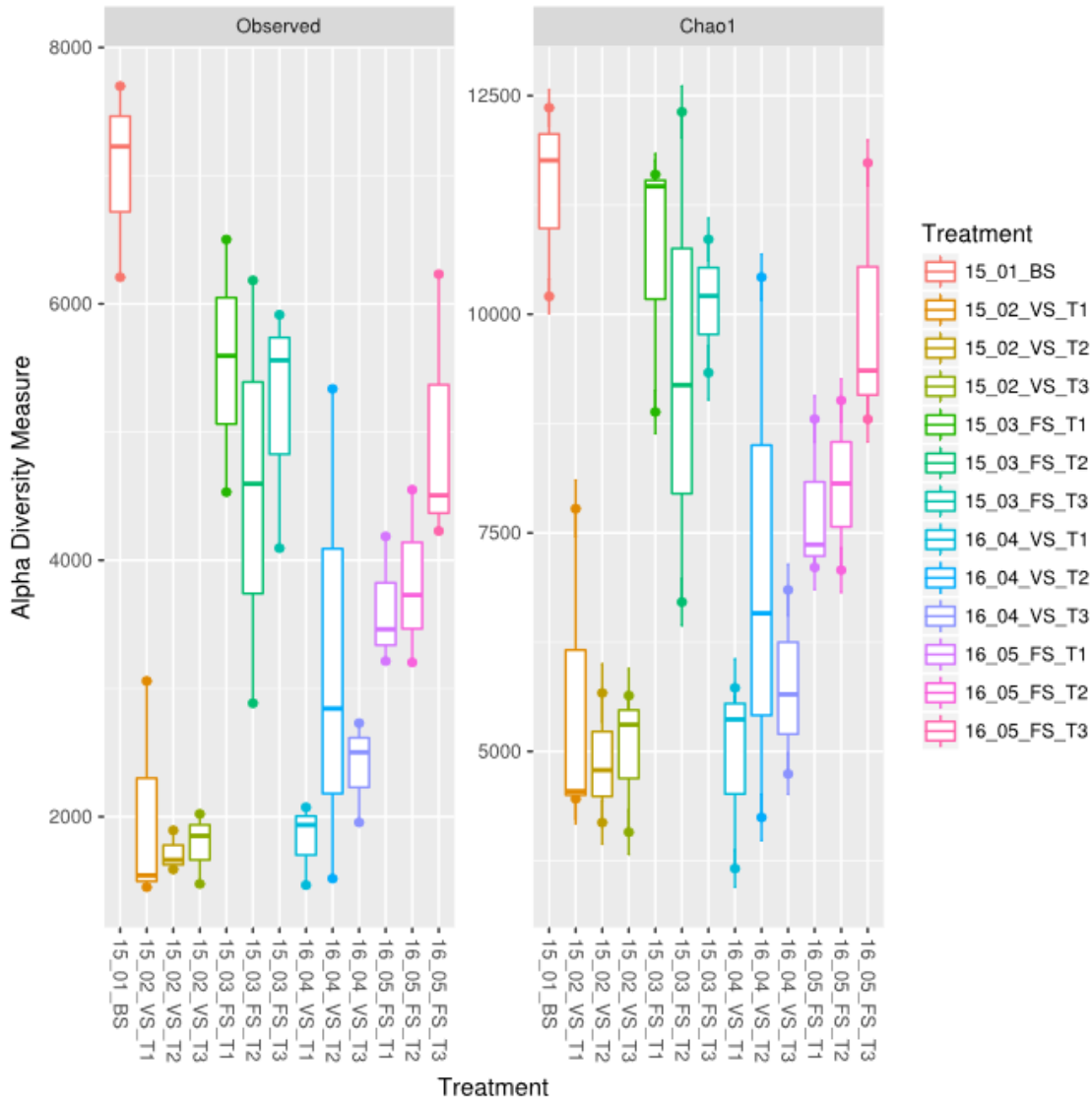
Por otro lado, en la Figura 38 se observa el índice de Simpson, este mide la fuerza de dominancia, porque su peso es hacia la abundancia de las especies más comunes y varía inversamente con la diversidad de especies. Este índice se basa en la probabilidad de que 2 individuos extraídos en una comunidad grande sean la misma especie.

El índice de Simpson en el suelo mostró valores de 0.9970, 0.9978 y 0.9973. Mientras que en la rizosfera colectada durante la etapa vegetativa 2015 el algodón convencional (15\_02\_VS\_T1) mostraron índices de Simpson de 0.9893, 0.9884 y 0.9890. La rizosfera del algodón transgénico 1 (15\_02\_VS\_T2) los valores fueron de 0.9886, 0.9892 y 0.9888. Además, en la rizosfera del algodón transgénico 2 (15\_02\_VS\_T3) los valores del índice fueron de 0.9895, 0.9901 y 0.9889. Durante este mismo año en la etapa de floración, en la rizosfera del algodón convencional

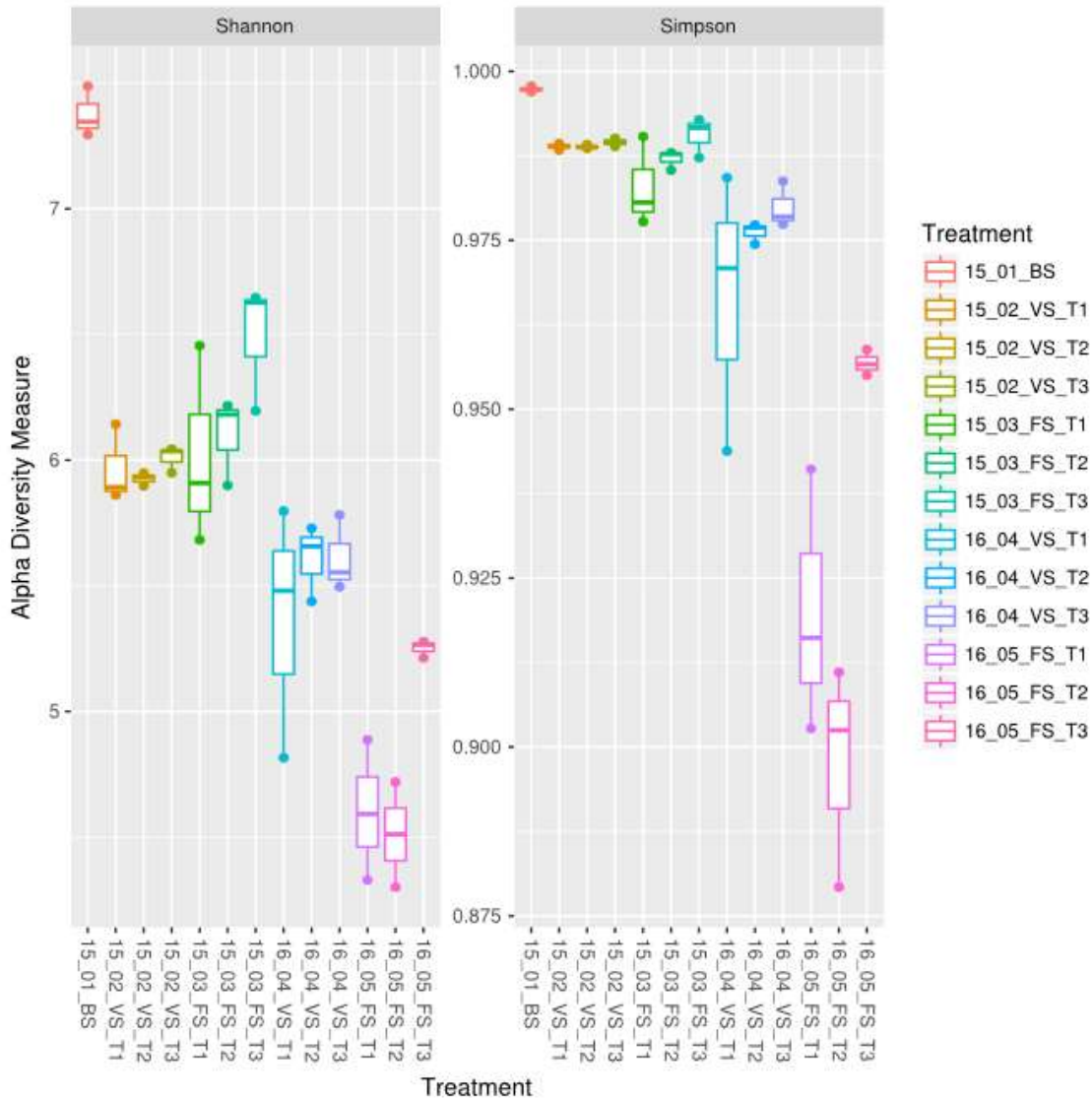
(15\_03\_FS\_T1) los índices fueron de 0.9806, 0.9778 y 0.9904. Para el algodón transgénico 1 (15\_03\_FS\_T2) fueron de 0.9854, 0.9878 y 0.9880. Finalmente, para el algodón transgénico 2 (15\_03\_FS\_T3) fueron de 0.9872, 0.9917 y 0.9928.

Durante la siembra del año 2016 en la rizosfera colectada durante la etapa vegetativa 2016 para el algodón convencional (16\_04\_VS\_T1) los índices de Simpson fueron de 0.9438, 0.9709 y 0.9843. Además, en la rizosfera del algodón transgénico 1 (16\_04\_VS\_T2) fueron de 0.9773, 0.9769 y 0.9744. Posteriormente, en la rizosfera del algodón transgénico 2 (16\_04\_VS\_T3) fueron 0.9838, 0.9785 y 0.9774. También, durante este mismo año en la etapa de floración, para el algodón convencional (16\_05\_FS\_T1) los índices fueron de 0.9411, 0.9162 y 0.9027. Mientras que los índices para el algodón transgénico 1 (16\_05\_FS\_T2) fueron de 0.8793, 0.9111 y 0.9025. Finalmente, los índices de Simpson en la rizosfera del algodón transgénico 2 (16\_05\_FS\_T3) fueron de 0.9566, 0.9588 y 0.9550.

El índice de diversidad de Simpson calculado fue uniforme y/o similar entre cada una de las muestras del suelo y la rizosfera. Un valor cercano al 1.0 indica alta diversidad. Por lo tanto, se observaron altos índices de diversidad en la rizosfera sin importar el genotipo de algodón. Además, estos índices se consideran altos en especies que tienen dominancia y distribuidos equivalentemente en estos suelos (Figura 38).



**Figura 37.** Especies observadas e índice de Chao1. T1= Convencional, T2= Transgénico 1 y T3=Transgénico 2. BS=Before sowing (antes de la siembra), VS=Vegetative stage (etapa vegetative) y FS=Flowering stage (etapa de floración) durante el 15 (año 2015) y 16 (año 2016)

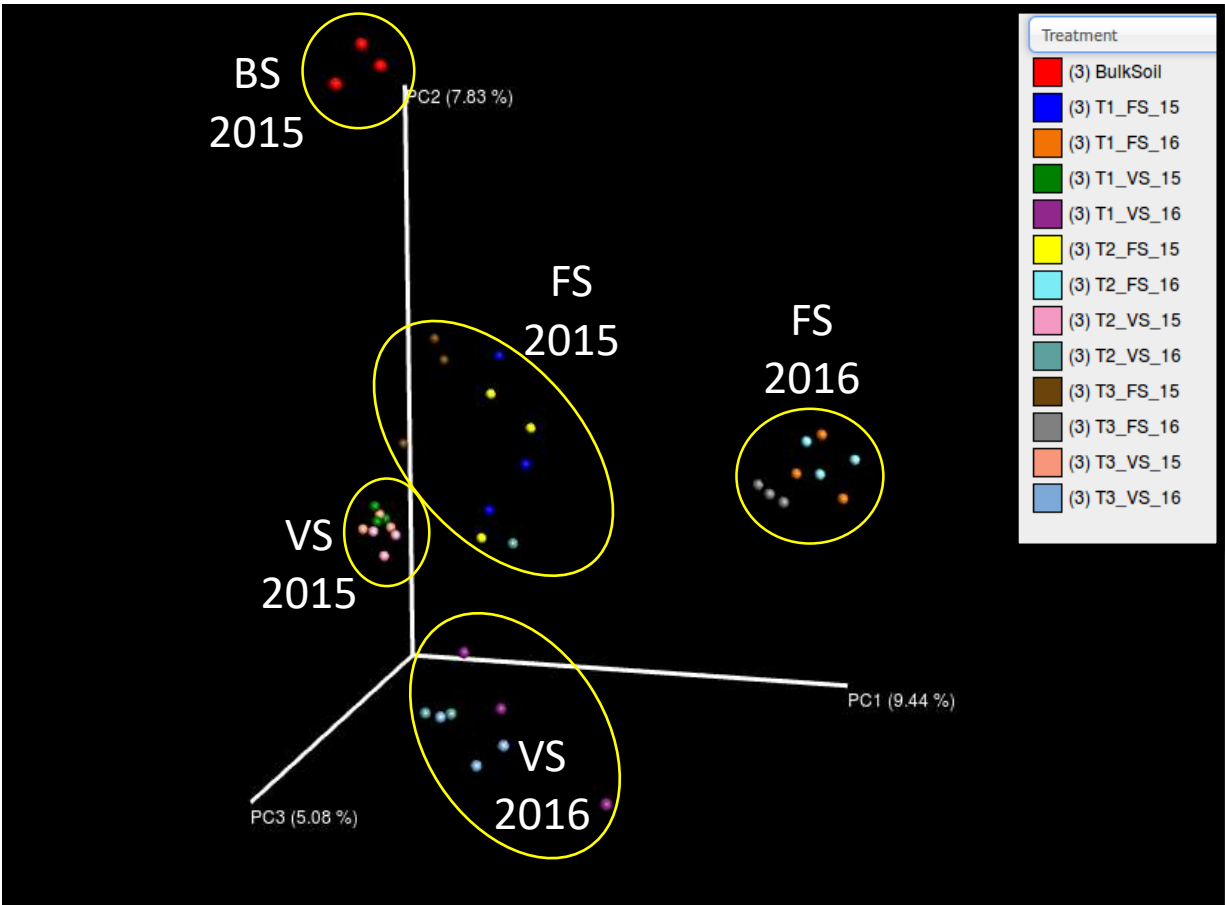


**Figura 38.** Índice de Shannon e índice de Simpson. T1= Convencional, T2= Transgénico 1 y T3=Transgénico 2. BS=Before sowing (antes de la siembra), VS=vegetative stage (etapa vegetative) y FS=Flowering stage (etapa de floración) durante el 15 (año 2015) y 16 (año 2016)

#### 7. 7. 4 Beta diversidad de las muestras de suelo (Bulk soil, BS) y de la rizosfera colectadas durante la etapa vegetativa y floración en el año 2015 y 2016

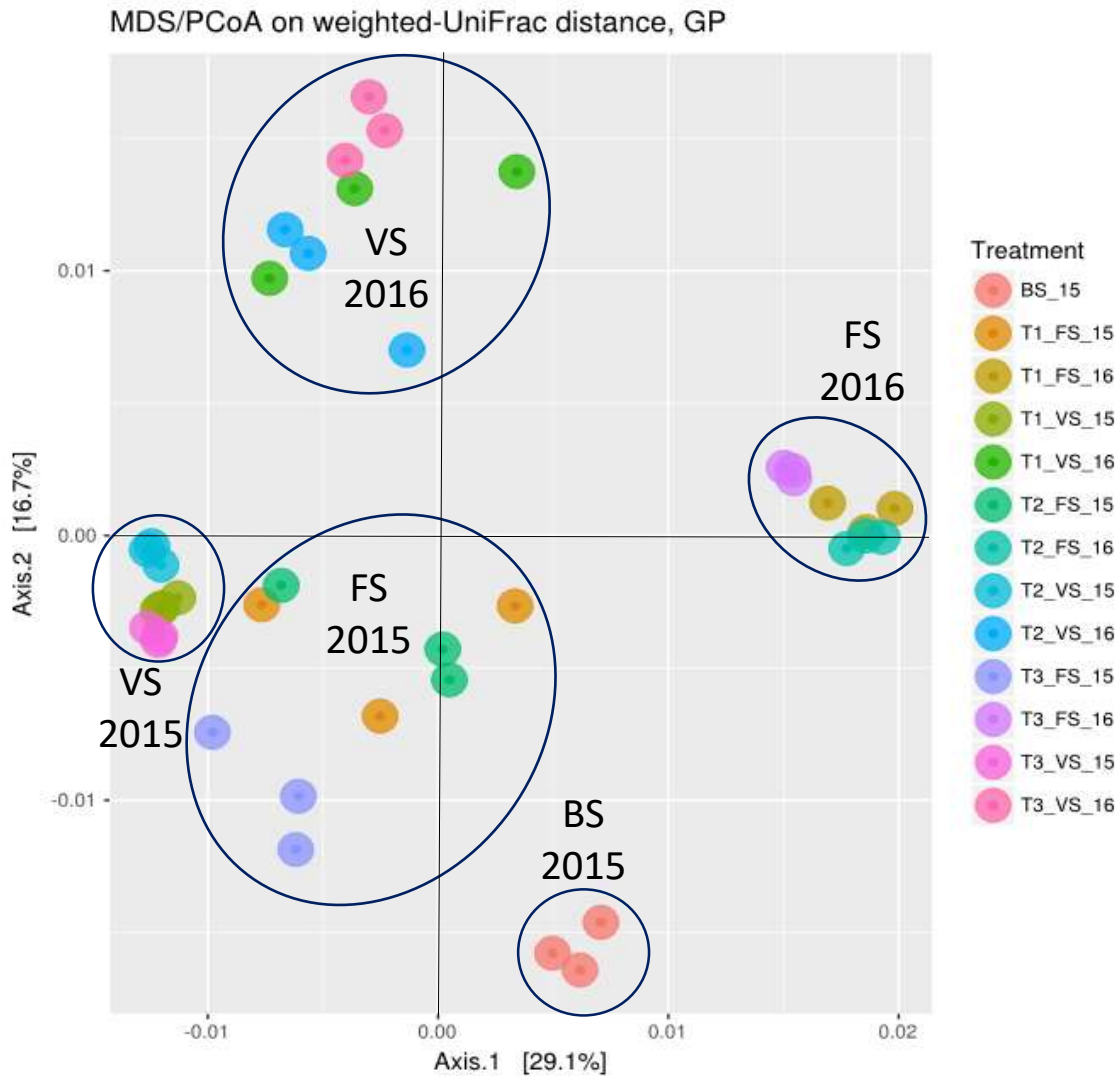
Se calculó la beta diversidad para la comparación entre las muestras mediante el análisis de Coordenadas Principales (Principal Coordinate Analysis, PcoA) o de escalamiento

multidimensional métrico. Esto incluyó el uso del método Jackknifed Unweighted Pair Group Method (UPGMA), este análisis indicó que las muestras de suelo (PC2) y de la rizosfera (PC1 y PC3) se separaron en grupos en diferentes componentes. Asimismo, las muestras de la rizosfera de algodón convencional (T1) y transgénico (T2 y T3) colectadas en la etapa vegetativa y floración 2015 y 2016, se separaron formando 5 grupos principales (Figura 39).



**Figura 39.** Análisis de Coordenadas Principales (PcoA) unweighted de las comunidades rizobacterianas identificadas durante la etapa vegetativa y floración durante dos años de siembra (2015-2016). T1= Convencional, T2= Transgénico 1 y T3=Transgénico 2. BS=Suelo (antes de la siembra), VS=Vegetative stage (etapa vegetative) y FS=Flowering stage (etapa de floración)

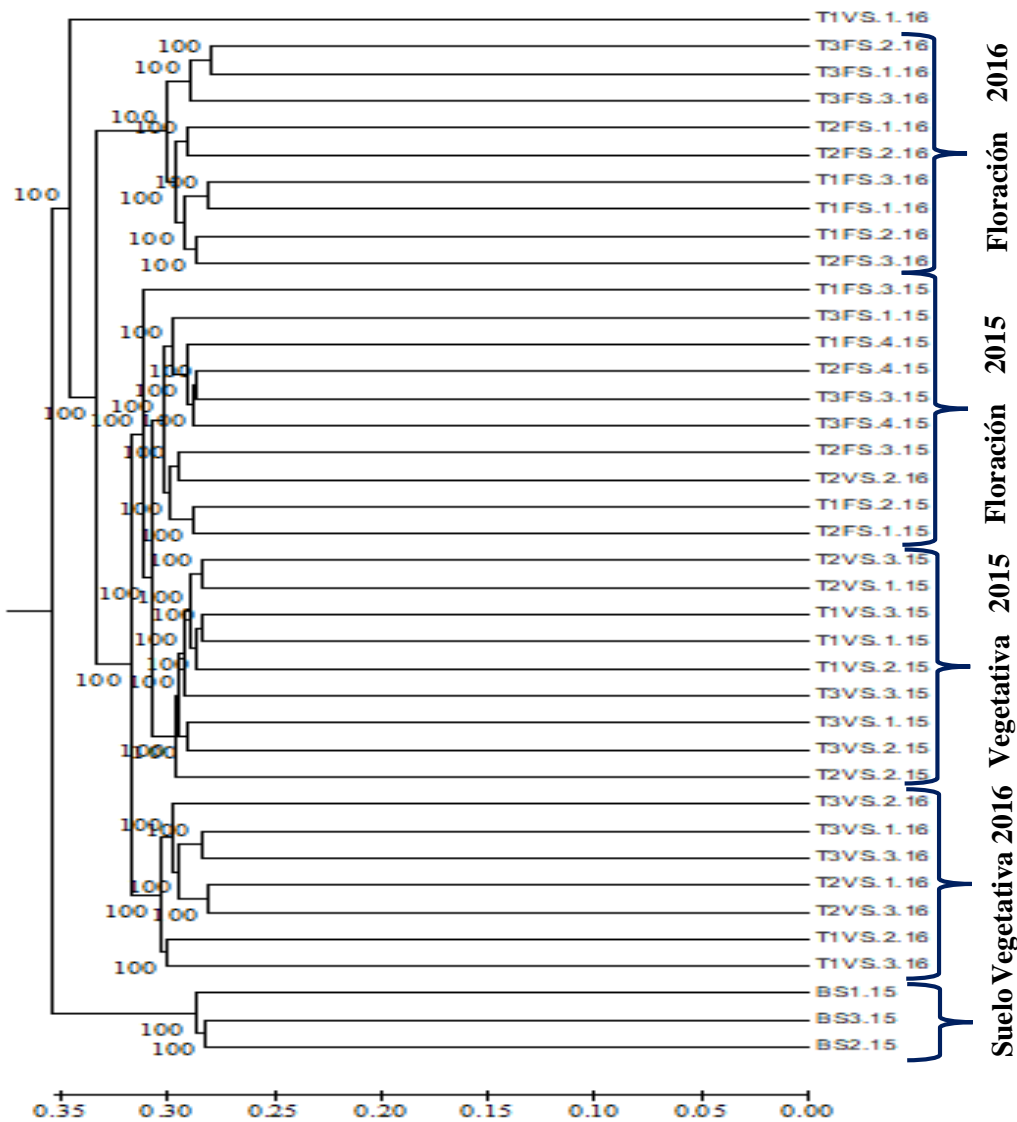
Además, empleando el análisis weighted Unifrac el resultado fue similar al de unweighted, puesto se agrupó en cinco grupos tal como se observa en la Figura 40.



**Figura 40.** Análisis de Coordenadas Principales (PcoA) weighted de las comunidades rizobacterianas identificadas durante la etapa vegetativa y floración durante dos años de siembra (2015-2016). T1= Convencional, T2= Transgénico 1 y T3=Transgénico 2. BS=Suelo (antes de la siembra), VS=Vegetative stage (etapa vegetative) y FS=Flowering stage (etapa de floración)

Por otro lado, el árbol de agrupamiento jerárquico mostró la formación de grupos dependiendo de la etapa fenológica y el año de siembra (Figura 41). Es decir, se agruparon dependiendo de la temporada de siembra y etapa fenológica (2015 y 2016), independientemente del genotipo de la planta de algodón (Figura 41).





**Figura 41.** Árbol de Agrupamiento jerárquico de las comunidades rizobacterianas durante la etapa vegetativa y floración durante dos años de siembra (2015-2016). T1= Convencional, T2= Transgénico 1 y T3=Transgénico 2. BS=Suelo (antes de la siembra), VS=Vegetative stage (etapa vegetative) y FS=Flowering stage (etapa de floración)

### **7. 7. 5 Análisis estadístico: comparación de categorías para identificar los biomarcadores metagenómicos**

Las bacterias biomarcadores que marcan la diferencia se determinan mediante el análisis Lefse y como resultado se observa que los géneros que promueven los cambios. Se homogeneizaron los resultados a un LDA score mayor o igual a 3.5.

#### **7. 7. 5.1 Etapa vegetativa 2015.**

El suelo fue más diverso en comparación con la rizosfera de las plantas de algodón convencional y transgénico. Los biomarcadores, en el suelo fueron: No clasificado derivado de 0319\_6A21, Sinobacteraceae, Syntrophobacteraceae, *Rubrobacter*, no clasificado derivado de mb2424, Betaproteobacteria, no clasificado derivado de RB41, Syntrophobacterales, Chitinophagaceae, Myxococcales, no clasificado derivado de BME43, Oxalobacteraceae, Gemm-1, Gaiellaceae, *Flavisolibacter*, Saprospirae, Gemmatimonadetes, Bacteroidetes, no clasificado derivado de iii1\_15, Acidobacteria\_6, Bacilli y Firmicutes (Figura 42).

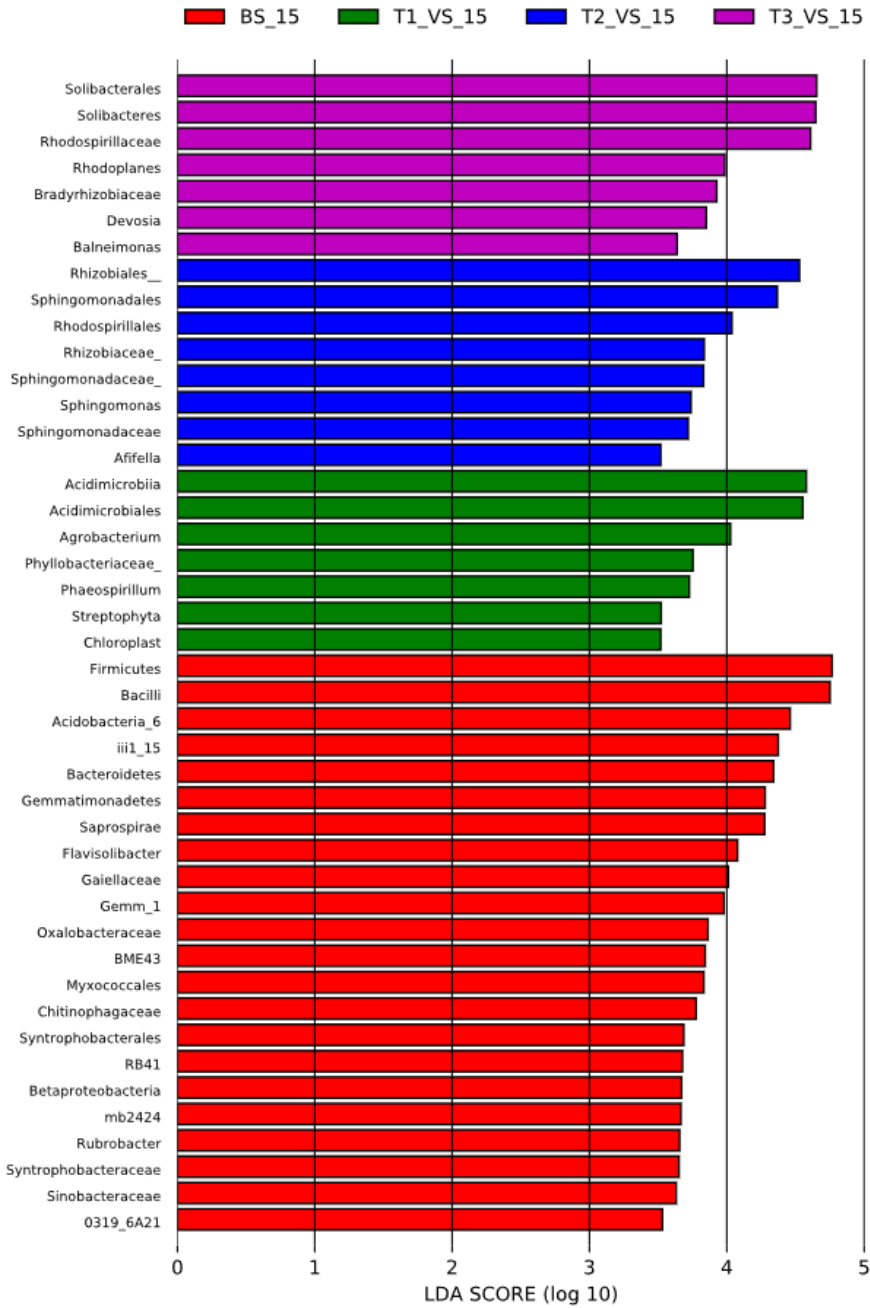
De acuerdo a la Figura 42, en la rizosfera de las plantas de algodón convencional (T1), los biomarcadores fueron Chloroplast, Streptophyta, *Phaeospirillum*, Phyllobacteriaceae, *Agrobacterium*, Acidimicrobiales y Acidimicrobiia. Mientras que en la rizosfera de las plantas de algodón transgénico (T2), los biomarcadores fueron *Afifella*, Sphingomonadaceae, Sphingomonas, Rhizobiaceae, Rhodospirillales, Sphingomonadales y Rhizobiales. Finalmente, en la rizosfera del algodón transgénico (T3) fueron *Balneimonas*, *Devosia*, Bradyrhizobiaceae, *Rhodoplanes*, Rhodospirillaceae, Solibacteres y Solibacterales.

#### **7. 7. 5.2 Etapa vegetativa 2016**

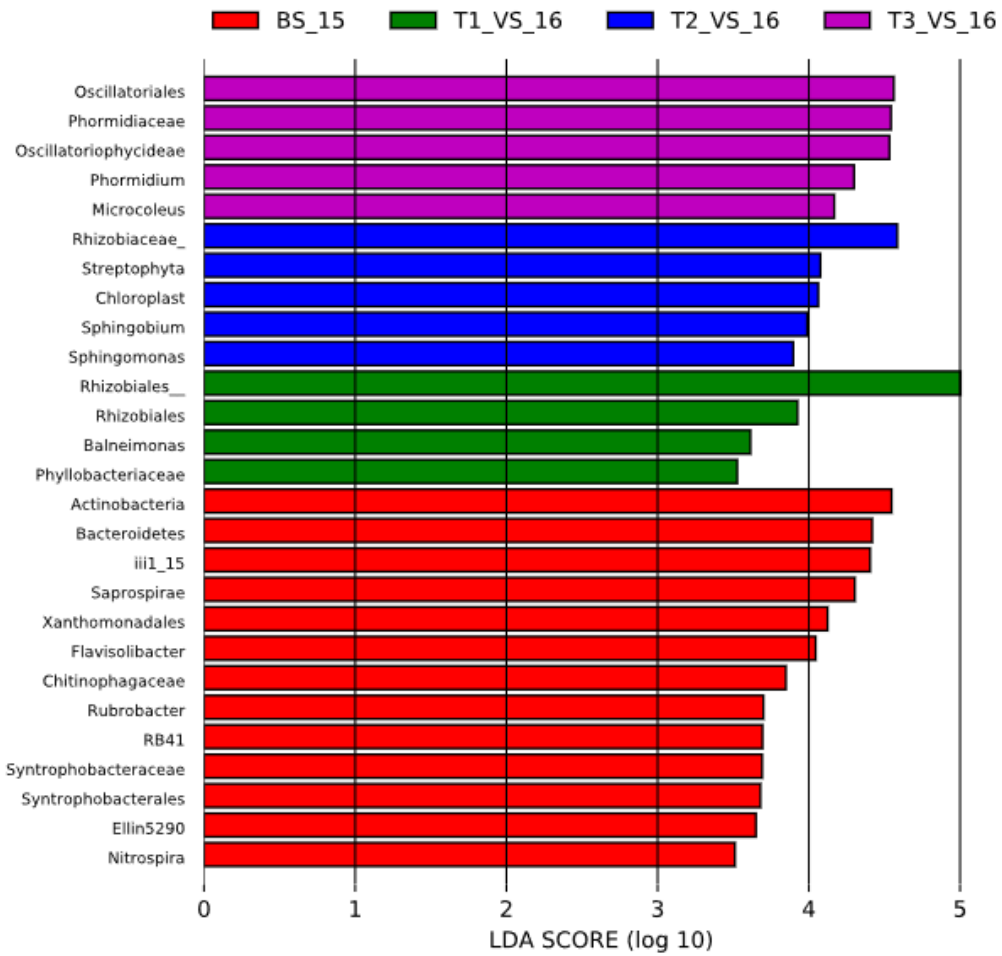
De acuerdo a la Figura 43, al comparar las muestras de suelo con las de la rizosfera de algodón durante la etapa vegetativa del año 2016 mostraron que los principales biomarcadores del suelo fueron Nitrospira, no clasificado derivado de Ellin 5290, Syntrophobacterales,

Syntrophobacteraceae, RB41, Rubrobacter, Chitinophagaceae, Flavisolibacter, Xanthomonadales, Saprospirae, no clasificado derivado de iii1\_15, Bacteroidetes y Actinobacteria.

En la rizosfera de las plantas de algodón convencional (T1), los biomarcadores fueron los derivados del orden Rhizobiales, de la familia Phyllobacteriaceae (del orden de los rhizobiales) y el género *Balneimonas*. Mientras que, en la rizosfera de las plantas de algodón transgénico (T2) los biomarcadores fueron *Sphingomonas*, *Sphingobium*, Chloroplast, Streptophyta y Rhizobiaceae. Finalmente en la rizosfera del algodón transgénico (T3) los biomarcadores fueron *Microcoleus*, *Phormidium*, Oscillatoriophycideae, Phormidiacea y Oscillatoriales. Esto resulta interesante, pues todos estos géneros pertenecen al Phylum Cyanobacteria.



**Figura 42.** Análisis Lefse empleando el análisis discriminante lineal (LDA, Linear Discriminant analysis) a nivel de género. Suelo (BS), Algodón convencional (T1) y Transgénico (T2 y T3) durante la etapa vegetativa del año 2015



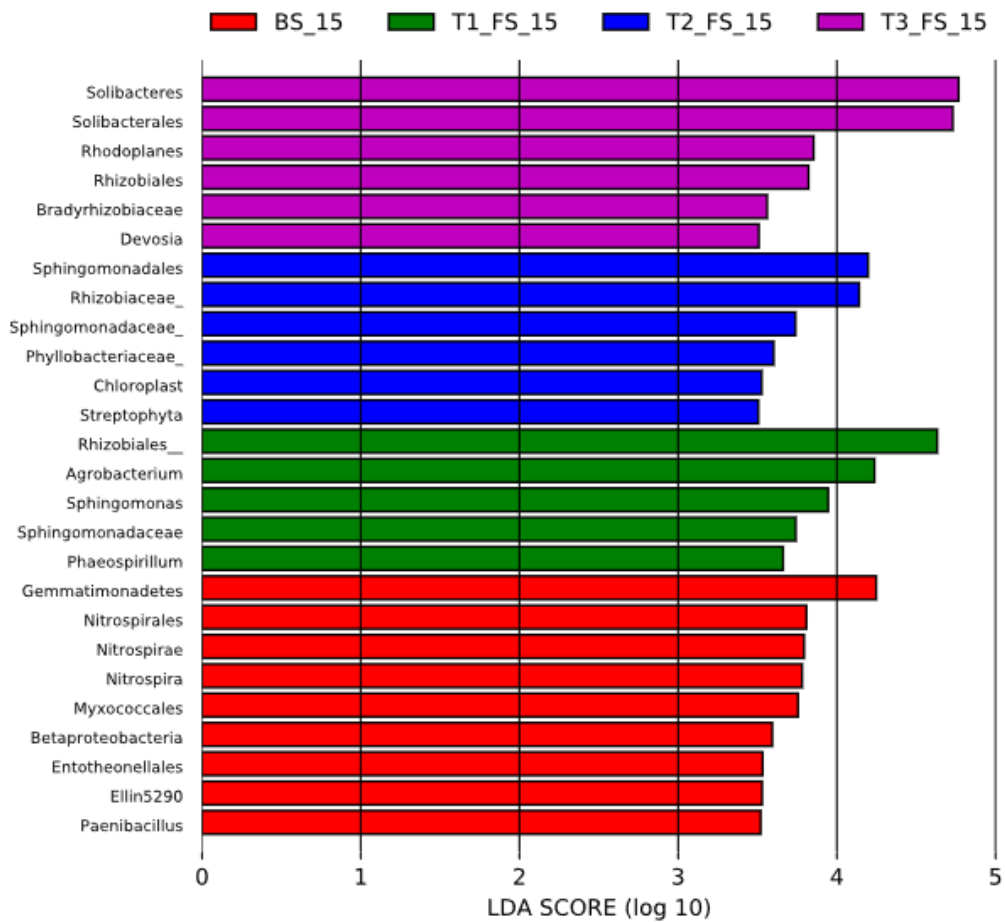
**Figura 43.** Análisis Lefse empleando el análisis discriminante lineal (LDA, Linear Discriminant analysis) a nivel de género. Suelo (soil), Algodón convencional (T1) y Transgénico (T2 y T3) durante la etapa vegetativa del año 2016

### 7. 7. 5.3 Etapa de floración 2015.

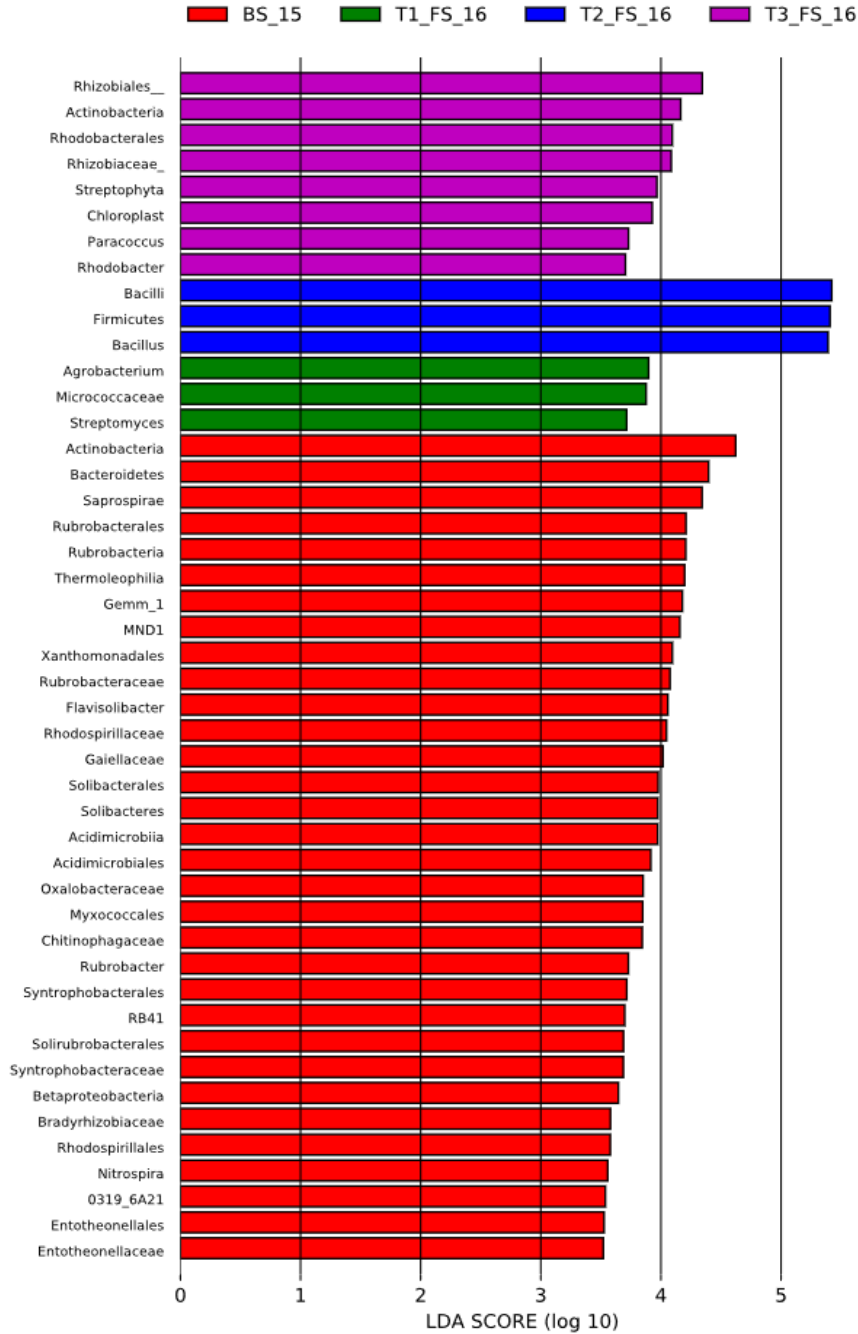
De acuerdo a la Figura 44, al comparar las muestras de suelo con las de la rizosfera de algodón durante la etapa floración del año 2015 mostraron que los principales biomarcadores del suelo fueron *Paenibacillus*, no clasificado Ellin5290, Entotheonellales, Betaproteobacterias, Myxococcales, Nitrospira, Nitrospirae, Nitrospirales y Gemmatimonadetes. En la rizosfera de las plantas de algodón convencional (T1), los biomarcadores fueron *Phaeospirillum*, Sphingomonadaceae, *Sphingomonas*, *Agrobacterium* y Rhizobiales. Los biomarcadores en la rizosfera de las plantas de algodón transgénico 1 (T2) fueron Streptophyta, Chloroplast, Phyllobacteriaceae, Rhizobiaceae y Sphingomonadales. Finalmente, los biomarcadores en la rizosfera de las plantas de algodón transgénico 2 (T3) fueron *Devosia*, Bradyrhizobiaceae, Rhizobiales, *Rhodoplanes*, Solibacterales y Solibacteres.

### 7. 7. 5.3 Etapa de floración 2016.

De acuerdo a la Figura 45, al comparar las muestras de suelo con las de la rizosfera de algodón durante la etapa floración del año 2016 mostraron que los principales biomarcadores Entotheonellales, 0319\_6A21, Nitrospira, Rhodospirillales, Bradyrhizobiaceae, Betaproteobacteria, Syntrophobacteraceae, Solirubrobacterales, RB41, Syntrophobacterales, *Rubrobacter*, Chitinophagaceae, Myxococcales, Oxalobacteraceae, Acidimicrobiales, Acidimicrobiia, Solibacteres, Solibacterales, Gaiellaceae, Rhodospirillaceae, *Flavisolibacter*, Rubrobacteraceae, Xanthomonadales, MND1, Gemm\_1, Thermoleophilia, Rubrobacteria, Rubrobacterales, Saprospirae, Bacteroidetes y Actinobacteria. Mientras que en el algodón convencional (T1) los biomarcadores fueron Streptomyces, Micrococcaceae y *Agrobacterium*. Por otro lado, en el algodón transgénico 1 (T2) los biomarcadores fueron *Bacillus*, Firmicutes y Bacilli. Finalmente, en el algodón transgénico 2 (T3) los biomarcadores fueron *Rhodobacter*, Paracoccus, Chloroplast, Streptophyta, Rhizobiaceae, Rhodobacterales, Actinobacteria y Rhizobiales. Por lo tanto, la gran variabilidad de los géneros bacterianos asociados a la rizosfera existe una preferencia dependiendo del genotipo de la planta. Es decir, la planta está generando el cambio en las comunidades bacterianas e influyen las condiciones climáticas.



**Figura 44.** Análisis Lefse empleando el análisis discriminante lineal (LDA, Linear Discriminant analysis) a nivel de género. Suelo (soil), Algodón convencional (T1) y Transgénico (T2 y T3) durante la etapa de floración del año 2015

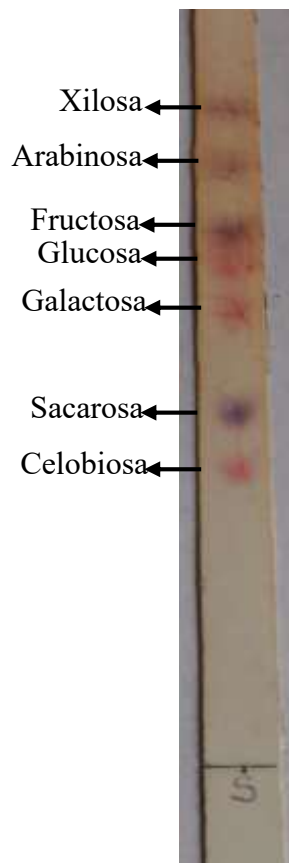


**Figura 45.** Análisis Lefse empleando el análisis discriminante lineal (LDA, Linear Discriminant analysis) a nivel de género. Suelo (soil), Algodón convencional (T1) y Transgénico (T2 y T3) durante la etapa de floración del año 2016



## 7.8 Cromatografía en Capa Fina (TLC)

De acuerdo a la Figura 46, se estandarizó la fase móvil para los azúcares estándar xilosa, arabinosa, fructosa, glucosa, galactosa, sacarosa y celobiosa para poder determinar si en las muestras se encontraban estos azúcares y se realizaron dos corridas en una lámina de (20 x 2) cm con la fase móvil CH<sub>3</sub>CN (acetonitrilo): H<sub>2</sub>O (85:15, v/v), a una concentración final de 2 mg/mL por cada muestra.

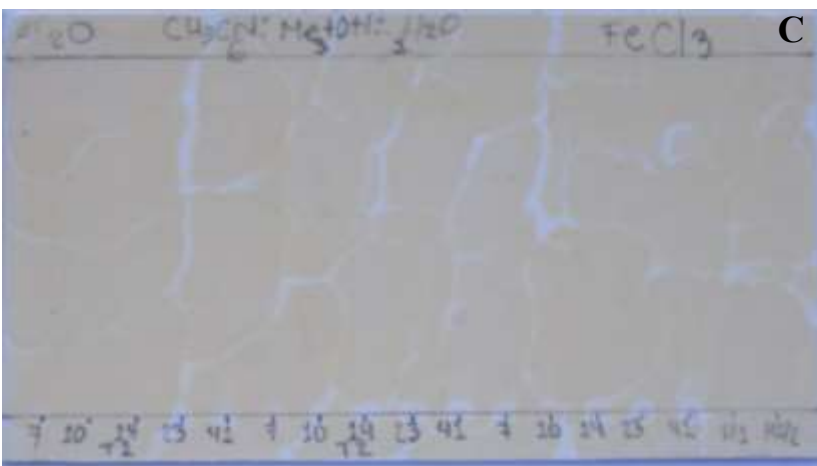
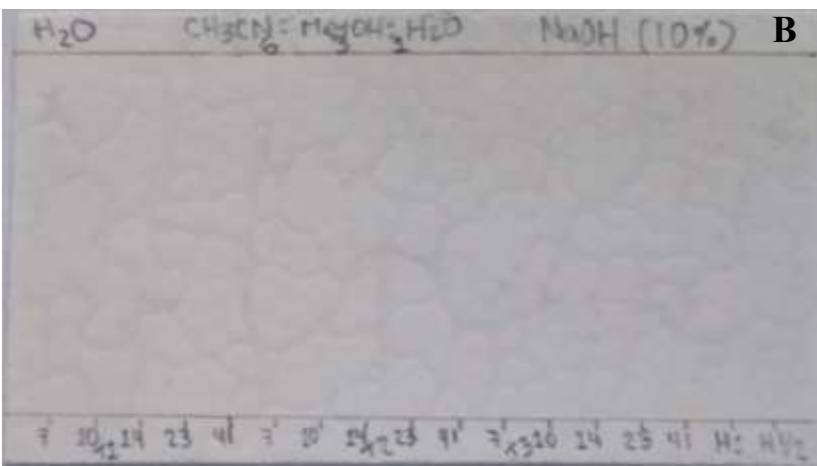
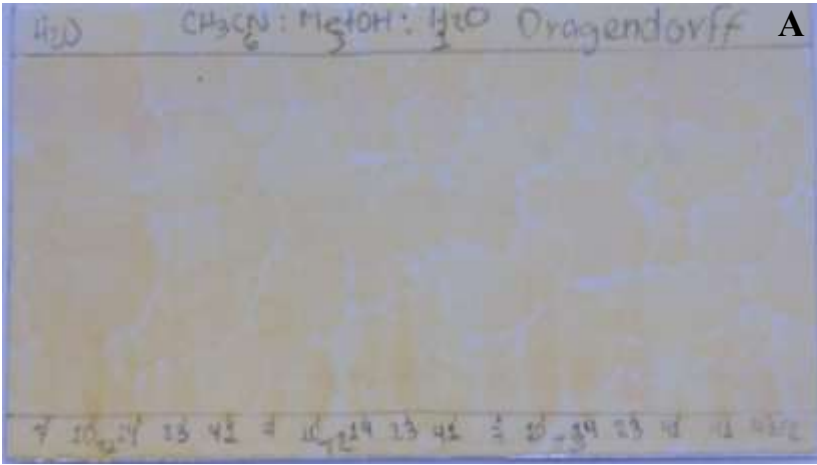


**Figura 46.** CCF de los de azuceres a utilizar como estándares. Empleando una fase móvil CH<sub>3</sub>CN (acetonitrilo): H<sub>2</sub>O (85:15, v/v)

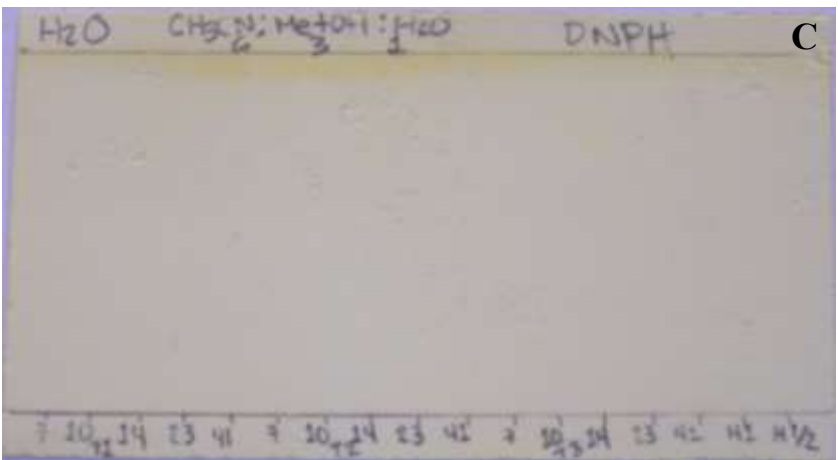
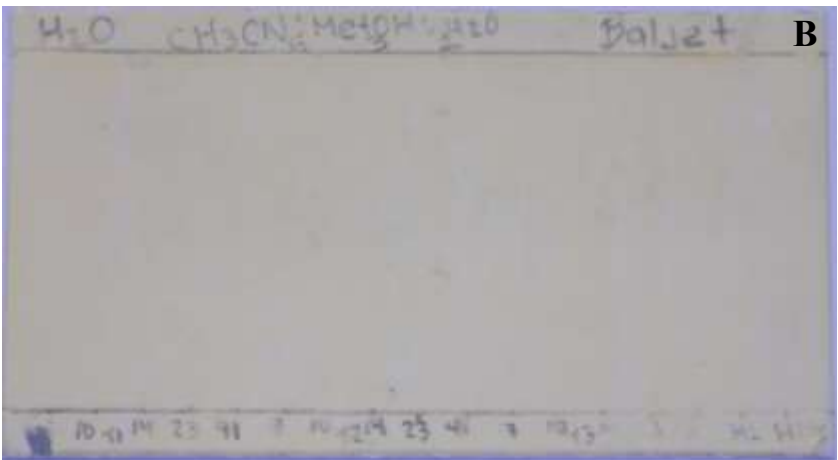
Además, se determinó la presencia de compuestos presentes en las muestras liofilizadas disueltas en agua mediante la prueba general de Yodo y reveladores específicos (Figura 47, 48 y 49).



**Figura 47.** CCF de los exudados radiculares de algodón Convencional (T1), Transgénico 1 (T2) y Transgénico 2 (T3) colectados a los 7, 10, 14, 23 y 41 días de crecimiento. Empleando una fase móvil CH<sub>3</sub>CN (Acetonitrilo): Metanol: H<sub>2</sub>O (6:3:1). Revelando con A) Yodo y B) Molish. Control=H1 y H1/2 (medio Hoagland)

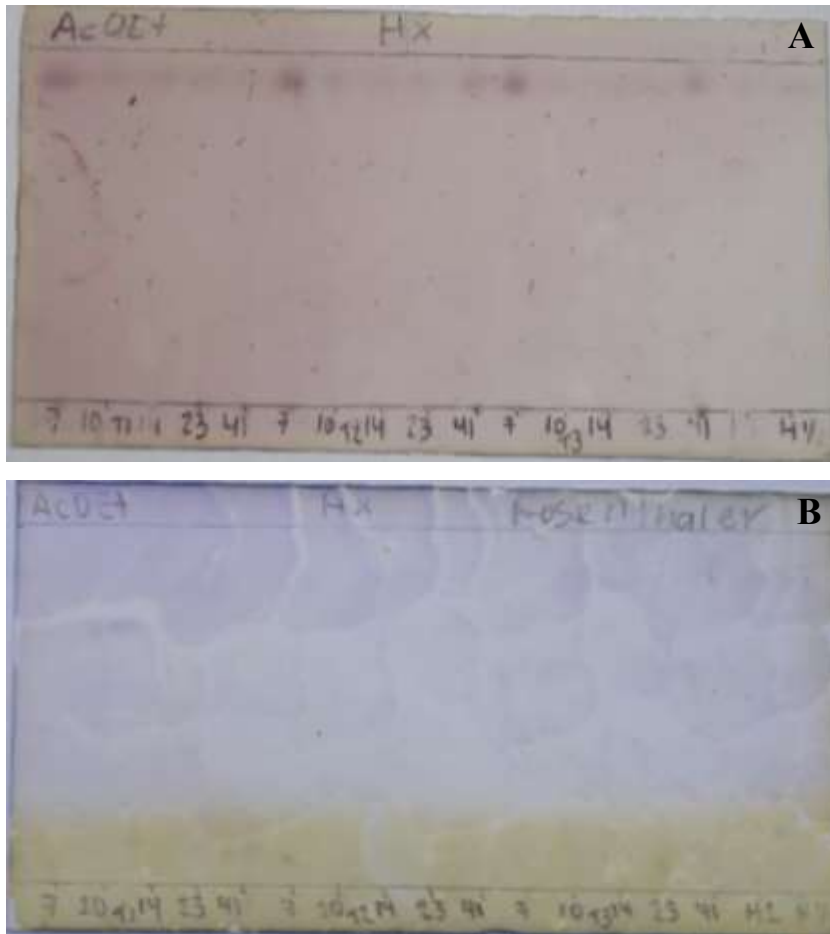


**Figura 48.** CCF de los exudados radiculares del algodón Convencional (T1), Transgénico 1 (T2) y Transgénico 2 (T3) colectados a los 7, 10, 14, 23 y 41 días de crecimiento. Empleando una fase móvil CH<sub>3</sub>CN (Acetonitrilo): Metanol: H<sub>2</sub>O (6:3:1 v/v/v) y reveladores A) Dragendorff, B) NaOH y C) FeCl<sub>3</sub>. Control=H1 y H1/2 (medio Hoagland)

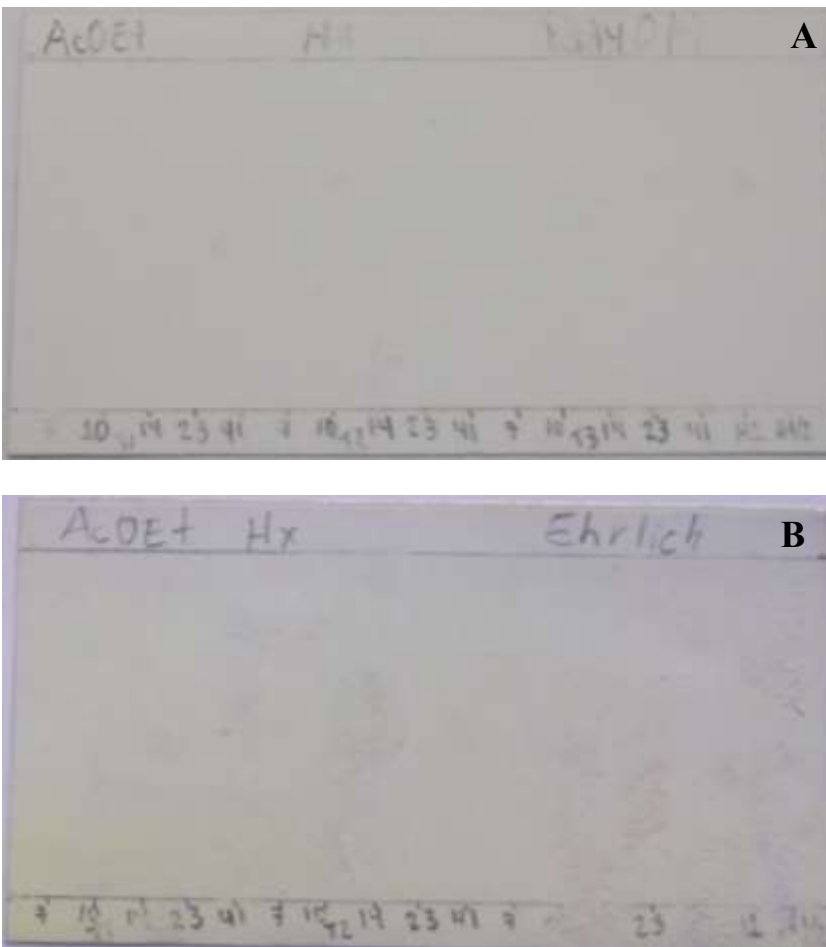


**Figura 49.** CCF de los exudados radiculares del algodón Convencional (T1), Transgénico 1 (T2) y Transgénico 2 (T3) colectados a los 7, 10, 14, 23 y 41 días de crecimiento. Empleando una fase móvil CH<sub>3</sub>CN (Acetonitrilo): Metanol: H<sub>2</sub>O (6:3:1 v/v/v) y reveladores A) Folin-Ciocalteu, B) Baljet y C) 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH)

Por otro lado, como se observa en las figuras 50 y 51, en otro conjunto de exudados radiculares liofilizados de los tres genotipos de las plantas de algodón colectados a los 7, 10, 14, 23 y 41 días de crecimiento se disolvieron en Acetato de Etilo.

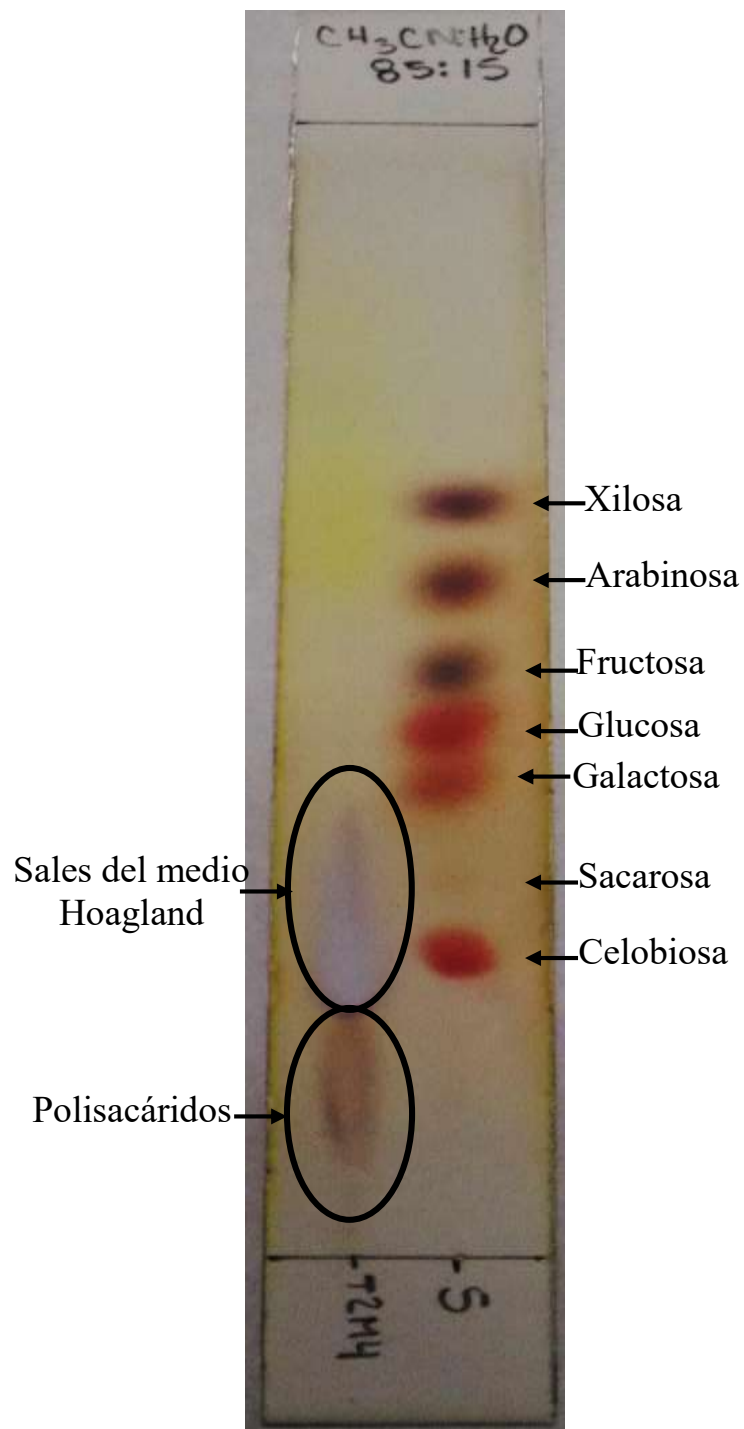


**Figura 50.** TLC de los exudados radiculares de algodón Convencional (T1), Transgénico 1 (T2) y Transgénico 2 (T3) colectados a los 7, 10, 14, 23 y 41 días de crecimiento. Empleando una fase móvil de Hexano. Reveladores A) Salkowski y B) Rosenthaler (Vainillina)



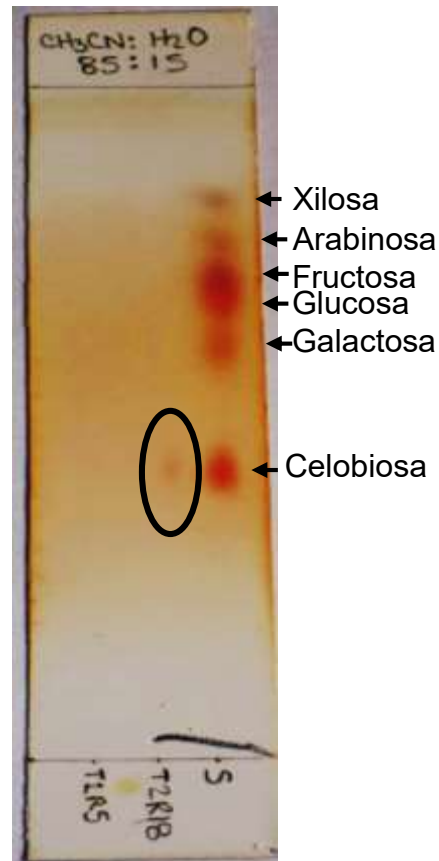
**Figura 51.** CCF de los exudados radiculares de algodón Convencional (T1), Transgénico 1 (T2) y Transgénico 2 (T3) colectados a los 7, 10, 14, 23 y 41 días de crecimiento. Empleando una fase móvil de Hexano. Reveladores A)  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Hidróxido de amonio) y B) Ehrlich

Por otro lado, se realizó extracción de la una muestra liofilizada del exudado radicular derivado del algodón transgénico 1 (T2), ésta se disolvió en metanol (concentración final de 60 mg/mL) y posteriormente se concentró en el rotavapor. Posteriormente, se procedió a realizar CCF, tal como se observa en la Figura 52. Se encontró que las sales presentes en la muestra, éstas derivan del medio Hoagland las cuales no permitieron que los polisacáridos fueran observados adecuadamente. Por lo tanto, se decidió analizar con muestras de exudados radiculares que provenían de plantas crecidas sólo en agua desionizada.



**Figura 52.** TLC de los exudados radiculares de algodón transgénico 1 (T2) colectados a 41 días de crecimiento. Empleando una fase móvil CH<sub>3</sub>CN (Acetonitrilo): H<sub>2</sub>O (85:15, v/v) y revelador de Molish.

Además se realizó una prueba en las muestras de la colecta de exudados radiculares de las plantas de algodón transgénico (T2) mantenidas durante una semana en agua desionizada. Durante este experimento fue posible identificar un azúcar en al menos una muestra de los genotipos (transgénico T2) tal como se observa en la Figura 53.



**Figura 53.** CCF de los exudados radiculares de algodón Convencional (T1), Transgénico 1 (T2) colectado a los 42 días de crecimiento (7 días en agua desionizada). Empleando una fase móvil CH<sub>3</sub>CN (Acetonitrilo): H<sub>2</sub>O (85:15, v/v).



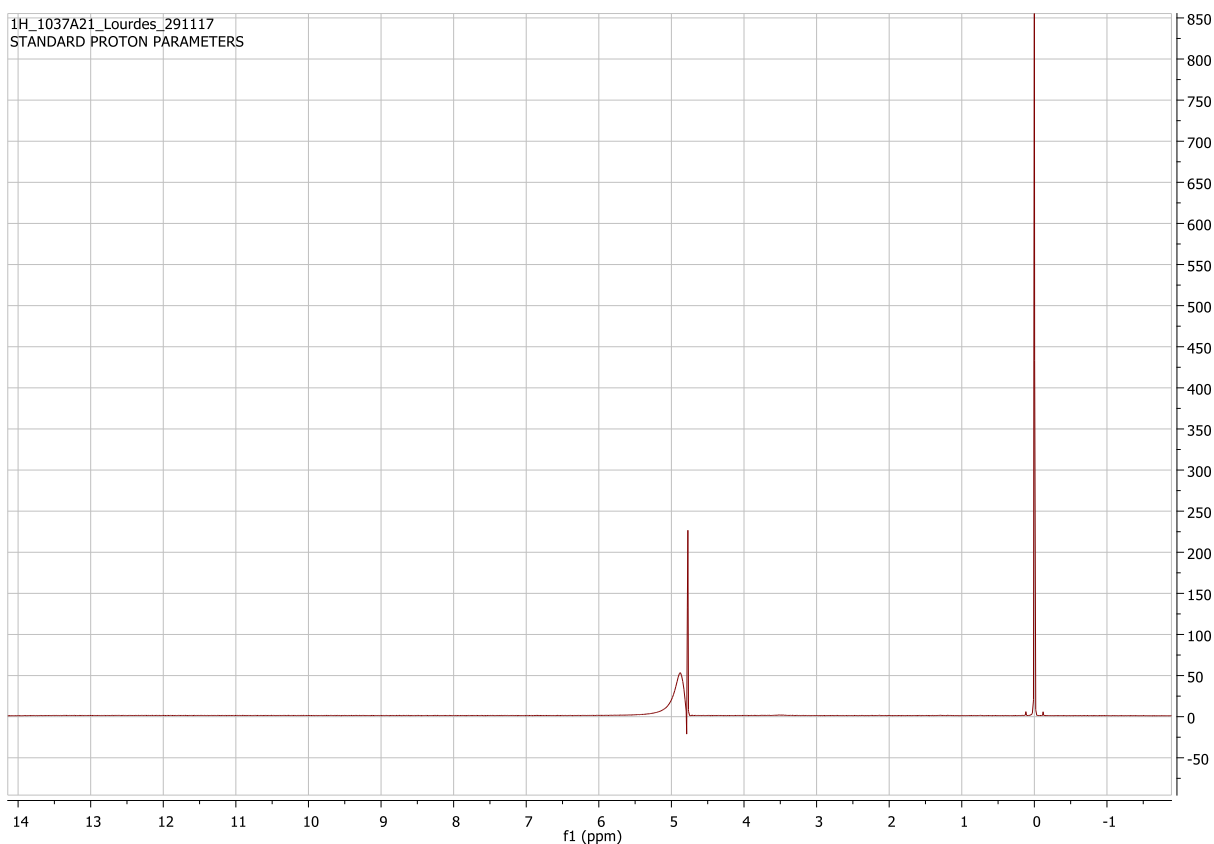
La Tabla 13 muestra los reveladores químicos empleados en esta investigación, sin embargo, no se logró identificar otros grupos químicos en los exudados radiculares liofilizados con el medio de Hoaglands en los diferentes genotipos de algodón colectados a los 7, 10, 14, 23 y 41 días de crecimiento.

**Tabla 13.** Resultados de las pruebas y grupos químicos encontrados en cada uno de los exudados radiculares

<b>CCF</b>				
<b>Gpos. químicos</b>	<b>Revelador</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
<b>Alcaloides</b>	Dragendorff	+	+	
<b>Flavonoides</b>	NaOH	-	-	-
<b>Taninos (fenólicos)</b>	FeCl <sub>3</sub>	-	-	-
<b>Ácidos fenólicos</b>	Folin-Ciocalteu	-	-	-
<b>Carbohidratos</b>	Molish	+	+	+

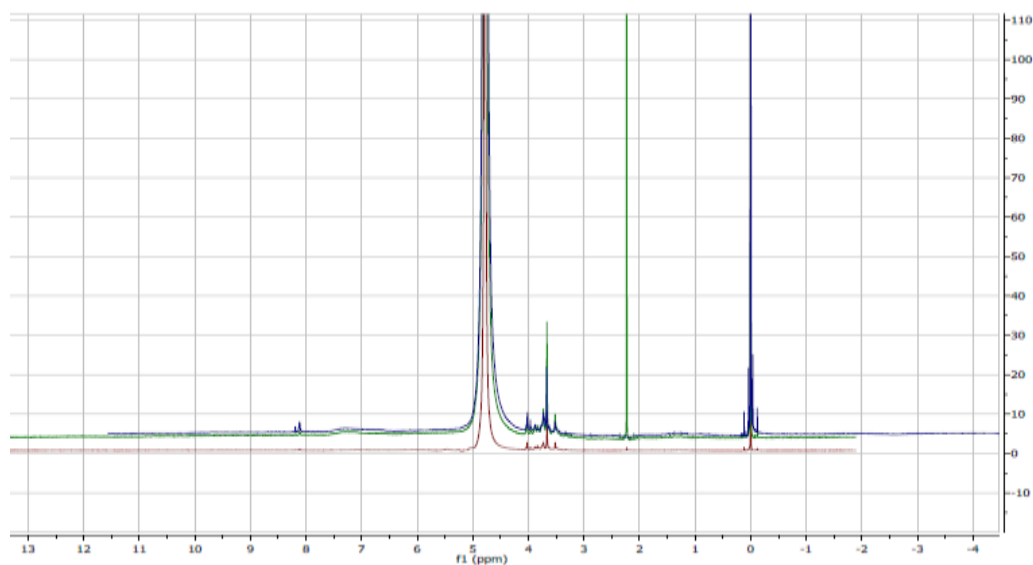
## 7.9 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

De acuerdo a los resultados encontrados empleando la CCF, se crecieron durante 42 días las plantas en medio Hoagland y se eliminaron las sales para posteriormente realizar el análisis RMN a estas muestras derivadas de los exudados radiculares. El resultado se muestra en el siguiente espectro (Figura 54), el cual no se logró identificar el perfil metabólico en el exudado radicular del algodón convencional. Comprobando que la cantidad del exudado radicular es muy poco en la muestra y éste se fue durante el proceso de la desalinización.



**Figura 54.** Espectro de Resonancia Magnética Nuclear  $^1\text{H}$  de los exudados radiculares del algodón Convencional (T1) crecidos en 42 días en medio Hoagland (previamente desalinizados). Región 0 ppm (TSP referencia interna) y región del agua (5.16–4.70) ppm. Región 0 ppm (TSP referencia interna) y región del agua (5.16–4.70) ppm.

Por lo tanto, se decidió analizar las muestras de exudados radiculares derivados de las plantas de algodón crecidas en medio Hoagland. En la Figura 55, se observa el espectro de Resonancia Magnética Nuclear  $^1\text{H}$  de los exudados radiculares del algodón convencional (T1), transgénico 1 (T2) y transgénico 2 (T3) colectados a los 42 días de crecimiento en el medio Hoagland. La cantidad o concentración relativa de los compuestos en cada uno de los exudados radiculares se encuentra altamente representada en el algodón transgénico 1 (T2) y 2 (T3). De acuerdo a los resultados de la base de datos, los compuestos identificados se conservan en el centro (T1, T2 y T3), en el transgénico 2 (T3) se incrementa la cantidad de los compuestos, mientras que en convencional se disminuyen (ver Figura 55 y 56).



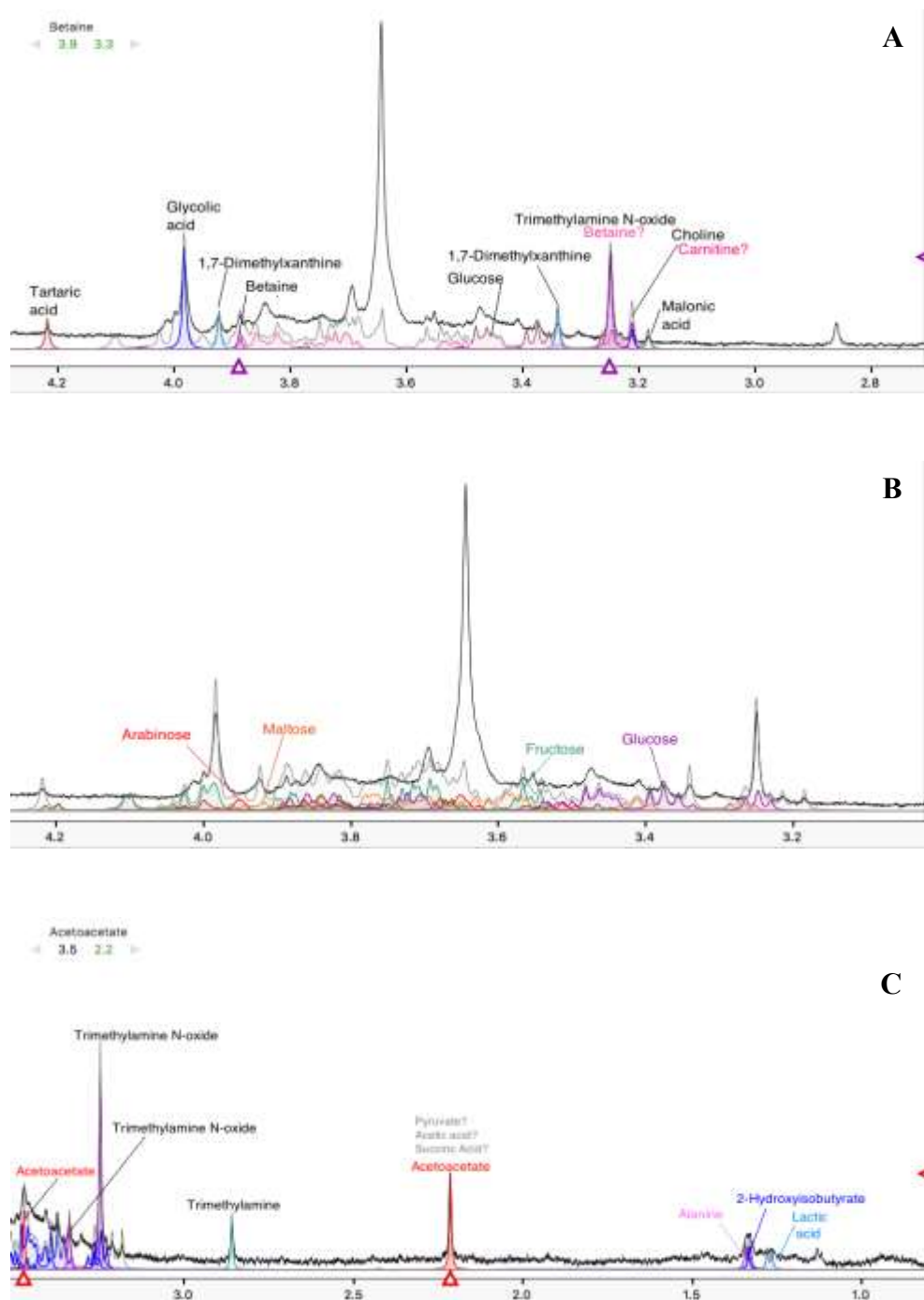
**Figura 55.** Espectro de Resonancia Magnética Nuclear  $^1\text{H}$  de los exudados radiculares del algodón Convencional (T1), Transgénico 1 (T2) y Transgénico 2 (T3). Convencional (línea en rojo), transgénico 1 (línea en verde) y transgénico 2 (línea en azul). Región 0 ppm (TSP referencia interna) y región del agua (5.16–4.70) ppm.

Los posibles metabolitos encontrados en los exudados radiculares fueron azúcares, tales como la glucosa, fructosa, maltosa y arabinosa. Además, se encontraron otros compuestos tales como la Betaína, Carnitina, Xantina y Colina (Figura 56). También, el análisis del espectro de resonancia demostró que los exudados radiculares (azúcares y carbohidratos) estuvieron altamente representados en el algodón transgénico (T2 y T3) con respecto al convencional (T1). Finalmente, se deben realizar estudios posteriores para determinar si hay una diferencia entre los genotipos de algodón tales como la disminución, el aumento o la casi desaparición de ciertos compuestos.

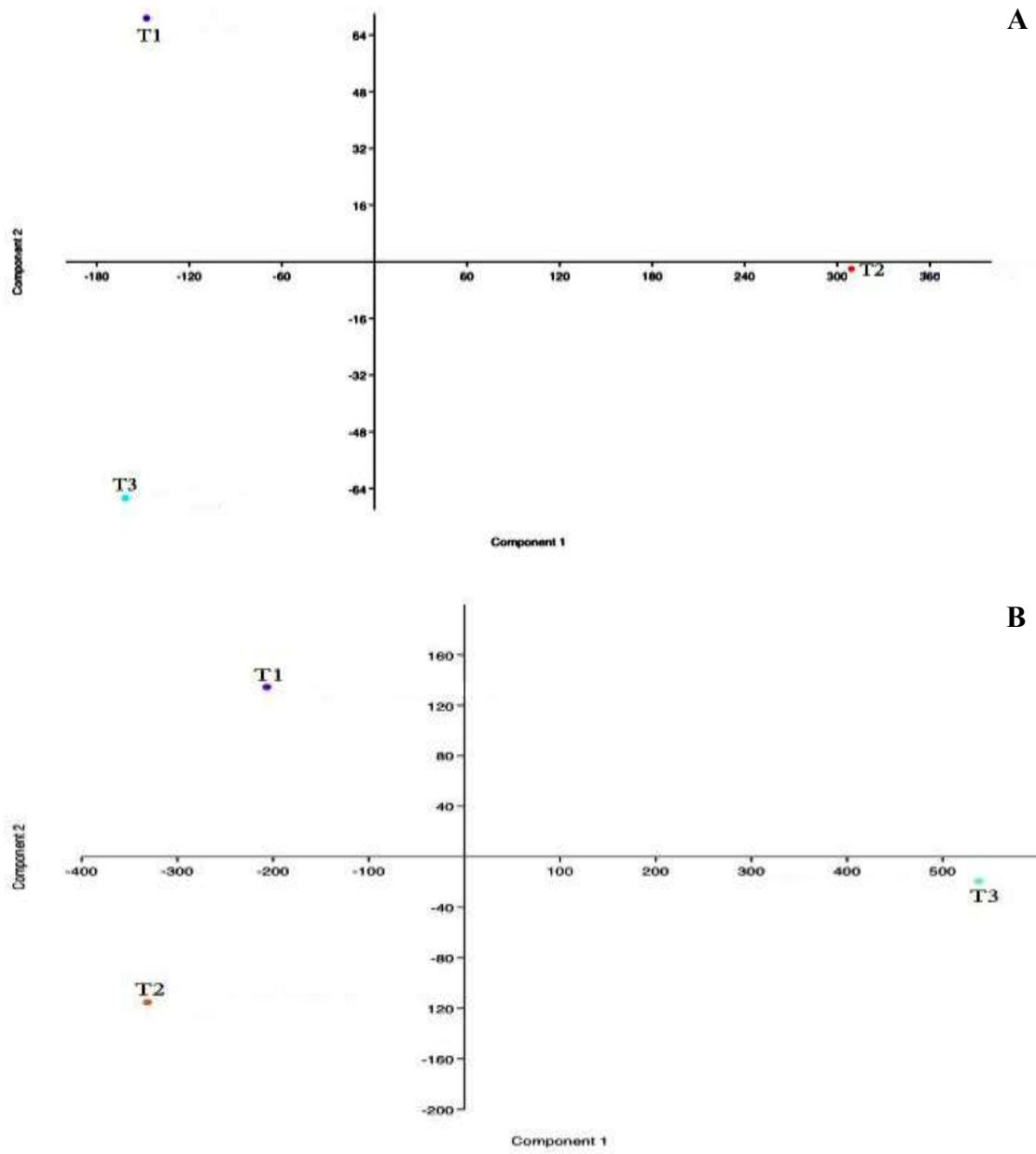
Por lo tanto, de forma representativa se muestran los resultados de los compuestos identificados a partir de los espectros empleando el software Chenomx (Figura 56). En el caso de los carbohidratos, como puede verse en la Figura 56, no es tan fácil deducir qué tipo de azúcares son los que contiene el liofilizado, ya que muchas de las señales están sobrepuestas y el ancho de la presaturación del agua no alcanza a resolver los protones de los carbonos anoméricos. Sin embargo, los colocados en la Figura 56 son los que más asemejan la suma de las áreas bajo la curva (línea gris).

En el análisis estadístico se muestra en la Figura 57A, el análisis de los componentes principales (PCA) de los exudados de los tres genotipos de algodón, donde el primer componente explica un 94% de la separación de los 3 exudados; donde, las cargas del loading plot estos dicen que la mayor diferencia está en la región de 2.23-2.24 que sería la región donde se encuentra el ácido acético, oxaloacético, succínico o piruvato.

Asimismo, como se observa en la Figura 57B, se muestra el PCA, quitando del binning la señal en 2.23-2.24 y la región del agua, resulta que donde el primer componente explica un 93% de la separación; las cargas del loading plot demuestran que la mayor diferencia está en la región de 3.65-3.65 que no está completamente identificado.



**Figura 56.** Análisis del espectro empleando la plataforma Chenomx a partir del exudado radicular del algodón convencional (T1). **A.** Compuestos nitrogenados. **B.** Carbohidratos. **C** Acetoacetato.



**Figura 57.** Análisis de Componentes principales de los exudados radiculares del algodón Convencional (T1), Transgénico 1 (T2) y Transgénico 2 (T3) colectados a los 42 días de crecimiento.

## 8. DISCUSIÓN

En este estudio se emplearon dos plataformas MG-RAST y QIIME para el análisis de las comunidades bacterianas, los resultados concuerdan con D'Argenio et al. (2014) que demuestran que para el análisis de los amplicones del 16S DNAr es la plataforma QIIME debido a su precisión en la asignación taxonómica y en el análisis de la diversidad. Asimismo, las comunidades bacterianas del suelo se determinaron antes de la siembra de las plantas de algodón debido a que la influencia del genotipo se ha considerado un factor que puede afectar a las comunidades que habitan en el suelo (Berg and Smalla, 2009; Gałazka *et al.*, 2017).

La textura del suelo y la composición fueron uniformes en todo el campo experimental. Este resultado concuerda con Garza Cano y colaboradores (2005) que concluyeron que los suelos de esta region son pobres en nitrógeno y fósforo, así que las comunidades bacterianas se han adaptado bajo estas condiciones extremas. Por lo tanto, nuestros resultados concuerdan con los de (Schmalenberger and Tebbe, 2002) los cuales proponen que la calidad del suelo debe ser homogéneo en el diseño experimental para este tipo de estudios donde involucra OGMs. Atribuimos la predominancia de Firmicutes en el suelo por su habilidad de abarcar varios géneros formadores de esporas y que éstos son capaces de sobrevivir por mucho tiempo bajo condiciones extremas (Teixeira *et al.*, 2010). Las especies de *Bacillus* son ampliamente extendidas en ambientes de suelos y para muchos aislados, tienen numerosas funciones en los suelos (Hong *et al.*, 2009). Las abundancias relativas de los principales phyla en el suelo son similares a los resultados reportados por Janssen (2006). Además, estos resultados son consistentes con estudios previos donde se ha reportado un gran porcentaje de los Firmicutes en el suelo (Acosta-Martínez *et al.*, 2010).

El phylum Proteobacteria tiene una diversidad metabólica e importancia biológica debido a que juegan papeles clave en los ciclos de Carbono, Azufre y Nitrógeno (Kerstens *et al.*, 2006). Las Acidobacterias son el phylum más abundante en un gran número de ambientes incluyendo suelos (Janssen, 2006) y algunos miembros de este phylum pueden estar involucrados en procesos del

ecosistema terrestre (Kielak *et al.*, 2010). Dentro del phylum de las Actinobacterias, éstas representan una gran fuente inexplorada de la biotecnología como es la producción de bioactivos (Suela Silva *et al.*, 2013). Los miembros de este phylum han sido reportados como importantes componentes de las comunidades microbianas del suelo desempeñando un papel en el recambio de la materia orgánica y el ciclo del Carbono (Hodgson, 2000). Además, se ha demostrado que la abundancia relativa de los Bacteroidetes mismos que han sido más altos en suelos con alta disponibilidad de C y descomponedores candidatos de la materia orgánica (Fierer *et al.*, 2007).

La estructura y función de la comunidad bacteriana también puede ser cambiada según las prácticas de manejo, las temporadas y el genotipo de la planta (Dunfield and Germida, 2003; Gałazka *et al.*, 2017). Los resultados de las abundancias relativas de los géneros en la rizosfera del algodón concuerdan con los de Li y colaboradores (2014) que concluyeron que las estructuras de las comunidades en la rizosfera cambiaron a través de las etapas de crecimiento en los rangos taxonómicos (nivel familia y género). Puesto que algunos géneros fueron específicos dependiendo de las etapas de crecimiento ya sea tempranas o tardías.

La diversidad bacteriana disminuye en la etapa de floración en comparación a la vegetativa y este fenómeno se repite en los dos años de siembra (Dunfield and Germida, 2003). Además, Acosta-Martínez y colaboradores (2010) han discutido que el índice de diversidad es solo un valor que no puede representar completamente la composición total de una comunidad. Así que dos comunidades pueden tener el mismo valor de índice de diversidad, pero uno puede comprender baja uniformidad y alta riqueza, y el otro puede comprender alta uniformidad y baja riqueza.

Se observaron variaciones en la proporción de las comunidades rizobacterianas, principalmente durante la etapa vegetativa y floración del año 2016. Es importante mencionar que los miembros de las cianobacterias (incluyendo al género *Phormidium* y *Microcoleus*) mostraron una mayor abundancia relativa en el algodón transgénico T3 durante la etapa vegetativa. Se ha reportado que el género *Microcoleus* sp., una Cianobacteria filamentosa, se inoculó en plántulas de mangle joven para determinar la fijación de nitrógeno. Los resultados de este estudio concluyen que la fijación de N<sub>2</sub> aumentó gradualmente con el tiempo y alcanzó su pico 5 días después de la inoculación. Además, el nivel de fijación de N<sub>2</sub> en presencia de la planta fue significativamente mayor que la



cantidad de nitrógeno fijado por una cantidad similar de cianobacterias en un medio de crecimiento libre de nitrógeno (Toledo *et al.*, 1995).

A pesar de la modificación genética de la planta no ejerció un efecto dañino en las poblaciones microbianas puesto que los géneros identificados (Hartmann *et al.*, 2009) pueden incrementar el crecimiento y productividad de la planta denominadas rizobacterias (PGPR) las cuales colonizan la rizosfera.

Esto pudo estar relacionado con los metabolitos que la planta de algodón exudó principalmente los compuestos nitrogenados durante esta temporada, principalmente en las plantas transgénicas (T2 y T3). Los resultados de los perfiles metabólicos concuerdan con los obtenidos de Kumar y colaboradores (2007) puesto que ellos encontraron azúcares en los exudados radiculares del algodón (xilosa, glucosa), ácidos orgánicos (ácido cítrico y oxálico) y aminoácidos (lisina, treonina y arginina) y que estos dependieron de la variedad de la planta de algodón.

De acuerdo a los resultados encontrados empleando la técnica de cromatografía en capa fina y resonancia magnética nuclear. Se encontraron azúcares mismos que ayudan a regular la sincronización de las fases de desarrollo tales como la progresión de juvenil a fase adulto, la floración y senescencia. Dentro de las principales funciones de los azúcares en la rizosfera son fuente de nutrientes y promotores del crecimiento microbiano (Kumar *et al.*, 2007). Se ha postulado que la glucosa promueve la división celular (embriogénesis), a altas concentraciones de glucosa promueven la formación de la hoja verdadera y el crecimiento radicular (Gibson, 2005).

Además, la glucosa se ha encontrado en los exudados radiculares de las plantas de *Arabidopsis* (Chaparro *et al.*, 2013) y en *Brachypodium distachyon* (Kawasaki *et al.*, 2016). También, se ha encontrado la fructosa en los exudados radiculares de las plantas de *Arabidopsis* durante las colectas de 7 a 10, 14 a 17, 21 a 24 y 28 a 31 días (Chaparro *et al.*, 2013) y en los exudados radiculares de *Brachypodium distachyon* (Kawasaki *et al.*, 2016).

Por otro lado, la maltosa tiene una participación temprana en la ruta del cloroplasto beta amilasa. Aunque no se sabe claramente donde en la célula o por intermediarios de los cuales las enzimas llevan el metabolismo de la maltosa, hay una evidencia que ésta puede ser exportada del

cloroplasto al metabolismo del citosol. Un transportador de maltosa desconocido, es esencial para la conversión de almidón a sacarosa en las hojas de *Arabidopsis* durante la noche (Niittylä *et al.*, 2004). Otro azúcar, la arabinosa se ha encontrado en los exudados radiculares de las plantas de *Arabidopsis* (Chaparro *et al.*, 2013) y *Brachypodium distachyon* (Kawasaki *et al.*, 2016).

Asimismo en este estudio se encontraron compuestos nitrogenados tales como la betaína misma que se ha encontrado en la cebada (*Hordeum vulgare*) y las espinacas (*Spinacia oleracea*) se acumula betaína en respuesta al estrés salino y frío, mientras que *Arabidopsis thaliana*, papa (*Solanum tuberosum*) y arroz (*Oryza sativa*), no acumulan betaína bajo las mismas condiciones (Rhodes and Hanson, 1993). Entre las betaínas, es este caso la trigonelina (ácido nicotínico N-metil-betaína) está presente especialmente altas cantidades en las semillas de leguminosas (Goldmann *et al.*, 1991) y de *Medicago sativa*. Las betaínas son osmoprotectores y fuentes de energía para algunas cepas tales como *Rhizobium meliloti* RCR2011 la cual codifica funciones esenciales al su función en el catabolismo de tres betaínas: Trigonelina (ácido nicotínico N-metil-betaína), Estacidrina (prolina betaína o dimetil prolina) y Carnitina (γ-trimetil-β-hidroxi-butirobetaína).

La Carnitina es un aminoácido de amonio cuaternario, se produce en los reinos microbianos, vegetal y animal y está involucrado en el metabolismo energético, acción hormonal y adaptación al estrés. Asimismo, está asociada con el metabolismo de ácidos grasos en plantas (Bourdin *et al.*, 2007). También está presente en los tejidos y órganos de varias especies incluyendo cereales y leguminosas, en semillas secas y germinando y en las hojas (Wood *et al.*, 1992).

La Xantina deshidrogenasa (XDH) es una oxidoreductasa de importancia en el metabolismo de la purina. La distribución de la enzima XDH ha sido estudiada en los ejes longitudinales y transversales de las raíces del maíz concluyendo que éstas fueron afectadas por las fuentes de nitrógeno y la salinidad (Barabás *et al.*, 2000). La función básica de la XDH es en el catabolismo de la purina, catalizando la conversión de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico (Hofmann, 2016). Se ha identificado la síntesis de la xantina en las plantas de *Arabidopsis* durante la senescencia y su papel como una fuente continua de nitrógeno en el crecimiento de la planta (Brychkova *et al.*, 2008). En otro estudio, la enzima oxidante de xantina se encontró solo en el

citósol del nódulo de las raíces de soya (Triplett *et al.*, 1980). Además, la actividad de la xantina deshidrogenasa en el citósol fue suficiente para el metabolismo del Nitrógeno fijado, ya que los cálculos mostraron que las tasas de fijación de nitrógeno y oxidación de xantina son similares (Triplett *et al.*, 1980).

Este es el primer estudio realizado en nuestro país donde se determinó la composición de las comunidades microbianas empleando técnicas de nueva generación (NGS) tanto en los suelos de la región Zona Norte de Tamaulipas, así como de las comunidades rizobacterianas que habitan en la rizosfera del algodón convencional con respecto a dos algodones transgénicos. Se observaron variaciones en la estructura de las comunidades microbianas que habitan en la rizosfera y éstas dependieron de la etapa de crecimiento (Sugiyama *et al.*, 2014) y año de siembra (Barriuso and Mellado 2012) más que la modificación genética en la planta transgénica concordando con los resultados de Schmalenberger and Tebbe (2002) puesto que el maíz Bt no afectaron a la composición de las comunidades microbianas de la rizosfera.

## 9. CONCLUSIONES

En conclusión, el análisis de secuenciación masiva reveló que la composición y dinámica de las comunidades bacterianas en las muestras de suelo estuvieron dominadas principalmente por seis Phyla: Proteobacteria, Firmicutes, Acidobacteria, Actinobacteria, Gemmatimonadetes, and Bacteroidetes. El género más abundante fue *Bacillus* sp., el cual juega un papel muy importante en los cambios fisicoquímicos del suelo y realizan funciones esenciales asociadas a los cultivos como Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Además el grupo de las Acidobacterias que tienen la habilidad de utilizar el utilizar nitrito como fuente de N, respondiendo a los macro y micronutrientes del suelo.

En este trabajo fue posible identificar nuevas especies bacterianas muy poco estudiadas y no fue posible su clasificación (Unclassified derived from). Se clasificaron taxonómicamente algunos

miembros del orden Rhizobiales y la familia Rhodospirillaceae mismos que son considerados importantes en la agricultura y ecología participando en la fijación de nitrógeno.

En este estudio los principales Phylum en las muestras de suelo (BS) fueron Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria y Firmicutes. Durante la siembra del año 2015, los phylum dominantes en mayor abundancia relativa fue uniforme en la rizosfera de los tres genotipos de algodón durante la etapa vegetativa y floración. Dentro de los principales phylum fueron Proteobacteria, Firmicutes, Acidobacteria, Actinobacteria. Mientras que en menor abundancia relativa fueron Gemmatimonadetes, Bacteroidetes, Chloroflexi, Cianobacterias y Nitrospirae. En el segundo año de siembra 2016, se observaron variaciones en las comunidades rizobacterianas del algodón T3 colectadas en la etapa vegetativa. Mientras que en la etapa de floración se observaron variaciones en la abundancia relativa en las comunidades rizobacterianas del algodón transgénico T2 y T3. Los principales phyla fueron Proteobacteria seguido de Acidobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Cianobacteria, Bacteroidetes, Gemmatimonadetes, Chloroflexi y Nitrospirae. Se identificaron un total de 392 familias y 667 géneros diferentes en la rizosfera de las plantas de algodón convencional y transgénicos.

En lo que respecta a la alfa diversidad (especies observadas, índice de Chao1, Shannon y Simpson) fue similar entre las plantas de algodón convencional T1 y transgénicos (T2 y T3). Sólo se observaron variaciones dependiendo si pertenecía a muestra de suelo o rizosfera, así como el año de siembra. Por otro lado, se observan diferencias de los biomarcadores metagenómicos que hacen los cambios en las comunidades bacterianas asociadas a la rizosfera de los tres genotipos de algodón, en base al análisis estadístico Lefse Análisis Discriminante Lineal (LDA score) y el algodón transgénico mostró mayor número de biomarcadores en comparación con el algodón convencional. Además, la diversidad beta reveló que es posible que se compartan algunas comunidades bacterianas entre los genotipos de plantas de algodón. Los resultados fueron consistentes, indicando que las variaciones detectadas en la estructura de las comunidades bacterianas son posiblemente al factor climático más que la modificación genética de las plantas de algodón.

Finalmente, se logró estandarizar un fase móvil para la separación de azúcares estándar empleando la técnica de cromatografía en capa fina. Se identificó esteroides y polisacáridos en los exudados radiculares colectados a los 7, 10, 14, 23 y 41 días de crecimiento en medio Hoagland. Se identificó a un azúcar en una muestra de planta de algodón transgénico (T2) con una semana de crecimiento en agua empleando un método de extracción de la muestra disuelta en metanol. Mediante el análisis de RMN fue posible identificar los azúcares y carbohidratos presentes en las muestras de exudados radiculares. Se encontró que estos son muy pocos en comparación con otro tipo de plantas. Se concluye entonces que las plantas de algodón son capaces de exudar metabolitos en poca cantidad y calidad bajo condiciones hidropónicas.

## 10. REFERENCIAS

- Acosta-Martínez, V., Dowd, S.E., Sun, Y., Wester, D., Allen, V., 2010. Pyrosequencing analysis for characterization of soil bacterial populations as affected by an integrated livestock-cotton production system. *Appl. Soil Ecol.* 45, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.01.005>
- Aira, M., Gómez-Brandón, M., Lazcano, C., Bååth, E., Domínguez, J., 2010. Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 42, 2276–2281. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.08.029>
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., 2006. the Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions With Plants and Other Organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 233–266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>
- Barriuso, J., Mellado, R.P., 2012. Glyphosate affects the rhizobacterial communities in glyphosate-tolerant cotton. *Appl. Soil Ecol.* 55, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.12.010>
- Berg, G., Smalla, K., 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68, 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x>
- Bourdin, B., Hervé, A., Perrin, Y., 2007. Carnitine is associated with fatty acid metabolism in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 45, 926–931. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.09.009>
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J.,

- Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Castaldini, M., Turrini, A., Sbrana, C., Benedetti, A., Marchionni, M., Mocali, S., Fabiani, A., Landi, S., Santomassimo, F., Pietrangeli, B., Nuti, M.P., Miclaus, N., Giovannetti, M., 2005. Impact of Bt corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6719–6729. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6719-6729.2005>
- Chaparro, J.M., Badri, D. V, Bakker, M.G., Sugiyama, A., Manter, D.K., Vivanco, J.M., 2013. Root Exudation of Phytochemicals in Arabidopsis Follows Specific Patterns That Are Developmentally Programmed and Correlate with Soil Microbial Functions 8, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055731>
- Clive, J., 2016. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. ISAAA Briefs 317. <https://doi.org/10.1017/S0014479706343797>
- Clive, J., 2013. Brief 46 Resumen ejecutivo Situación Mundial de los Cultivos Biotecnológicos / GM Comercializados : 2013. Isaaa.
- D'Argenio, V., Casaburi, G., Precone, V., Salvatore, F., 2014. Comparative metagenomic analysis of human gut microbiome composition using two different bioinformatic pipelines. *Biomed Res Int* 2014, 10. <https://doi.org/10.1155/2014/325340>
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., Andersen, G.L., 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5069–5072. <https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>
- Dohrmann, A.B., Tebbe, C.C., 2005. Effect of Elevated Tropospheric Ozone on the Structure of Bacterial Communities Inhabiting the Rhizosphere of Herbaceous Plants Native to Germany Effect of Elevated Tropospheric Ozone on the Structure of Bacterial Communities Inhabiting the Rhizosphere of. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7750–7758. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.7750>
- Dunfield, K., Germida, J., 2001. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field grown genetically modified Brassica napus. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38, 1–9.
- Dunfield, K.E., Germida, J.J., 2003. Seasonal Changes in the Rhizosphere Microbial Communities

- Associated with Field-Grown Genetically Modified Canola ( *Brassica napus* ) Seasonal Changes in the Rhizosphere Microbial Communities Associated with Field-Grown Genetically Modified Canola ( *Brassi.* *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7310–7318. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7310>
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Fang, M., Kremer, R.J., Motavalli, P.P., Davis, G., 2005. Bacterial diversity in rhizospheres of nontransgenic and transgenic corn. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4132–4136. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4132-4136.2005>
- Fierer, N., Bradford, M.A., Jackson, R.B., 2007. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88, 1354–1364.
- Gałązka, A., Gawryjołek, K., Grządziel, J., Frać, M., Książak, J., 2017. Microbial community diversity and the interaction of soil under maize growth in different cultivation techniques. *Plant, Soil Environ.* 63, 264–270. <https://doi.org/10.17221/171/2017-PSE>
- Garza Cano, I., Pecina Quintero, V., Díaz Franco, A., Williams Alanís, H., Ramírez De León, J.A., 2005. Sorgo cultivado con biofertilizantes, fitohormonas y fósforo inorgánico. *TERRA Latinoam.* 23, 581–586.
- Gibson, S.I., 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.11.003>
- Goldmann, A., Boivin, C., Fleury, V., Message, B., Lecoeur, L., Maille, M., 1991. Betaine Use by Rhizosphere Bacteria: Genes Essential for Trigonelline Stachydrine, and Carnitine Catabolism in *Rhizobium meliloti* Are Located on pSym in the Symbiotic Region. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4, 571–578.
- Gomes, N.C.M., Heuer, H., Schönfeld, J., Costa, R., Smalla, K., 2001. Edited by Foxit Reader Bacterial diversity of the rhizosphere of maize ( *Zea mays* ) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant Soil* 167–180.
- Grifoni, A., Bazzicalupo, M., Di Serio, C., Fancelli, S., Fani, renato, 1995. Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of the 16S rDNA and of the histidine operon. *FEMS Microbiol. Lett.* 127, 85–91. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00042-4](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00042-4)
- Hart, M.M., Powell, J.R., Gulden, R.H., Dunfield, K.E., Peter Pauls, K., Swanton, C.J.,

- Klironomos, J.N., Antunes, P.M., Koch, A.M., Trevors, J.T., 2009. Separating the effect of crop from herbicide on soil microbial communities in glyphosate-resistant corn. *Pedobiologia (Jena)*. 52, 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2008.10.005>
- Hartmann, A., Schmid, M., van Tuinen, D., Berg, G., 2009. Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* 321, 235–257. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9814-y>
- Hodgson, D.A., 2000. Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 42, 47–238.
- Hong, H.A., To, E., Fakhry, S., Baccigalupi, L., Ricca, E., Cutting, S.M., 2009. Defining the natural habitat of *Bacillus* spore-formers. *Res. Microbiol.* 160, 375–379. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.06.006>
- Janssen, P.H., 2006. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1719–1728. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1719>
- Kapur, M., Bhatia, R., Pandey, G., Pandey, J., Paul, D., Jain, R.K., 2010. A Case study for assessment of microbial community dynamics in genetically modified Bt cotton crop fields. *Curr. Microbiol.* 61, 118–124. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9585-6>
- Kawasaki, A., Donn, S., Ryan, P.R., Mathesius, U., Devilla, R., Jones, A., Watt, M., 2016. Microbiome and Exudates of the Root and Rhizosphere of *Brachypodium distachyon*, a Model for Wheat. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164533>
- Kerstens, K., De Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P., Stackebrandt, E., 2006. Introduction to the Proteobacteria, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses*. Springer New York, New York, NY, pp. 3–37. [https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1\\_1](https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_1)
- Kielak, A.M., Veen, J.A. Van, Kowalchuk, G.A., 2010. Comparative Analysis of Acidobacterial Genomic Fragments from Terrestrial and Aquatic Metagenomic Libraries, with Emphasis on Acidobacteria Subdivision 6. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6769–6777. <https://doi.org/10.1128/AEM.00343-10>
- Kumar, R., Bhatia, R., Kukreja, K., Behl, R.K., Dudeja, S.S., Narula, N., 2007. Establishment of *Azotobacter* on plant roots: Chemotactic response, development and analysis of root exudates of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Basic Microbiol.* 47, 436–439. <https://doi.org/10.1002/jobm.200610285>



- Li, X., Rui, J., Mao, Y., Yannarell, A., Mackie, R., 2014. Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. *Soil Biol. Biochem.* 68, 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.017>
- Mansouri, H., Petit, A., Oger, P., Dessaux, Y., 2002. Engineered rhizosphere: The trophic bias generated by opine-producing plants is independent of the opine type, the soil origin, and the plant species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2562–2566. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2562-2566.2002>
- Meyer, F., Paarmann, D., D’Souza, M., Olson, R., Glass, E.M., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilke, A., Wilkening, J., Edwards, R.A., 2008. The metagenomics RAST server -- a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* 9, 386. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-386>
- Mulder, C., Wouterse, M., Raubuch, M., Roelofs, W., Rutgers, M., 2006. Can transgenic maize affect soil microbial communities? *PLoS Comput. Biol.* 2, 1165–1172. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020128>
- Niittylä, T., Messerli, G., Trevisan, M., Chen, J., Smith, A.M., Zeeman, S.C., 2004. A Previously Unknown Maltose Transporter Essential for Starch Degradation in Leaves 303, 87–88.
- Oger, P., 1997. © 199 7 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/naturebiotechnology>. *Nat. Biotechnol.* 15, 328–330. <https://doi.org/10.1038/nm0798-822>
- Oliver, K.L., Hamelin, R.C., Hintz, W.E., 2008. Effects of transgenic hybrid aspen overexpressing polyphenol oxidase on rhizosphere diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5340–5348. <https://doi.org/10.1128/AEM.02836-07>
- Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., Van Der Putten, W.H., 2013. Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 789–799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>
- Robyt, J.F., 2000. CARBOHYDRATES | Thin-Layer (Planar) Chromatography, *Encyclopedia of Separation Science*. Academic Press, Oxford, pp. 2235–2244. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-226770-2/02651-X>
- SAGARPA, 2017. *Agrícola Nacional*.
- Schmalenberger, A., Tebbe, C.C., 2002. Bacterial community composition in the rhizosphere of a transgenic, herbicide-resistant maize (*Zea mays*) and comparison to its non-transgenic cultivar Bosphore. *FEMS Microbiol. Ecol.* 40, 29–37. <https://doi.org/10.1016/S0168->

SFA-SAGARPA, 2011. La Monografía del Algodón.

Suela Silva, M., Naves Sales, A., Teixeira Magalhães-Guedes, K., Ribeiro Dias, D., Schwan, R.F., 2013. Brazilian Cerrado soil *Actinobacteria* ecology. Biomed Res. Int. 2013, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/503805>

Sugiyama, A., Ueda, Y., Zushi, T., Takase, H., Yazaki, K., 2014. Changes in the Bacterial Community of Soybean Rhizospheres during Growth in the Field 9, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100709>

Teixeira, L., Peixoto, R.S., Cury, J.C., Sul, W.J., Pellizari, V.H., Tiedje, J., Rosado, A.S., 2010. Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica. Isme J 4, 989–1001. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.35>

USDA, F., 2018. Cotton : World Markets and Trade World Stocks Continue to Climb.

Villalón-López, N., Serrano-Contreras, J.I., Téllez-Medina, D.I., Gerardo Zepeda, L., 2018. An <sup>1</sup>H NMR-based metabolomic approach to compare the chemical profiling of retail samples of ground roasted and instant coffees. Food Res. Int. 106, 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.077>

Vital, L., Narvaez, J.A., Cruz, M.A., Ortiz, E.L., Sanchez, E., Mendoza, A., 2017. Unravelling the composition of soil belowground microbial community before sowing transgenic cotton. Plant, Soil Environ. 63, 512–518. <https://doi.org/10.17221/523/2017-PSE>

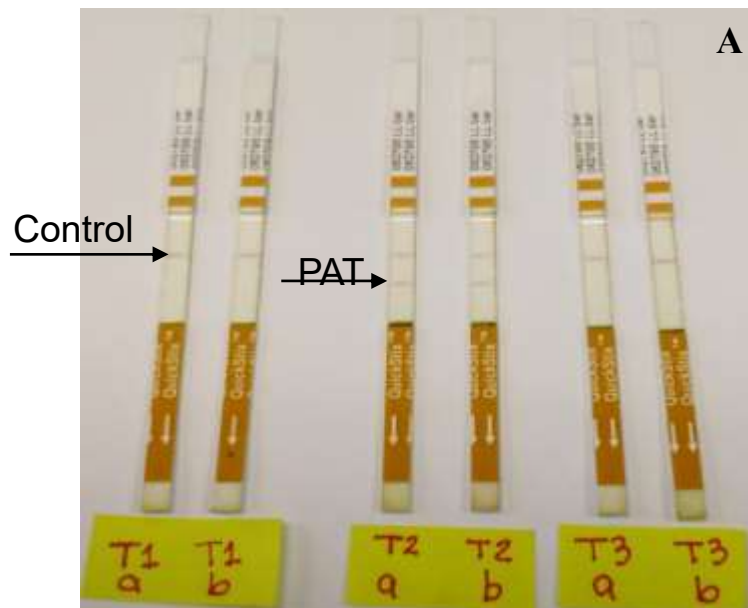
Vital López, L., Hernández, M.A.C., Dávila, S.F., Herrera, A.M., 2015. Diversidad bacteriana en raíces de maíz híbrido convencional y genéticamente modificado. Phytón (B. Aires). 84, 233–243.

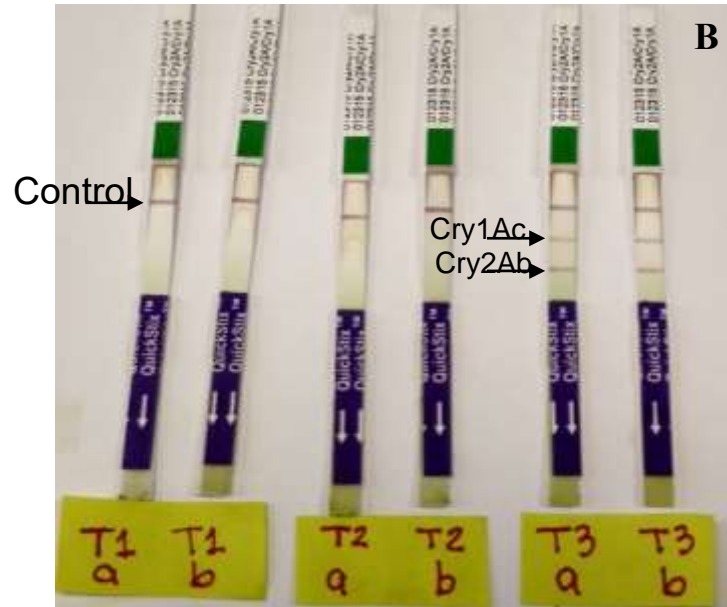
Wuyts, J., 2002. The European database on small subunit ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. 30, 183–185. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.183>

Xue, K., Serohijos, R.C., Devare, M., Thies, J.E., 2011. Decomposition rates and residue-colonizing microbial communities of bacillus thuringiensis insecticidal protein Cry3Bb-expressing (Bt) and non-Bt corn hybrids in the field. Appl. Environ. Microbiol. 77, 839–846. <https://doi.org/10.1128/AEM.01954-10>

## 11. APÉNDICE

**Apéndice 1.** Inmunostrip para la determinación de las proteínas Pat/bar y Cry's en las hojas de las plantas de algodón convencional (T1), transgénico 1 (T2) y transgénico 2 (T3). **A.** Proteína PAT. **B.** Proteínas Cry1Ac y Cry2Ab.





**Apéndice 2.** Inmunostrip para la determinación de las proteínas Pat/bar y Cry's en las raíces de las plantas de algodón convencional (T1), transgénico 1 (T2) y transgénico 2 (T3). **A.** Proteína PAT. **B.** Proteínas Cry1Ac y Cry2Ab.

