

Root endophyte bacteria in drought-tolerant and drought-susceptible maize lines

Bacterias endófitas de la raíz en líneas de maíces tolerantes y susceptibles a sequía

Alma Sánchez-Bautista, Carlos De León-García de Alba, Sergio Aranda-Ocampo*, Emma Zavaleta-Mejía, Cristian Nava-Díaz, Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carretera México- Texcoco. Montecillo, CP. 56230, Texcoco, Estado de México; **Paul H. Goodwin,** Department of Plant Pathology, School of Environmental Sciences, University of Guelph, 50 Stone Road East, Guelph, Ontario, N1G 2W1, Canada; **Santos G. Leyva-Mir,** Laboratorio de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México- Texcoco, Chapingo, CP. 56230, Texcoco, Estado de México. *Autor para correspondencia: saranda@colpos.mx.

Recibido: 10 de Octubre, 2017.

Aceptado: 07 de Diciembre, 2017.

Sánchez-Bautista A, De León-García de Alba C, Aranda-Ocampo S, Zavaleta-Mejía E, Nava-Díaz C, Goodwin PH, Leyva-Mir SG. 2017. Root endophyte bacteria in drought-tolerant and drought-susceptible maize lines. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 35-55.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1710-3

Primera publicación DOI: 1 de Enero, 2018.

First DOI publication: January 1, 2018.

Resumen. El maíz (*Zea mays*) ocupa el segundo lugar como alimento en el mundo y la sequía limita su productividad. Las plantas albergan bacterias endófitas que influyen en la sanidad y tolerancia a la sequía. El objetivo de esta investigación fue estimar la densidad y diversidad de las bacterias endófitas cultivables de la raíz en siete líneas homocigóticas de maíces tolerantes y siete susceptibles a sequía en tres localidades de México durante tres ciclos del cultivo. La densidad y diversidad de las

Abstract. Maize (*Zea mays*) ranks second as food in the world and drought limits its productivity. Plants harbor endophytic bacteria that influence health and drought tolerance. The goal of this research was to estimate the density and diversity of cultivable endophyte bacteria from the root system of seven homozygous maize drought-tolerant and seven drought-susceptible lines in three locations of Mexico during three crop cycles. The density and diversity of bacterial populations was assessed by direct counting on plates and identified by PCR. The results identified three groups of endophytic bacteria: 1) highly frequent (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas geniculata*), 2) frequent (*Bacillus firmus*, *Pseudomonas hibiscicola* y *Sinorhizobium meliloti*) y 3) low frequency (*Acinetobacter soli*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia gladioli*). The analysis of variance (ANOVA) showed significant differences ($p \leq 0.05$) in density ($_{\text{Log}_{10}} \text{CFU g}^{-1} \text{ root}$) of population by location, crop cycle, days after sowing and

poblaciones bacterianas se evaluó mediante conteo directo en placas y se identificaron por PCR. Los resultados identificaron tres grupos de bacterias endófitas: 1) altamente frecuentes (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas geniculata*), 2) frecuentes (*Bacillus firmus*, *Pseudomonas hibiscola* y *Sinorhizobium meliloti*) y 3) baja frecuencia (*Acinetobacter soli*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia gladioli*). El análisis de varianza (ANOVA) mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la densidad ($_{\text{Log}_{10}}$ UFC g⁻¹ de raíz) de población por localidad, ciclo de cultivo, días después de siembra y líneas de maíz. La densidad de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas hibiscola* en la localidad de El Batán y *Bacillus megaterium*, *Sinorhizobium meliloti* en Tlaltizapán, fueron significativamente mayores en las líneas de maíz tolerantes que en las susceptibles a sequía.

Palabras clave: *Zea mays*; bacterias endofíticas; diversidad bacteriana; 16S rADN.

El maíz (*Zea mays*) es actualmente el segundo cultivo alimenticio más importante en términos de fuentes de energía y un contenido de proteína de aproximadamente 9.2% en la nutrición humana (FAO, 2016). México ocupa el séptimo lugar en producción del cereal con aproximadamente 25 millones de toneladas al año (FIRA, 2016). La productividad de esta gramínea se limita por factores bióticos por varias plagas y enfermedades y abióticos como sequía, deficiencia de nutrientes, salinidad y altas temperaturas (Grover *et al.*, 2007). La sequía es el término meteorológico para la escasez de agua y es uno de los factores ambientales de estrés más importantes que afectan la germinación, vigor de la planta y productividad de los cultivos agrícolas (Kamara *et al.*, 2003; Wilkinson y Davies, 2010) y una posible alternativa para hacer frente a este

maize lines. The density of *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas hibiscola* at El Batán and *Bacillus megaterium*, *Sinorhizobium meliloti* in Tlaltizapán, were significantly higher in drought-tolerant maize lines compared to drought-susceptible lines.

Key words: *Zea mays*; endophytic bacteria; bacterial diversity; 16S rADN.

Maize (*Zea mays*) is currently the second most important food staple in terms of energy sources, and provides a protein content of approximately 9.2% to human nutrition (FAO, 2016). Mexico is in the seventh place in maize production, with approximately 25 million tons a year (FIRA, 2016). Maize productivity is limited by several biotic stresses (pests and diseases) and abiotic stresses (drought, nutrient deficiency, salinity and high temperatures) (Grover *et al.*, 2007). Drought is the meteorological term for water scarcity, and is one of the major environmental stress factors that affect germination, plant vigor and productivity of agricultural crops (Kamara *et al.*, 2003; Wilkinson and Davies, 2010). A possible alternative for tackling this problem is to develop knowledge about plant microorganisms that play an important role in the expression of abiotic stress resistance (Gond *et al.*, 2015).

Endophytic microorganisms are bacteria, fungi or viruses that live all or part of their lives in plants' internal tissues without damaging their hosts. They establish a symbiotic interaction that modulates the health of plants, as well as their ability to adapt to different environmental stress factors (Hardoim *et al.*, 2015). Endophytic bacteria are a subgroup of the rhizosphere and rhizoplane bacterial community that colonizes the internal root tissue of the host plant; this gives them ecological advantages over other populations that colonize

problema es la generación de conocimiento sobre los microorganismos de las plantas que desempeñan una función importante en la expresión de resistencia al estrés por factores abióticos (Gond *et al.*, 2015).

Los microorganismos endófitos son bacterias, hongos o virus que habitan, parte o todo su ciclo de vida, en el tejido interno de las plantas sin causar daño a su hospedante y que establecen una interacción simbiótica que modulan la sanidad de la planta y su habilidad para adaptarse a diferentes factores de estrés del ambiente (Hardoim *et al.*, 2015). Las bacterias endófitas representan un subgrupo dentro de la comunidad de bacterias de la rizosfera y rizoplasma que colonizan el tejido interno de las raíces de la planta hospedante y que le confiere ventajas ecológicas sobre otras poblaciones que colonizan en forma epífita. Diversas especies de bacterias endófitas Gram positivas y Gram negativas se han aislado de diferentes tipos de tejido en numerosas especies de plantas (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006).

Existen evidencias del efecto positivo que inducen los microorganismos endófitos mediado por la expresión de mecanismos como el antagonismo, resistencia sistémica inducida (RSI) y adquirida (RSA), promotores del crecimiento de la planta, y la inducción de una respuesta de adaptación al estrés ambiental (Liu *et al.*, 2013). La relación entre la planta hospedante y la comunidad bacteriana endofítica refleja la coevolución en el proceso de colonización influenciado por el genotipo, etapa de crecimiento, estado fisiológico y tejido de la planta, así como por las características del suelo, prácticas agronómicas y condiciones ambientales como la temperatura, agua y el suministro de nutrientes (Higgins *et al.*, 2007).

En Maíz, la inoculación de estos microorganismos se relaciona con un incremento en la germinación, altura de la planta, biomasa radical y aérea que mejora el rendimiento (Morales *et al.*, 2011).

epiphytically. Diverse species of Gram-positive and Gram-negative endophytic bacteria have been isolated from different types of tissue from many plant species (Rosenblueth and Martínez-Romero, 2006).

There is evidence of the positive effect of endophytic microorganisms through the expression of mechanisms such as antagonism, induced systemic resistance (RSI) and acquired systemic resistance (RSA), plant growth promoters and induced adaptation response to environmental stresses (Liu *et al.*, 2013). The relationship between the host plant and the endophytic bacterial community reflects a co-evolution in the colonization process influenced by the genotype, growth stage, physiological condition and plant tissue, as well as by soil characteristics, agronomic practices and environmental conditions such as temperature, water and nutrient supply (Higgins *et al.*, 2007).

When maize is inoculated with these microorganisms, this increases germination, plant height, root and aboveground mass and improves yield (Morales *et al.*, 2011). It has also been shown that inoculating maize with these bacteria efficiently promotes drought stress tolerance (Fan *et al.*, 2015) as a result of the increase in root length and biomass, which in turn improves water and nutrient absorption (Naseem and Bano, 2014; Yasmin *et al.*, 2013). Endophytic bacteria can induce tolerance to abiotic stresses such as salinity and drought, while some populations confer tolerance to specific stress factors and are responsible for the survival of plants under these particular environmental conditions (Gond *et al.*, 2015; Montañez *et al.*, 2011). Thus, the microorganisms that establish positive interactions with plant roots play a key role in cropping systems and have promising biotechnological potential to be used in sustainable agriculture.

In Mexico there are no studies on endophytic bacterial communities in roots of drought

Así mismo, se ha demostrado la eficiencia con la inoculación de estas bacterias en maíz promoviendo tolerancia al stress por sequía (Fan *et al.*, 2015), mediado por el incremento de la longitud y biomasa de la raíz mejorando la absorción de agua y nutrientes (Naseem y Bano, 2014; Yasmin *et al.*, 2013). Las bacterias endófitas pueden inducir tolerancia contra enfermedades abióticas como salinidad y sequía, mientras que algunas poblaciones confieren tolerancia a factores de estrés específico y son responsables de la supervivencia de las plantas bajo esas condiciones particulares del ambiente (Gond *et al.*, 2015; Montañez *et al.*, 2011). Así, los microorganismos que establecen una interacción positiva con las raíces de las plantas desempeñan un papel clave en sistemas agrícolas con un promisorio potencial biotecnológico para su uso en una agricultura sostenible.

En México no existen investigaciones sobre las comunidades bacterianas endófitas en raíces de líneas de maíz tolerantes y susceptibles a sequía. Tales bacterias endófitas, potencialmente podrían utilizarse para el desarrollo de futuras estrategias biotecnológicas como inductores de tolerancia a sequía y a otros factores bióticos y abióticos limitantes en la productividad del cultivo. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue estimar la densidad y diversidad de las poblaciones bacterianas cultivables endófitas en la raíz en líneas de maíz homocigóticas (S6) tolerantes y susceptibles a sequía previamente identificadas con este carácter en condiciones de campo y cultivadas en tres localidades de México durante tres ciclos del cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de muestreo. Se sembraron siete líneas homocigóticas de maíz tolerantes (CLQRQ108, CML384, CML445, CML544, DTMA90, DTMA224, DTMA256) y siete susceptibles a

tolerant or drought susceptible maize lines. Such endophytic bacteria could be used to develop future biotechnological strategies such as inducers of drought tolerance and other abiotic and biotic factors that limit crop productivity. Therefore, the objective of this study was to estimate the density and diversity of endophytic bacterial populations in roots of homozygous (S6) drought tolerant and drought susceptible maize lines previously identified as such under field conditions and sown at three Mexican locations during three crop cycles.

MATERIALS AND METHODS

Sampling site. Seven drought-tolerant homozygous maize lines (CLQRQ108, CML384, CML445, CML544, DTMA90, DTMA224, DTMA256) and seven drought-susceptible homozygous maize lines (CML181, DTMA34, DTMA41, DTMA43, DTMA109, DTMA144, DTMA182) were sown, which were selected because they were inbred due to their uniform response to drought. Each line was sown with three replications at the experiment stations of the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) in Tlaltizapán, Morelos (18.68 N; 99.11 O), El Batán, Texcoco, Mexico (19.53 N; 98.85 W), and Agua Fría, Puebla (20.5 N; 97.6 W) during the 2012 summer crop cycle (V-2012), 2012 winter cycle (I-2012) and 2013 autumn cycle (V-2013). Samples of the internal tissue formed in the apical root area of three plants per line were taken for each location and crop cycle 25, 52 and 75 days after sowing (dds) to be analyzed at CIMMYT's Maize Pathology Laboratory at El Batán, State of Mexico. The size of the sample was determined by the method proposed by Cochran (1982).

Isolation of endophytic root bacteria. Bacterial isolates from the internal tissue of maize roots that

sequía (CML181, DTMA34, DTMA41, DTMA43, DTMA109, DTMA144, DTMA182), las cuales se seleccionaron por ser líneas endocriadas debido a su uniformidad en la respuesta a sequía. Cada línea se sembró con tres repeticiones en el Campo Experimental del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) en las localidades de Tlaltizapán, Morelos (18.68 N; 99.11 O), El Batán, Texcoco, México (19.53 N; 98.85 O), y Agua Fria, Puebla (20.5 N; 97.6 O) durante los ciclos de cultivo verano 2012 (V-2012), invierno 2012 (I-2012) y verano 2013 (V-2013). Se realizaron muestreos del tejido interno formado en la zona apical de la raíz en tres plantas de cada línea por localidad y ciclo de siembra a los 25, 52 y 75 días después de la siembra (dds) para su análisis en el Laboratorio de Patología de Maíz del CIMMYT, El Batán, Edo. México. El tamaño de muestra se determinó por el método propuesto por Cochran (1982).

Aislamiento de bacterias endófitas de raíces.

Se definieron como cepas endófitas aquellos aislamientos bacterianos obtenidos del tejido interno de las raíces del maíz superficialmente esterilizadas. Las raíces de maíz sin síntomas se lavaron con agua destilada estéril y se cortaron en trozos de 2 cm. Se esterilizaron superficialmente 10 g de raíces en frascos de vidrio estériles con lavados en serie con etanol 70% durante 5 min; hipoclorito de sodio 0.53% durante 10 min y tres lavados con agua destilada estéril. Del último lavado con agua destilada estéril, se sembraron 100 µL de cada frasco en placas Petri con medio de cultivo NB (1L): Agar Bacteriológico 15 g (BIOXON® México), Peptona 5 g (BD DIFCO™ EE. UU), Extracto de levadura 3 g (DIBICO® México, NaCl JT BAKER® México) y se incubaron a 28±1 °C durante 2-5 días. La ausencia de crecimiento bacteriano en el medio de cultivo confirmó la eficiente esterilización superficial de las raíces. Estas raíces se molieron en morteros

had been superficially sterilized were defined as endophytic strains. Symptomless maize roots were washed with sterile distilled water and cut in 2-cm pieces. 10 g of roots were sterilized superficially for 5 min in sterile glass jars and washed with 70% ethanol for 5 min, 0.53% sodium hypochlorite for 10 min and then rinsed three times with sterile distilled water. After the last washing with sterile distilled water, 100 µL from each jar were sown in Petri dishes containing NB culture medium (1L): 15 g bacteriological agar (BIOXON® Mexico), 5 g peptone (BD DIFCO™ USA), 3 g yeast extract (DIBICO® Mexico, NaCl JT BAKER® Mexico) and incubated at 28±1°C from 2 to 5 days. The absence of bacterial growth in the culture medium confirmed that the root surface had been efficiently sterilized. The roots were ground in cold mortars using 20 mL of a sterile buffer solution (50 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7.6). The resulting suspensions were diluted in series (1:9) from 10⁰ to 10⁻³; then 100 µL of each dilution and three replications were sown in NB medium and incubated at 28 °C for 24 h under continuous light. The different bacterial morphotypes were counted and classified according to their color, shape, texture and type of growth. The bacterial growth was considered representative of cultivable endophytic bacteria in maize roots. Bacterial strains were preserved by freezing in NB medium and 20% glycerol for subsequent studies.

Population density of endophytic bacteria. The population density of bacteria per root tissue was estimated by directly counting the colonies on the plate. The number of bacterial colonies isolated from the 14 maize lines was counted using a colony counter (Quebec®, Darkfield Colony Counter). The bacterial population of root tissue samples was expressed in terms of colony forming units (UFC g⁻¹ of root tissue). The resulting data were converted to $_{\text{Log10}} \text{UFC g}^{-1}$ of root and an analysis of variance

fríos con 20 mL de una solución amortiguadora (50 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, pH 7.6) estéril. Las suspensiones obtenidas se diluyeron en serie (1:9) desde 10^0 hasta 10^{-3} y se sembraron 100 μL de cada dilución con tres repeticiones en medio NB incubados a 28 °C durante 24 h con luz continua. Se cuantificaron y clasificaron los diferentes morfotipos bacterianos con base al color, forma, textura y tipo de crecimiento. El crecimiento bacteriano se consideró representativo de bacterias cultivables endófitas en la raíz de maíz. Las cepas bacterianas se preservaron por congelación en medio NB y glicerol 20% para estudios posteriores.

Densidad poblacional de bacterias endófitas. La densidad poblacional de bacterias por tejido de raíz se estimó por conteo directo de colonias en placa. El número de colonias bacterianas aisladas de las 14 líneas de maíz se cuantificó con un contador de colonias (Quebec[®], Darkfield Colony Counter). La población bacteriana de las muestras de tejido de raíz se expresó como unidades formadoras de colonias (UFC g^{-1} de raíz). Los datos obtenidos se transformaron a Log_{10} UFC g^{-1} de raíz y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) siguiendo un diseño de análisis factorial de donde se obtuvo la separación de medias por DMS ($\alpha=0,05$) con el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System, versión 9.1.3 SAS Institute, Cary, NC, EE.UU) en función del ciclo de cultivo, localidad, días después de la siembra (dds) y líneas de maíz tolerantes/susceptibles a sequía estudiadas.

Amplificación del gen 16S rADN e identificación de bacterias endófitas. La extracción de ADN de las bacterias se realizó por el protocolo descrito por Mahuku (2004), con las siguientes modificaciones: las células bacterianas se obtuvieron a partir del crecimiento en medio NB a 28 °C durante 48 h. Después de suspender el precipitado en 100 μL

(ANOVA) was performed using a factorial analysis design to separate the media by DMS ($\alpha=0,05$) using the SAS statistical program (Statistical Analysis System version 9.1.3 SAS Institute, Cary, NC, USA) according to the crop cycle, location, days after sowing (dds) and the studied drought-tolerant or drought-susceptible maize lines.

Amplification of the 16S rDNA gene and identification of endophytic bacteria. Bacterial DNA was extracted using the protocol described by Mahuku (2004) with the following modifications: bacterial cells were obtained by growing them in NB medium at 28 °C for 48 h. After suspending the precipitate in 100 μL of 1X TE, 2 μL of RNAsa were added (1 mg mL^{-1}) and then incubated in a water bath at 37 °C for 1 h. The DNA quality was verified by electrophoresis in agarose gel. Bacteria were identified by partially amplifying the 16S rADN gene using universal primers 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5'TACGGHTACCTTGTTACGACTT-3') under the PCR conditions described by Galkiewicz and Kellogg (2008). DNA amplification and sequencing were carried out using Macrogen (DNA Sequency Service. Korean Biotechnology Company), and the sequences obtained were aligned with sequences kept at the GenBank of (NCBI) using the BLASTn program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

RESULTS AND DISCUSSION

Taxonomic identification of endophytic bacteria. Through partial sequencing of the 16S rADN gene, 22 endophytic bacteria species were identified in roots of both groups of maize lines. The greatest abundance of bacteria was associated with the *Proteobacteria* phyla followed by *Firmicutes* and

de 1X TE, se agregaron 2 µL de RNAsa (1 mg mL⁻¹), y se incubó en baño María a 37 °C durante 1 h. La calidad del ADN se verificó por electroforesis en gel de agarosa. Las bacterias se identificaron mediante la amplificación parcial del gen 16S rADN con los iniciadores universales 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'TACGGHTACCTTGTTACGACTT-3') con las condiciones de PCR descritas por Galkiewicz y Kellogg (2008). La amplificación y secuenciación se hizo en Macrogen (DNA Sequency Service. Korean Biotechnology Company); las secuencias obtenidas se alinearon con secuencias depositadas en el GenBank del Centro Nacional de Biotecnología de los Estados Unidos (NCBI) utilizando el programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación taxonómica de bacterias endófitas. La secuenciación parcial del gen 16S rADN permitió identificar 22 especies de bacterias endófitas en la raíz en ambos grupos de líneas de maíz. La mayor abundancia de bacterias se asoció a los phyla *Proteobacteria*, seguido de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Dentro de *Firmicutes*, el 100% de las cepas se identificaron como *Bacillus sp.* y dentro de la clase *Gammaproteobacteria*, 33% como *Pseudomonas sp.*

La diversidad y riqueza de bacterias naturalmente asociadas a las raíces de maíz es amplia y la estimación de esta depende del método de análisis. En este estudio se utilizó un enfoque de cultivo dependiente y los resultados coinciden con investigaciones previas que reportaron el phylum *Proteobacteria* como el más dominante entre las poblaciones bacterianas endófitas aisladas en raíces, tallos y hojas de maíz (Rosenblueth y Martínez-

Bacteroidetes. Within *Firmicutes*, 100% of strains were identified as *Bacillus sp.*, and within the class *Gammaproteobacteria*, 33% were identified as *Pseudomonas sp.*

The diversity and richness of bacteria naturally associated with maize roots is wide, and their estimation depends on the analytic method used. In this study, a dependent culture approach was used, and the results coincide with previous studies that found that the *Proteobacteria* phylum was the most predominant of the endophytic bacterial populations isolated from maize roots, stems and leaves (Rosenblueth and Martínez-Romero, 2006). Other studies of the diversity of endophytic communities in maize roots using dependent and independent culture methods also found that the bacteria most frequently associated with this crop are *Firmicutes* (*Bacillus*), *Gammaproteobacteria* (*Pseudomonas*) (Pereira *et al.*, 2011) and *Burkholderia spp.* (Ikeda *et al.*, 2013). By analyzing these populations using gas chromatography and fatty acid profiles, *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens* were identified as the most predominant species in maize stalks (Rai *et al.*, 2007), but when using pyrosequencing, the *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* and *Actinobacteria* phyla were identified as being the most abundant in the maize rhizosphere (Li *et al.*, 2014).

Maize research has shown that these populations could be used as bacterial inoculants for controlling drought stress, and suggests that drought tolerance is induced by the production of phytohormones such as abscisic, gibberellic and indole-3-acetic acids, cytokinins, enzymes such as ACC deaminase, production of bacterial exopolysaccharides and systemic tolerance induction (Dimkpa *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012; Timmusk *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2009). In other crops, they have been identified as tolerance inductors in wheat (*Triticum sativum*) and legumes (*Vigna radiata*) when they were inoculated

Romero, 2006). Así mismo, otros estudios sobre la diversidad de las comunidades endófitas de la raíz en maíz utilizando métodos de cultivo dependiente e independiente también coinciden en que las bacterias más frecuentemente asociadas a este cultivo son *Firmicutes* (*Bacillus*), *Gammaproteobacteria* (*Pseudomonas*) (Pereira *et al.*, 2011) y *Burkholderia* spp. (Ikeda *et al.*, 2013). El análisis de estas poblaciones por cromatografía de gases y perfiles de ácidos grasos identificaron a *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *P. fluorescens* como las especies relativamente más predominantes en el tallo de maíz (Rai *et al.*, 2007), mientras que mediante pyrosecuenciación se identificó como los más abundantes en la rizosfera de maíz a los phyla *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* (Li *et al.*, 2014).

Experimentaciones en maíz han mostrado el potencial uso de estas poblaciones como inoculantes bacterianos para el control de estrés por sequía, sugiriendo que la inducción de tolerancia a sequía se debe a la producción de fitohormonas como el ácido abscísico, giberélico, indol-3-acético, citocininas, enzimas como la ACC deaminasa, producción de exopolisacáridos bacterianos y la inducción de tolerancia sistémica (Dimkpa *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012; Timmusk *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2009). En otros cultivos se han señalado como inductores de tolerancia en trigo (*Triticum sativum*) y leguminosas (*Vigna radiata*) al ser inoculados en semilla y promoviendo el incremento en los niveles de regulación de genes relacionados con la tolerancia a sequía y la actividad de diversas enzimas (Kasim *et al.*, 2013; Saravanakumar *et al.*, 2011).

Por la frecuencia de los aislamientos, en el presente estudio se destacan tres grupos de bacterias endófitas en la raíz de maíces tolerantes y susceptibles a sequía: 1) altamente frecuentes (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas geniculata*), aislados durante los tres ciclos de cultivo

in seed, for they promoted an increase in the levels of regulation of genes related to drought tolerance and the activity of diverse enzymes (Kasim *et al.*, 2013; Saravanakumar *et al.*, 2011).

Based on the frequency of the isolates, three groups of endophytic bacteria in the roots of drought tolerant and drought susceptible maize stand out in this study: 1) highly frequent (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* and *Pseudomonas geniculata*), isolated during the three crop cycles at the three locations, 2) frequent (*Bacillus firmus*, *Pseudomonas hibiscola* and *Sinorhizobium meliloti*), isolated during the three crop cycles at two locations, and 3) low frequency (*Acinetobacter soli*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia gladioli*), isolated only at two locations and not in all crop cycles (Table 1).

The taxonomic and functional structure of bacterial communities in soil is influenced by biotic and abiotic factors such as soil physical and chemical characteristics, weather conditions, plant genotype and interaction with other soil prokaryotes and eukaryotes, a fact that suggests that those interactions are complex. In this study, the structure and large number of isolated bacteria may be associated with the interaction of several factors, including plant genotype, the genetic characteristics of bacterium, soil, temperature, crop cycle and maize plant phenology (Li *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2009) that influence the colonization and dynamics of the endophytic bacterial community (Bodenhausen *et al.*, 2013). A specific plant-endophyte relationship was revealed by performing bacterial chemotaxis on host plant exudates as carbon sources that act as signaling molecules (Albareda *et al.*, 2006); it also showed that differences in exudate composition and patterns depend on the crop variety, development stage, exposure of the plant to stress and type of soil, which influence colonization by bacterial

en las tres localidades, 2) frecuentes (*Bacillus firmus*, *Pseudomonas hibiscola* y *Sinorhizobium meliloti*), aislados durante los tres ciclos de cultivo en dos localidades y 3) baja frecuencia (*Acinetobacter soli*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia gladioli*), aisladas solo en dos localidades y no en todos los ciclos del cultivo (Cuadro 1).

La estructura taxonómica y funcional de las comunidades bacterianas en el suelo está influenciada por factores bióticos y abióticos como las características físicoquímicas del suelo, condiciones climáticas,

communities (Haichar *et al.*, 2008). Studies on maize indicated that root exudates are 65% sugar, 33% organic acids and 2% amino acids, and that changes in the quantity and quality of exudation patterns at different root growth and physiological stages influenced the biomass and the structure of bacterial communities by increasing nutrient activity and deposition by those microbial communities and favored plant growth (Baudoin *et al.*, 2003). Some maize studies that used a dependent culture approach have shown dynamic changes

Cuadro 1. Especies de bacterias endófitas identificadas en la raíz de 14 líneas de maíz en tres localidades y durante tres ciclos del cultivo.

Table 1. Endophyte bacteria species identified in roots of 14 maize lines in three locations during three crop cycles.

ID	Endófito	Línea	Identidad de Nucleótidos	Clase	Localidad/ciclo de cultivo		
		T/S			TL	AF	EB
AF101	<i>Acinetobacter soli</i> ^Z	T, S	96% (KU551890)	γ Proteobacteria		1	1
AF105	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	T, S	97% (KX518841)	α Proteobacteria		1	
TL007	<i>Bacillus asahii</i>	T, S	95% (KU551893)	Firmicutes	1, 2, 3		1
TL008	<i>Bacillus firmus</i> ^Y	T, S	98% (KU551896)	Firmicutes	1, 2, 3		1, 2, 3
AF103	<i>Bacillus megaterium</i> ^X	T, S	96% (KC414697)	Firmicutes	1, 2, 3	1, 2, 3	1, 2, 3
AF102	<i>Bacillus subtilis</i> ^X	T, S	97% (KU551891)	Firmicutes	1, 2, 3	1, 2, 3	1, 2, 3
AF111	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	T, S	96% (GU433447)	β Proteobacteria		1, 2, 3	
AF129	<i>Burkholderia gladioli</i> ^Z	S	97% (EU1611873)	β Proteobacteria	1, 2	2	
AF109	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	T, S	98% (KU551895)	Flavobacteria		1, 2, 3	2
TL032	<i>Enterobacter aerogenes</i>	T, S	97% (AM184247)	γ Proteobacteria	1	1, 2, 3	
BT011	<i>Enterobacter</i> spp.	T, S	97% (KX518848)	γ Proteobacteria			1
TL012	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	T, S	96% (KU551897)	Flavobacteria	1		
AF116	<i>Klebsiella oxytoca</i>	T, S	97% (KU551901)	γ Proteobacteria		2	
AF128	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	T, S	96% (KX518847)	γ Proteobacteria		1	
TL015	<i>Pseudomonas hibiscola</i> ^Y	T, S	97% (KX518846)	γ Proteobacteria	1, 2, 3		1, 2, 3
AF112	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	T, S	96% (KX518844)	γ Proteobacteria		1, 2, 3	
AF115	<i>Pseudomonas geniculata</i> ^X	T, S	96% (KU551900)	γ Proteobacteria	1, 2, 3	1, 2, 3	1, 2, 3
TL011	<i>Pseudomonas lini</i>	T, S	99% (KX518842)	γ Proteobacteria	1		
AF107	<i>Salmonella bongori</i>	T, S	96% (KU551899)	γ Proteobacteria	1		
AF106	<i>Serratia marcescens</i>	T, S	96% (KX518843)	γ Proteobacteria	1, 2, 3	1	
TL010	<i>Sinorhizobium meliloti</i> ^Y	T, S	98% (KU551892)	α Proteobacteria	1, 2, 3		1, 2, 3
TL009	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ^Z	T, S	98% (KU551894)	γ Proteobacteria		1, 2, 3	1

T= Línea de maíz tolerante a sequía, S= Línea de maíz susceptible a sequía / T= drought-tolerant maize line, S= drought-susceptible maize line.

TL= Tlaltizapán, Mor., AF= Agua Fría, Pue., EB= El Batán, Méx. / TL= Tlaltizapán, Mor., AF= Agua Fría, Pue., EB= El Batán, Méx.

1=Verano 2012; 2=Invierno 2012; 3=Verano 2013 / 1=Autumn 2012; 2=Winter 2012; 3=Summer 2013.

^X Endófitos altamente frecuentes / ^X Highly frequent endophytes.

^Y Endófitos frecuentes / ^Y Frequent endophytes.

^Z Endófitos de baja frecuencia / ^Z Low-frequent endophytes.

genotipo de la planta y la interacción con otros procariontes y eucariontes en el suelo, lo cual indica que son interacciones complejas. En este estudio, la estructura y abundancia de las bacterias aisladas puede asociarse con la interacción de varios factores, incluyendo el genotipo de la planta, las características genéticas de la bacteria, el suelo, la temperatura, ciclo de cultivo y fenología de la planta de maíz (Li *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2009) que influyen en la colonización y dinámica de las comunidades bacterianas endófitas (Bodenhause *et al.*, 2013). Se ha mostrado la relación específica entre planta-endófito mediante una quimiotaxia bacteriana hacia exudados de la planta hospedante como fuentes de carbono que actúan como moléculas de señalización (Albareda *et al.*, 2006) y que las diferencias en la composición y patrones de exudación son dependientes del cultivar, etapa de desarrollo, exposición a estrés de la planta y tipo de suelo, los cuales influyen en la colonización por comunidades bacterianas (Haichar *et al.*, 2008). Estudios en maíz indicaron que los exudados de la raíz están compuestos de 65% de azúcares, 33% de ácidos orgánicos y 2% de aminoácidos y que los cambios en cantidad y calidad en estos patrones de exudación en las diferentes etapas del crecimiento y fisiología de la raíz, influyó en la biomasa y estructura de las comunidades bacterianas incrementando la actividad y deposición de nutrientes por estas comunidades microbianas beneficiando el crecimiento de la planta (Baudoin *et al.*, 2003). Algunas investigaciones en maíz mediante un enfoque de cultivo dependiente han demostrado cambios dinámicos en la comunidad bacteriana de la rizosfera en diferentes etapas de crecimiento del cultivo (Cavaglieri *et al.*, 2009; Nacamulli *et al.*, 1997).

En este estudio se identificaron bacterias específicas como *Burkholderia gladioli*, la cual se aisló con baja frecuencia únicamente en las líneas susceptibles en dos localidades y ciclos de cultivo (Cuadro 1).

in the bacterial community of the rhizosphere at different crop growth stages (Cavaglieri *et al.*, 2009; Nacamulli *et al.*, 1997).

In this study, specific bacteria were identified such as *Burkholderia gladioli*, which was isolated at a low frequency only in susceptible maize lines at two locations and crop cycles (Table 1).

Burkholderia gladioli was previously identified in roots of a wild maize ancestor (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) and in modern maize genotypes as an endophyte showing antifungal properties (Shehata *et al.*, 2016). Also, *Burkholderia* sp. inoculation in maize had positive effects on drought tolerance (Fan *et al.*, 2015; Naveed *et al.*, 2014).

Density of endophytic populations in maize lines.

The density of endophytic bacteria in the 14 maize lines ranged from 1, 6_{Log10} UFC g⁻¹ of root. The ANOVA showed highly significant differences (**= p≤0,01) in the density of the endophytic population of *B. subtilis*, *B. megaterium*, *P. hibiscicola* and *S. meliloti* in terms of location, crop cycle, days after transplanting (dds) and group (drought tolerance/susceptibility) of maize lines (Table 2).

By location, the highest population densities recorded at El Batán were those of *B. subtilis* and *P. hibiscicola*, while in Tlaltizapán they were *B. megaterium* and *S. meliloti*. By crop cycle and sampling date, *B. megaterium* and *P. hibiscicola* were significantly different (p≤0,05) during the V-2012 cycle at 52 dds. In this study, a total of 22 endophytic bacteria were identified in roots of drought tolerant and drought susceptible maize lines. However, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *P. hibiscicola* and *S. meliloti* population densities were significantly higher in drought tolerant maize lines than in susceptible lines (Table 2).

The density of bacterial populations is a key element, considered to be the greatest metabolism regulation mechanism in the interaction with the biotic and abiotic environment, through which

B. gladioli se ha identificado previamente en raíces del ancestro silvestre (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) y en genotipos modernos de maíz como un endófito con propiedades antifúngicas (Shehata *et al.*, 2016); así mismo, la inoculación de *Burkholderia* sp. en maíz mostró efectos positivos en la tolerancia a sequía (Fan *et al.*, 2015; Naveed *et al.*, 2014).

Densidad de poblaciones endófitas en líneas de maíz. La densidad de bacterias endófitas en las 14 líneas de maíz tuvo rangos entre 1, 6_{Log10} UFC g⁻¹ de raíz. El ANOVA mostró diferencias altamente significativas (**= p≤0,01) en la densidad de población endófitas de *B. subtilis*, *B. megaterium*, *P. hibiscola* y *S. meliloti* en función de la localidad, ciclo de cultivo, días después del trasplante (dds) y grupo (tolerancia/susceptibilidad a sequía) de línea de maíz (Cuadro 2).

Por localidad, en El Batán, las mayores densidades de poblaciones se registraron con *B. subtilis* y *P. hibiscola*, mientras que en Tlaltizapán fueron con *B. megaterium* y *S. meliloti*. Por ciclo de cultivo y fecha de muestreo, *B. megaterium* y *P. hibiscola* fueron significativamente diferentes (p≤0,05)

it coordinates the expression of specialized genes, depending on cellular density. It has been demonstrated that this behavior, known as quorum sensing (QS) in bacteria associated with plants, regulates the expression of genes in the rhizosphere to synthesize secondary metabolites, antifungal compounds, antibiotics and extracellular enzymes involved in biocontrol (Somers *et al.*, 2004; Whitehead *et al.*, 2001).

In this study, the total population density of *B. subtilis* in the maize lines sown at El Batán was 3, 4_{Log10} UFC g⁻¹ of root, and there was no significant difference by cycle or days after sowing, but it was significantly higher in drought-tolerant maize lines (Table 2, Figure 1).

As an endophyte, *B. subtilis* is a microorganism of great interest in biotechnological applications as biocontrol agent for biotic and abiotic stresses because of its efficient colonization of plant roots which triggers different biocontrol and adaptation mechanisms in different environments (Marulanda *et al.*, 2006). Additionally, this demonstrates its high capacity to produce volatile organic compounds (VOCs) that act as signaling molecules to trigger a defense response through specific

Cuadro 2. Análisis de varianza y comparación de medias de la densidad de población (Log₁₀ UFC g⁻¹ de raíz) en las raíces de 14 líneas de maíces tolerantes y susceptibles a sequía.

Table 2. Variance analysis and comparison of means of population density (Log₁₀ UFC g⁻¹ of root) in roots of 14 drought-tolerant maize lines and drought-susceptible maize lines.

	<i>B. subtilis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>P. hibiscola</i>	<i>S. meliloti</i>
Localidad	**	**	**	**
Ciclo	NS	**	**	NS
Días	NS	**	NS	**
Tolerancia	**	**	**	**
Tolerante	2.2684 a	3.7374 a	2.9388 a	4.8880 a
Susceptible	1.7410 b	3.3976 b	2.4501 b	4.6389 b

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (DMS, 0.05) / Means with the same letter are not statistically different (DMS, 0.05).

NS= No existen diferencias significativas / NS= There are no significant differences.

**= Diferencias altamente significativas / **= Highly significant differences.

durante el ciclo V-2012 a los 52 dds. En el presente estudio se identificaron un total de 22 bacterias endófitas en raíces de líneas de maíces tolerantes y susceptibles a sequía. Sin embargo, la densidad de población de *B. subtilis*, *B. megaterium*, *P. hibiscicola* y *S. meliloti* fueron significativamente mayores en las líneas de maíz tolerantes que en las susceptibles a sequía (Cuadro 2).

La densidad de poblaciones en bacterias es un elemento clave y se considera como el mayor mecanismo de regulación del metabolismo en la interacción con el medioambiente biótico y abiótico, a través del cual coordina la expresión de genes especializados dependiente de una densidad celular. Este comportamiento conocido como Quorum sensing (QS), en bacterias asociadas a plantas se ha demostrado que regula la expresión de genes en la rizosfera para la síntesis de metabolitos secundarios, compuestos antifúngicos, antibióticos y enzimas extracelulares que están involucrados en el biocontrol. (Somers *et al.*, 2004; Whitehead *et al.*, 2001).

En este estudio, la densidad total de población de *B. subtilis* en las líneas de maíz en la localidad de El Batán fue de $3, 4_{\text{Log}_{10}}$ UFC g⁻¹ de raíz, no hubo diferencia significativa por ciclo y días después de la siembra, pero fue significativamente mayor en las líneas de maíz tolerantes a sequía (Cuadro 2, Figura 1).

Como endófito, *B. subtilis* es un microorganismo de gran interés en aplicaciones biotecnológicas como agente de biocontrol de enfermedades bióticas y abióticas, mediada por la eficiente colonización de las raíces de las plantas que desencadenan diferentes mecanismos de biocontrol y adaptación a diferentes ambientes (Marulanda *et al.*, 2006); además, demostrando su alta capacidad de producir compuestos orgánicos volátiles (VOCs) que actúan como moléculas de señalización para disparar una respuesta de defensa mediante la resistencia

induced systemic resistance (ISR) (Farag *et al.*, 2013). These VOCs activate hormone production paths, including auxins, gibberellins, cytokinins and salicylic acid that foster host plant growth under stress conditions, mainly by increasing root biomass, which in turn improves water absorption (Zhang *et al.*, 2007). Another study showed that maize seed inoculated with selected *B. subtilis* strains provided important benefits as a growth promoter and increased nutrient absorption capacity (Canbolat *et al.*, 2006). In Tlaltizapán, the population density of *B. megaterium* in maize lines was from $3, 5_{\text{Log}_{10}}$ UFC g⁻¹ of root during the three cycles and significantly higher ($5_{\text{Log}_{10}}$ UFC g⁻¹ of root) in the V-2012 cycle at 52 dds, and in drought tolerant maize lines (Table 2, Figure 2).

Recent studies have shown that *B. megaterium* modifies the maize plant response to several abiotic stresses, and the importance of the population density of some *Bacillus* species in the drought tolerance and water transportation response in *Retama sphaerocarpa*, because it promotes root growth and water absorption capacity, as well as the levels of proline and indoleacetic acid (Marulanda *et al.*, 2006). In particular, those studies point out that the presence of *B. megaterium* in the host plant increases biomass and water content in the root (Marulanda *et al.*, 2009), a fact that suggests that these endophytic populations could be used in maize plants sown in arid and semi-arid areas. The biological function of other endophytic *Bacillus* species in maize are related to the plant's efficient defense response against pathogens associated with the production of antifungal lipopeptides that induces the expression of defense genes (Gond *et al.*, 2015).

At El Batán, the population density of *P. hibiscicola* in maize lines was from $3, 5_{\text{Log}_{10}}$ UFC g⁻¹ of root during the three crop cycles and significantly higher ($5_{\text{Log}_{10}}$ UFC g⁻¹ of root) in the V-2012 cycle.

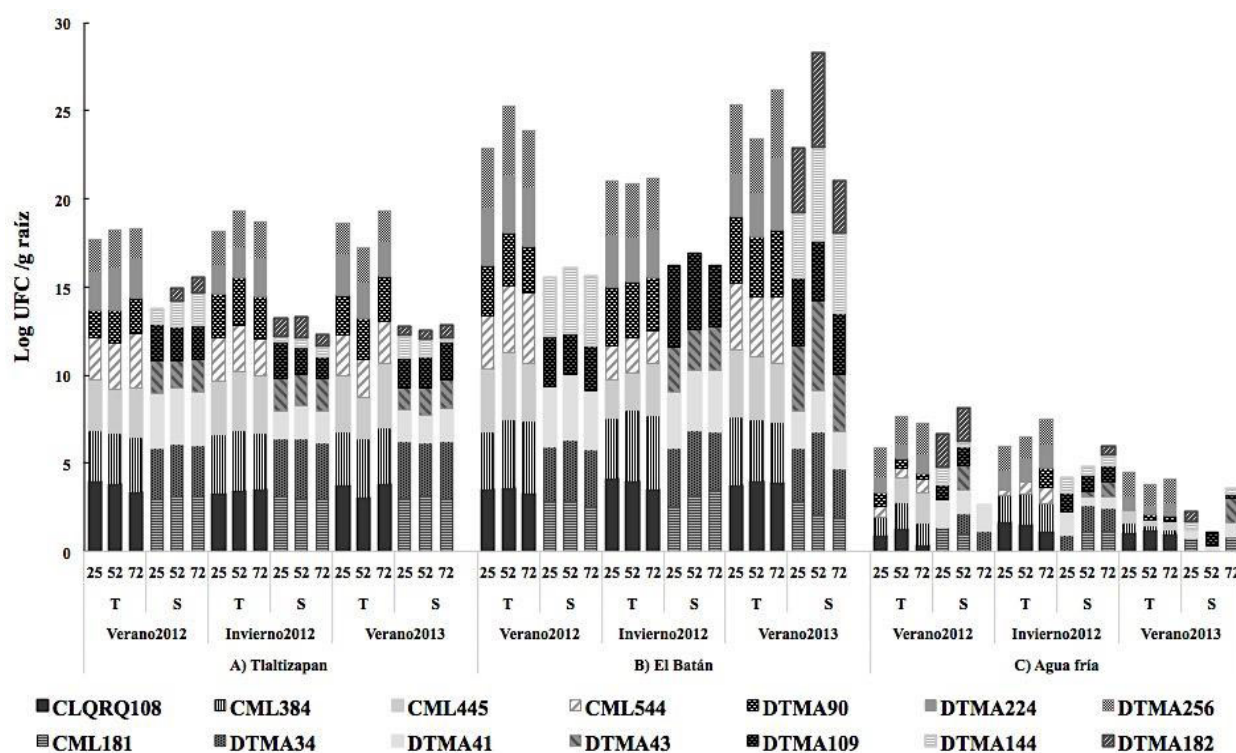


Figura 1. Población de *B. subtilis* en 7 líneas de maíz tolerantes y 7 susceptibles a sequía a los 25, 52 y 75 dds en los ciclos de cultivo Verano 2012, Invierno 2012 y Verano 2013, en tres localidades de México.

Figure 1. *B. subtilis* population in 7 drought-tolerant maize lines and 7 drought-susceptible maize lines at 25, 52 and 75 dds during the 2012 summer crop cycle, 2012 winter crop cycle and 2013 summer crop cycle in three locations of México.

sistémica inducida (ISR) específica (Frag *et al.*, 2013). Estos VOCs activan las vías de producción de hormonas incluyendo auxinas, giberelinas, citocininas y ácido salicílico, que promueven el desarrollo de la planta hospedante en condiciones de estrés, principalmente por el incremento de biomasa radicular resultando en una mejor absorción de agua (Zhang *et al.*, 2007). Otro estudio demostró que la inoculación en semilla de maíz con cepas seleccionadas de *B. subtilis* aportó importantes beneficios como promotor de crecimiento y mayor capacidad de absorción de nutrientes (Canbolat *et al.*, 2006).

En Tlaltizapán, la densidad de población de *B. megaterium* en las líneas de maíz estuvo entre 3,

It was not isolated in Agua Fría. There were no significant differences among the days after sowing (dds), but the density was significantly higher in drought-tolerant maize lines (Table 2, Figure 3).

P. hibiscicola has not been cited as a maize endophyte. However, according to the phylogenetic affiliation of the *P. hibiscicola* type ATCC 19867 strain based on a comparative analysis of 16S rADN gene sequences and chemical taxonomy profiles, it was reclassified as *Stenotrophomonas* sp. (Anzai *et al.*, 2000). *S. maltophilia* has been cited as a maize endophyte (McInroy and Kloepper, 1995) and reported to act as a biological control agent against soil-borne pathogens such as *Pythium* spp., *Fusarium* spp. and *Rhizoctonia solani*. It has also

$5_{\text{Log}_{10}}$ UFC g^{-1} de raíz en los tres ciclos y fue significativamente mayor ($5_{\text{Log}_{10}}$ UFC g^{-1} de raíz) en el ciclo V-2012 a los 52 dds, fue significativamente mayor en las líneas de maíz tolerantes a sequía (Cuadro 2, Figura 2).

Investigaciones recientes demostraron que *B. megaterium* modifica la respuesta de la planta del maíz ante varios estreses abióticos, incluyendo la importancia de la densidad poblacional de algunas especies de *Bacillus* en la respuesta de tolerancia a sequía y transporte de agua en *Retama sphaerocarpa*, al estimular el crecimiento de la raíz y la capacidad de absorción de agua y los niveles de prolina y ácido indol acético (Marulanda *et al.*, 2006). Particularmente, destacan que la presencia de *B.*

been reported to produce indoleacetic acid, which regulates the development of sprouts and side roots in plants (Mehnaz *et al.*, 2010).

The population density of *S. meliloti* in drought-tolerant maize lines in Tlaltizapán was from 4, $6_{\text{Log}_{10}}$ UFC g^{-1} of root during the three cycles, and significantly higher ($6_{\text{Log}_{10}}$ UFC g^{-1} of root) at 52 dds. It was not isolated in Agua Fria. There were no significant differences per crop cycle, but it was significantly higher in drought-tolerant maize lines (Table 2, Figure 4).

S. meliloti is known to be a nitrogen-fixing nodular bacterium in plants of the *Medicago* genus, and involved in the drought tolerance and salinity response (Roumiansteva and Muntyan, 2015). In

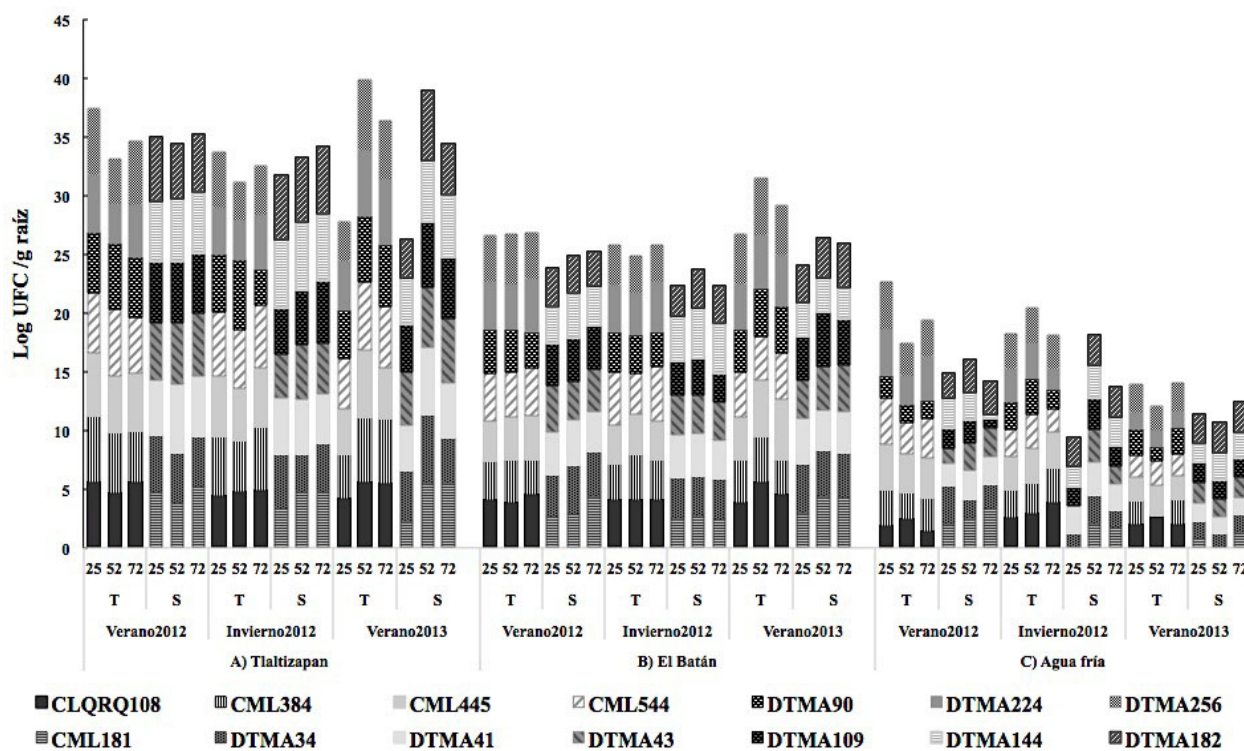


Figura 2. Población de *B. megaterium* en 7 líneas de maíz tolerantes y 7 susceptibles a sequía a los 25, 52 y 75 dds en los ciclos de cultivo Verano 2012, Invierno 2012 y Verano 2013, en tres localidades de México.

Figure 2. *B. megaterium* population in 7 drought-tolerant maize lines and 7 drought-susceptible maize lines at 25, 52 and 75 dds during the 2012 summer crop cycle, 2012 winter crop cycle and 2013 summer crop cycle in three locations of Mexico.

megaterium en su planta hospedante aumenta la biomasa y contenido de agua de la raíz (Marulanda *et al.*, 2009), que sugiere un uso potencial de estas poblaciones endófitas en plantas de maíz cultivadas en zonas áridas y semiáridas. La función biológica de otras especies de *Bacillus* endofíticos en maíz se relaciona con una eficiente respuesta de defensa de la planta contra patógenos relacionada con la producción de lipopéptidos antifúngicos que induce la expresión de genes de defensa (Gond *et al.*, 2015).

En El Batán, la densidad de población de *P. hibiscola* en líneas de maíz estuvo entre 3, 5_{Log10} UFC g⁻¹ de raíz en los tres ciclos y fue significativamente mayor (5_{Log10} UFC g⁻¹ de raíz) en el ciclo V-2012. No se aisló en la localidad de Agua Fría. No hubo diferencias significativas entre los días después de la siembra (dds), fue significativamente mayor en las líneas de maíz tolerantes a sequía (Cuadro 2, Figura 3).

P. hibiscola no se ha citado como endófito en maíz; sin embargo, la afiliación filogenética de la cepa tipo ATCC 19867 de *P. hibiscola*, basados en el análisis comparativo de secuencias del gen 16S rADN y perfiles quimio-taxonómicos, lo reclasifican como *Stenotrophomonas* sp. (Anzai *et al.*, 2000). *S. maltophilia* se ha citado como endófito en maíz (McInroy y Kloepper, 1995) y se reporta su función como agente de control biológico contra patógenos con origen en el suelo como *Pythium* spp., *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia solani* además de la capacidad para producir ácido indol acético que en plantas regula el desarrollo de brotes y raíces laterales (Mehnaz *et al.*, 2010).

La densidad de población de *S. meliloti* en líneas tolerantes a sequía en Tlaltizapán estuvo entre 4, 6_{Log10} UFC g⁻¹ de raíz en los tres ciclos y fue significativamente mayor (6_{Log10} UFC g⁻¹ de raíz) a los 52 dds. No se aisló en la localidad de Agua Fría. No hubo diferencias significativas por ciclo de cultivo, pero fue significativamente mayor en las líneas de maíz tolerantes a sequía (Cuadro 2, Figura 4).

Mexico, the presence of a great genetic diversity of native *S. meliloti* populations in alfalfa (*Medicago* spp.) was reported, and so far, new species have been identified in woody legumes of the *Leucaena* (Wang *et al.*, 2002) and *Acacia* genera (Toledo *et al.*, 2003). The *Sinorhizobium* genus was found in the maize rhizosphere (Rosenblueth and Martínez-Romero, 2006), and *Rhizobium etli* bv. *phaseoli* as an endophyte in maize roots in Mexico (Gutiérrez-Zamora and Martínez-Romero, 2001). However, there is no information about *S. meliloti* as an endophyte in maize roots, so the present study provides reference information about the natural endophytic colonization of *S. meliloti* in maize in Mexico. Alfalfa and maize intercropping is common in the studied locations, so this may explain the endophytic colonization of *S. meliloti* in maize roots. Studies conducted on rice (*Oryza sativa*) suggest that *S. meliloti* may produce a lumichrome signaling molecule in the rhizosphere of those plants and promote growth by inducing better root respiration, stomatal conductance, leaf transpiration and photosynthetic efficiency (Chi *et al.*, 2010). When it was applied at nanomolar concentrations, it promoted legume and cereal growth and increased root biomass in the legume *Lotus japonicus* and in tomato (*Solanum lycopersicum*) (Gouws *et al.*, 2012).

The frequency of certain bacteria genera isolated from maize roots in this study may be related to the phylogeny of the maize lines. For example, among bacteria showing higher frequency and density in drought-tolerant maize lines, two *Bacillus* species stand out. *Bacillus* is considered an important endophytic bacterium that has been isolated from both Teozintle (a maize ancestor) and modern maize genotypes; it has been shown that the composition of the endophytic bacteria colony in maize seed varies and that it has been preserved through the evolution, ethnography and ecology of the maize plant as a host (Johnston-Monje and Raizada, 2011).

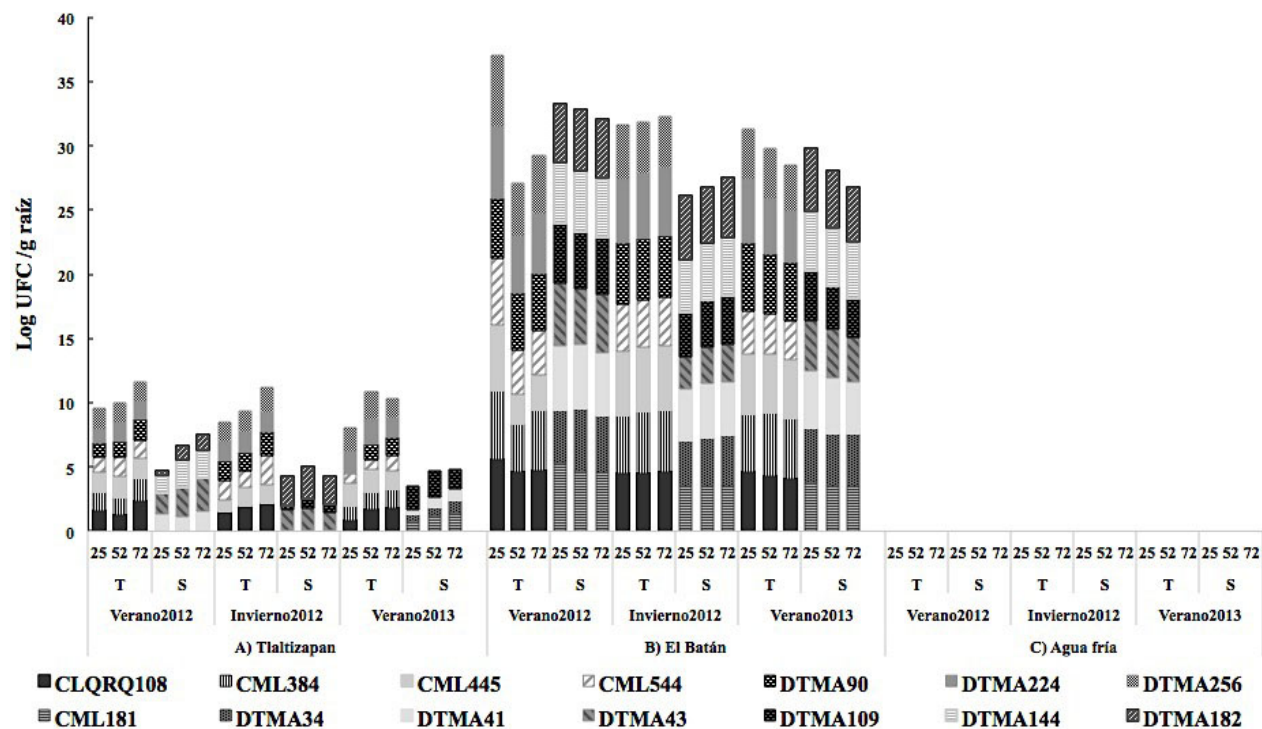


Figura 3. Población de *P. hibiscola* en 7 líneas de maíz tolerantes y 7 susceptibles a sequía a los 25, 52 y 75 dds en los ciclos de cultivo Verano 2012, Invierno 2012 y Verano 2013, en tres localidades de México.

Figure 3. *P. hibiscola* population in 7 drought-tolerant maize lines and 7 drought-susceptible maize lines at 25, 52 y 75 dds during the 2012 summer crop cycle, 2012 winter crop cycle and 2013 summer crop cycle in three locations of Mexico.

S. meliloti se conoce como una bacteria noduladora fijadora de nitrógeno en plantas del género *Medicago*, con implicaciones en la respuesta de tolerancia a sequía y salinidad (Roumiansteva y Muntyan, 2015). En México se determinó la existencia de una gran diversidad genética de poblaciones nativas de *S. meliloti* en alfalfa (*Medicago* spp.) y actualmente se han identificado nuevas especies en leguminosas leñosas en el género *Leucaena* (Wang *et al.*, 2002) y *Acacia* (Toledo *et al.*, 2003). El género *Sinorhizobium* se encontró en la rizosfera de maíz (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006) y a *Rhizobium etli* bv. *phaseoli* como endófito en raíces de maíz en México (Gutiérrez-Zamora y Martínez-Romero, 2001); sin embargo, no existe información sobre *S. meliloti* como endófito en la raíz

In this research, we determined that some factors such as drought tolerance/susceptibility of the maize lines used, as well as the location, crop cycle and time (days after transplanting) significantly affected the density of cultivable endophytic bacteria in the roots of the maize genetic materials. Rhizobacteria as promoters of growth (PGPR), nutrition and plant disease management have been extensively studied, but their function in managing abiotic stresses such as drought has generated great interest in recent years (Dimpka *et al.*, 2009; Grover *et al.*, 2010; Kavamura *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2009). The use of endophytic microorganisms may be a viable alternative against biotic and abiotic stresses. Strains isolated in this study are a microbial resource that is intimately

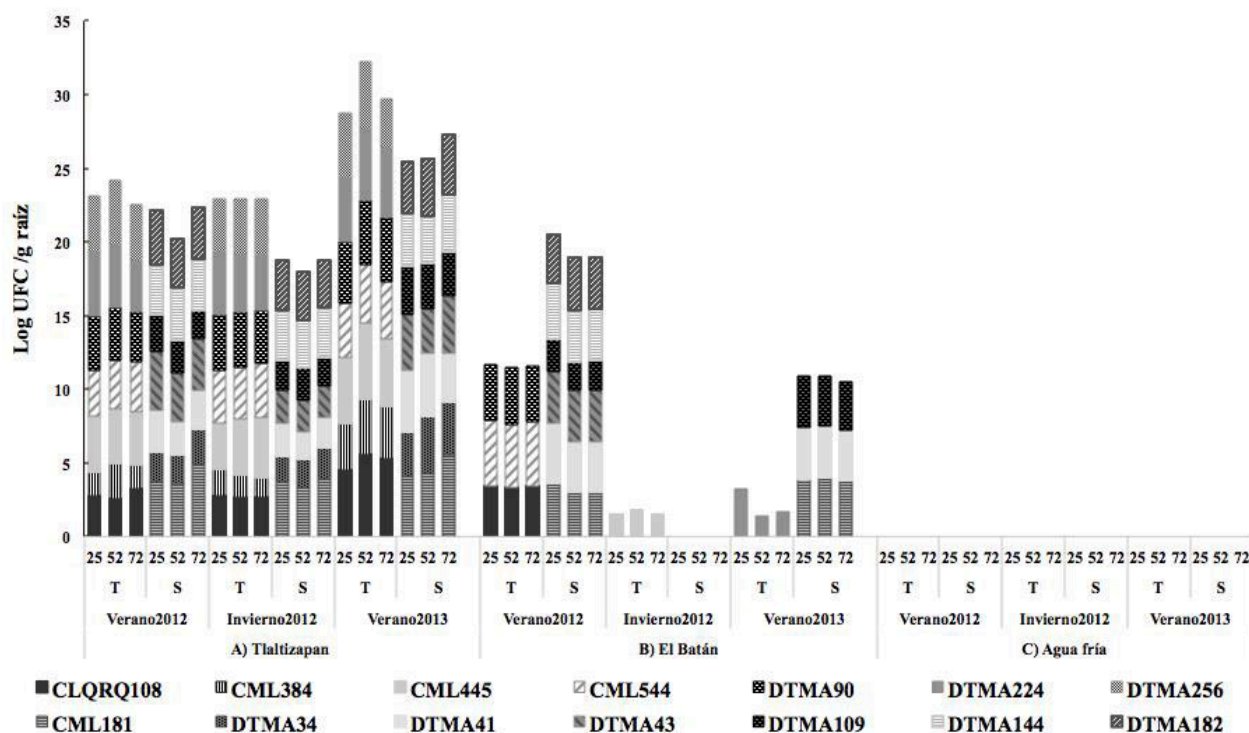


Figura 4. Población de *S. meliloti* en 7 líneas de maíz tolerantes y 7 susceptibles a sequía a los 25, 52 y 75 dds en los ciclos de cultivo Verano 2012, Invierno 2012 y Verano 2013, en tres localidades de México.

Figure 4. *S. meliloti* population in 7 drought-tolerant maize lines and 7 drought-susceptible at 25, 52 and 75 dds during the 2012 summer crop cycle, 2012 winter crop cycle and 2013 summer crop cycle in three locations of Mexico.

de maíz, por lo que el presente estudio aporta información de referencia de la colonización natural endófito de *S. meliloti* en esta gramínea en México. En las localidades estudiadas es común el cultivo intercalado de alfalfa con maíz, que podría explicar la colonización endófito de raíces de maíz por *S. meliloti*. Estudios en arroz (*Oryza sativa*) sugieren que *S. meliloti* podría producir la molécula señal lumicromo en la rizosfera de estas plantas promoviendo el crecimiento por inducción de una mejor respiración de las raíces, conductancia estomática, transpiración de la hoja y eficiencia fotosintética (Chi *et al.*, 2010). Su aplicación en concentraciones nanomoleculares promovió el crecimiento en leguminosas y gramíneas e incrementó la biomasa de las raíces de la leguminosa *Lotus japonicus*

associated with maize and has the potential to be used as a biotechnological tool in agriculture; these strains deserve to be evaluated in the future as microbial inoculants and inducers of drought stress tolerance, as well as to other biotic and abiotic factors in regions of Mexico where maize is produced under limiting conditions.

CONCLUSIONS

Cultivable root endophytic bacteria that were most frequently present in the 14 maize lines tested belong to the *Proteobacteria* and *Firmicutes* phyla. The highest population density of endophytic bacteria was found in drought-tolerant maize

y jitomate (*Solanum lycopersicum*) (Gouws *et al.*, 2012).

La frecuencia de ciertos géneros de bacterias aisladas de la raíz en este estudio podría tener relación con la filogenia de estas líneas de maíz. Por ejemplo, entre las bacterias con mayor frecuencia y densidad en líneas tolerantes de maíz destacan dos especies de *Bacillus*; *Bacillus* se considera una bacteria endófito importante que se ha aislado tanto de Teozintle (ancestro del maíz) como de genotipos de maíces modernos y se demostró que la composición de la comunidad bacteriana endófito en semilla de maíz, es variable y conservada a través de la evolución, etnografía y ecología de la planta de maíz como hospedante (Johnston-Monje y Raizada, 2011).

En esta investigación se determinó que algunos de los factores: tolerancia/susceptibilidad a sequía de las líneas de maíz estudiadas, localidad, ciclo de cultivo, tiempo (días después del trasplante) afectaron significativamente la densidad de bacterias cultivables endófitas en la raíz de estos materiales genéticos de maíz. Las rizobacterias como promotores del crecimiento (PGPR), nutrición y manejo de enfermedades en plantas ha sido ampliamente estudiado; sin embargo, su función en el manejo de enfermedades abióticas como el estrés a sequía es de gran interés en los últimos años (Dimpka *et al.*, 2009; Grover *et al.*, 2010; Kavamura *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2009). El uso de microorganismos endófitos puede ser una alternativa viable contra estreses bióticos y abióticos; las cepas aisladas en este estudio constituyen un recurso microbiano que está íntimamente asociados al maíz con potencial de uso biotecnológico en la agricultura que merecen ser evaluados en el futuro como inoculantes microbianos e inductores de tolerancia al estrés hídrico y otros factores bióticos y abióticos en regiones con condiciones limitantes para la producción de este cultivo en México.

lines. Bacteria of the *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Sinorhizobium* genera showed the highest frequency and population density in drought-tolerant maize lines at the three study locations and crop cycles. *Sinorhizobium meliloti* is able to endophytically colonize maize roots.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Colegio de Postgraduados and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for funding this research and for the scholarship granted, as well as the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) for providing the seed for conducting this research.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

#### CONCLUSIONES

Las bacterias cultivables endófitas de la raíz que tuvieron mayor presencia en las 14 líneas de maíz probadas pertenecen a los phyla *Proteobacteria* y *Firmicutes*. La mayor densidad de población de bacterias endófitas se estimó en líneas de maíz tolerantes a sequía. Las bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Sinorhizobium* fueron las que presentaron mayor frecuencia y densidad de población en las líneas de maíz tolerantes a sequía en las tres localidades y ciclos de cultivo estudiados. *Sinorhizobium meliloti* es capaz de colonizar endofíticamente la raíz de maíz.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por los recursos económicos y beca otorgados. Al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), por la semilla proporcionada para el desarrollo de esta investigación.

## LITERATURA CITADA

- Albareda M, Dardanelli MS, Sousa C, Megías M, Temprano F and Rodríguez D. 2006 Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots. *FEMS Microbiology Letters* 259:67-73. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00244.x>
- Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H and Oyaizu H. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:1563-1589. DOI: 10.1099/00207713-50-4-1563
- Baudoin E, Benizri E and Guckert A., 2003. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 35:1183-1192. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00179-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00179-2)
- Bodenhausen N, Horton MW and Bergelson J. 2013. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE* 8:e56329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056329>
- Canbolat M, Bilen S, Çakmakçı R, Sahin F and Aydi A. 2006. Effect of plant growth promoting bacteria and soil compaction on barley seeding growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biology and Fertility of Soils* 42:350-357. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00374-005-0034-9>
- Cavaglieri L, Orlando J and Etcheverry M. 2009. Rhizosphere microbial community structure at different maize plant growth stages and root locations. *Microbiological Research* 164:391-399. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.03.006>
- Chi F, Yang P, Han F, Jing Y and Shen S. 2010. Proteomic analysis of rice seedlings infected by *Sinorhizobium meliloti* 1021. *Proteomics* 10:1861-1874. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.200900694/full>
- Cochran, W. G. Técnicas de muestreo. México: Compañía Editorial Continental, 1982. 513 p.
- Dimpka C, Weinand T and Asch F. 2009. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell and Environment* 32:1682-1694. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x
- Fan X, Hu H, Huang G, Huang F, Li Y and Palta J. 2015. Soil inoculation with *Burkholderia* sp. LD-11 has positive effect on water-use efficiency in inbred lines of maize. *Plant Soil* 390:337-349. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2410-z>
- Farag MA, Zhang H and Ryu CM. 2013. Dynamic chemical communication between plants and bacteria through airborne signals: induced resistance by bacterial volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 39:1007-1018. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10886-013-0317-9>
- FAO. 2016. Disponible en línea: <http://www.fao.org/docrep/003/x7650s/x7650s10.html> (Consulta, marzo 2016)
- FIRA, Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. 2016. Disponible en línea: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/61952/Panorama\\_Agroalimentario\\_Ma\\_z\\_2015.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/61952/Panorama_Agroalimentario_Ma_z_2015.pdf) (Consulta, febrero 2016)
- Galkiewicz JP and Kellogg CA. 2008. Cross-Kingdom amplification using *Bacteria*-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology. *Applied Environmental Microbiology* 74:7828-7831. Disponible en línea: <http://aem.asm.org/content/74/24/7828.short>
- Gond SK, Bergen MS, Torres MS, White JF and Kharwar RF. 2015. Effect of bacterial endophyte on expression of defense in Indian popcorn against *Fusarium moniliforme*. *Symbiosis* 66:133-140. <https://doi.org/10.1007/s13199-015-0348-9>
- Gouws LM, Botes E and Wiese AJ, Trenkamp S, Torres-Jerez I, Tang J, Hills NP, Usadel B, Lloyd RJ, Fernie RA, Kossmann J and van der Merwe M. 2012. The plant growth promoting substance, lumichrome, mimics starch, and ethylene-associated symbiotic responses in lotus and tomato roots. *Front Plant Science* 120:1-20. <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffpls.2012.00120>
- Grover M, Ali SZ, Sandhya V, Rasul A and Venkateswarlu B. 2010. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27:1231-1240. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0572-7>
- Gutiérrez-Zamora ML and Martínez-Romero E. 2001. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *Journal of Biotechnology* 91:117-126. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00332-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00332-7)
- Haichar FZ, Marol C, Berge O, Rangel-Castro JI, Prosser JI, Balesdent J, Heulin T and Achouak W. 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal* 2:1221-1230. Disponible en línea: [http://www.abdn.ac.uk/staffpages/uploads/mbi010/ISME%20Journal%202012,%201221-1230\\_1.pdf](http://www.abdn.ac.uk/staffpages/uploads/mbi010/ISME%20Journal%202012,%201221-1230_1.pdf)
- Hardoim PR, Van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A, Döring M and Sessitsch A. 2015. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79:293-320. Disponible en línea: <http://mmbr.asm.org/content/79/3/293.short>
- Higgins KL, Arnold AE, Miadlikowska J, Sarvate SD and Lutzoni F. 2007. Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42:543-555. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.07.012>
- Ikeda CA, Bassani LL, Adamoski D, Stringari D, Cordeiro VK, Glienke C, Steffens MBR, Hungria M and Galli-Terasawa LV. 2013. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. *Microbial Ecology* 65:154-160. DOI: 10.1007/s00248-012-0104-0
- Johnston-Monje D and Raizada MN. 2011. Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *PLoS ONE* 6: e20396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020396>
- Kasim WA, Osman ME, Omar MN, Abd El-Daim IA, Bejai S and Meijer J. 2013. Control of drought stress in wheat using plant-growth- promoting bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation* 32:122-130. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00344-012-9283-7>
- Kamara YA, Menkir A, Badu-Apraku B and Ibikunle O. 2003. The influence of drought stress on growth, yield and yield components of selected maize genotypes. *Journal of*

- Agricultural Science 141:43-50. <https://doi.org/10.1017/S0021859603003423>
- Kavamura VN, Santos SN, Silva JL, Parma MM, Avila LA, Visconti A, Zucchi TD, Taketani RG, Andreote FD and Melo IS. 2013. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological Research* 168:183-191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.002>
- Kim YC, Glick BR., Bashan Y and Ryu CM. 2012. Enhancement of plant drought tolerance by microbes. In: Aroca R. (eds) *Plant responses to drought stress*. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-32653-0\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-642-32653-0_15)
- Li X, Rui J, Mao Y, Yannarell A and Mackie R. 2014. Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. *Soil Biology and Biochemistry* 68: 392-401. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.017>
- Liu Y, Zuo S, Zou YY, Wang JH and Song W. 2013. Investigation on diversity and population succession dynamics of endophytic bacteria from seeds of maize (*Zea mays* L., Nongda108) at different growth stages. *Annals of Microbiology* 63:71-79. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13213-012-0446-3>
- Mahuku GS. 2004. A simple extraction method suitable for PCR based analysis of plant, fungal and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter* 22:71-81. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007%2F02773351?LI=true>
- Marulanda A, Barea JM and Azcón R. 2006. An indigenous drought-tolerant strain of *Glomus intraradices* associated with a native bacterium improves water transport and root development in *Retama sphaerocarpa*. *Microbial Ecology* 52:670-678. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-006-9078-0>
- Marulanda A, Barea JM and Azcón R. 2009. Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM fungi and bacteria) from dry environments: mechanisms related to bacterial effectiveness. *Journal of Plant Growth Regulation* 28:115-124. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00344-009-9079-6>
- McInroy JA and Kloepper JW. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil* 173:337-342. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007%2F027700011472?LI=true>
- Mehnaz S, Kowalik T, Reynolds B and Lazarovits G. 2010. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 42:1848-1856. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.07.003>
- Montañez A, Blanco RA, Barlocco C, Beracochea M and Sicardi M. 2012. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*. *Applied Soil Ecology* 58:21-28. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.02.009>
- Morales Y, Juárez D, Aragón C, Mascarua M, Bustillos M, Fuentes L, Martínez R and Muñoz J. 2011. Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* spp., as a model for alternative agriculture. *Revista Argentina de Microbiología* 43:287-293. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v43n4/v43n4a09.pdf>
- Nacamulli C, Bevivino A, Dalmastrì C, Tabacchioni S and Chiarini L. 1997. Perturbation of maize rhizosphere microflora following seed bacterization with *Burkholderia cepacia* MCI 7. *FEMS Microbiology Ecology*. 23:183-193. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00401.x>
- Naseem H and Bano A. 2014. Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance in maize. *Journal of Plant Interactions*. 9:689-701. <https://doi.org/10.1080/17429145.2014.902125>
- Naveed M, Mitter B, Reichenauer TG, Wiczorek K and Sessitsch A. 2014. Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD 17. *Environmental and Experimental Botany* 97:30-39. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.014>
- Oliveira ALM, Stoels M, Schmid M, Reis VM, Baldani JJ and Hartmann A. 2009. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *European Journal of Soil Biology* 45:106-113. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.09.004>
- Pereira P, Ibáñez F, Rosenblueth M, Etcheverry M and Martínez-Romero E. 2011. Analysis of the bacterial diversity associated with the roots of maize (*Zea mays* L.) through culture-dependent and culture-independent methods. *International Scholarly Research Network* 2011:1-10. DOI:10.5402/2011/938546
- Rai R, Prasanta K, Dash BM, Prasanna AS. 2007. Endophytic bacterial flora in the stem tissue of a tropical maize (*Zea mays* L.) genotype: isolation, identification and enumeration. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 23:853-858. DOI:10.1007/s11274-006-9309-z
- Rosenblueth M and Martínez-Romero E. 2006. Bacterial endophytes and their interaction with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:827-837. Disponible en línea: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/MPMI-19-0827>
- Roumiansteva ML and Muntyan VS. 2015. Root nodule bacteria *Sinorhizobium meliloti*: Tolerance to salinity and bacterial genetic determinants. *Microbiology* 84:303-318. DOI: 10.1134/S0026261715030170
- Saravanakumar D, Kavino M, Raguchander T, Subbian P and Samiyappan R. 2011. Plant growth promoting bacteria enhance water stress resistance in green gram plants. *Acta Physiology Plant* 33:203-209. Disponible en línea: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11738-010-0539-1.pdf>
- Shehata HR, Lyons EM, Jordan KS and Raizada MN. 2016. Bacterial endophytes from wild and ancient maize are able to suppress the fungal pathogen *Sclerotinia homoeocarpa*. *Journal of Applied Microbiology* 120:756-769. Disponible en línea: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jam.13050/epdf>
- Somers E, Vanderleyden J and Srinivasan M. 2004. Rhizosphere bacterial signalling: A love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology*: 30:205-240. DOI: 10.1080/10408410490468786
- Timmusk S, Islam A, Abd El D, Lucian C, Tanilas T and Kananste A, Behers L, Nevo E, Seisenbaeva G, Stenström E and

- Niinemets Ü. 2014. Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: Enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. *PLoS One* 9:1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096086>
- Toledo I, Lloret L and Martínez-Romero E. 2003. *Sinorhizobium americanum* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. *Systematic and Applied Microbiology* 26:54-64. Disponible en línea: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202004701599>
- Wang E, Tan ZY, Willems A, Fernández-López M, Reinhold-Hurek B and Martínez-Romero E. 2002. *Sinorhizobium morelense* sp. nov., a Leucaena leucocephala-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:1687-1693. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-52-5-1687>
- Wilkinson S and Davies WJ. 2010. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, Cell & Environment* 33:510-525. Disponible en línea: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3040.2009.02052.x/full>
- Whitehead AN, Barnard LMA, Slater H, Natalie JL, Simpson G and Salmond PC. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 25:365-404. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00583.x>
- Yang J, Kloepper JW and Ryu C. 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science* 14:1-4. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.004>
- Yasmin H, Bano A and Samiullah A. 2013. Screening of PGPR isolates from semi-arid region and their implication to alleviate drought stress. *Pakistan Journal Botany* 45: 51-58. Disponible en línea: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-84873424619&origin=inward&txGid=f67ad4b109d3d368731a8b22a1f14cfa>
- Zhang H, Kim MS, Krishnamachari V, Payton P, Sun Y, Grimson M, Farag MA, Ryu CM, Allen R, Melo IS and Pare PW. 2007. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta* 226:839-851. Disponible línea: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00425-007-0530-2.pdf>