



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS COMUNIDADES
MICROBIANAS ENDÓFITAS EN POBLACIONES
SILVESTRES Y COMERCIALES DE *Vanilla planifolia*, Y
ESTABLECIMIENTO DE UNA METODOLOGÍA DE
ACLIMATACIÓN

Tesis que presenta

JUAN DANIEL MACÍAS HERNÁNDEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México
2021

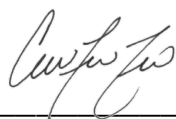
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Juan Daniel Macías Hernández titulado **Análisis comparativo de las comunidades microbianas endófitas en poblaciones silvestres y comerciales de *Vanilla planifolia*, y establecimiento de una metodología de aclimatación**, fue realizado en la Unidad de Biotecnología, en la línea de análisis de comunidades microbianas, en los laboratorios de Metagenómica y laboratorio de biotecnología informática del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la Dra. Ingrid Aileen O'Connor Sánchez y la Dra. Elsa Beatriz Góngora Castillo, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 10 de noviembre de 2021.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Juan Daniel Macías Hernández

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la Dra. Ingrid Aileen O'Connor Sánchez y Dra. Elsa Beatriz Góngora Castillo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), por la oportunidad de estudiar la Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca (No. 941079) durante el periodo 2019-2021.

A mis directores de tesis, la Dra. Aileen O'Connor Sánchez y a la Dra. Elsa Góngora Castillo por sus consejos y enseñanzas durante la realización de la tesis.

A los integrantes de mi comité tutorial, a la Dra. Blondy Canto Canché y a la Dra. Sara Nahuat Dzib por sus aportaciones a la tesis.

Al Dr. César de los Santos Briones y a la M.C. Adriana Quiroz Moreno por su apoyo técnico en el laboratorio de Metagenómica y Biotecnología informática; y también al Ing. José Luis Giorgana Figueroa por su apoyo técnico en el laboratorio de Biotecnología vegetal en el Instituto Tecnológico de Mérida.

A mis compañeros del laboratorio de la Unidad de Biotecnología y del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto Tecnológico de Mérida por sus consejos y apoyo moral en la realización de esta tesis.

DEDICATORIAS

A mi familia, que siempre me apoyo en la realización de este proyecto.

ÍNDICE

RESUMEN.....
ABSTRACT
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	5
1.1. GENERALIDADES DE VANILLA PLANIFOLIA	5
1.1.1. Estado del cultivo de <i>V. planifolia</i> en México	5
1.2. LA MICROBIOTA ENDÓFITA.....	7
1.2.1. La microbiota endófito de poblaciones silvestres de plantas	8
1.2.2. Implicaciones biotecnológicas de la investigación de la microbiota endófito	10
1.2.3. Estudios metagenómicos de la microbiota endófito.....	11
1.2.3.1. Genes marcadores	12
1.2.3.2. Secuenciación de amplicones 16S e ITS.....	14
1.2.3.3. Paquetes bioinformáticos para el análisis de la microbiota	16
1.2.4. Estudios de la microbiota en <i>Vanilla</i>	20
1.3. ACLIMATACIÓN DE PLANTAS <i>IN VITRO</i>: PROBLEMÁTICA Y ALTERNATIVAS	21
1.3.1. Efecto de la ventilación en el desarrollo de plantas <i>in vitro</i>	22
JUSTIFICACIÓN	24
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	26
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS ENDÓFITAS EN POBLACIONES SILVESTRES Y COMERCIALES DE <i>V. PLANIFOLIA</i>.....	27
2.1.1. Obtención de muestras de hojas y raíces de una población silvestre y una comercial de <i>V. planifolia</i>	27
2.1.2. Extracción del ADN metagenómico.....	29
2.1.3 Análisis bioinformáticos de los amplicones 16S e ITS.....	31
2.2. ESTABLECIMIENTO DE UNA METODOLOGÍA DE ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS DE <i>V. PLANIFOLIA</i>.....	33
2.2.1. Efecto de la ventilación en el crecimiento y la multiplicación de <i>V. planifolia</i>	33
2.2.1.1. Obtención del material vegetal	33
2.2.1.2. Preparación de los tratamientos	33
2.2.2. Aclimatación de plántulas de <i>V. planifolia</i>	35

2.2.2.1. Proceso de pre-adaptación <i>in vitro</i> de las plántulas de <i>V. planifolia</i>	35
2.2.2.2. Medio de cultivo.....	35
2.2.2.3. Aclimatación de plántulas pre-adaptadas de <i>V. planifolia</i>	35
CAPÍTULO III. RESULTADOS	39
3.1. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS ENDÓFITAS EN POBLACIONES SILVESTRES Y COMERCIALES DE <i>V. PLANIFOLIA</i>	39
3.1.1. Extracción del ADN metagenómico de <i>V. planifolia</i>	39
3.1.2. Análisis general de las secuencias	41
3.1.3. Rarefacción e índices ecológicos.....	44
3.1.4. Análisis de la estructura de las comunidades bacterianas	46
3.1.5. Análisis de la estructura de las comunidades fúngicas	49
3.2. ESTABLECIMIENTO DE UNA METODOLOGÍA DE ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS DE <i>V. PLANIFOLIA</i>	51
3.2.1. Efecto de la ventilación en el crecimiento y la multiplicación de <i>V. planifolia</i>	51
3.2.2. Aclimatación de plántulas de <i>V. planifolia</i>	55
3.2.2.1. Pre-adaptación <i>in vitro</i> de plántulas de <i>V. planifolia</i>	55
3.2.2.2. Aclimatación de plántulas pre-adaptadas <i>in vitro</i>	56
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN GENERAL	59
4.1. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS ENDÓFITAS EN POBLACIONES SILVESTRES Y COMERCIALES DE <i>V. PLANIFOLIA</i>	59
4.1.1. Extracción del ADN metagenómico.....	59
4.1.2. Rarefacción e índices ecológicos.....	60
4.1.3. Análisis de la estructura de las comunidades bacterianas	63
4.1.4. Análisis de la estructura de las comunidades fúngicas	72
4.2. ESTABLECIMIENTO DE UNA METODOLOGÍA DE ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS DE <i>V. PLANIFOLIA</i>	77
4.2.1. Efecto de la ventilación en el crecimiento y la multiplicación de <i>V. planifolia</i>	77
4.2.2. Aclimatación de plántulas de <i>V. planifolia</i>	78
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	81
5.1. CONCLUSIONES.....	81
5.1.1. Análisis comparativo de las comunidades microbianas endófitas en poblaciones silvestres y comerciales de <i>V. planifolia</i>	81
5.1.2. Establecimiento de una metodología de aclimatación de plántulas de <i>V. planifolia</i>	83
5.2. PERSPECTIVAS	84
5.2.1. Análisis comparativo de las comunidades microbianas endófitas en poblaciones silvestres y comerciales de <i>V. planifolia</i>	84
5.2.2. Establecimiento de una metodología de aclimatación de plántulas de <i>V. planifolia</i>	85
REFERENCIAS	86

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Dibujo de la planta <i>Vanilla planifolia</i>	6
Figura 1.2. Estructura del gen ribosomal 16S.....	13
Figura 1.3. Resumen gráfico del proceso de secuenciación con Illumina	15
Figura 1.4. Mapa general del flujo de trabajo de QIIME2	19
Figura 1.5. Sección transversal de <i>Eucalyptus</i>	23
Figura 2.1. Fotografía de plantas silvestres de <i>V. planifolia</i>	27
Figura 2.2. Fotografía de las plantas comerciales de <i>V. planifolia</i>	28
Figura 2.3. Muestras de hojas y raíces aéreas silvestres	29
Figura 2.4. Muestras de hojas y raíces aéreas comerciales	30
Figura 2.5. Tratamientos usados en la línea de crecimiento y multiplicación	34
Figura 2.6. Fotografía de las plantas aclimatadas al primer día	36
Figura 3.1. Imagen del ADN extraído de la población silvestre	39
Figura 3.2. Imagen del ADN extraído de la población comercial	40
Figura 3.3. Curvas de rarefacción para las muestras de <i>V. planifolia</i>	45
Figura 3.4. Gráficas de abundancia relativa (filum) para las comunidades bacterianas.....	46
Figura 3.5. Gráficas de abundancia relativa (especie) para las comunidades bacterianas	48
Figura 3.6. Gráficas de abundancia relativa (filum) para las comunidades fúngicas	49
Figura 3.7. Gráficas de abundancia relativa (especie) para las comunidades bacterianas	50
Figura 3.8. Desarrollo de las plántulas <i>in vitro</i> de <i>V. planifolia</i>	52
Figura 3.9. Plántulas <i>in vitro</i> de <i>V. planifolia</i>	53
Figura 3.10. Brotes múltiples de plántulas <i>in vitro</i> de <i>V. planifolia</i>	54
Figura 3.11. Fotografía de plántulas tras 5 meses en pre-adaptación <i>in vitro</i>	56
Figura 3.12. Fotografías de plántulas de <i>V. planifolia</i> en aclimatación, primer lote	57
Figura 3.13. Fotografías de plántulas de <i>V. planifolia</i> en aclimatación, segundo lote	58
Figura 4.1. Gráfica de cajas con bigote del índice de Shannon	61
Figura 4.2. Gráfica de análisis de componentes principales	63
Figura 4.3. Comparación de abundancias relativas (filum) comunidades bacterianas	64
Figura 4.4. Comparación de abundancias relativas (especie) comunidades bacterianas	65
Figura 4.5. Comparación de abundancias relativas (filum) comunidades fúngicas	72
Figura 4.6. Comparación de abundancias relativas (especie) comunidades fúngicas	73
Figura 4.7. Línea de tiempo que muestra el protocolo de micropropagación de <i>V. planifolia</i> ..	79

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1. Puntuación de calidad Phred para diferentes valores	17
Tabla 2.1. Tratamientos establecidos para el crecimiento y multiplicación	34
Tabla 3.1. Valores de concentración de ADN	41
Tabla 3.2. Resultado del filtrado de secuencias 16S	42
Tabla 3.3. R Resultado del filtrado de secuencias ITS	43
Tabla 3.4. Índices ecológicos al 3% de disimilitud	44
Tabla 4.1. Resumen de las especies bacterianas	66
Tabla 4.2. Resumen de las especies fúngicas	74
Tabla 5.1. Resumen de las especies bacterianas y fúngicas con mayor abundancia relativa .	82

RESUMEN

La *Vanilla planifolia* es una especie vegetal perteneciente a la familia *Orchidaceae*, clase *Monocotyledonae*, que posee una enorme importancia comercial debido a su uso en diferentes industrias. Sin embargo, no está exenta de problemas en su cultivo. Ante ello, se buscan alternativas que subsanen estos inconvenientes y permitan un mejor manejo de las plantas. Recientemente, diversos estudios han sugerido que algunos miembros de las comunidades bacterianas y fúngicas de la microbiota endófitas pueden tener aplicaciones útiles en la agricultura, y que las poblaciones silvestres de plantas son de especial importancia como punto de partida para la identificación y aislamiento de estos microorganismos benéficos.

En este trabajo, se realizó un análisis metagenómico comparativo de las comunidades microbianas endófitas de hojas y raíces aéreas, entre dos poblaciones de *V. planifolia*: una silvestre, colectada en el municipio de Izamal, Yucatán, y otra adquirida de forma comercial, proveniente de cultivos en Veracruz. El análisis se llevó a cabo usando secuenciación por metabarcoding del gen ribosomal 16S (para la identificación de bacterias) y de la región ITS2 (para la identificación de hongos). Los resultados mostraron que la microbiota endófitas de la población silvestre fue más diversa y tuvo una mayor riqueza de especies comparada con la población comercial. La especie bacteriana más abundante en las hojas fue *Candidatus Phytoplasma*, tanto en la población silvestre como en la comercial. En las raíces, *Sphingomonas* sp. fue la especie más abundante y además la única que estuvo presente en todas las muestras evaluadas. Por otro lado, *Cladosporium halotolerans* y *Gibberella intricans* fueron las especies fúngicas más abundantes en las hojas, mientras que *Epicoccum andropogonis* lo fue para las raíces.

Además de este análisis comparativo, se estandarizó una metodología para la propagación y aclimatación de vitroplántulas de *V. planifolia*, usando sistemas de ventilación en frascos. La ventilación propició un mejor desarrollo en las raíces de las vitroplántulas, además de promover la proliferación de brotes múltiples. De igual forma, el uso del sistema ventilado permitió obtener un porcentaje de sobrevivencia *ex vitro* del 100% en los 6 ejemplares que fueron evaluados. Esta metodología permitirá una mayor eficiencia en la multiplicación de esta valiosa especie.

ABSTRACT

Vanilla planifolia is a plant belonging to the *Orchidaceae* family, class Monocotyledonae, which is of enormous commercial importance due to its use in different industries. However, its cultivation is not free of problems. Because of this, alternatives are being sought to solve these problems and allow better management of the plants. Recently, several studies have suggested that some members of the bacterial and fungal communities of the endophytic microbiota may have useful applications in agriculture. The wild populations of plants are a starting point for the identification and isolation of these beneficial microorganisms.

In this work, a comparative metagenomic analysis of the endophytic microbial communities of leaves and aerial roots between two populations of *V. planifolia*: one wild, collected in the municipality of Izamal, Yucatan, and another commercially acquired from cultivars in Veracruz. The analysis used metabarcoding sequencing of the 16S ribosomal gene (for bacterial identification) and the ITS2 region (for fungal identification). The results showed that the endophytic microbiota of the wild population was more diverse and had a higher species richness compared to the commercial. The most abundant bacterial species in leaves was *Candidatus Phytoplasma* in both the wild and commercial populations. In roots, *Sphingomonas* sp. was the most abundant species and the only one present in all samples evaluated. On the other hand, *Cladosporium halotoleran* and *Gibberella intricans* were the most abundant fungal species on leaves, while *Epicoccum andropogonis* was the more abundant on roots.

In addition to this comparative analysis, a methodology for propagation and acclimatization of *V. planifolia* vitroplantlets was standardized using ventilation systems in flasks. The ventilation system favored a better root development of the vitroplantlets and promoted the proliferation of multiple shoots. Likewise, the use of the ventilated system allowed obtaining an *ex vitro* survival rate of 100% in the sixth specimens that were evaluated. This methodology will enable greater efficiency in the multiplication of this valuable species.

INTRODUCCIÓN

La *Vanilla planifolia*, es una orquídea tropical, reconocida a nivel nacional e internacional por ser fuente del saborizante más utilizado a nivel mundial: la vainilla (Paniagua *et al.*, 2009). La vainilla es imprescindible en la industria alimentaria, cosmética e inclusive farmacológica (Azofeifa *et al.*, 2014). México es el centro de origen de *V. planifolia*, la cual se cultiva principalmente en las regiones sur del estado de Veracruz (Villanueva *et al.*, 2017). Cabe destacar que la vainilla es un cultivo clave para México, donde se pretende impulsar su producción para llegar a más mercados internacionales (Semarnat, 2017). El aumento del cultivo de esta especie y la comercialización de su extracto constituye un gran nicho de oportunidades para muchos productores.

La mejora en los cultivos de plantas, especialmente de aquellas que poseen ciclos de vida largos o son de baja producción, es un gran campo de estudio. En la búsqueda de alternativas para aumentar la tasa de producción de los cultivares, se tiene como alternativa la aplicación de microorganismos benéficos a los cultivos (Quambush y Winkelman, 2018). Estas bacterias u hongos pueden funcionar como agentes de biocontrol o como promotores del crecimiento vegetal, repercutiendo directamente en la productividad del cultivar.

Recientes estudios han demostrado las grandes funciones que cumple la microbiota endófitas en las plantas huésped (Hardoim *et al.*, 2015). Las plantas son colonizadas por un número asombroso de microorganismos. Algunos de estos mejoran el vigor y la salud del huésped mediante interacciones metabólicas y atenuando el efecto de los patógenos. Los endófitos, en conjunto con los microorganismos que habitan en la rizosfera, son ampliamente estudiados como alternativas para emplearlos en la mejora de cultivos comerciales, como el trigo, la cebada o el arroz.

El primer paso para la identificación y uso de microorganismos endófitos es el conocer las especies que habitan en el interior de la planta. Sin embargo, mediante métodos de aislamiento tradicionales, solo podemos tener acceso al 1% de estas comunidades microbianas. Con la finalidad de conocer (idealmente) a toda la comunidad de endófitos, se utilizan técnicas moleculares novedosas, como la metagenómica, que se define como el estudio de la colección de genomas en un ambiente determinado (Xu, 2006). La aplicación de la metagenómica permite tener un conocimiento más amplio de las comunidades microbianas endófitas.

Una fuente frecuente de microorganismos benéficos son las poblaciones de plantas silvestres, las cuales han evolucionado en su entorno en función de sus necesidades, lo cual incluye el reclutamiento de su propia microbiota, que les confiere diversas capacidades (Jaramillo *et al.*, 2019). Estos microorganismos pueden ser identificados, extraídos y aplicados para la optimización y el mejoramiento de plantas cultivadas, pues varios de ellos mejoran el vigor y la productividad de las plantas, siendo una gran alternativa sustentable para la agricultura (Pérez *et al.*, 2016).

El presente trabajo es el primero en el que se analiza la estructura de las comunidades bacterianas endófitas presentes en *V. planifolia*. En este estudio se planteó dar un primer paso en el conocimiento de la microbiota endófitas asociada a poblaciones silvestres de *V. planifolia*, con el fin de conocer la composición de sus comunidades de microorganismos endófitos, y compararla con la microbiota de plantas cultivadas comercialmente. Se espera identificar microorganismos que puedan jugar un papel benéfico en los cultivos, para en trabajos posteriores aislarlos y verificar su función. Este trabajo busca ser una primera aproximación al entendimiento del dinamismo y complejidad de la microbiota en *V. planifolia*.

Por otro lado, la utilización del cultivo *in vitro* es una gran alternativa probada para la búsqueda del mejoramiento de cultivares, conservación de especies y punto de partida para la investigación dirigida en una especie en concreto.

Uno de los problemas comunes en el cultivo de tejidos vegetales es la alta mortalidad en los procesos de aclimatación de las vitroplántulas a las condiciones de invernadero, pues estas poseen diversas malformaciones anatómicas y fisiológicas propiciadas por el ambiente *in vitro* (Kozai *et al.*, 2001).

Favorecer el intercambio gaseoso en los contenedores de las vitroplántulas permite mejorar los índices de supervivencia *ex vitro*, además de reducir la incidencia de malformaciones anatómicas o fisiológicas (Valero *et al.*, 2012; Zobayed *et al.*, 2001).

V. planifolia es una especie con un alto valor agregado, de modo que en este trabajo se busca establecer una metodología para la propagación de plántulas *in vitro* de *V. planifolia* bajo condiciones de intercambio gaseoso, así como establecer un protocolo de aclimatación de vitroplántulas que permita aumentar su tasa de supervivencia *ex vitro*.

El estudio de las comunidades endófitas y el desarrollo de un protocolo de aclimatación de *V. planifolia* buscan ser en conjunto, un punto de partida para futuras investigaciones referentes a esta preciada especie.

CAPÍTULO I

1. ANTECEDENTES

1.1. GENERALIDADES DE *Vanilla planifolia*

El género *Vanilla*, pertenece a la familia *Orchidaceae*. Es de hábito hemiepífito, sosteniéndose con sus raíces aéreas en el tronco de árboles tutores en ambientes sombreados (Fouché y Jouve, 1999). La planta ancla sus raíces sobre materiales orgánicos en descomposición y forma simbiosis con los hongos y otros microorganismos que habitan el sustrato.

México es el centro de origen de *V. planifolia*, el principal aromatizante de la industria refresquera y culinaria a nivel mundial (Méndez, 2014). Las cápsulas de esta orquídea tropical son muy apreciadas en el mercado tanto nacional como internacional. De estos frutos se extrae la sustancia aromatizante y saborizante vainilla, codiciada en diferentes industrias, principalmente en la alimentaria, para dar sabor a helados, bebidas, o postres. También en la industria farmacéutica, de perfumes y cosmética (Azoifeifa *et al.*, 2014).

El cultivo de *V. planifolia* tiene una gran importancia económica, ecológica, ambiental y social en las regiones de producción. Es la segunda especie más cara del mundo, después del azafrán (Paniagua *et al.*, 2009) y para el año 2012, la producción total de vainilla estuvo concentrada en Madagascar (35.5 %), Indonesia (34.5%) y China (13.7 %). México ocupó el quinto lugar con 4.0 % del volumen total (Financiera Nacional de Desarrollo, 2014). El precio estimado del kilogramo de la vaina de vainilla procesada es de US \$600 (Méndez, 2014). Estos indicadores muestran la gran importancia comercial que tiene *V. planifolia* en el mercado mundial.

1.1.1. Estado del cultivo de *V. planifolia* en México

Tradicionalmente, las orquídeas han sido utilizadas por distintos pueblos con fines ornamentales y medicinales, muy pocas han sobresalido por ser aprovechadas como especias. Una de esas excepciones a la regla es la planta *Vanilla planifolia*, orquídea empelada desde tiempos prehispánicos por las culturas aztecas y mayas.

La *V. planifolia*, llamada “tlilxóchitl” en náhuat y “zizbic” en maya, fue utilizada por diferentes pueblos a lo largo de Mesoamérica como saborizante y aromatizante (Ossenbach, 2005). Las comunidades mayas y aztecas la utilizaban para preparar sus bebidas a base de chocolate, y

utilizaban el extracto como moneda de cambio en los mercados prehispánicos (Lubinsky *et al.*, 2008). *V. planifolia* fue la primera orquídea americana ilustrada en el Códice de la Cruz-Badiana (Figura 1.1); un manuscrito escrito por Juan Badiano y Martín de la Cruz en 1552, siendo el primer reporte sobre el uso indígena de las hierbas (Gómez, 2008)

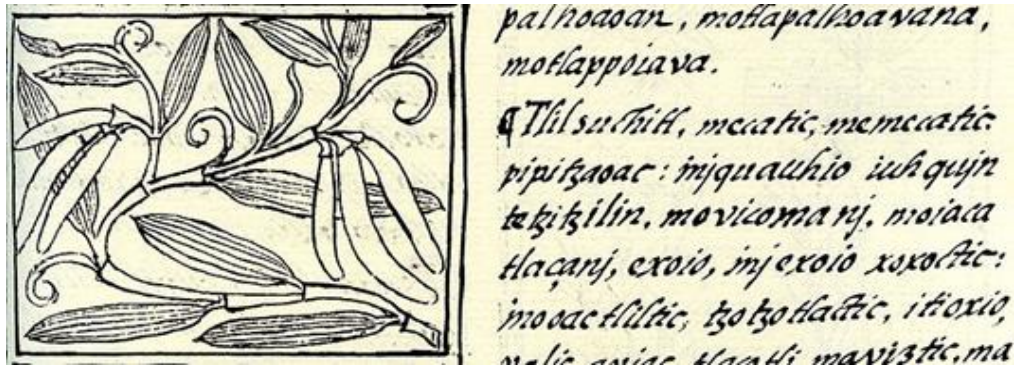


Figura 1.1. Dibujo de la planta *Vanilla planifolia* encontrado en el Códice de la Cruz - Badiano en 1580. Tomado de Gómez, 2008.

México posee una gran diversidad genética del género *Vanilla* comparada con otros países productores del extracto (Gonzales *et al.*, 2009). En la zona de la península de Yucatán, se ha identificado la presencia de poblaciones silvestres de *V. planifolia*, *V. pahentha* y *V. pompona* (Villanueva *et al.*, 2017). Sin embargo, las poblaciones de *V. planifolia* (especialmente las poblaciones silvestres) son muy vulnerables y susceptibles a desaparecer, debido a la erosión genética que se ha propiciado por su forma de propagación, la sobreexplotación de las poblaciones silvestres y la destrucción de su hábitat (Lubinsky, 2003).

Aunado a ello, la mayoría de los morfotipos de *V. planifolia*, son incapaces de polinizarse naturalmente, debido a la propia morfología de las flores de la planta (Bory *et al.*, 2008). Por ello, el manejo del cultivar conlleva un régimen estricto de propagación asexual vía esquejes y por polinización manual de las flores, ocasionando una pérdida en la variabilidad genética en los cultivares, que se han vuelto muy susceptibles a patógenos (Schlüter *et al.*, 2007), provocando pérdidas que impactan negativamente en la producción. Es de destacar que *V. planifolia* se encuentra dentro del marco de la norma NOM-059-SEMARNAT-2010, como una especie en riesgo (Semarnat, 2010).

Los impactos de organismos patógenos pueden mermar de forma considerable las poblaciones silvestres y comerciales de *V. planifolia*. El hongo *Fusarium oxysporum* es el principal causante de la pérdida de ejemplares, trayendo consigo un gran problema económico; para los agricultores, así como desde el punto de vista ecológico (Hernández, 2019).

Todo lo antes mencionado, representa una problemática para la conservación de estos valiosos recursos genéticos, y dado el gran interés económico que conllevan, emprender acciones de rescate cuanto antes es de suma importancia.

Comprender las interacciones entre la *V. planifolia* y su medio ambiente, incluyendo las relaciones con los microorganismos, pueden suponer una gran ventaja para los productores de este preciado saborizante. Particularmente, el estudio de la presencia de organismos endófitos y su impacto directo en la salud y crecimiento de la planta suponen grandes ventajas para el manejo de este cultivar.

En conjunto con el cultivo de tejidos o el mejoramiento genético, la identificación, selección e inoculación de microorganismos que pueden llevar a una mejora en el desarrollo de las plantas presupone un gran avance en términos de conservación y de producción., siendo una alternativa viable y amigable con el medio ambiente.

1.2. LA MICROBIOTA ENDÓFITA

Desde inicios del siglo XIX se tiene constancia de la presencia de microorganismos en los tejidos internos de las plantas. En 1809, el botánico alemán Heinrich Link, describió a un grupo de hongos parásitos habitando plantas, acuñando el término “*Endophytæ*” (Hardoim *et al.*, 2015). Para 1888, el microbiólogo Martinus Beijerinck logró aislar bacterias fijadoras de nitrógeno en los nodos de las raíces de leguminosas (Hardoim *et al.*, 2015). Entendiendo la función de estos microorganismos en las plantas y propiciando su investigación.

Los endófitos se definen como todos los organismos que habitan dentro de los órganos de las plantas en algún momento del ciclo de vida de estas, y pueden colonizar tejidos internos de la planta hospedera sin causar un daño aparente (Quambusch y Winkelmann, 2018). La mayoría de los diferentes endófitos que colonizan a las plantas son de tipo comensal (Knief, 2014), siendo en algunos casos benéficos para el hospedero.

Gran parte de los endófitos entran a la planta huésped por las raíces, aunque diversas investigaciones apuntan a una transferencia vertical por medio de las semillas, propiciando un

intercambio de microorganismos por varias generaciones entre la planta hospedera y sus hijas (Oldroyd *et al.*, 2011).

En general, las comunidades de microorganismos endófitos cumplen una serie de funciones de alta utilidad para la planta huésped, propiciando desde el crecimiento hasta la defensa contra patógenos o al estrés abiótico (Hardoim *et al.*, 2015).

La estructura de la microbiota, influencia la salud de la planta hospedera de diversas formas. Algunos endófitos desencadenan mecanismos de defensa, confiriendo una alta tolerancia a la planta huésped contra ataques de patógenos. Estos sistemas pueden darse por la atenuación de los efectos del patógeno a través de los mecanismos de defensa de la planta que fueron desencadenadas por los organismos endófitos (sistemas de defensa por inducción, ISR) (Zamioudis y Pieterse, 2011), o por la producción de compuestos con actividad biocida, como antibióticos o compuestos orgánicos volátiles que suprimen el crecimiento de los competidores, incluyendo los patógenos de la planta (Gunatilaka, 2006).

Aunado a los mecanismos de defensa que confieren los microorganismos endófitos, se ha reportado que estos promueven el crecimiento de las plantas. La producción de hormonas vegetales es el mecanismo mejor estudiado en cuanto a promoción del crecimiento se refiere (Millet *et al.*, 2010). Por ejemplo, la síntesis de la fitohormona ácido indol acético (AIA) se encuentra asociado con las bacterias que habitan en los tejidos internos de las plantas. Las bacterias usan esta auxina para interactuar con la planta como parte de su estrategia de colonización, evitando los mecanismos basales de defensa del huésped (Spaepen *et al.*, 2007).

La biosíntesis de hormonas vegetales no es la única forma en que los microorganismos desencadenan la promoción del crecimiento. Algunas bacterias tienen la capacidad de solubilizar minerales, como el fósforo, haciéndolos más asequibles para las plantas. Algunos de los microorganismos que habitan la rizosfera fijan el nitrógeno atmosférico, contribuyendo al correcto desarrollo del huésped, especialmente en suelos pobres en nitrógeno (Ryan *et al.*, 2008).

1.2.1. La microbiota endófitas de poblaciones silvestres de plantas

El cultivo de las plantas ha contribuido en gran medida a la instauración y prosperidad de las civilizaciones humanas, pero también ha generado un fuerte decremento en la diversidad genética de los cultivares, así como interrupciones en la microbiota de las plantas. Parte de este

cambio se debe a las prácticas de monocultivo (Xiong *et al.*, 2015) así como el uso de fertilizantes y fungicidas (Weese *et al.*, 2015).

Las plantas silvestres han coevolucionado a lo largo de millones de años con su microbiota, desarrollando presiones selectivas y mecanismos para la integración de su comunidad de microorganismos (Pérez *et al.*, 2016). Estas relaciones hacen al microbioma un ente dinámico y susceptible a las condiciones de la planta hospedera.

Los microorganismos endófitas de las plantas silvestres son muy diversos. Estudios en maíz y trigo silvestres han observado una mayor riqueza en la estructura de la microbiota endófitas en comparación con sus parientes cultivados, además del establecimiento de relaciones simbióticas favorables para la planta (Sangabriel *et al.*, 2012; Hetrick *et al.*, 1992). La domesticación puede disminuir la diversidad de especies en la endosfera de las plantas, sobre todo debido a la disminución de la diversidad genética de la planta; a que las condiciones de cultivo suelen ser más estables que las condiciones en el medio natural; y al uso de productos agroquímicos (Gopal y Gupta, 2016).

Las plantaciones modernas son típicamente cultivadas en suelos agrícolas manipulados y lejos del centro de origen de sus parientes silvestres. La transición de un hábitat nativo a suelos agrícolas es un factor relacionado con la desaparición de muchos microorganismos asociados a las plantas, afectando las funciones benéficas del microbioma para el huésped (Jaramillo *et al.*, 2019).

El uso de fertilizantes químicos con nitrógeno da como resultado la pérdida de bacterias mutualistas (Weese *et al.*, 2015). La adición de fertilizantes suprime la respiración del suelo, promoviendo la colonización de Actinobacteria y Firmicutes, mientras que reducen la abundancia de Acidobacteria y Verrucomicrobia, siendo estos últimos, bacterias clave para la toma de nutrientes por parte de la planta (Ramirez *et al.*, 2012).

Diversas investigaciones han comparado la microbiota endófitas de especies cultivadas en suelos agrícolas contra el de sus parientes en condiciones silvestres. Por ejemplo, Bulgarelli y colaboradores (2015), hallaron diferencias al comparar la microbiota de cebada (*Hordeum vulgare*) en accesiones domesticadas y silvestres. Actinobacterias, Proteobacteria y Bacteroidetes dominaban ampliamente la rizosfera y las raíces de cebada silvestre, hallando una mayor abundancia de Bacteroidetes en las accesiones silvestres. De la misma forma se han comparado la microbiota en la rizosfera y raíces de remolacha (*Beta vulgaris*) silvestre y

domesticada, hallando una mayor riqueza de especies en la remolacha silvestre, siendo principalmente del filum Proteobacteria y Planctomycetes (Zachow *et al.*, 2014).

La domesticación del girasol (*Helianthus annuus*) afectó la composición de las comunidades fúngicas de su rizosfera, aunque se observó un cambio mínimo en las comunidades bacterianas (Leff *et al.*, 2017). Por otro lado, el análisis de la microbiota del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) reveló una mayor diversidad del filum Bacteroidetes en accesiones silvestres, mientras que en las domesticadas se observó un mayor dominio del filum Actinobacteria (Jaramillo *et al.*, 2019).

Una mayor abundancia de bacterias del filum Bacteroidetes es observado en gran parte de los estudios de microbiotas de plantas silvestres. Esta abundancia se ve disminuida en las accesiones de plantas cultivadas, donde los fila Actinbacteria y Proteobacteria son los dominantes (Pérez *et al.*, 2018). Estas alteraciones en la composición del microbioma se deben a las prácticas agrícolas, la salida del hábitat nativo, cambios en la arquitectura de las raíces y la alteración en la composición de los exudados de la planta (Pérez *et al.*, 2016)

La manipulación de la microbiota del suelo para optimizar la productividad de los cultivos es una práctica antigua, trazada desde el año 300 a.e.c. (Finkel *et al.*, 2017). Por ello, no es sorpresa que los microorganismos puedan ser una solución sustentable para incrementar la producción agrícola (Parnell *et al.*, 2016). La implementación de esta estrategia de mejoramiento usando la microbiota de poblaciones silvestres de plantas es una idea atractiva y novedosa en el sector agrícola, que tiene el potencial de beneficiar a los productores y al medio ambiente, pues se reduciría el uso de pesticidas, plaguicidas y fertilizantes que puedan contaminar el suelo y agua.

1.2.2. Implicaciones biotecnológicas de la investigación de la microbiota endófitas

La idea de utilizar los microorganismos benéficos hallados en la microbiota de especies silvestres es una de las nuevas tecnologías que ha tomado auge desde el inicio del siglo XXI, en parte por la contaminación ambiental que genera el uso descontrolado de agroquímicos en la producción de cultivos. Investigaciones apuntan a que solo el 0.1% de los pesticidas químicos alcanzan su objetivo, y los remanentes terminan contaminando el suelo o el agua (Fukamachi, 2019). El uso de consorcios microbianos promete ser una gran alternativa al uso de fertilizantes químicos.

Los resultados de muchas investigaciones han permitido consolidar el papel benéfico de muchos microorganismos en la salud de las plantas. Por mencionar algunas, está el uso de los hongos del género *Phoma* como agentes de biocontrol contra la infección de *Fusarium graminearum* en trigo (Gdanetz *et al.*, 2017). *Pseudomonas* permite mejorar el crecimiento de las raíces del frijol común, así como la solubilización de fósforo inorgánico (Remans *et al.*, 2007). La identificación de especies del género *Nocardia* en orquídeas y su capacidad de producir auxinas permiten la elongación de las raíces (Palaniyandi *et al.*, 2013), entre otros muchos ejemplos de las aplicaciones de microorganismos benéficos.

La manipulación de los microorganismos de las plantas puede reducir la incidencia de patógenos o aumentar la productividad de los cultivos, pero se requiere de un profundo conocimiento de las interacciones microorganismos – hospederos, ya que lo que en una planta puede ser un microorganismo benéfico, en otras puede ser un patógeno. Entender estas relaciones no es trivial y requiere del uso de nuevas tecnologías que permitan esclarecer estas intrincadas relaciones.

Las nuevas tecnologías de secuenciación en conjunto con las herramientas bioinformáticas son una opción para comenzar la búsqueda de estos microorganismos, y permitir modelar las relaciones entre el microbioma y la planta hospedera.

1.2.3. Estudios metagenómicos de la microbiota endófitas

El entendimiento de la estructura de la microbiota de una planta requiere la identificación de, idealmente, todos los organismos que lo conforman. De forma general, se puede clasificar a los microorganismos como “cultivables” y “no cultivables”. Los microorganismos cultivables corresponden al 1% de los organismos conocidos (Vartoukian *et al.*, 2010). Este sesgo de información se ve subsanado actualmente gracias al desarrollo de nuevos métodos de secuenciación y de paquetes informáticos que permiten el análisis masivo de datos.

Durante muchos años, la asignación de las categorías taxonómicas de microorganismos estuvo basada en la distinción de características bioquímicas y/o antigénicas y, en el mejor de los casos, en aspectos fisiológicos o morfológicos detectables (Valenzuela *et al.*, 2015). Con el advenimiento de las tecnologías genómicas, se comenzaron a utilizar fragmentos específicos del genoma que permitieron una mejor distinción taxonómica entre especies.

Del interés de estudiar de forma integral las comunidades bacterianas y fúngicas surgió la metagenómica, definida como el estudio del conjunto de genomas de muestras ambientales (Xu, 2006). Se encarga del estudio de las comunidades de microorganismos en un ambiente dado, desde la identificación de cada organismo hasta la búsqueda de genes relacionados con su metabolismo.

1.2.3.1. Genes marcadores

Hoy en día, la forma óptima en términos de costo-beneficio para revelar la taxonomía de una comunidad de microorganismos, es mediante el análisis de genes que permiten la identificación de las especies. Un gen utilizado para esto debe cumplir las siguientes características: debe estar compuesto por sitios altamente variables, que serán las regiones que permitan la discriminación de las especies, así como sitios conservados adyacentes a las regiones variables, que permitan el diseño de *primers* universales; una presencia extendida en las especies y con un gran abundancia en el genoma; y deben tener una longitud adecuada que permita su amplificación y secuenciación de forma fácil, reproducible y precisa (Valenzuela *et al.*, 2015; Hirsch *et al.*, 2010).

Los genes ribosomales cumplen estos requerimientos, siendo los marcadores moleculares más utilizados en la microbiología actual (Weisburg *et al.*, 1991), especialmente el 16S en procariontes y el 18S en eucariotas (aunque en hongos se recomiendan las regiones ITS, como se explicará más adelante).

La variabilidad y divergencia de estos genes, así como su ubicuidad, proporciona un marco para asignar secuencias a géneros y especies para la investigación de la riqueza y diversidad de la comunidad microbiana, deducir la filogenia y relaciones evolutivas entre bacterias, arqueas y eucariotas (Hirsch *et al.*, 2010).

El ARN ribosomal 16S se localiza en la subunidad menor del ribosoma, es el sitio de unión para el ARN mensajero (a través del reconocimiento de la secuencia Shine-Dalgarno) durante el proceso de traducción y el andamiaje estructural para el ensamblado de la subunidad menor del ribosoma (Gürtler y Stonisch, 1996). El gen ribosomal 16S en bacterias, contiene 9 regiones hipervariables flanqueadas por regiones conservadas.

Las regiones hipervariables difieren en su secuencia en cada especie de bacteria, de modo tal que pueden ser utilizadas para la identificación de bacterias en una muestra, además el hecho

de estar flanqueadas por secuencias conservadas facilita el diseño de *primers* universales que se acoplan a estas regiones y amplifiquen las hipervariables (Chakravorty, 2007).

Las regiones hipervariables más utilizadas para la asignación taxonómica son las regiones 4, 5 y 6 (V4, V5 y V6), siendo las secuencias que mejor discriminación permiten entre especies bacterianas (Yang *et al.*, 2016) (Figura 1.2).

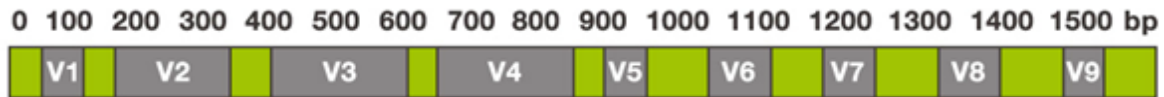


Figura 1.2. Estructura del gen ribosomal 16S. Las regiones de color gris (V1 – V9) son las regiones hipervariables, mientras que las regiones de color verde son las conservadas. Tomado de Renvoisé *et al.*, 2013.

Sin embargo, cabe mencionar que el gen ribosomal 16S no es perfecto, y puede llegar a acarrear consigo ciertos inconvenientes. Por ejemplo, en algunas especies existen diferencias en las secuencias en las copias del gen ribosomal 16S en un mismo individuo y en última instancia, una alta disimilitud incluso en especies del mismo taxón (Janda y Abbot., 2007). No obstante, estos casos son raros, por lo que no constituyen un problema relevante en su uso.

Es importante tener especial cuidado cuando se analizan microbiotas de plantas, pues los cloroplastos y mitocondrias de las células vegetales poseen genes ribosomales 16S, de modo tal que se deben de filtrar y retirar estas secuencias para evitar falsos positivos (Case *et al.*, 2007).

El gen ribosomal 16S es el marcador molecular más usado en la ecología microbiana, en gran parte debido a su presencia en todo el reino bacteria; su alto número de copias en el genoma bacteriano, la presencia tanto de regiones hipervariables como conservadas que permiten la identificación de las bacterias, y la enorme cantidad de secuencias disponibles en los bancos de datos, permiten el uso de este gen como un marcador universal.

La identificación de hongos suele realizarse empleando las regiones espaciadoras internas transcritas (ITS por sus siglas en inglés, *Internal Transcribed Spacer*), localizadas entre los genes del ARN ribosomal 18S y 5.8S (Schoch *et al.*, 2012). Las regiones ITS permiten una

identificación exitosa del amplio reino de los hongos, siendo estas secuencias adoptadas como marcadores primarios en hongos.

En bacterias existe un solo ITS, localizado entre las regiones 16S y 23S de los genes ribosomales. En eucariotas existen dos ITS: el ITS1 localizado entre los genes ribosomales 18S y 5.8S y el ITS2 delimitado por los genes 5.8S y 28S en hongos y 26S en plantas (Lafontaine y Tollervey., 2001).

A diferencia de los demás eucariotas, donde la asignación taxonómica involucra el gen ribosomal 18S, en los hongos es común utilizar los ITS. Iwen y colaboradores (2002), compararon las regiones 18S e ITS para determinar cuál de ellas permite una mejor discriminación entre especies de hongos, encontrando que los ITS muestran una extensa diversidad en sus secuencias, lo suficiente para una correcta asignación taxonómica. El complejo ITS mostró ser muy útil como marcador debido a la variabilidad en su secuencia y que se encuentran flanqueados por genes conservados, que como se mencionó con anterioridad, son de gran ayuda en el diseño de *primers* (White *et al.*, 1990).

De los dos ITS encontrados en los hongos, diversos autores hacen hincapié en uso del ITS2 por encima del ITS1 (Blaalid *et al.*, 2013; Toju *et al.*, 2012). La razón de esta elección es debido a que el ITS1 es mucho más variable en muchos linajes de hongos, complicando la discriminación de las especies.

Al igual que el gen ribosomal 16S, los ITS no son ajenos a limitantes. La variación intraespecífica en los ITS es un problema que dificulta la asignación taxonómica, en algunos hongos se observan discrepancias de solo unos cuantos nucleótidos entre especies (Kiss, 2012). Los ITS no son únicos de los hongos, las plantas también lo poseen, de modo que al trabajar con la microbiota de plantas, es necesario descartar estas secuencias ITS vegetales para evitar errores en las asignaciones taxonómicas y en los cálculos de los índices ecológicos (Toju *et al.*, 2012). Aun con todo lo anteriormente expuesto, los ITS son marcadores robustos y ampliamente utilizados en el estudio de hongos.

1.2.3.2. Secuenciación de amplicones 16S e ITS

Una vez seleccionados los genes marcadores, se procede a realizar la extracción del ADN metagenómico, cuyos protocolos son en extremo variados y dependen fuertemente del organismo, así como del tejido. El siguiente paso a la extracción es la amplificación mediante la

reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) de los genes marcadores, empleando el material genético y los *primers*.

Uno de los sesgos que se puede presentar en los estudios de metagenómicos tiene estrecha relación con la selección de los *primers*. Diversos *primers* se han desarrollado para mejorar la discriminación entre especies, resaltando los diseñados por el *Earth Microbiome Project* (Walters *et al.*, 2016) que amplifican la región V4 del gen ribosomal 16S. Y para los hongos son utilizados los cebadores ITSF (Toju *et al.*, 2012) que amplifican la región ITS2.

Posteriormente a la amplificación, se realiza el paso de la secuenciación, que consiste en obtener la secuencia de nucleótidos del material genético obtenido. Una de las plataformas de secuenciación masiva más utilizada por su bajo costo y alta reproducibilidad es Illumina.

El principio básico que utiliza la plataforma Illumina es la secuenciación de terminación reversible utilizando nucleótidos marcados con fluorescencia. Durante la secuenciación con Illumina, los amplicones (esto es, los genes marcadores amplificados) son unidos y distribuidos en una celda (llamada *flow cell*) donde la reacción de secuenciación se lleva a cabo. Los fragmentos de amplicones se unen con los *primers*, adaptadores y *barcodes* (secuencias utilizadas para separar las muestras, como se mencionará más adelante). Luego, los fragmentos de ADN son desnaturalizados e hibridados con fragmentos complementarios formando una estructura similar a un puente de doble cadena de ADN (Figura 1.3).

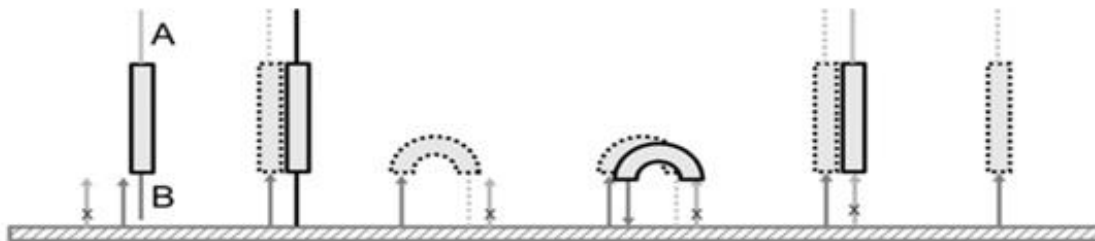


Figura 1.3. Resumen gráfico del proceso de secuenciación con Illumina. Tomado de Buermans y den Dunnen, 2014.

Este proceso se repite en varios ciclos hasta tener aglomeraciones (o clúster). Posteriormente, se remueve una cadena de los fragmentos de ADN (para tener una cadena) y se le unen nucleótidos marcados que sean complementarios con la cadena (el proceso va de nucleótido

en nucleótido). Cuando el nucleótido fluorescente se incorpora, este es excitado por un láser, la señal resultante es registrada por el equipo de secuenciación. El nucleótido es removido y se procede a incorporar uno nuevo, de forma que el proceso se repite hasta terminar la secuencia del fragmento de ADN (Escobar *et al.*, 2015; Buermans y den Dunnen, 2014). En las secuenciaciones múltiplex, el ADN de cada muestra es ligado con un set de oligonucleótidos llamadas “etiquetas” o “*barcodes*”. Estas etiquetas permiten identificar cada muestra en la celda. Es por eso que un paso imprescindible en los análisis bioinformáticos de las secuencias es eliminar estos *barcodes* pues podrían ocasionar errores durante la asignación taxonómica (Teeling y Glöckner, 2012).

1.2.3.3. Paquetes bioinformáticos para el análisis de la microbiota

Los avances científicos y tecnológicos han revolucionado la forma en cómo se estudian los microbiomas. Desde la llegada de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva (NGS, por las siglas en inglés de *Next Generation Sequencing*) se ha generado una cantidad sin precedentes de información genómica, ya que las nuevas plataformas de secuenciación reducen los costos por secuenciación y son más eficientes (Ram *et al.*, 2011).

De igual forma, el desarrollo exponencial de las tecnologías informáticas, y su implementación en las áreas biológicas, ofrece una enorme posibilidad de análisis de metagenomas, con miles de datos de secuencias provenientes de diferentes organismos (Escobar *et al.*, 2015). Los paquetes bioinformáticos permiten hacer manejable la gran cantidad de datos que provienen de la secuenciación, de modo que podemos obtener interesantes conclusiones al enfrentarnos a miles o millones de secuencias. Es de recalcar el gran impacto que tiene la bioinformática en la asignación taxonómica, pues esto no se podría realizar sin los algoritmos o programas especializados para dicha tarea. La bioinformática permite dilucidar la estructura y relaciones entre las comunidades microbianas en un entorno dado a partir de los datos de secuenciación.

La robustez de los análisis taxonómicos depende de una serie de pasos iniciales de preprocesamiento de las secuencias. Antes de realizar un análisis taxonómico, se debe hacer un análisis de la calidad de las secuencias mismas ya que durante la amplificación y secuenciado pueden darse errores en la replicación de los nucleótidos (de media, las polimerasas tienen errores de sustitución cada $10^5 - 10^6$ pares de bases). También puede ocurrir la formación de quimeras, secuencias producto de una reacción de PCR incompleta,

que pueden llevar a errores en el momento de realizar la asignación taxonómica, interpretando las quimeras o los errores en la replicación como posibles microorganismos (Haas *et al.*, 2011).

Para reducir estos errores, se deben filtrar los datos, remover secuencias erróneas, identificar y descartar las quimeras, y eliminar las secuencias sin significado biológico. La determinación de qué secuencias son erróneas (o de baja calidad) se da por el valor de Phred. Este valor es una medida de la calidad de cada nucleótido en cada posición en una secuencia, y se define como la probabilidad de que ocurra una lectura incorrecta en una base. La puntuación se asigna desde un mínimo de 10 (un 90% de probabilidad de error), y va en aumento – por ejemplo, un valor de 50 tendría una probabilidad de precisión del 99.9999% - (Erwing *et al.*, 1998) (Tabla 1.1). La puntuación de calidad Phred es usada para valorar la calidad de las secuencias, reconocer y excluir aquellas secuencias o regiones de baja calidad y tener un consenso preciso de secuencias.

Tabla 1.1. Puntuación de calidad Phred para diferentes valores

Puntuación de calidad (Phred)	Probabilidad de error por base	Porcentaje de precisión por base
10	1 en 10	90%
20	1 en 100	99%
30	1 en 1,000	99.9%
40	1 en 10,000	99.99%
50	1 en 100,000	99.999%
60	1 en 1,000,000	99.9999%

La evaluación de la calidad de las secuencias se realiza con programas informáticos. FastQC es un programa que permite realizar controles de calidad en archivos de secuencias, aportando una idea general del estado de los datos (Andrews, 2010), y asigna a cada posición un valor de calidad (en escala de Phred).

El programa también da información sobre parámetros tan amplios como el contenido de Guanina/Citocina, presencia de bases ambiguas (debidas a errores de secuenciación) o secuencias muy representadas. La presentación de los resultados es en forma gráfica y de fácil

interpretación, permitiendo llegar a conclusiones rápidas y seleccionar regiones de baja calidad que se procede a eliminar. De igual forma, existen otros paquetes que incorporan en su flujo de trabajo un análisis de calidad, como el caso de QIIME2, que otorga un análisis de calidad de las secuencias, dando un valor en la escala de Phred a cada una de ellas (Bokulich *et al.*, 2013)

Para una correcta asignación taxonómica, se deben considerar secuencias de alta calidad, pues estas impactarán directamente en las conclusiones. Una mala decisión en la filtración de secuencias puede descartar lecturas que exageren la diversidad estimada (Bokulich *et al.*, 2013); las etapas de preprocesamiento no son triviales.

Existen diversas herramientas informáticas para realizar los análisis taxonómicos de comunidades microbianas, QIIME2 es una de ellas, y hoy en día la más utilizada.

QIIME2 (por sus siglas en inglés *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) es un conjunto de herramientas de acceso libre que realiza la asignación taxonómica de comunidades bacterianas o fúngicas a partir de datos de secuenciación de nueva generación (Caporaso *et al.*, 2010). QIIME2 utiliza algoritmos de diferentes softwares ofreciendo un paquete que permite un análisis completo de las secuencias de genes ribosomales (Kuczynski *et al.*, 2011).

En la figura 1.4 se muestra un mapa de flujo de trabajo en QIIME2. De modo general, el paquete informático sigue cinco pasos. El primero de ellos es la importación de los datos al formato de trabajo, siendo este un archivo comprimido; los formatos de los archivos a importar pueden ser FASTA o FASTQ. En segundo lugar las secuencias son demultiplexadas; la demultiplexación es el proceso que permite la detección de *barcodes* (secuencias de 4 nucleótidos puestas durante la secuenciación, que permiten diferenciar una muestra de otra) y su eliminación.

Las secuencias demultiplexadas son sometidas a una limpieza (llamada *denoise*) que consiste en el filtrado de las secuencias, verificación y remoción de quimeras (artefactos de PCR indeseables). Este paso lo lleva a cabo implementado las herramientas DADA2 (Boylen *et al.*, 2019). DADA2 (*Divisive Amplicon Denoising Algorithm*) es un software para el modelado y corrección de errores en amplicones de Illumina (Callahan *et al.*, 2016).

QIIME2 agrupa las secuencias ya filtradas en clústers basados en su porcentaje de identidad, formando OTUs. Las unidades taxonómicas operativas (OTU por sus siglas en inglés) son una aproximación pragmática al término taxón. El uso del término OTU y no especie se debe a

problemas de definición y compatibilidad con el término especie en bacterias. Es por ello que los OTUs definen las especies en función de su porcentaje de identidad en sus secuencias, siendo del 97% de identidad (Blaxter *et al.*, 2005)

QIIME2 toma las secuencias y las alinea entre ellas, las separa en función de su porcentaje de identidad (97% para especie) y los agrupa formando clústers. Posteriormente, el programa toma una secuencia representativa de los clústers y los compara con una base de datos. La comparación se realiza con un clasificador Bayesiano, que busca similitudes entre la secuencia representativa y la base de datos (Boylen *et al.*, 2019)

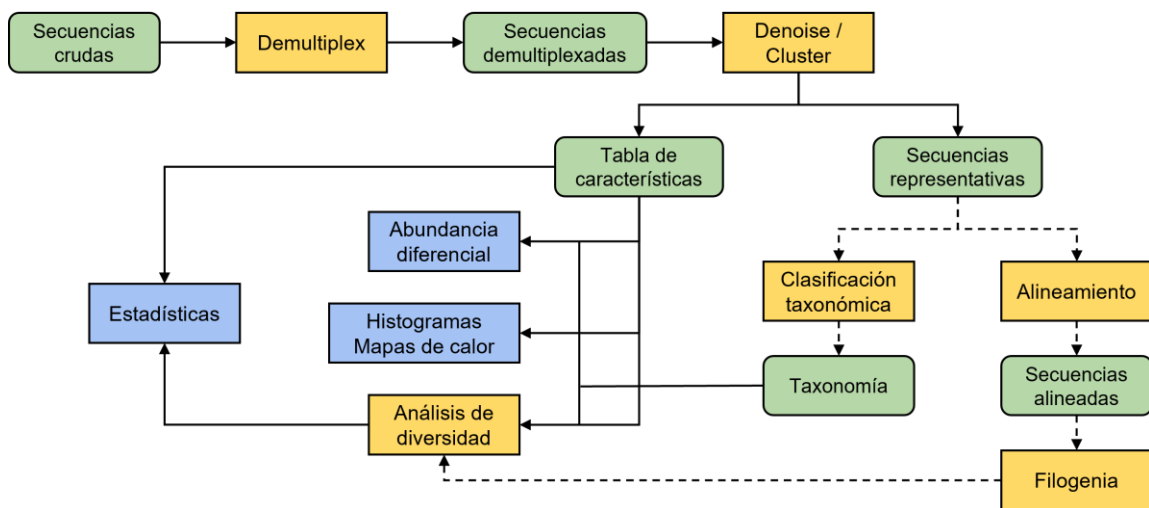


Figura 1.4. Mapa general del flujo de trabajo de QIIME2. Basado en Boylen *et al.*, 2019.

Las bases de datos más usadas son Greengenes (DeSantis *et al.*, 2006) que contiene secuencias del gen ribosomal 16S de bacterias y arqueas, y SILVA (Quast *et al.*, 2012) que está compuesto por datos de la subunidad grande (LSU) y pequeña (SSU) del ribosoma. UNITE la base de datos libre que contiene secuencias ITS eucariotas de alta calidad proveniente del *North European ECM*. A la par está la base datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) que cuenta con diversas colecciones de secuencias de genes ribosomales.

Subsecuentemente a la asignación taxonómica, QIIME2 construye una tabla de OTUs, donde resume el análisis y da el nombre de las especies que conforman el set de secuencias, así como su nivel de representación en la comunidad (Navas *et al.*, 2013). Para finalmente,

representar los resultados por diferentes métricas que comparan la diversidad de especies entre las muestras.

Además de QIIME2, existen programas libres y gratuitos en la web para la realización de alineamientos y asignaciones taxonómicas. Por ejemplo, el RDP (*Ribosomal Database Project*, Cole *et al.*, 2013) es un programa libre y permiten realizar estudios de comunidades bacterianas. El RDP compila secuencias ribosomales y datos relacionados y los redistribuye en alineamientos y los ordena filogenéticamente (Olsen *et al.*, 1992).

Estos programas permiten esclarecer la estructura y composición de las comunidades microbianas, siendo utilizados en la asignación taxonómica de muchos ecosistemas (Leray *et al.*, 2016; Bacci *et al.*, 2015; Navas *et al.*, 2013).

1.2.4. Estudios de la microbiota en *Vanilla*

Existen pocos estudios de la microbiota endófito en orquídeas, destacando las investigaciones con el género *Dendrobium*, concretamente de los efectos benéficos de bacterias endófitas en su crecimiento (Wang *et al.*, 2016). La mayoría de las investigaciones en orquídeas están orientadas al entendimiento de los hongos de la rizosfera, más allá que la endosfera (Sathiyadash *et al.*, 2012; Bayman y Otero, 2006), y es un campo de investigación amplio de oportunidades.

En cuanto al género *Vanilla*, gran parte de los estudios de la microbiota se orientan a la rizosfera, donde se han identificado una gran variedad de hongos del género *Rhizoctonia*, reportado como formadores de micorrizas en una gran variedad de plantas. Ordoñez, 2012 realizó una identificación por medio de ITS para dilucidar la estructura fúngica de la rizosfera en *V. planifolia*, donde encontró los géneros: *Bipolaris*, *Phoma*, y *Phomopsis*, todos ellos reportados como patógenos en otras plantas, pero curiosamente formando parte del microbioma en *V. planifolia* sin que ésta presente síntomas de infección.

Otros estudios en *V. planifolia* identificaron a los géneros *Tulasnella* y *Ceratobasidium* presentes en la rizosfera, los cuales intervienen en el proceso de germinación de muchas semillas de orquídeas (Alomía, 2014).

Gran parte del flujo de investigación referente a *Vanilla* responde a estrategias de control contra *Fusarium*, uno de los patógenos con mayor incidencia en *Vanilla* y con la capacidad de mermar cultivares (Jayasekhar *et al.*, 2008). Concretamente, llama la atención la gran incidencia de

este patógeno en monocultivos de *V. planifolia* en algunas localidades de China. Las prácticas de monocultivo degradan el microbioma del suelo, de modo tal que las plantas son más susceptibles a ser infectadas (Xiong *et al.*, 2016).

En la investigación desarrollada por Xiong *et al.* (2016), se realizó un análisis metagenómico para la búsqueda de hongos presentes en la rizosfera de *V. planifolia*, en un suelo que mostraba una actividad antifúngica contra *Fusarium*. Al respecto, encontraron hongos pertenecientes al género *Penicillium* y *Trichoderma*, mismos que proveen a la planta de compuestos que inhiben el desarrollo de *Fusarium*.

En cuanto a estudios de microorganismos endófitos, no existen muchos reportes, siendo el más relevante la investigación de White *et al.* (2014), donde identificaron a *Bacillus amyloliquefaciens* como bacteria endófito sistemática en *V. phaenantha*.

La poca información referente a la composición de la endosfera en el género *Vanilla* representa un gran campo de posibilidades. La identificación y el conocimiento de los microorganismos (especialmente en las plantas silvestres) permite tener nuevas alternativas para el mejoramiento de cultivares, donde las bacterias y hongos pueden ser usados como fertilizantes, agentes de biocontrol e inclusive ayudar en la resistencia de las plantas al estrés abiótico.

1.3. ACLIMATACIÓN DE PLANTAS *in vitro*: PROBLEMÁTICA Y ALTERNATIVAS

El fin del presente trabajo es dar un primer paso hacia un futuro donde se puedan (i) micropropagar eficientemente plantas de *V. planifolia* y (ii) inocularlas con microorganismos benéficos (provenientes de plantas silvestres de *V. planifolia*), que ayuden a cultivarlas de forma que no requieran la aplicación de agroquímicos.

El cultivo *in vitro* comprende un abanico de diversas técnicas de propagación de plantas con altas tasas de efectividad, sin embargo, estas metodologías no son perfectas. Uno de los problemas que enfrenta el cultivo de tejidos vegetales es la alta mortalidad en la aclimatación de las vitroplántulas, pues estas acarrearán diversas deformaciones anatómicas propiciadas por el desarrollo *in vitro*. A pesar de ello, existen diversas alternativas para sobrellevar estas complicaciones, como el desarrollo de sistemas ventilados o el enriquecimiento con atmósferas de CO₂.

1.3.1. Efecto de la ventilación en el desarrollo de plantas *in vitro*

La propagación *in vitro* ha sido utilizada comúnmente para la multiplicación rápida de especies de plantas. Los métodos de propagación *in vitro* se llevan a cabo en contenedores cerrados que previenen la contaminación por bacterias y hongos, y evitan la deshidratación de los explantes y del medio de cultivo (Saldanha *et al.*, 2012).

En los sistemas convencionales de propagación *in vitro*, las formas más comunes de cerrar los contenedores, que contienen el explante y el medio de cultivo, son capas de papel aluminio, películas de plástico (cloruro de polivinilo) y sellos de polipropileno. Todos estos sistemas limitan el intercambio gaseoso y el crecimiento de las plántulas (Kozai *et al.*, 2001).

El cultivo *in vitro* en contenedores cerrados tiene implicaciones negativas en el desarrollo de las plántulas. Estos efectos adversos se deben al microambiente generado, con una alta humedad relativa, concentraciones de CO₂ variables y una potencial acumulación de etileno y otros gases. Aunado a ello, la propagación *in vitro* se lleva a cabo con altas concentraciones de azúcares (principalmente sacarosa), ocasionando desórdenes anatómicos y fisiológicos en las estomas de las plantas micropropagadas, aminorando el potencial fotoautotrófico de los explantes y convirtiendo sus órganos fotosintéticos en almacenes de carbohidratos (Fuentes *et al.*, 2005).

Las vitroplántulas presentan desórdenes morfológicos, como un pobre desarrollo en los brotes, tejidos con una baja resistencia mecánica, estomas pequeños y no funcionales, deformidades en el mesófilo esponjoso de las hojas (Figura 1.5), carencia de ceras, pobre absorción de nutrientes por parte de las raíces, y una baja actividad fotoautotrófica (Chandra *et al.*, 2010). Esto ocasiona una alta mortalidad de las plantas durante la aclimatación, principalmente por la deshidratación y la falta de un aparato fotosintético completamente desarrollado (Álvarez *et al.*, 2012).

Por estas razones, es importante mantener los contenedores de cultivo ventilados, con la finalidad de minimizar los efectos nocivos en los explantes. El intercambio gaseoso mantiene las concentraciones adecuadas de CO₂ para la estimulación de la fotosíntesis y reduce las concentraciones de etileno y humedad dentro de los contenedores de cultivo (Kozai y Kubota, 2001), mejorando el vigor y las características anatómicas de las plantas. En los sistemas ventilados, se utilizan membranas que permiten el intercambio de gases, y evitan la contaminación del medio de cultivo, reduciendo la humedad relativa dentro del contenedor e

incrementando la transpiración de las plantas y la correcta absorción de nutrientes del medio (Xiao *et al.*, 2011).

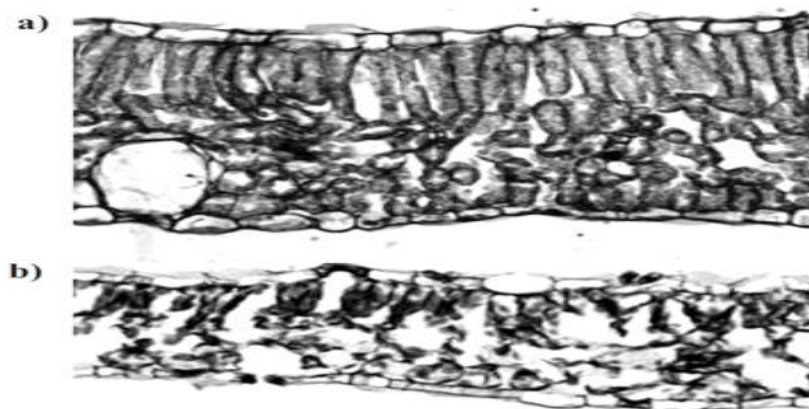


Figura 1.5. Sección transversal de la hoja de plántulas *Eucalyptus* de 28 días de edad. A) Crecimiento en contenedores ventilados y B) bajo contenedores cerrados. Tomado de Zobayed *et al.*, 2001.

El primer reporte del uso y los beneficios de los sistemas ventilados fue en la década de los 60, en la propagación de limón (*Citrus limon*) (Kordan, 1965). Actualmente, los sistemas ventilados han sido utilizados de forma exitosas para la propagación de *Azadirachta indica* (Rodrigues *et al.*, 2012), *Solanum melongena* (Ribeiro *et al.*, 2009), *Uniola paniculata* (Valero *et al.*, 2007), *Eucalyptus tereticornis* (Shavalli *et al.*, 2002) y *Dendrobium* (Ferreira *et al.*, 2011). Los sistemas ventilados no sólo se usan para el desarrollo de explantes. Además, permite la maduración y germinación de embriones somáticos (El Meskaoui y Tremblay, 1999). Bajo este panorama, en este estudio se realizó la propagación, multiplicación y crecimiento de plántulas de *Vanilla planifolia* bajo condiciones ventiladas. Todo ello con la finalidad de obtener vitroplantas que sean capaces de sobrevivir durante la aclimatación. Además, se espera que el intercambio de gases promueva el crecimiento y el desarrollo de brotes múltiples, acortando los tiempos de cultivo y aumentando la sobrevivencia *ex vitro*.

JUSTIFICACIÓN

Las plantas son colonizadas por un enorme número de microorganismos, siendo las bacterias y los hongos los de mayor presencia. Al conjunto de todos estos microorganismos se les llama microbiota y, de forma concreta, a aquellos microorganismos que habitan en el interior de los tejidos de las plantas sin causar un daño se les llama endófitos (Quambusch y Winkelmann, 2018).

La estructura de la microbiota endófitas tiene una fuerte influencia en la salud y el desarrollo de las plantas. Se sabe que varios de los microorganismos que lo conforman suelen ser benéficos, sin embargo, también hay algunos neutrales y otros que son patógenos potenciales en estado “latente”. Los que son benéficos llevan a cabo una gran variedad de funciones en el interior de la planta, que van desde agentes de biocontrol y fijadores de nutrientes esenciales, hasta productores de hormonas vegetales que promueven el crecimiento y el desarrollo de la planta (Hardoim *et al.*, 2015; Zamiodis *et al.*, 2001).

Debido a esta estrecha relación entre los microorganismos endófitos y la planta hospedera, se han comenzado a realizar investigaciones con la finalidad de identificar aquellos que tengan papel benéfico en los cultivos. Una opción que ha tomado recientemente gran auge es el estudio de la microbiota de los parientes silvestres de las especies cultivadas. Esto porque se ha visto que el manejo de los cultivos, sobre todo la aplicación de agroquímicos disminuye la gama de microorganismos benéficos presentes en su microbiota (Jaramillo *et al.*, 2019). Y si estos se aíslan a partir de sus parientes silvestres y se usan para inocular a las variedades domesticadas, pueden llegar a internalizar y evitar la necesidad de agregar tantos agroquímicos (Jaramillo *et al.*, 2017; Zamiodis *et al.*, 2001), conduciendo a una agricultura más amigable con el ambiente. Estas investigaciones tempranas se encuentran en la frontera del conocimiento, y constituyen el contexto en el que se enmarca el presente trabajo.

La identificación de microorganismos presentes en las plantas silvestres supone un punto de partida para el mejoramiento de los cultivos modernos, ya que algunos tienen el potencial de otorgar a la planta una mayor resistencia a los patógenos, una mejora en la absorción de nutrientes y una mejora en su crecimiento (Wang *et al.*, 2016). El desarrollo de las nuevas tecnologías de secuenciación en conjunto con el desarrollo de nuevos programas bioinformáticos abre la posibilidad de un estudio a mayor profundidad de la microbiota de

poblaciones silvestres, permitiendo identificar a una cantidad mayor de especies que las técnicas microbiológicas tradicionales.

Es bajo estas premisas que conocer las comunidades de microorganismos en *V. planifolia* en un ambiente silvestre es un parteaguas para la búsqueda de bacterias y hongos que sean potencialmente benéficos para el desarrollo y vigor de las plantas cultivadas en condiciones de menor uso de agroquímicos.

Con base en lo anterior en este trabajo se propuso el estudio de la microbiota endófito de hojas y raíces de una población silvestre y una comercial de *V. planifolia*, para verificar si en realidad existe una diferencia en la composición de sus comunidades endófitas, así como la identificación de microorganismos que formen parte de la microbiota *core*. Esto a su vez puede conducir a plantear proyectos futuros en los que se vislumbren posibles alternativas para el aislamiento dirigido de algunos microorganismos, o conjunto de ellos, con el fin ulterior de contribuir a un mejor manejo y conservación de este cultivar, de gran importancia ecológica y económica para México.

Además, dada la gran importancia económica de este cultivar, en este trabajo también se describe una metodología para la aclimatación de plántulas de *V. planifolia* provenientes de cultivo *in vitro*, utilizando sistemas ventilados para promover un mejor desarrollo de la planta y aumentar su sobrevivencia *ex vitro*. El establecimiento de una metodología de aclimatación permitirá la multiplicación y conservación de esta especie, permitiendo realizar futuros trabajos de investigación con este preciado material vegetal.

El fin ulterior de esta tesis es dar un primer paso en el entendimiento de la microbiota e identificación de posibles microorganismos candidatos para aplicaciones biotecnológicas, especialmente aquellos microorganismos benéficos que puedan ser inoculados en plantas cultivadas de *V. planifolia*. Aunado a ello, se planteó desarrollar una metodología de aclimatación exitosa de *V. planifolia*, para generar material vegetal para futuras investigaciones en la aplicación de inóculos benéficos en *V. planifolia*.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Existe diferencia en las comunidades bacterianas y fúngicas endófitas de hojas y raíces entre una población silvestre y una cultivada comercialmente de *V. planifolia*?

¿Es posible aumentar el porcentaje de sobrevivencia *ex vitro* de vitroplántulas de *V. planifolia* implementando un sistema de aclimatación con ventilación?

HIPÓTESIS

En este trabajo se plantean dos hipótesis:

1. La riqueza y diversidad de la microbiota endófitas de hojas y raíces es mayor en una población silvestre de plantas de *V. planifolia* en comparación con la riqueza y diversidad microbiana de una población de plantas cultivadas comercialmente.
2. El proceso de pre-adaptación *in vitro*, usando un sistema de ventilación, propicia un incremento en la sobrevivencia de plántulas de *V. planifolia* durante su aclimatación en condiciones de invernadero

OBJETIVO GENERAL

Comparar las comunidades microbianas endófitas de hojas y raíces entre una población de plantas silvestres y una de comerciales, utilizando el gen 16S y la región ITS2 para la búsqueda de microorganismos con posibles aplicaciones agrobiotecnológicas, y establecer un sistema de aclimatación para plantas de *V. planifolia*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar y comparar las diferencias entre las comunidades microbianas endófitas de hojas y raíces de una población silvestre y comercial de *V. planifolia*, utilizando secuenciación de amplicones del gen ribosomal 16S y la región ITS2;
2. Identificar la presencia diferencial de bacterias y hongos como posibles candidatos para aplicaciones agrobiotecnológicas en las poblaciones comerciales de *V. planifolia*;
3. Establecer una estrategia de aclimatación de vitroplántulas de *V. planifolia* para incrementar su sobrevivencia *ex vitro*.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS ENDÓFITAS EN POBLACIONES SILVESTRES Y COMERCIALES DE *V. planifolia*

2.1.1. Obtención de muestras de hojas y raíces de una población silvestre y una comercial de *V. planifolia*

Para este trabajo, se obtuvieron por un lado plantas de *V. planifolia* de una población silvestre y por otro plantas propagadas comercialmente. Las muestras de *V. planifolia* silvestres fueron colectadas en el estado de Yucatán, en el municipio de Izamal, el lugar exacto no se menciona por razones de conservación. El área de colecta pertenecía a un ecosistema de selva perennifolia típica de esta región. Las muestras que se colectaron formaban parte de una población de aproximadamente 20 plantas silvestres que se encontraban creciendo en una zona de unos 10 metros de diámetro. La mayor parte de la población se encontraba anclada a los árboles de la zona, los cuales eran principalmente de *Brosimum alicastrum* (conocido vulgarmente como “ramón”). Ninguna de las plantas tenía signos de enfermedad. Las raíces áreas anclaban las plantas a la corteza de los árboles tutores, a las rocas que se encontraban cerca de ellas, a las ramas caídas y al suelo, el cual consistía principalmente de hojarasca (Figura 2.1).



Figura 2.1. Fotografía de algunas de las plantas silvestres de *V. planifolia* colectadas en este trabajo, en Izamal, Yucatán.

El muestreo se realizó al medio día. En el momento de la colecta, la población se encontraba a 28 °C, a la sombra de los árboles, con una humedad atmosférica del 70%. Se colectaron muestras de hojas y raíces. Las muestras se cortaron con la ayuda de un bisturí estéril y fueron guardadas en paquetes de aluminio previamente esterilizados y etiquetados. Se colectó una hoja y un fragmento de raíz aérea de tres plantas, dando un total de 3 hojas y 3 raíces de individuos diferentes. Los tejidos se mantuvieron a 4 °C hasta ser transportados al laboratorio.

Las plantas comerciales de *V. planifolia* se adquirieron de una empresa ubicada en Xalapa, Veracruz (llamada Finca Quiroz). Un total de 12 plantas de buen estado y sin signos de enfermedad fueron recibidas, teniendo un largo aproximado de 90 cm, con 4 a 5 hojas (Figura 2.2). Las plantas se sembraron en un sustrato estéril (30% de tierra, 35% de agrolita y 35% de Peat moss) agrupadas en tres plantas por maceta; el tutor utilizado consistió en palillos de madera previamente lavados y desinfectados con etanol al 70% (v/v). Las plantas fueron sembradas a una profundidad de 5 cm, y enrolladas sobre el tutor. El riego fue cada dos días por aspersión de agua destilada previamente esterilizada.



Figura 2.2. Fotografía de las plantas comerciales de *V. planifolia*. La planta de la izquierda presenta marchitez así como daños en los extremos, en contraposición con la planta de la derecha con mayor vigor y sin daños.

Tras 2 semanas de adaptación y crecimiento en invernadero (25 °C), se colectaron muestras de hojas y raíces áreas. Para el muestreo, se seleccionaron al azar tres plantas que no presentarán daños o signos de marchitez, los tejidos fueron cortados con la ayuda de un bisturí estéril y guardados en paquetes de aluminio previamente esterilizados y etiquetados. Los tejidos se mantuvieron a 4°C por 24 horas.

2.1.2. Extracción del ADN metagenómico

Las muestras procedentes de cada uno de los diferentes tejidos de las plantas, tanto silvestres (Figura 2.3) como comerciales (Figura 2.4), fueron esterilizadas superficialmente siguiendo la metodología reportada por Mapula *et al.*, (2015).



Figura 2.3. A) Muestra de hoja de *V. planifolia* silvestre. B) Muestra de raíz de *V. planifolia* silvestre.

Los tejidos (hojas y raíces) fueron lavados con agua purificada para eliminar cualquier residuo de suelo. Posteriormente, fueron sumergidos en una solución de etanol al 70 % (v/v) por 3 minutos, seguido de un lavado con una solución de hipoclorito de sodio al 2% por 20 minutos y finalmente se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril para retirar cualquier

remanente de cloro. Los tejidos esterilizados fueron congelados con nitrógeno líquido, macerados y guardados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su uso posterior.



Figura 2.4. A) Muestra de hoja de *V. planifolia* comercial. B) Muestra de raíz de *V. planifolia* comercial.

La extracción de ADN metagenómico se realizó siguiendo el protocolo descrito por Edwards (1991). El buffer de lisis CTAB consistió en 100 mM de Tris-HCl, 1.2 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB y 0.2% de β -mercaptoetanol. El procedimiento de la extracción se detalla a continuación:

Se tomaron 200 mg de tejido macerado y se les adicionó 1 ml del buffer de lisis CTAB, seguido de una agitación con vortéx por 5 minutos y una incubación a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora a baño maría.

Pasado este tiempo, se adicionó 1 ml de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v/v) y 10 μL de RNasa A (10 mg/ml), seguidamente, los tubos se mezclaron por inversión 20 veces y se centrifugaron a 13 000 rcf por 10 minutos. Se recuperó la fase acuosa transparente (aproximadamente 600 μL) a la cual se añadieron 600 μL de isopropanol frío y 5 μL de RNasa A (10 mg/ml). Los tubos fueron agitados suavemente por inversión 20 veces y congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos.

Luego del tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron a 13 000 rcf por 5 minutos, se desechó el sobrenadante cuidando de no eliminar la pastilla. Seguido a ello, se adicionó 250 μL de etanol 70% (v/v) y se centrifugaron a 13 000 rcf por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se repitió el mismo paso de lavado con etanol, solo que esta vez, posteriormente a la centrifugación, el ADN se incubó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos. Finalmente, se retiró el sobrenadante

y se dejó evaporar el etanol de las muestras a temperatura ambiente por 35 minutos. El ADN se resuspendió en buffer TE para su almacenaje a -20 °C.

La integridad del ADN se confirmó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (v/v) bajo las siguientes condiciones: 80 V por 30 minutos, teñido con bromuro de etidio. Se utilizó el marcador Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). La concentración de ADN de cada muestra se estimó con un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Para la secuenciación, se envió al Laboratorio de Investigación y Ensayos (RTL, por sus siglas en inglés) (Lubbock, Texas, USA) un total de 50 ng de ADN por muestra. La secuenciación de amplicones etiquetados se realizó con un equipo Miseq de Illumina. La región que se usó para la detección de bacterias fue la región V4 del gen ribosomal 16S; la secuencia de los primers que se usaron fue 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') y 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), provenientes del *Earth Microbiome Project* (Walters *et al.*, 2016). Para la detección de hongos se usó la región ITS2; los primers fueron ITS3F (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') e ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Toju *et al.*, 2012). La longitud de los amplicones fue de 291 pb para los amplicones 16S y de 350 pb para los amplicones ITS2. La secuenciación de 16S se realizó solicitando un mínimo de 20,000 lecturas, mientras que para los ITS se solicitó un mínimo de 10,000 lecturas.

2.1.3. Análisis bioinformáticos de los amplicones 16S e ITS

Las lecturas de amplicones 16S e ITS2 fueron proporcionadas por la compañía de secuenciación RTL Genomics en formato fastq, es decir, con una evaluación de calidad previamente hecha. Las lecturas fueron importadas al programa QIIME2 (Boyle *et al.*, 2019) en el formato CASAVA 1.8.

El filtrado de la calidad se realizó en el programa de DADA2 (Callahan *et al.*, 2016) incorporado en QIIME2 v. 2020.2.0 (Caporaso *et al.*, 2019). Las lecturas se truncaron hasta un valor de Phred de 20 (99% de precisión por base) como límite para realizar la limpieza y se retiraron los primeros 20 nucleótidos correspondientes a los primers usados en la secuenciación. Las lecturas filtradas fueron agrupadas en clusters de acuerdo con sus porcentajes de identidad, fijado para especie en un 97% mediante la herramienta DADA2 incorporada en QIIME2.

Posteriormente, se realizó la asignación taxonómica usando un clasificador Bayesiano ingenuo entrenado para las regiones 515F-806R e ITS2 para los amplicones 16S e ITS2, respectivamente (Pedregosa *et al.*, 2011). Para la clasificación taxonómica, se utilizaron las bases de datos SILVA v. 138 (Quast *et al.*, 2013) para los genes ribosomales 16S y UNITE v. 8.2 (Nilsson *et al.*, 2018) para los ITS.

Las secuencias 16S anotadas como cloroplastos y mitocondrias, al igual que los ITS anotados para *V. planifolia*, fueron eliminados. Previo a la eliminación, también se realizó una búsqueda en BLAST, para confirmar que se tratasen de secuencias no objetivo.

Las curvas de rarefacción y el cálculo de los índices ecológicos Chao1, Shannon (H') y equidad de Pielou, así como los gráficos PCA, fueron realizados en QIIME2 utilizando el plugin "diversity group significance".

La riqueza estimada se calculó usando la fórmula de Chao1 (Chao, 1984):

$$S_{Chao1} = S_{obs} + \frac{F_1(F_1 - 1)}{2(F_2 + 1)}$$

Donde S_{obs} es el número de OTUs observados, F_1 y F_2 son el conteo de OTUs con una secuencia y con dos secuencias, respectivamente. La diversidad de Shannon (Shannon & Weaver, 1949) se calculó con la fórmula:

$$H' = - \sum_{i=1}^S (p_i \ln p_i)$$

Donde S es la riqueza de OTUs, p_i es la proporción de la comunidad representada por el i -ésimo OTU. La equidad de Pielou se calculó con la siguiente ecuación (Pielou, 1966):

$$J' = \frac{H'}{\log_2 S}$$

Donde H' es el índice de Shannon, y $\log_2 S$ es la diversidad máxima que se obtendría si la distribución de las abundancias de los OTUs en la comunidad fuera perfectamente equitativa.

2.2. ESTABLECIMIENTO DE UNA METODOLOGÍA DE ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS DE *V. planifolia*

2.2.1. Efecto de la ventilación en el crecimiento y la multiplicación de *V. planifolia*

2.2.1.1. Obtención del material vegetal

El material vegetal inicial fue provisto por el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Ingeniería química y bioquímica del Instituto Tecnológico de Mérida. La variedad usada fue *Vanilla planifolia* (Andrews) morfotipo “Mansa”, obtenida de los cultivares de la región del Totonacapan y la región del sur del estado de Veracruz.

2.2.1.2. Preparación de los tratamientos

Se establecieron dos líneas de cultivo *in vitro*, una línea destinada al desarrollo de plantas completas de *V. planifolia*, y otra con la finalidad de obtener brotes múltiples. En ambas líneas, se buscó evaluar el efecto de la ventilación en el desarrollo de las plantas y en la tasa de multiplicación; así como el efecto del volumen del contenedor en el crecimiento y el desarrollo de brotes.

En ambas líneas se utilizó el medio de cultivo de sales de MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con 50 mg/l de myo-inositol, 2.5 mg/l de tiamina-HCl, 12.5 mg/l de cisteína-HCl y 15 g/l de sacarosa. El pH del medio se ajustó a 6.2 con la adición de NaOH 1M o HCl 1M, se añadió 2.5 g/l de Phytigel como agente gelificante. Para la obtención de brotes múltiples, se agregó, adicionalmente, 2 mg/l de 6-bencil aminopurina (BAP). Los medios de cultivo fueron dispensados en los diferentes frascos y esterilizados a 121 °C, 1 kg/cm² por 15 minutos.

Los tratamientos evaluados se presentan en la tabla 2.1. El sistema ventilado consistió en hacer un agujero (de 2 cm de diámetro) en la cara frontal de las tapas de los frascos, posterior a ello, se cubrió con cuatro capas de cinta microporo entrecruzadas de acuerdo con Saldanha *et al.* (2012). Para el estudio del efecto del volumen en el desarrollo de plántulas y de brotes múltiples, se probaron dos tipos de frascos, unos de 7 cm y otros de 20 cm de alto (Figura 2.5).

En todos los tratamientos, el explante utilizado consistió en un segmento nodal (de aproximadamente 1 cm de largo), al cual se le retiró las raíces y un 75 % de la hoja, los explantes se mantuvieron en incubación a 25 ± 3 °C, con un fotoperiodo de 16 horas luz.

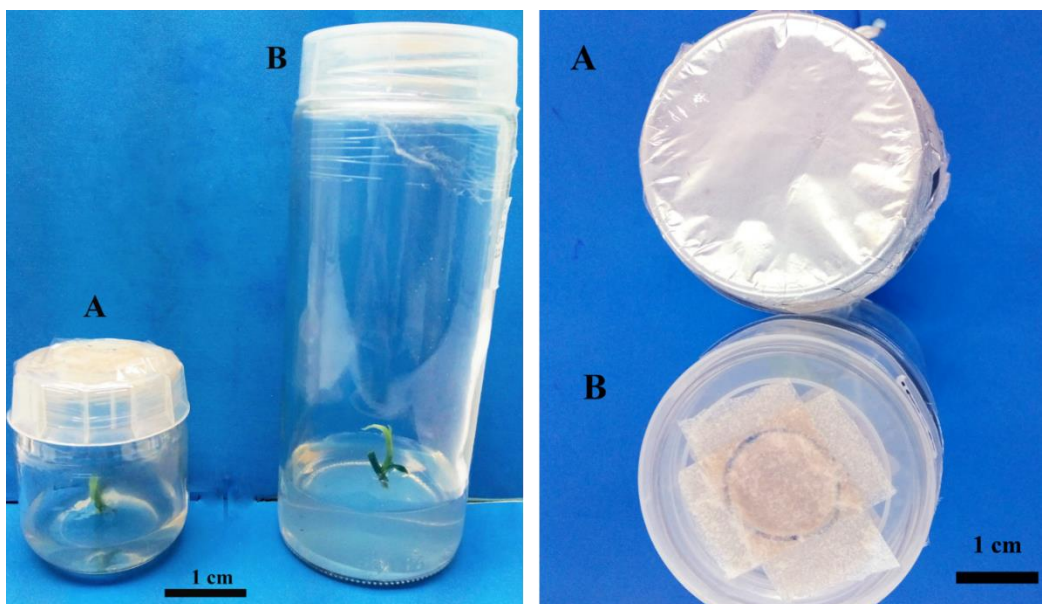


Figura 2.5. Tratamientos utilizados en las líneas de crecimiento y de multiplicación. En la imagen izquierda: A) Frasco de 7 cm de altura; B) Frasco de 20 cm de altura. En la imagen de la derecha: A) Sistema cerrado con una tapa de papel aluminio; B) Sistema ventilado con las capas de cinta microporo (vista superior).

Tabla 2.1. Tratamientos establecidos para las líneas de crecimiento y multiplicación de plántulas *in vitro* de *V. planifolia*.

Tratamiento	Descripción
Control cerrado (CC)	Frasco de 7 cm de longitud con una tapa de papel aluminio
Control ventilado (CV)	Frasco de 7 cm de longitud con el sistema ventilado de microporo
Cajetero cerrado (CajC)	Frasco de 20 cm de longitud con una tapa de papel aluminio
Cajetero ventilado (CajV)	Frasco de 20 cm de longitud con el sistema ventilado de microporo

Las plantas fueron monitoreadas por 90 días evaluando los siguientes parámetros: 1) número de hojas; 2) número de raíces y brotes; 3) altura alcanzada y 4) la calidad de las plántulas (no presencia de clorosis o necrosis).

2.2.2. Aclimatación de plántulas de *V. planifolia*

Se partió de un lote inicial de 20 plántulas *in vitro*, en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) sin reguladores de crecimiento, de 5 a 10 cm y, al menos 4 hojas verdaderas. Estas plántulas fueron sometidas a un proceso de pre-adaptación.

2.2.2.1. Proceso de pre-adaptación *in vitro* de las plántulas de *V. planifolia*

Se realizó un proceso de pre-adaptación *in vitro* de las plántulas de *V. planifolia*, con la finalidad de propiciar el intercambio gaseoso entre la planta y el medio ambiente, y así disminuir el nivel de humedad relativa, y favorecer el desarrollo de nuevas estructuras con una mayor capacidad fotosintética.

Para ello, las plántulas, fueron puestas en contenedores (de 20 cm de alto) ventilados con un filtro de microporo en la tapa. Se realizaron agujeros de 2 cm de diámetro en el centro de las tapas, y los filtros se situaron en las caras externas e internas, para evitar posibles contaminaciones del medio ambiente.

Las plántulas permanecieron en estas condiciones hasta alcanzar 25 cm de altura, desarrollar hojas nuevas y que al menos posean 4 raíces (dos ancladas al sustrato y dos aérea). Las condiciones de incubación fueron: 25 °C ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas luz, por un tiempo estimado de 5 meses, hasta cumplir con las características deseadas para pasar al proceso de aclimatación.

2.2.2.2. Medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) a una concentración de sales del 50%, adicionado con 6 g/L de sacarosa, 100 mg/L de myo-inositol, 5 mg/L de tiamina-HCl y 25 mg/L de cisteína-HCl. El pH del medio se ajustó a 6.2 con la adición de NaOH 1M o HCl 1M según lo requiera, y se gelificó con 2.5 g/L de Phytigel. El medio de cultivo se esterilizó a 121 °C a 1 kg/cm² por 15 minutos.

2.2.2.3. Aclimatación de plántulas pre-adaptadas de *V. planifolia*

La aclimatación se realizó siguiendo el protocolo modificado de Reyes, (2016). Las plántulas fueron sembradas en recipientes de plástico transparente de un litro de capacidad. Como sustrato se utilizó una mezcla de musgo turboso, agrolita y tierra (35:35:30 en volumen) el cual

se esterilizó durante 25 min en autoclave a 121 °C a 1 kg/cm². Posterior a ello, el sustrato estéril fue secado en una estufa Pasteur a 125 °C por 30 minutos. Los recipientes se llenaron con 500 mg de sustrato. Como tutor se utilizaron varas de plástico.

Las plántulas en pre-adaptación *in vitro* fueron retiradas del contenedor, con la ayuda de pinzas estériles y se lavaron las raíces con agua destilada estéril para remover los excesos de medio y minimizar el riesgo de contaminación por bacterias u hongos.

Las plántulas se trasplantaron en los contenedores con el sustrato estéril, con una profundidad de 3 a 5 cm., dependiendo del tamaño de estas. Se cubrieron los recipientes con bolsas de nylon transparente y se aseguraron con ligas (Figura 2.6). Las plantas se pusieron en invernadero a una temperatura de 26.5° C + 0.5 °C.



Figura 2.6. Fotografía donde se muestran las plantas de *V. planifolia* en aclimatación al primer día.

Durante el transcurso del tiempo en aclimatación, se llevaron a cabo las siguientes actividades:

- 5 días posteriores a la siembra, se realizaron micro perforaciones a la bolsa con la ayuda de una aguja.
- 10 días después de la siembra, se regaron las plantas con agua estéril. Las bolsas se retiraron durante 20 min. y se realizaron dos perforaciones de 8.5 mm a cada bolsa de nylon.

- 12 días posteriores a la siembra, se procedió a realizar otras dos perforaciones de 8.5 mm, a cada bolsa de nylon, y se dejaron destapadas durante 60 min.
- 17 días después de la siembra las bolsas fueron retiradas durante 90 min, y se realizaron 4 perforaciones a las bolsas de nylon.
- 23 días después de la siembra se retiraron las bolsas durante 120 min, y las bolsas de nylon fueron perforadas dos veces más
- A los 30 días posteriores de la siembra se retiraron de forma definitiva las bolsas de nylon y los riegos se mantuvieron cada 24 horas, por aspersion de agua destilada. Las plantas permanecieron en este estadio por 3 meses.

Se realizaron monitoreos del tamaño, número de hojas y raíces de las plantas a lo largo de su periodo de aclimatación.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS ENDÓFITAS EN POBLACIONES SILVESTRES Y COMERCIALES DE *V. planifolia*

3.1.1. Extracción del ADN metagenómico de *V. planifolia*

En la figura 3.1 se muestra el ADN aislado de los órganos de las plantas silvestres en una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Como se puede apreciar, en todos los casos se obtuvo una banda de ADN compacta (mayor a 20 kb) que muestra que el ADN está íntegro.

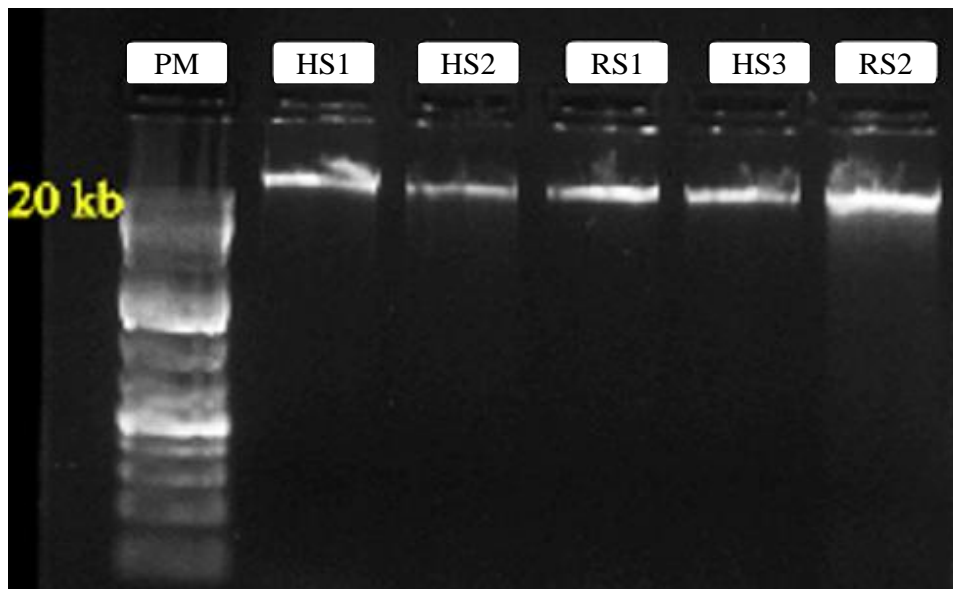


Figura 3.1. Imagen del ADN extraído de las muestras de hoja y raíz de *V. planifolia* silvestre. Abreviaturas: PM, Marcador de peso molecular; HS1 hoja de la planta 1; HS2 hoja de la planta 2; HS3 hoja de la planta 3; RS1 raíz de la planta 1; RS2 raíz de la planta 2. La raíz de la planta 3 no se muestra en la imagen.

Por otro lado, en la figura 3.2 se observa el gel con las muestras de ADN de las plantas comerciales, que al igual que en las silvestres, la integridad fue muy buena. El ADN metagenómico extraído de las muestras provenientes de las poblaciones silvestres mostró poca degradación, y en las muestras de raíces se detectó contaminación fenólica, seguramente debido al alto contenido de metabolitos presentes en las raíces.

Aún con ello, esto no interfirió en el proceso de amplificación y secuenciación de las muestras. Por otro lado, el ADN metagenómico extraído de las muestras de poblaciones comerciales presentó un poco de contaminación por ARN, como se aprecia en la figura 3.2. Sin embargo, se observó también una banda sólida de ADN en el gel, denotando que las muestras estaban íntegras.

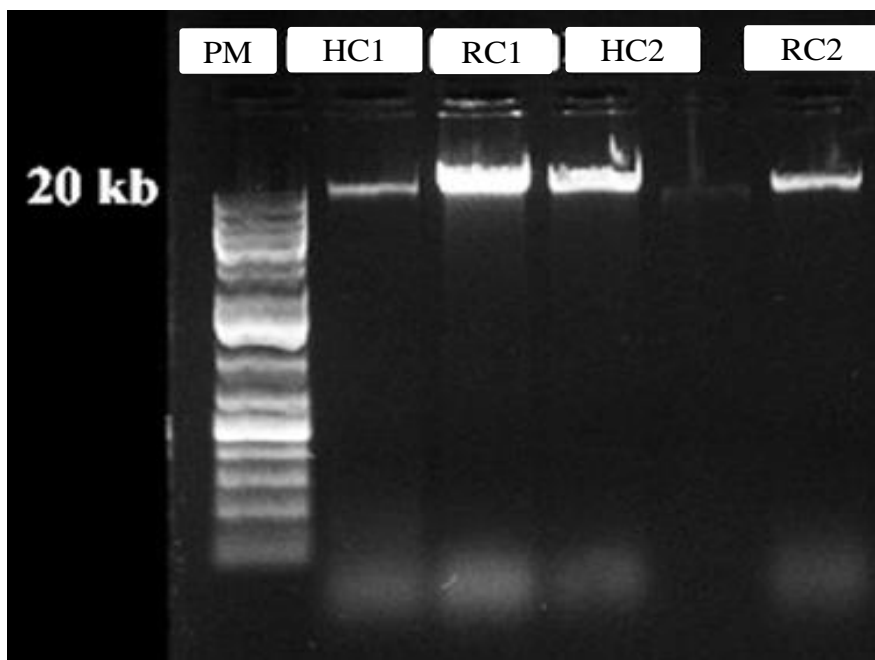


Figura 3.2. Imagen del ADN extraído de las muestras de hoja y raíz de *V. planifolia* comercial. Abreviaturas: PM, Marcador de peso molecular; HC1 hoja de la planta 1; RC1 raíz de la planta 1; HC2 hoja de la planta 2; RC2 raíz de la planta 2. Las muestras de hoja y raíz de la planta 3 no se muestran en la imagen.

Posteriormente a la electroforesis, se realizó un análisis de calidad del ADN extraído usando un equipo de Nanodrop 2000. El ADN fue cuantificado y sus relaciones 260/280 y 260/230 fueron calculadas (Tabla 3.1). De acuerdo con los resultados de calidad, se seleccionaron un total de 6 muestras (3 de *V. planifolia* silvestre y 3 de *V. planifolia* comercial) para ser enviadas a secuenciar. El criterio de elección se basó en la concentración de ADN, así como un valor mínimo de 1.9 para la relación 260/280 y 2 para la relación 260/230.

Las relaciones 260/280 y 260/230 presentaron valores de 1.8 a 2, esto indica que la muestra no está contaminada con carbohidratos. Por lo tanto, las muestras de ADN son adecuadas para la

secuenciación. De igual forma que en las comerciales, las muestras de raíces silvestres presentaban contaminación por compuestos fenólicos a juzgar por su relación 260/230.

Tabla 3.1. Valores de concentración de ADN y relación de absorbancia 260/280 y 260/230 para las muestras de ADN metagenómico de las plantas silvestres y comerciales de *V. planifolia*. Los datos se obtuvieron con un equipo de Nanodrop 2000. Abreviaturas: HC hojas de poblaciones comerciales. HS hojas de poblaciones silvestres. RC raíz de poblaciones comerciales de las plantas. RS raíz de poblaciones silvestres.

Muestra	Concentración ADN (ng/ μ l)	A 260/280	A 260/230
HS1	240.7	1.99	2.23
HS2	154.5	2.08	1.94
HS3	211.3	2.03	2.03
RS1	250.2	1.79	1.58
RS2	742.1	1.6	1.03
RS3	164.6	1.69	2.05
HC1	207	2	2.23
HC2	216	1.94	2.27
HC3	215.3	1.89	2.18
RC1	230	1.95	2.31
RC2	199.7	2.06	2.11
RC3	212	2.1	2.09

3.1.2. Análisis general de las secuencias

En total se analizaron 24 grupos de secuencias, 12 para 16S y 12 para ITS2, correspondientes a las comunidades bacterianas y fúngicas respectivamente. El número total de secuencias crudas de 16S analizadas fue de 708,185, y el número de secuencias por muestra estuvo en un intervalo de 37,711 (RS1) a 69,010 (HC2) (Tabla 3.2). Por otro lado, el número total de secuencias crudas de ITS fue de 386,823, y el número de secuencias por muestra estuvo entre 22,171 (HC1) y 88,527 (RS1) (Tabla 3.3).

Tabla 3.2. Resultados del filtrado de las secuencias 16S utilizando el programa DADA2, con una calidad de Phred igual o mayor a 20. Abreviaturas: ID, identificador de la muestra; HS, hojas de poblaciones silvestres; RS, raíz de poblaciones silvestre; HC, hojas de poblaciones comerciales; RC, raíz de poblaciones comerciales.

ID	Número de secuencias crudas	Número de secuencias filtradas	Porcentaje de secuencias filtradas	Número de secuencias filtradas para cloroplastos y mitocondrias
HS1	65,414	48,522	74.2	3,030
HS2	51,975	39,244	75.5	2,442
HS3	57,444	41,061	71.5	2,572
RS1	37,711	25,562	67.8	2,563
RS2	59,447	42,728	71.9	2,602
RS3	67,705	47,086	69.6	2,970
HC1	63,843	47,582	74.5	2,936
HC2	69,010	51,062	73.9	3,150
HC3	66,836	49,348	73.9	3,048
RC1	53,047	39,313	74.1	2,411
RC2	56,663	40,633	71.7	2,507
RC3	59,090	43,707	74	2,702

Las secuencias fueron recortadas hasta la posición que tenía un valor de Phred mínimo de 20 y se eliminaron las secuencias quiméricas, *primers* y etiquetas. Los resultados de la limpieza se resumen en las tablas 3.2 (16S) y 3.3 (ITS2), en donde se muestra el número de secuencias crudas que ingresaron, el número de secuencias retenidas por el filtro y el porcentaje de secuencias que pasaron el filtro. Las muestras se denotan como C o S según su fuente, ya sea comerciales o silvestres, respectivamente. Mientras, la etiqueta H hace referencia a las hojas y R a las raíces.

Tabla 3.3. Resultados del filtrado de las secuencias ITS utilizando el programa DADA2, con una calidad de Phred igual o mayor a 20. Abreviaturas: ID, identificador de la muestra; HS, hojas de poblaciones silvestres; RS, raíz de poblaciones silvestre; HC, hojas de poblaciones comerciales; RC, raíz de poblaciones comerciales.

ID	Número de secuencias crudas	Número de secuencias filtradas	Porcentaje de secuencias filtradas	Número de secuencias filtradas para ITS2 de <i>V. planifolia</i>
HS1	24,589	13,848	56.3	1,420
HS2	25,288	12,886	51.0	1,302
HS3	25,188	16,221	64.4	1,705
RS1	88,527	55,527	62.7	3,467
RS2	26,971	20,857	77.3	2,139
RS3	22,713	15,882	69.9	1,627
HC1	22,171	12,392	55.9	1,260
HC2	31,494	16,743	53.2	1,780
HC3	31,421	16,724	53.2	1,690
RC1	30,367	18,758	61.8	1,869
RC2	28,872	19,849	68.8	2,010
RC3	29,222	18,097	61.9	1,914

Como se puede apreciar comparando las tablas 3.2 y 3.3, se obtuvo una menor cantidad de secuencias crudas en las muestras de hongo (22,171 – 88,527) y un porcentaje más bajo en aquellas que pasaron el filtro (51% – 77.3%), que en la de bacterias, siendo el valor más bajo hallado en la muestra HS2. Esto se debe a una cantidad menor de secuencias solicitadas para los hongos. Sin embargo, este resultado no interfirió en el análisis de diversidad pues, como se comentará más adelante, en las curvas de rarefacción se apreció que la profundidad de la secuenciación fue suficiente.

3.1.3. Rarefacción e índices ecológicos

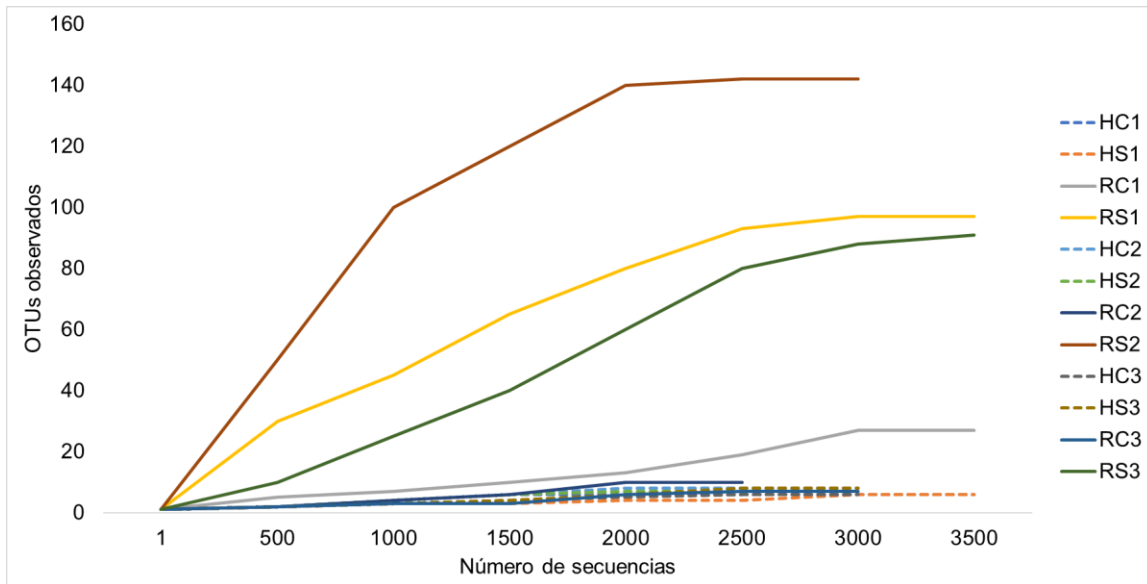
Después de la limpieza, los OTUs se agruparon con un 3% de disimilitud y después se retiraron las secuencias clasificadas como cloroplastos y mitocondrias. Para cada uno de los sets de secuencias de las plantas muestreadas, se realizó una curva de rarefacción, misma que se presenta en la figura 3.3, para las comunidades bacterianas (figura 3.3 A) y las comunidades fúngicas (figura 3.3 B). Como se puede apreciar en las gráficas, en todos los casos las curvas tienden hacia una pendiente igual a cero, es decir, una tendencia horizontal. Esto indica que, con la profundidad con la que se secuenciaron las muestras, fue suficiente para abarcar prácticamente a todos los OTUs presentes en cada una de las comunidades microbianas.

En la tabla 3.4 se presentan los índices ecológicos para cada muestra. La similitud entre los OTUs observados y la riqueza estimada, dada por el estimador Chao1, sugiere que todas las especies endófitas existentes en las muestras, tanto bacterianos como fúngicas; estos resultados, fueron capturados.

Tabla 3.4. Índices ecológicos al 3% de disimilitud para cada uno de los amplicones 16S e ITS2. Abreviaturas: HS, hoja silvestre; RS, raíz silvestre; HC, hoja comercial; RC, raíz comercial.

Muestra	16S				ITS2			
	#OTU	Chao1	Shannon (H')	Equidad	#OTU	Chao1	Shannon (H')	Equidad
HS1	6	6	2.6	1.0	12	12	1.3	0.3
HS2	7	7	2.6	0.9	8	8	1.1	0.4
HS3	8	8	2.6	0.9	9	9	1.1	0.3
RS1	95	95	4.5	0.8	90	90	4.6	0.7
RS2	142	142	5.5	0.8	84	84	4.4	0.7
RS3	91	91	4.6	0.7	85	85	4.6	0.7
HC1	6	6	2.6	0.9	7	7	1	0.3
HC2	8	8	2.6	0.8	7	7	1.1	0.4
HC3	6	6	2.6	0.9	9	9	1.2	0.3
RC1	27	27	3.2	0.7	22	22	1.2	0.3
RC2	10	10	2.7	0.8	15	15	1.2	0.3
RC3	7	7	2.6	0.9	11	11	1.2	0.3

A)



B)

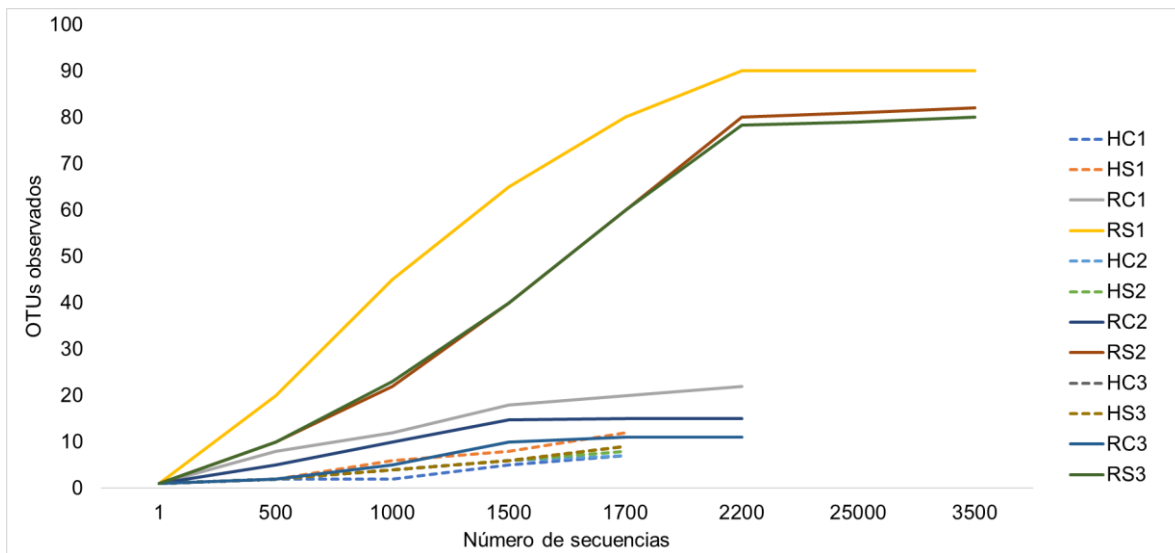


Figura 3.3. Curvas de rarefacción para las muestras de *V. planifolia*. A) Comunidades bacterianas, B) Comunidades fúngicas. HC hojas de poblaciones comerciales. HS hojas de poblaciones silvestres. RC raíz de poblaciones comerciales de las plantas. RS raíz de poblaciones silvestres.

En términos generales, el índice de Shannon (H') sugiere que las raíces poseen una mayor diversidad de especies microbianas (tanto procariontas como eucariotas) endófitas comparadas con las hojas. Las raíces silvestres fueron las que mayor diversidad mostraron, con un valor promedio de 4.9 ± 0.5 (16S) y 4.6 ± 0.1 (ITS2), comparado con los valores promedio para las

raíces comerciales: 2.8 ± 0.01 (16S) y 1.2 ± 0.02 (ITS2); también presentan una mayor riqueza de especies.

3.1.4. Análisis de la estructura de las comunidades bacterianas

Posteriormente a la limpieza de las secuencias, se realizó una clasificación taxonómica usando las bases de datos de SILVA y UNITE, en el programa QIIME2. Cabe recalcar que cerca del 95% de las secuencias 16S en las hojas pertenecieron a cloroplastos y mitocondrias, por lo que estas secuencias fueron eliminadas al momento de hacer los análisis. De la misma forma, en las secuencias ITS, se eliminó cerca del 90% de las secuencias debido a que provenían de la región ITS2 de *V. planifolia*. En la figura 3.4 se presenta la gráfica de abundancia relativa a nivel fílum para las comunidades bacterianas.

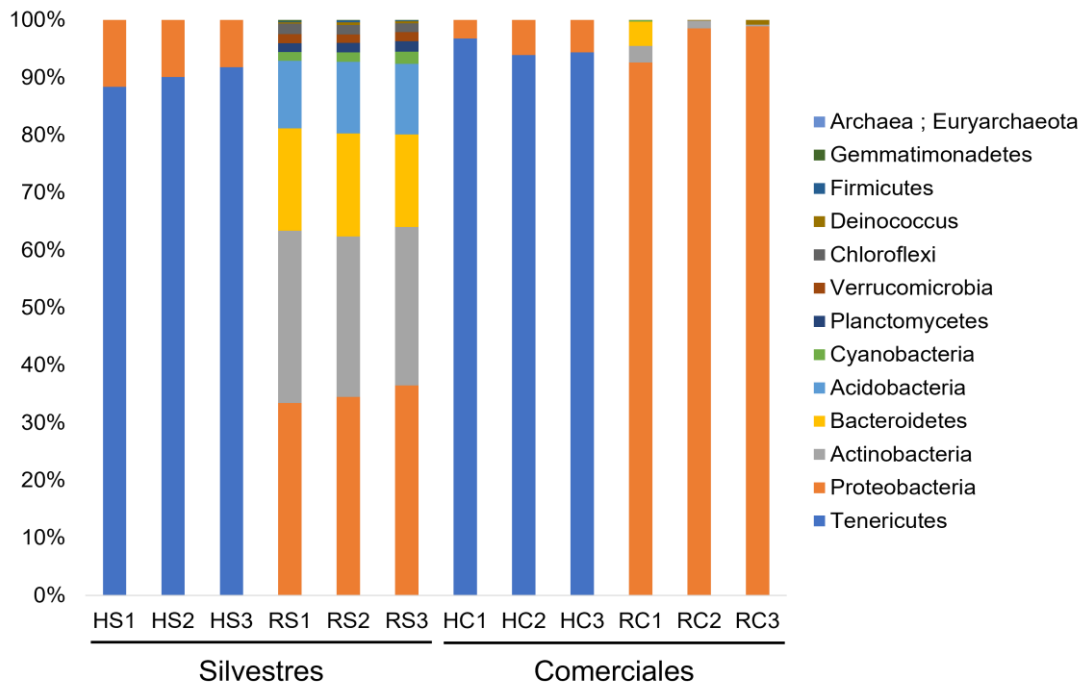


Figura 3.4. Gráfica de abundancias relativas al 20% de disimilitud (fílum) para las comunidades bacterianas. Se presenta todos los fila identificados. Abreviaturas: HS hojas de poblaciones silvestres. RC raíz de poblaciones comerciales de las plantas. RS raíz de poblaciones silvestres.

En las hojas, tanto de poblaciones silvestres como comerciales, el fílum más abundante fue Tenericutes (88 – 91%) seguido por Proteobacteria (8 – 11%). En las raíces, también tanto de

las poblaciones silvestres como comerciales, el fílum más abundante fue Proteobacteria (33 – 92%). Sin embargo, en las raíces de las plantas silvestres, el segundo fílum más abundante fue Actinobacteria (30 – 33%) seguido por Bacteroidetes (16 – 18%) y Acidobacteria (10 – 12%).

En cambio, en las raíces de las plantas comerciales, el segundo fílum más abundante fue Actinobacteria (4 – 2%) y sólo en la muestra RC1 se encontró el fílum Bacteroidetes (5%).

Cabe destacar que en la raíz de una de las plantas silvestres (RS3) se encontró un fílum perteneciente a Arqueas (Euryarcheota) en una abundancia menor al 1%. Esto no es de extrañar, ya que se ha reportado la presencia de arqueas como endófitos de raíz en otras plantas, como en *Beta vulgaris* (Shi *et al.*, 2015), *Phragmites australis* (Ma *et al.*, 2013), *Olea europea* (Müller *et al.*, 2015), *Oryza sativa* (Peng *et al.*, 2021; Sun *et al.*, 2008) y *Zea mays* (Avangberro y Babalola, 2020; Cheltus y Triplett, 2001).

En cuanto a las poblaciones comerciales, en las hojas, al igual que en las hojas silvestres, el fílum con mayor abundancia fue Tenericutes (93 – 96%) seguido por Proteobacteria (3 – 6%). En el tejido de raíz de las poblaciones comerciales, el fílum Proteobacteria fue el más abundante (92 -96%), seguido por Actinobacteria (1 – 2%) y Bacteroidetes (1 – 3%).

En la figura 3.5 se muestra la gráfica de abundancias relativas a nivel de especie para las comunidades bacterianas endófitas analizadas. El término “otros” engloba a todas las especies procariotas encontradas en una proporción menor al 1%. Las etiquetas HSm, RSm, HCm y RCm hacen referencia al promedio de las tres muestras, con un error estándar menor al 1%.

Como se puede observar, en las hojas, tanto en las poblaciones silvestres como en las comerciales, la especie bacteriana más abundante fue *Candidatus Phytoplasma* (“Sugarcane phytoplasma”), al cual, por simplicidad, nos referiremos como fitoplasma. Sin embargo, en las hojas de plantas silvestres su abundancia fue menor (57 – 87%) que en las comerciales (93 – 97%).

La segunda especie más abundante en las hojas silvestres y comerciales fue *Sphingomonas* sp (fílum Proteobacteria, clase Alphaproteobacteria). Su abundancia fue mayor en las hojas silvestres (12 – 38%) que en las comerciales (3 – 6%). En la muestra HS1 se encontró una tercera especie bacteriana con abundancia mayor al 1%, *Pseudonocardia* sp, (fílum Actinobacteria, clase Actinobacteria) con una abundancia del 8%; esta especie no se encontró

en las demás muestras de hojas (con un abundancia relativa mayor al 1%), incluyendo a las hojas de la población comercial.

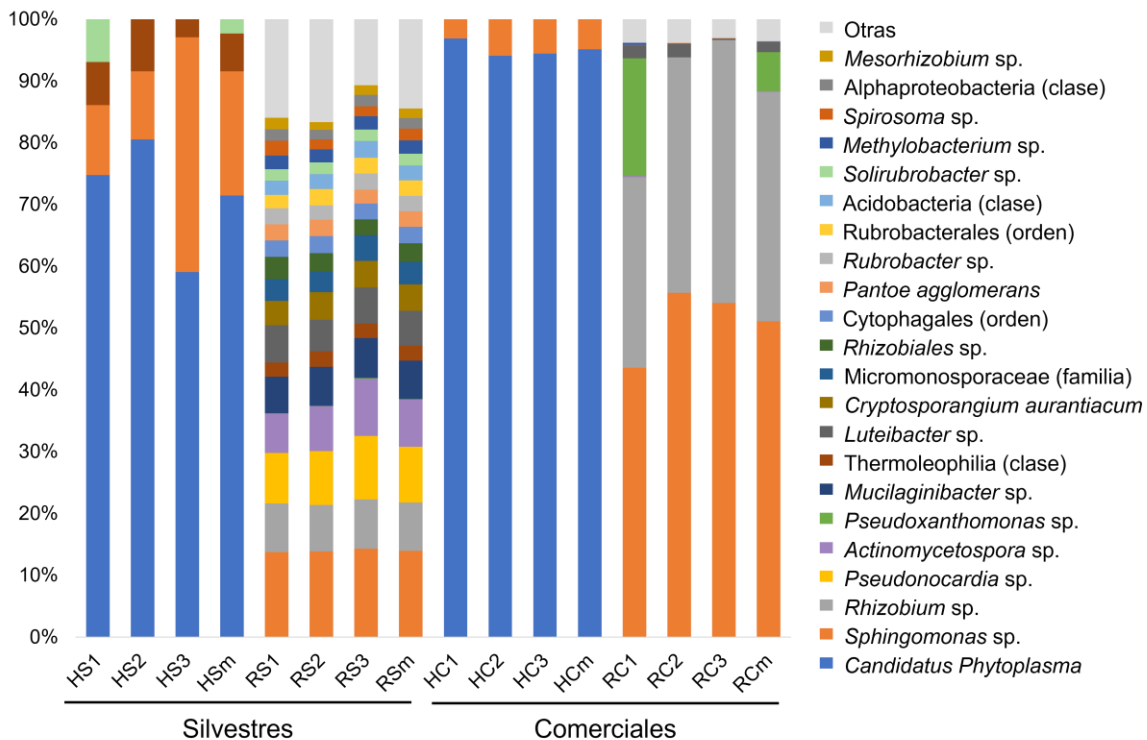


Figura 3.5. Gráfica de abundancias relativas al 3% de disimilitud (especie) para las comunidades bacterianas. Solamente se incluyen las especies con un porcentaje mayor al 1%. Abreviaturas: HS hojas de poblaciones silvestres. RC raíz de poblaciones comerciales de las plantas. RS raíz de poblaciones silvestres. La etiqueta “m” hace referencia al promedio de las tres muestras.

En las raíces de la población silvestre, la especie *Spingomonas* sp fue la especie bacteriana con mayor abundancia (12 – 16%), seguido por *Pseudonocardia* sp (8 – 12%), *Actinomycetospora* sp (fílum Actinobacteria, clase Actinobacteria) con una abundancia del 4 – 9%, y la cuarta especie bacteriana más abundante fue *Rhizobium* sp (fílum Proteobacteria, clase Alphaproteobacteria) con una abundancia del 7 – 9%.

En las raíces de la población comercial, *Spingomonas* fue la especie bacteriana con mayor abundancia (43 – 56%). Llama la atención que esta especie fue la única que se identificó (con un porcentaje mayor al 1%) en todas las muestras de *V. planifolia*. Esto apunta a que podría tratarse de un endófito ubicuo en la endosfera de las poblaciones de *V. planifolia*, siendo un

componente esencial en la estructura de su comunidad bacteriana; aunque se requiere más investigación para corroborar esta hipótesis. La segunda especie más abundante en las raíces comerciales fue *Rhizobium* (31 – 34%), seguido por *Luteibacter* sp (filum Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria) con una abundancia del 2 – 3%. En la muestra RC1 se encontró la especie *Pseudoxanthomonas* sp (filum Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria) en una abundancia del 18%.

3.1.4. Análisis de la estructura de las comunidades fúngicas

En la figura 3.6 se presenta la gráfica de abundancias relativas a nivel filum para las comunidades fúngicas. El filum más abundante en todas las muestras fue Ascomycota con proporciones variables: hojas silvestres (79 – 93%), raíces silvestres (74 – 77%), hojas comerciales (81 – 98%) y raíces comerciales (88 – 97%). El segundo filum presente en las muestras fue Basidiomycota, siendo más abundante en las raíces silvestres (26 – 23%) comparado con los demás tejidos, siendo su abundancia del 2% al 11%.

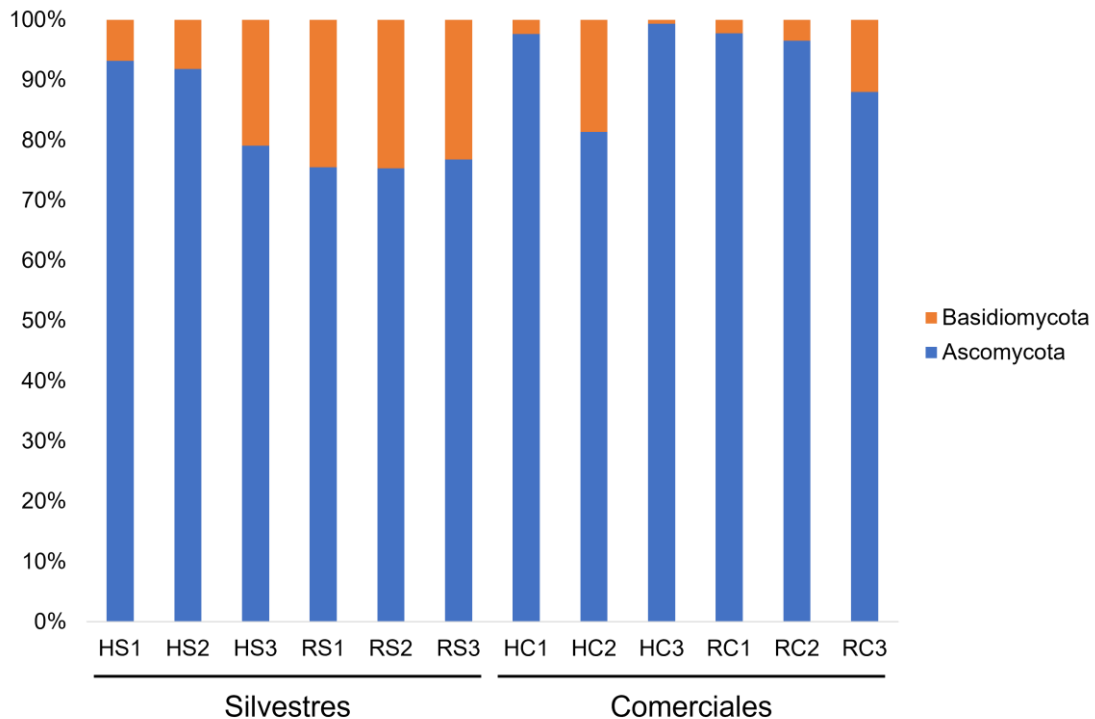


Figura 3.6. Gráfica de abundancias relativas al 20% de disimilitud (filum) para las comunidades fúngicas. Se presenta todos los fila identificados. Abreviaturas: HS hojas de poblaciones silvestres. RC raíz de poblaciones comerciales de las plantas. RS raíz de poblaciones silvestres.

En la figura 3.7 se presenta la gráfica de abundancias relativas a nivel especie para las comunidades fúngicas. El término “otros” hace referencia a las especies que se identificaron con una proporción menor al 1%. De igual forma, las etiquetas HSm, RSm, HCm y RCm hacen referencia al promedio de las tres muestras, con un error estándar menor al 1%.

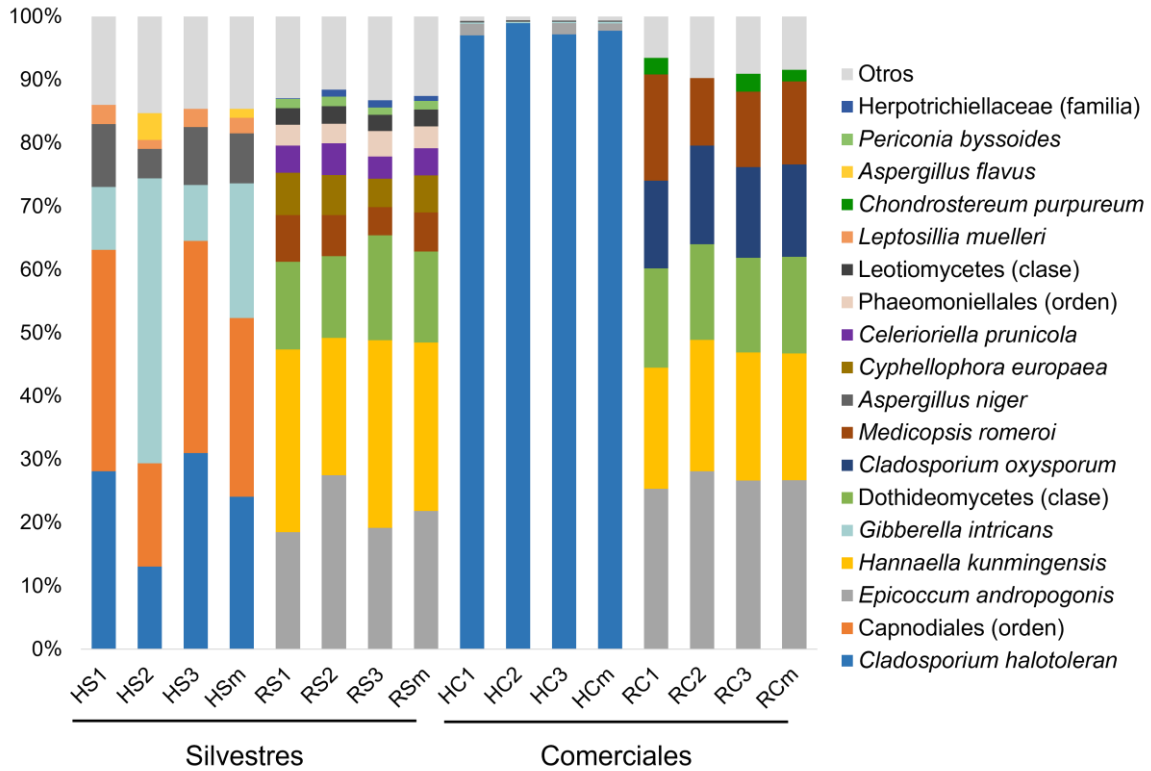


Figura 3.7. Gráfica de abundancias relativas al 3% de disimilitud (especie) para las comunidades fúngicas. Solamente se incluyen las especies con un porcentaje mayor al 1%. Abreviaturas: HS hojas de poblaciones silvestres. RC raíz de poblaciones comerciales de las plantas. RS raíz de poblaciones silvestres. La etiqueta “m” hace referencia al promedio de las tres muestras.

En las hojas silvestres, la especie más abundante (muestras HS1 y HS3) fue *Cladosporium halotolerans* (fílum Ascomycota, clase Dothideomycetes) en una proporción del 13 – 32%, seguido por *Gibberella intricans* (fílum Ascomycota, clase Sordariomycetes) con una abundancia relativa de 8 – 9%. En contraposición, en la muestra HS2 se observa que la especie más abundante fue *Gibberella intricans* (45%) seguido por *C. halotolerans* (13%).

Por otro lado, la especie fúngica más abundante en las hojas comerciales fue *C. halotolerans* (96 – 98%), seguido por *Epicoccum andropogonis* (fílum Ascomycota, clase Dothideomycetes)

en una proporción del 1 – 2%. Cabe resaltar que la especie *C. halotolerans* no fue encontrada en ninguna de las muestras de raíces (ni comerciales o silvestres), sugiriendo que esta especie es ubicua en las hojas de *V. planifolia* y no está presente en las raíces.

En las raíces silvestres, la especie más abundante fue *Hannaella kummingensis* (filum Basidiomycota, clase Tremellomycetes) en una proporción del 22 – 28%. La segunda especie más abundante fue *Epicoccum andropogonis* (17 – 28%), la tercera especie con mayor abundancia es un miembro de la clase *Dothideomycetes* (13 – 15%).

La especie más abundante en las raíces comerciales fue *E. andropogonis* (25 – 28%), especie que también se presentó en las raíces silvestres, pero no en las hojas; esto sugiere que se trata de una especie ubicua en la endosfera de las raíces de *V. planifolia*, aunque se requiere de más investigación para validar esta premisa. La segunda especie más abundante en las raíces comerciales fue *Hannaella kummingensis* (18 – 20%). La tercera especie con mayor proporción fue *Cladosporium oxysporum* (filum Ascomycota, clase Dothideomycetes) en una proporción de 14 al 16%. Cabe resaltar que *Aspergillus niger* (filum Ascomycota, clase Eurotiomycetes) se encontró en todas las muestras con una abundancia relativa mayor al 1%.

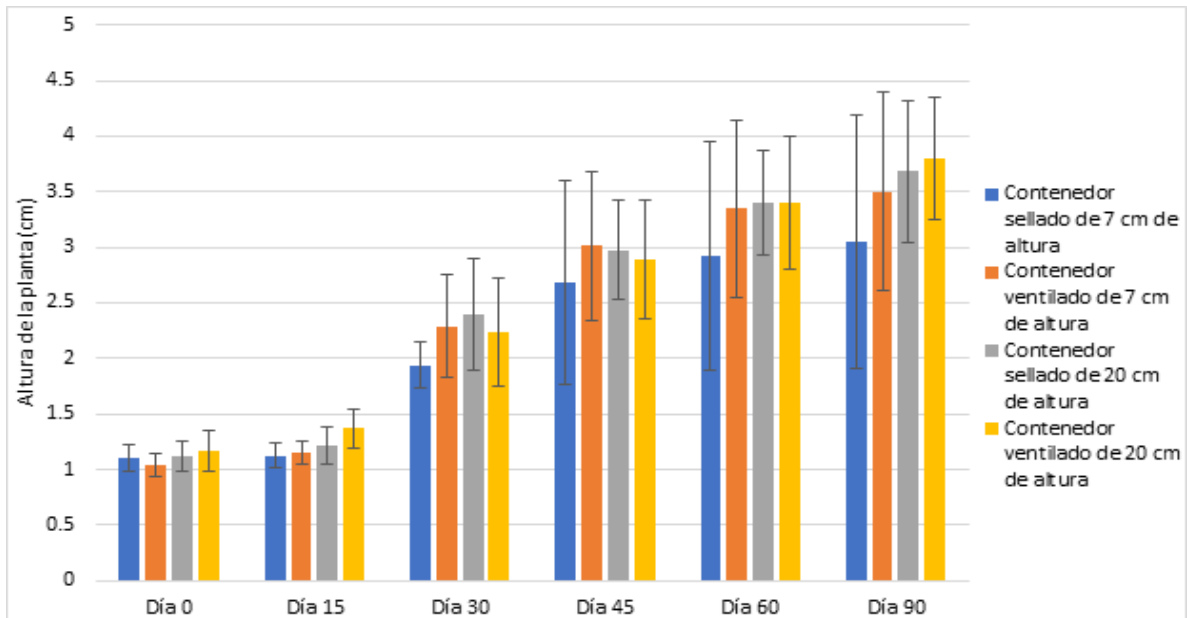
3.2. ESTABLECIMIENTO DE UNA METODOLOGÍA DE ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS DE *V. planifolia*

3.2.1. Efecto de la ventilación en el crecimiento y la multiplicación de *V. planifolia*

Se probaron cuatro tratamientos para evaluar el efecto de la ventilación y el volumen del contenedor en el desarrollo de las plántulas de *V. planifolia*, así como la tasa de producción de brotes. Los tratamientos fueron: frasco de 7 cm de alto con tapa de papel aluminio (sistema cerrado, CC); frasco de 7 cm de alto con tapa ventilada por cintas de microporo (sistema ventilado, CV); frasco de 20 cm de alto con tapa de papel aluminio (sistema cerrado, mayor volumen, CajC); y finalmente un frasco de 20 cm de alto con tapa ventilada por cintas de microporo (sistema ventilado, mayor volumen, CajV).

En la figura 3.8 se muestra el desarrollo de las plántulas a lo largo de los 90 días de cultivo. En la figura 3.8A se observa el crecimiento (altura en cm) de las plántulas de *V. planifolia*. La presencia de un sistema ventilado, así como también la disponibilidad de un mayor volumen que mejoró el desarrollo de las plántulas.

A)



B)

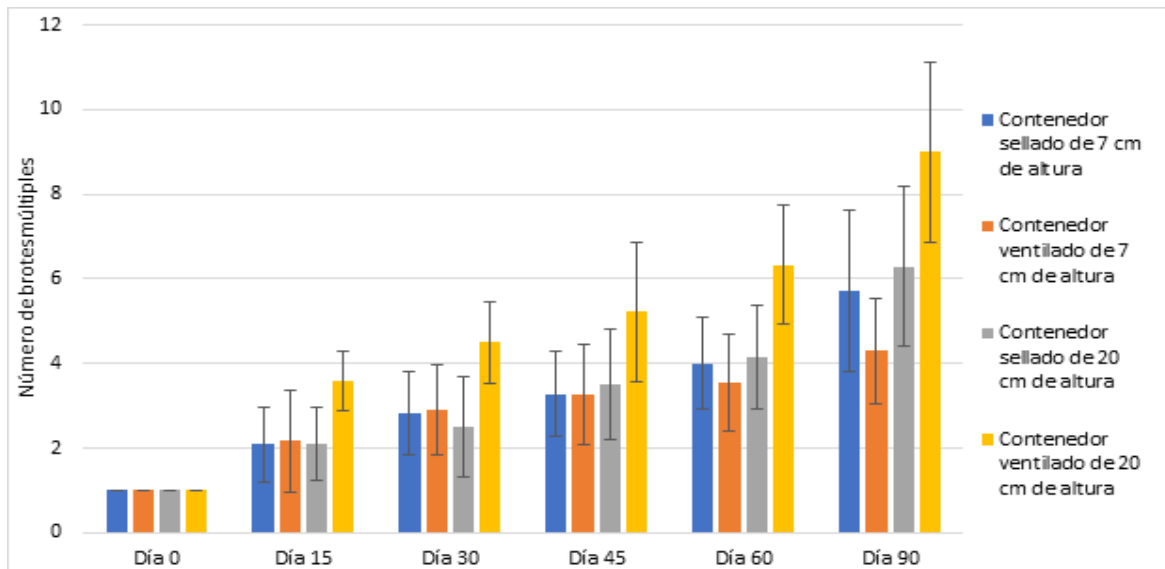


Figura 3.8. Desarrollo de las plántulas *in vitro* de *V. planifolia* en los días 0, 15, 30, 45, 60 y 90. A) Crecimiento de las plántulas en los diferentes tratamientos evaluados; B) Desarrollo de brotes múltiples en los diferentes tratamientos.

Al cabo de los 15 días de incubación, se observa un mejor crecimiento en los sistemas ventilados, así como en los frascos de mayor altura (20 cm). Esta tendencia se conservó hasta

el día 90. Realizando un análisis de Tukey ($p < 0.05$) no se observa una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos evaluados.

Si embargo, la mayor diferencia se observa en el desarrollo morfológico de las plántulas (Figura 3.9) donde se puede apreciar la mejora que otorgan los sistemas ventilados. De manera particular, los sistemas ventilados mostraron un mejor desarrollo en las raíces de las plántulas de *V. planifolia*, así como un mayor vigor.

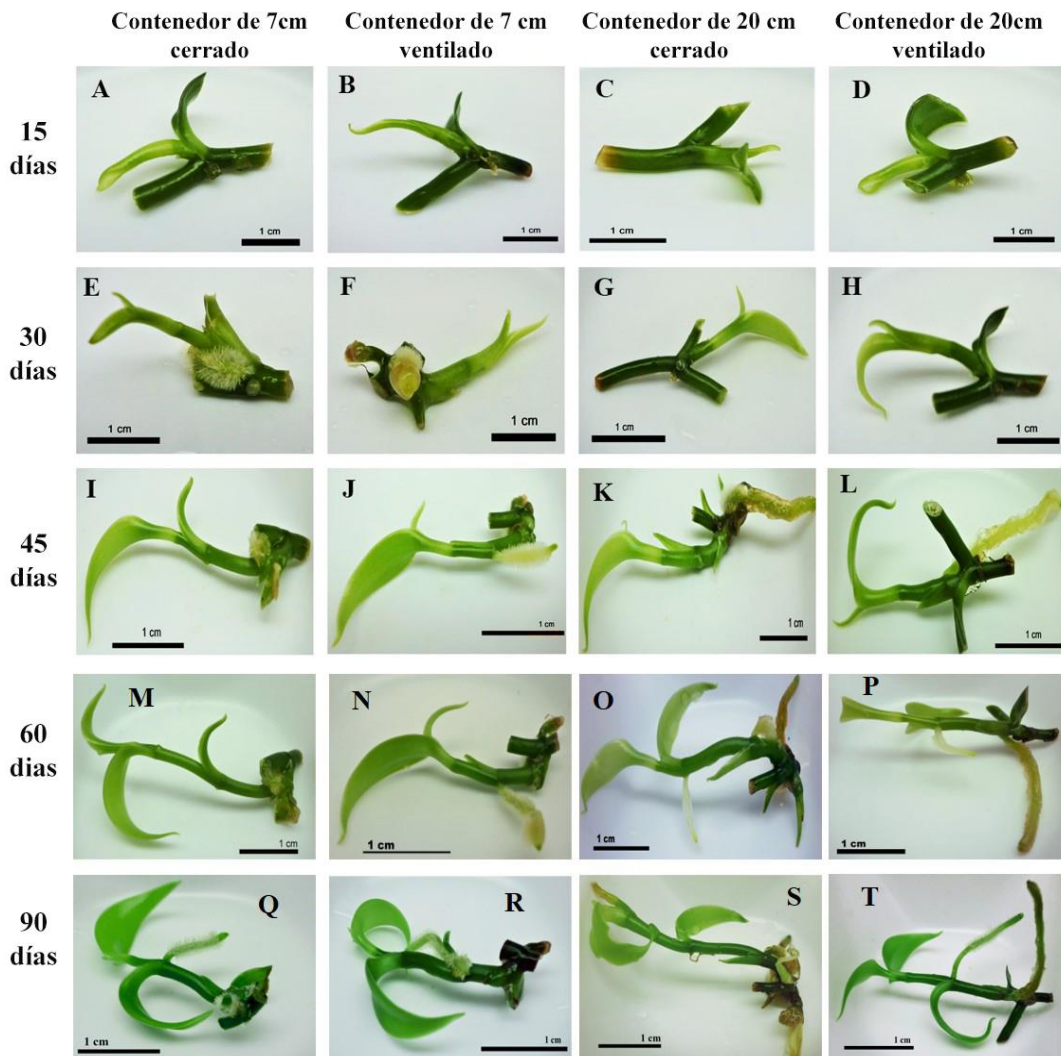


Figura 3.9. Plántulas *in vitro* de *V. planifolia* a 15, 30, 45, 60 y 90 días de crecimiento. Las plántulas se desarrollaron en diversos tratamientos: en A, E, I, M y Q en los frascos de 7 cm de alto cerrados; en B, F, J, N y R en frascos de 7 cm de alto ventilados; en C, G, K, O y S en frascos de 20 cm de alto cerrados; y D, H, L, P y T en frascos de 20 cm de alto ventilados.

De todos los tratamientos evaluados, el mejor para el desarrollo de plántulas de *V. planifolia* fue el frasco de 20 cm de alto, con el sistema de ventilación por microporos, que permitió no sólo el crecimiento del explante, sino también propició el desarrollo de raíces, así como un mayor número de hojas.

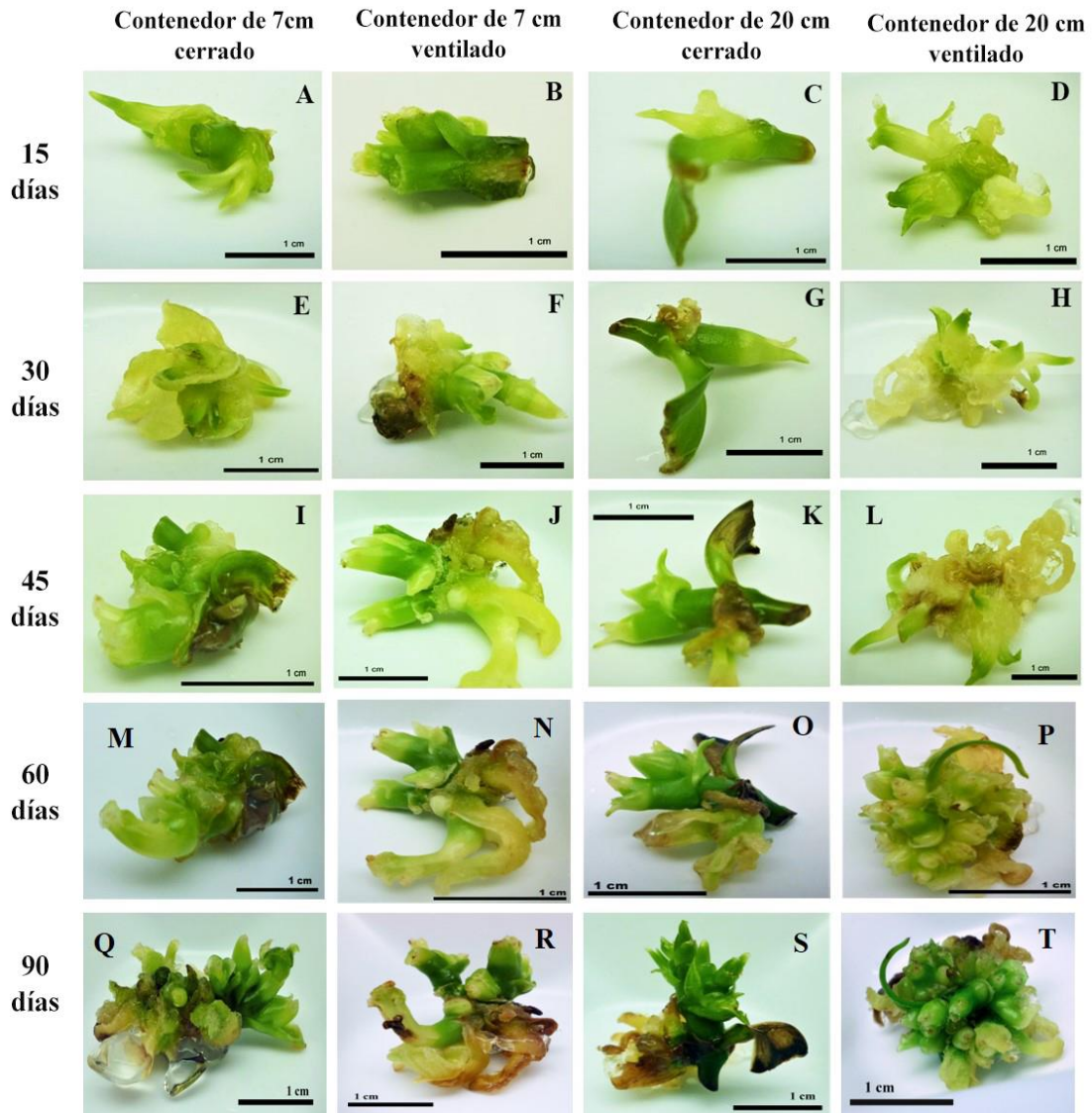


Figura 3.10. Brotes múltiples de plántulas *in vitro* de *V. planifolia* a 15, 30, 45, 60 y 90 días de crecimiento. Las plántulas se desarrollaron en diversos tratamientos: en A, E, I, M y Q en los frascos de 7 cm de alto cerrados; en B, F, J, N y R en frascos de 7 cm de alto ventilados; en C, G, K, O y S en frascos de 20 cm de alto cerrados; y D, H, L, P y T en frascos de 20 cm de alto ventilados.

La ventilación propició el desarrollo de una mayor cantidad de brotes, aunque muchos de estos presentaban zonas necróticas en las bases de los explantes (Figura 3.10). Al cabo de los 45 días, entre los brotes se generó una masa callogénica, de una coloración amarillenta, poco friable y de consistencia fibrosa.

Los callos se presentaron, en una mayor cantidad, en los sistemas ventilados. Los sistemas sin ventilación (cerrados) favorecieron el crecimiento de los brotes, mismos que estaban diferenciados y sin la presencia de callos entre ellos (Figura 3.10).

Un análisis estadístico con la prueba de Tukey ($p < 0.05$) indicó una diferencia significativa en los frascos de 20 cm con el sistema ventilado de microporo, como el mejor sistema para la multiplicación de *V. planifolia*. Sin embargo, este tratamiento propició el desarrollo de callo y, por lo tanto, puede verse dificultado el proceso de resiembra de brotes.

En conclusión, se ha probado que realizar la multiplicación y el crecimiento en el sistema de ventilación (y con un mayor volumen del contenedor) es benéfico para el crecimiento y la proliferación de brotes múltiples de *V. planifolia*.

3.2.2. Aclimatación de plántulas de *V. planifolia*

3.2.2.1. Pre-adaptación *in vitro* de plántulas de *V. planifolia*

Para la realización del proceso de pre-aclimatación de plántulas, se redujo la concentración de las sales del medio de cultivo MS (al 50 %), así como también la concentración de sacarosa en un 80 % (6 g/L), además, se implementó un sistema de ventilación, consistiendo en agujeros (de 2 cm de diámetro) en la parte superior de las tapas de plástico, sellados con tiras de papel adhesivo milipore a modo de filtro.

En el primer lote se obtuvo un porcentaje de contaminación del 28%, y las plántulas alcanzaron alturas promedio de 22.2 ± 3 cm al cumplir los 90 días de incubación. Estas presentaban un mejor vigor que lo obtenido en sistemas sin ventilación, además de un mejor desarrollo en las hojas. El tallo mostró una mejora sustancial con el sistema de ventilación, viéndose más resistente, por otro lado, las raíces muestran un incremento sustancial en su tamaño.

Las plántulas del segundo lote mostraron una mejora en el porcentaje de contaminación, siendo del 23 %, las plántulas alcanzaron un tamaño promedio de 25.3 ± 2.5 cm al cumplir los 90 días de incubación (Figura 3.11). Se obtuvieron resultados similares en cuanto a la calidad

de las plántulas en el segundo lote, comparado con el primer lote de prueba. Se observó una mejora sustancial en el tamaño y en la calidad de los órganos vegetales. Las hojas mostraron una mejor coloración, así como un mayor tamaño. El tallo se mostró más resistente y firme del mismo modo que las raíces. En algunas plántulas, se observó el desarrollo de nuevos brotes, provenientes de las yemas axilares.



Figura 3.11. Fotografía de las plántulas tras 5 meses en pre-adaptación *in vitro*.

3.2.2.2. Aclimatación de plántulas pre-adaptadas *in vitro*

El proceso de aclimatación se llevó a cabo en dos lotes, al igual que con la pre-adaptación *in vitro*. El primer lote (consistió en 2 plantas) funcionaba a modo de prueba piloto, mientras que el segundo lote (con 6 plantas) es la estandarización del proceso de aclimatación.

En la prueba piloto (primer lote; figura 3.12) se observó un desarrollo temprano de la yema apical al momento de comenzar la aclimatación, creciendo a razón de 1 cm por semana. Sin embargo, este proceso se estancó al término del primer mes, donde dejó de haber respuesta por parte de la yema apical. Esto se puede atribuir a la falta de luz solar, siendo deficiente para inducir la respuesta del meristemo apical y continuar con el crecimiento de la planta.

Tras 4 meses en aclimatación, las plantas no mostraron grandes avances en su crecimiento, y se observaba un aspecto deshidratado al momento de realizar los cortes en las bolsas de

plástico. La deshidratación se debe a la carencia de ceras y de un sistema de transpiración adecuado por parte de las plantas. Aún con ello, las plantas permanecieron en un estado inerte sin la presencia de tejido necrótico, salvo por una raíz que presentaba pudrición, el resto de la planta se mostraba con un aspecto relativamente sano, aunque sin crecimiento apical.



Figura 3.12. Fotografías de plántulas de *V. planifolia* en aclimatación (60 días) provenientes del primer lote de pre-adaptación *in vitro*. Prueba piloto, la altura de ambas plantas fue de 17 cm posterior a su deshidratación.

Con estos resultados en mente, se procedió a realizar un segundo lote de plantas pre-adaptadas bajo condiciones de invernadero. El lote consistió en 6 plantas provenientes de la pre-adaptación *in vitro* con 6 meses de incubación (Figura 3.13).

Una mayor intensidad de luz solar permitió el correcto desarrollo de este segundo lote. Al cabo de 15 días, las plantas comenzaron a crecer, específicamente en la yema apical, donde se observó el desarrollo de una nueva hoja, además, de la elongación de las raíces y la formación de nuevas. Las plantas en este estadio crecieron a un ritmo de 1.27 cm semanalmente

(duplicando a las plantas del primer lote en cuanto a tiempo requerido), la altura de las 6 plantas al inicio de la aclimatación fue de 25.3 ± 2.5 cm, y al cabo de 120 días en aclimatación su altura fue de 40.6 ± 7.71 cm. En general, se muestran con un mayor vigor, no presentan necrosis, clorosis o deshidratación y con un meristemo apical respondiendo al cambio de las condiciones.

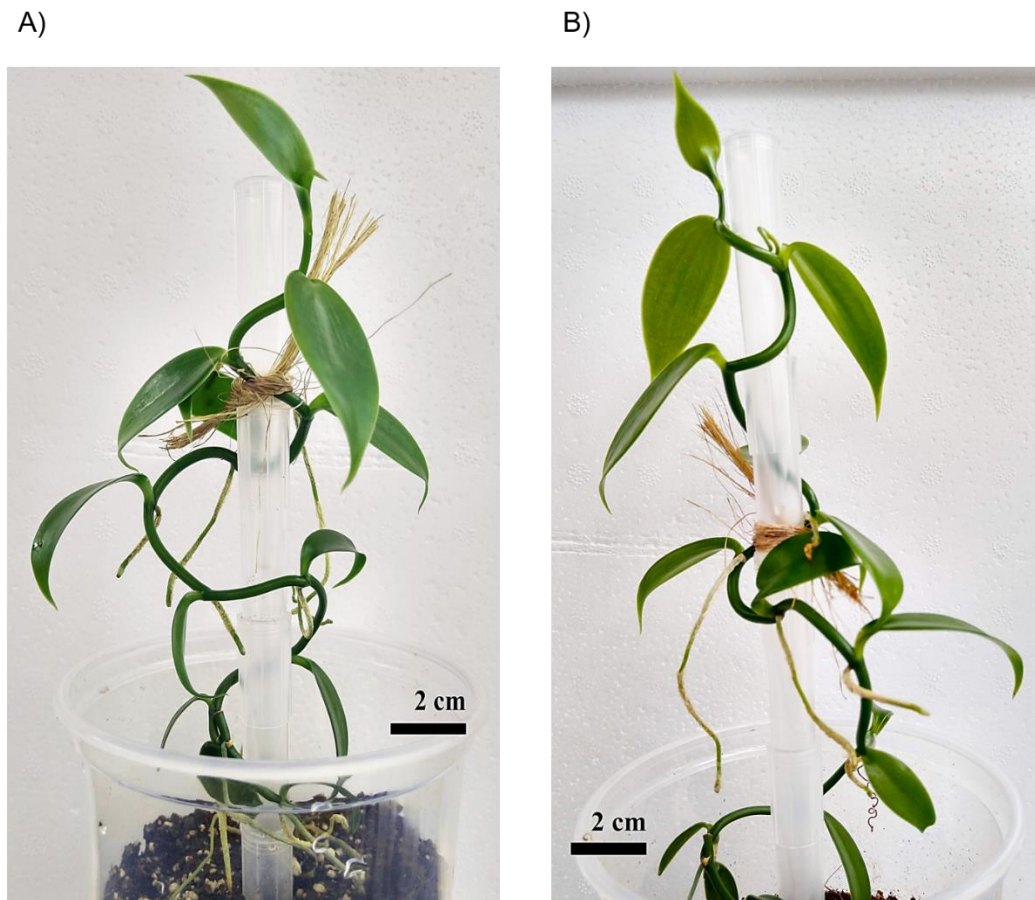


Figura 3.13. Fotografías de plántulas de *V. planifolia* en aclimatación provenientes del segundo lote de pre-adaptación *in vitro*. A) 90 días de aclimatación; B) 120 días de aclimatación.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN GENERAL

4.1. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS ENDÓFITAS EN POBLACIONES SILVESTRES Y COMERCIALES DE *V. planifolia*

4.1.1. Extracción del ADN metagenómico de *V. planifolia*

La metodología CTAB (Edwards *et al.*, 2002) fue efectiva en la extracción del ADN metagenómico en las hojas y raíces, tanto de las plantas silvestres como de las comerciales. El ADN extraído presentó muy poca degradación a juzgar por el gel de electroforesis (Figuras 3.1 y 3.2).

En el ADN extraído de las muestras de las poblaciones silvestres se detectó contaminación fenólica, principalmente en la raíz. Esto seguramente se debió al alto contenido de compuestos fenólicos que suelen estar presentes en las raíces de las plantas (Iannucci *et al.*, 2013). Esta contaminación se aprecia al contrastar la relación 260/230 de las raíces silvestres con el de las comerciales o con el ADN extraído de las hojas que idealmente debe ser 1.8 a 2 y en este caso fue de 1.6 a 1.7.

Una tendencia similar se observó en el ADN extraído de las muestras de la población comercial, donde las raíces mostraron contaminación por compuestos fenólicos. Además, en el ADN extraído de los tejidos de la población comercial se observó contaminación por ARN (Figura 3.2).

En cuanto al ADN extraído de las hojas, este no mostró contaminación por azúcares o compuestos fenólicos, como se observa en la relación 260/280 y 260/230 con valores de 1.8 a 2 en ambos casos.

La profundidad de secuenciación puede afectar de forma crítica los análisis informáticos posteriores. Sin embargo, los estudios de *metabarcoding* que buscan determinar la composición de comunidades microbianas requieren de una relativa menor profundidad de secuenciación comparada con otros estudios (como la identificación de genes específicos en una muestra ambiental). Algunos autores recomiendan una profundidad de secuenciación mínima de 2K (dos mil secuencias) hasta 10K (Gweon *et al.*, 2019; Fumagalli, 2013). En este trabajo, las profundidades de secuenciación fueron de 20K para los amplicones 16S y 10K para

los amplicones ITS2, ya que era predecible que la mayoría de las secuencias del gen 16S mitocondrial provinieran de las células de la planta (Fonseca, 2018). Con base en los resultados, la profundidad de la secuenciación fue adecuada para identificar los microorganismos de la endosfera.

Una de las principales problemáticas en los estudios de la microbiota en plantas es la presencia de cloroplastos, mitocondrias y los propios ITS de la planta de estudio. La homología entre el gen 16S, el ADN de los cloroplastos y el ADN mitocondrial es uno de los principales desafíos al momento de procesar las muestras y realizar los análisis taxonómicos (Beckers *et al.*, 2016). En diversos estudios se reportan entre 90 a 95% de contaminación de secuencias 16S de cloroplastos y mitocondrias, además de 90% de contaminación por las secuencias ITS de la misma planta (Pawar *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2016; Gottel *et al.*, 2011). Porcentajes similares de contaminación por cloroplastos, mitocondrias e ITS se encontraron en este trabajo, sin embargo, estas no impidieron la realización de los análisis taxonómicos como se describirá en la siguiente sección.

4.1.2. Rarefacción e índices ecológicos

Las curvas de rarefacción para las muestras de los amplicones de 16S e ITS2 se muestran en la figura 3.3. Cabe recordar que las curvas de rarefacción y el cálculo de los índices ecológicos fueron hechos después de haber descartado las secuencias clasificadas como cloroplastos, mitocondrias o ITS de *V. planifolia*; las cuales constituyeron más del 90% de las secuencias limpias en todas las muestras (Tabla 3.2 y 3.3).

En la figura 3.3 se observa como las raíces silvestres son las que tienen una mayor cantidad de especies comparadas con todas las otras muestras. Este resultado es de esperarse, pues se sabe que en un ambiente natural, las plantas tienden a tener una microbiota relativamente compleja comparada con aquellas que crecen en condiciones controladas (Jaramillo *et al.*, 2016), ya que las necesidades y su entorno suelen ser más cambiantes en el entorno natural.

En contraposición se encontraron las poblaciones comerciales, que en general, muestran una menor cantidad de OTUs. Esto seguramente se debe al ambiente controlado en el cual crecieron, con posibles aplicaciones de fertilizantes químico, especialmente fertilizantes nitrogenados. Diversos reportes afirman que la aplicación de fertilizantes inorgánicos disminuye la riqueza de las especies tanto en el suelo como en la planta (Zhao *et al.*, 2020; Pagé *et al.*, 2019; Ai *et al.*, 2015).

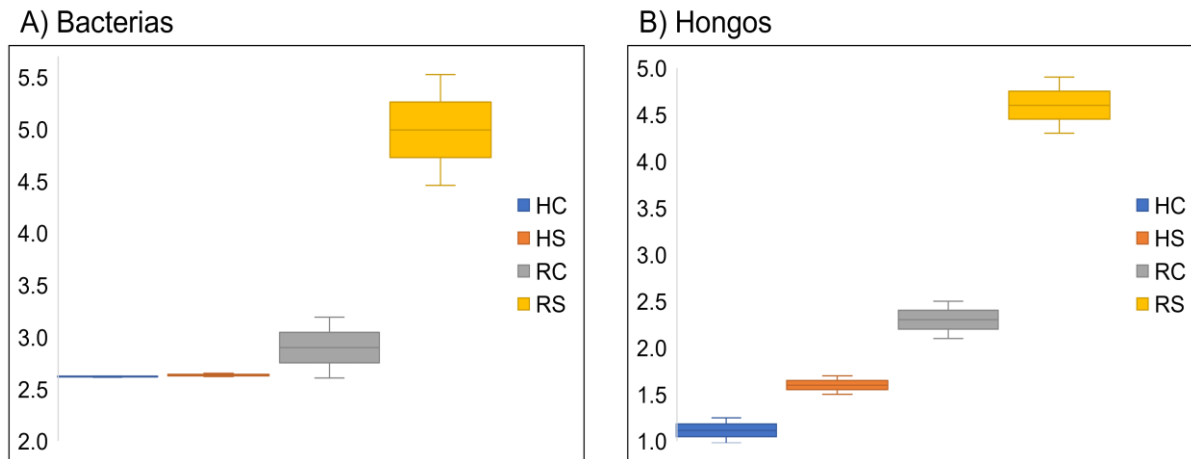


Figura 4.1. Gráficas de cajas con bigotes del índice de Shannon (H') para los amplicones 16S (bacterias) e ITS2 (hongos). Abreviaturas: HC hoja comercial, HS hoja silvestre, RC raíz comercial, RS raíz silvestre.

De acuerdo con el índice de Shannon (Figura 4.1), las raíces silvestres son las que tuvieron una diversidad significativamente mayor (4.9 ± 0.5 para los amplicones 16S y 4.6 ± 0.1 para los amplicones ITS2). Se sabe que la composición de las comunidades endófitas está fuertemente influenciada por el tejido en donde están los microorganismos (Hardoim *et al.*, 2008). Wang y colaboradores (2020) estudiando la endosfera de poblaciones silvestres de *Paris polyphylla*, observaron una remarcablemente mayor riqueza en las raíces, comparadas con las hojas. Resultados similares obtuvo Zheng y Gong (2019) en *Cycas panzihuaensis*, donde la diversidad de la microbiota endófitas varió de acuerdo con el tejido.

Hay estudios que apuntan a la compartimentalización del hospedero como un factor que determina la composición de las comunidades endófitas (Trivedi *et al.*, 2020). El proceso de colonización y formación de comunidades en la endosfera es complejo, rodeado por numerosos factores bióticos y abióticos, como el sistema inmune del hospedero y su respuesta a la colonización, las limitaciones del espacio intercelular, la disponibilidad de nutrientes y la heterogeneidad de la temperatura y humedad, que pueden definir la composición de la microbiota en una planta (Zheng y Gong, 2019; Huang *et al.*, 2018).

Hay varios estudios en los que se sugiere que el contraste entre la gran diversidad del suelo y la relativamente baja diversidad que hay en los tejidos de la planta, indica que solo un limitado número de microorganismos pueden vivir en la endosfera (Xiong *et al.*, 2016; Mapula *et al.*, 2015). Esta presión selectiva se hace evidente al notar la poca riqueza tanto de bacterias (que

en nuestro caso estuvo entre 6 y 142 OTUs a nivel de especie) como de hongos (entre 7 y 90 OTUs) sin importar que fueran de poblaciones silvestres o comerciales, en contraste con los miles de especies que normalmente se reportan en el suelo (Mwakilili *et al.*, 2021; Zarraonaindia *et al.*, 2015; Lakshmanan *et al.*, 2014).

Es de esperar que las raíces sean órganos con la capacidad de poseer una mayor cantidad de microorganismos endófitos, en parte porque normalmente se desarrollan en contacto constante con el suelo, el cual es una fuente vasta de microorganismos (Jaramillo *et al.*, 2019; Bulgarelli *et al.*, 2012). Sin embargo esto se observa también en las raíces aéreas, que si bien, no están en contacto directo con el suelo, presentan una mayor diversidad y riqueza de especies comparadas con las hojas (Butani *et al.*, 2021).

Chomicki y colaboradores (2014) argumentan que la baja colonización microbiana en las hojas, comparada con las raíces aéreas de plantas epífitas, puede deberse a la presencia de barreras estructurales en las hojas, las cuales limitan el alcance de la internalización y posterior colonización de las hojas. Se sabe que la presencia del velamen, el cual es un tejido esponjoso higroscópico presente en las raíces aéreas puede ser el responsable de la alta carga microbiana en las raíces (Johnson *et al.*, 2020; Tsakelova *et al.*, 2007). Este factor, sumado a los exudados de las raíces, que actúan como fuente de nutrientes para los microorganismos (Butani *et al.*, 2021), explican la mayor diversidad y riqueza de especies presentes en las raíces aéreas comparada con las hojas.

En la figura 4.2, se muestra una gráfica de análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) donde se observan las correlaciones y varianzas entre los órganos y las poblaciones comerciales y silvestres.

Analizando las muestras de amplicones 16S (Figura 4.2A) se observa como las muestras de las hojas comerciales y las hojas silvestres están altamente correlacionadas y poseen poca variabilidad, contrastado con las raíces, que si bien muestran cierta correlación, la variabilidad entre las raíces comerciales y las silvestres es mayor. Lo que demuestra que las hojas tienden a una microbiota más uniforme y similar, mientras que las raíces muestran una mayor heterogeneidad, misma que se pudieron observar en los análisis previos.

Un comportamiento totalmente diferente se observa en las muestras de amplicones ITS (Figura 4.2B) donde las muestras presentan una mayor heterogeneidad. Las hojas (silvestres y comerciales) muestran cierta correlación, pero son variables entre sí, de forma paralela, las

raíces (silvestres y comerciales) están correlacionadas pero son variables. Por lo que podemos concluir que en los amplicones ITS, las muestras tienen un grado de correlación menor, incluyendo las hojas, que en el caso de los amplicones 16S, mostraban poca variabilidad.

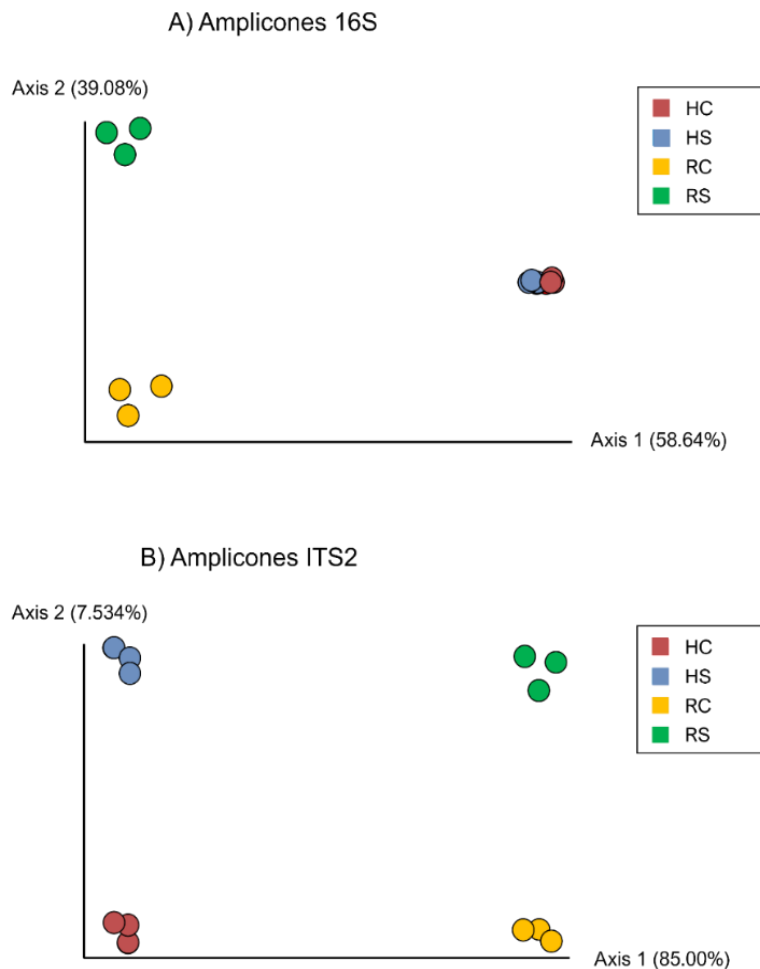


Figura 4.2. Gráfica de análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) para las poblaciones silvestres y comerciales de *V. planifolia*. A) amplicones 16S (bacterias); B) amplicones ITS2 (hongos).

4.1.3. Análisis de la estructura de las comunidades bacterianas

En la figura 4.3 se muestra la comparación de las abundancias relativas entre las muestras a nivel de fílum para las comunidades procariontas, en los tejidos de hojas y raíz de la población silvestre y de la comercial. Las gráficas representan el promedio de las tres muestras y en todos los casos el error estándar fue menor al 1%.

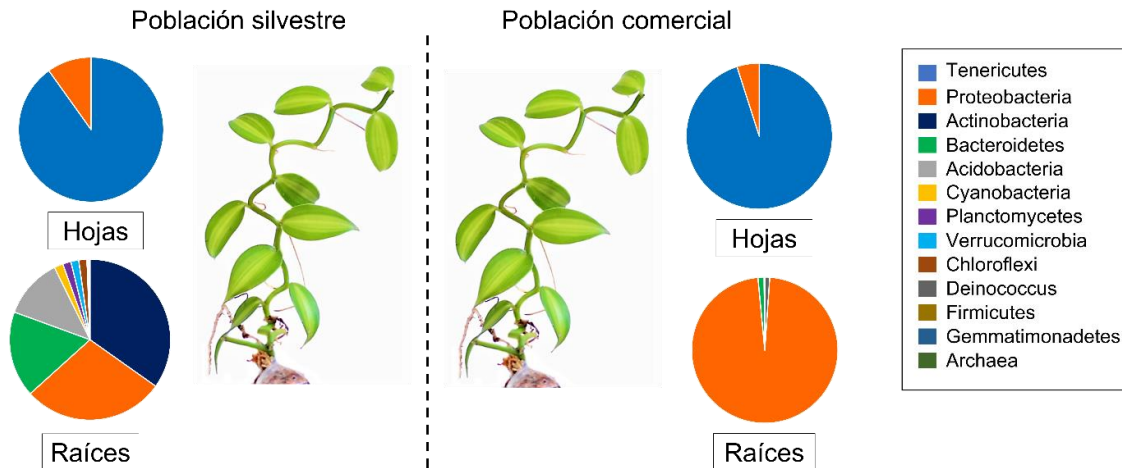


Figura 4.3. Comparación entre las abundancias relativas al nivel fílum de las comunidades bacterianas, para las poblaciones silvestres y comerciales de *V. planifolia* en los tejidos de hojas y raíces. Cada gráfica de pastel es el promedio de las tres muestras evaluadas con un error estándar menor al 1%.

Llama la atención que únicamente en la muestra RS3 (raíz silvestre) se encontró la presencia del dominio Archaea. La clasificación taxonómica muestra que se trata de una Archaea del género *Methanobrevibacter*. Este género, conformado por especies anaerobias obligadas productoras de metano, se encuentra presente en la mayoría de los intestinos de termitas (Skillman *et al.*, 2006; Dighe *et al.*, 2004). Probablemente la presencia de esta arquea (0.38 %) en la muestra de raíz silvestre puede atribuirse a una contaminación debida a la presencia de insectos que habitaban el área circundante a las plantas de *V. planifolia*, aunque también se han reportado arqueas como endófitas, por ejemplo en *Oryza longistaminata* y *O. sativa* (Peng *et al.*, 2021; Sun *et al.*, 2008), en *Beta vulgaris* (Shi *et al.*, 2015), e incluso en *Zea mays* (Cheltus y Triplett, 2001), por lo que se requerirán trabajos posteriores para investigar la presencia de arqueas como endófitos de *V. planifolia*.

Como se puede observar en la figura 4.3, el fílum bacteriano más abundante en las hojas (tanto en las de las plantas silvestres como en el de las comerciales) fue Tenericutes (88 – 91% en las hojas silvestres y 93 – 96% en las comerciales). El fílum Tenericutes está conformado por bacterias que carecen de una pared celular, son parásitos obligados o comensales de humanos, animales domésticos, plantas e insectos (Wang *et al.*, 2020). Dentro de este fílum se encuentran los *Phytoplasma*, *Mycoplasma* y *Acholeplasma*. El fílum Tenericutes solo se encontró en las hojas, siendo completamente ausente en las raíces, tanto en las comerciales

como en las silvestres. Majumdar *et al* (2021) reportó la presencia del fílum Tenericutes en los granos de maíz (*Zea mays* L.), de modo que se puede hipotetizar una transferencia vertical del endófito, pasando de generación en generación.

En las raíces, Proteobacteria fue el fílum más abundante (3 – 36% en raíces silvestres y 92 – 96% en las raíces comerciales). Resultados similares encontraron Souza y colaboradores (2016) al estudiar la endosfera en las raíces de caña de azúcar, donde el fílum Proteobacteria era el más abundante seguido por Bacteroidetes. El mismo patrón se encontró al estudiar la endosfera en las raíces de *Opuntia robusta*, donde Proteobacteria se mostraba como el fílum con mayor abundancia (García *et al.*, 2016). Los resultados de este trabajo apoyan que este es un patrón en la estructura de la comunidad bacteriana endófito de las raíces en general, sin importar si son aéreas o subterráneas.

En la tabla 4.1, se resumen las especies bacterianas con mayor abundancia relativa de la microbiota endófito de *V. planifolia*, y en la figura 4.4 se muestra la comparación de las abundancias relativas entre las muestras a nivel de especie para las comunidades bacterianas, en los tejidos de hojas y raíz de la población silvestre y de la comercial. Las gráficas representan el promedio de las tres muestras, el término “otros” engloba a todas las especies con una abundancia menor al 5%.

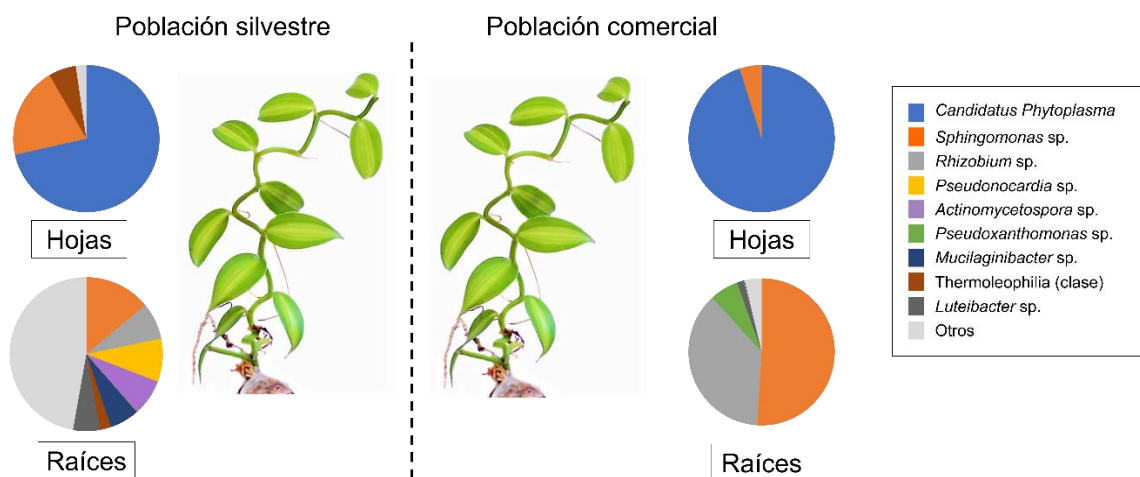


Figura 4.4. Comparación entre las abundancias relativas al nivel especie de las comunidades bacterianas, para las poblaciones silvestres y comerciales de *V. planifolia* en los tejidos de hojas y raíces. Cada gráfica de pastel es el promedio de las tres muestras evaluadas con un error estándar menor al 1%. El término “otros” engloba a todas las especies con una abundancia menor al 5%.

Tabla 4.1. Resumen de las 10 especies bacterianas con mayor abundancia relativa encontradas en la microbiota endófitas de *V. planifolia*. Los porcentajes reflejan el promedio de las tres muestras. Abreviaturas: (–) no identificado

Especie	Silvestres		Comerciales		Observaciones	Referencia
	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz		
<i>Candidatus Phytoplasma</i>	71%	–	95%	–	Patógeno obligado. Especie encontrada solo en hojas.	Soufi y Komor, 2010
<i>Sphingomonas</i> sp.	20%	14%	4%	51%	Producción de auxinas. Especie encontrada en todas las muestras.	Tsavkelova et al., 2007
<i>Rhizobium</i> sp.	–	8%	–	37%	Fijación de nitrógeno. Especie encontrada solo en raíces.	Mehnaz et al., 2006
<i>Pseudonocardia</i> sp.	–	9%	–	–	Producción de antimicrobianos. Especie encontrada solo en raíz silvestre.	Cafaro et al., 2006
<i>Actinomycetospora</i> sp.	–	7%	–	1%	Producción de citotóxicos. Especie encontrada solo en raíz.	Fu et al., 2015
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	–	1%	–	6%	Especie encontrada solo en raíz.	–
<i>Mucilaginibacter</i> sp.	–	6%	–	–	Especie encontrada solo en raíz silvestre.	–
Thermoleophilia (clase)	6%	2%	–	–	Clase encontrada solo en silvestres.	–
<i>Luteibacter</i> sp.	–	5%	–	2%	Especie encontrada solo en raíz.	–
<i>Cryptosporangium aurantiacum</i>	–	4%	–	–	Especie encontrada solo en raíz silvestre.	–

A nivel de especie, llama la atención la presencia de fitoplasma en las hojas, tanto silvestres (57 – 87%) como en las comerciales (93 – 97%). Los fitoplasmas normalmente se reportan como bacterias patógenas de plantas, pertenecientes al fílum Tenericutes. Son considerados formas intermedias entre los virus y las bacterias, son parásitos obligados del floema de las plantas, carentes de pared celular, con un diámetro menor a un micrómetro, poseen un genoma

muy pequeño (entre 1350 – 530 kb) y suelen ser transmitidos por insectos vectores, a menudo de la familia Cicadellidae (Vázquez *et al.*, 2011; Nishigawa *et al.*, 2003). Además, están pobremente caracterizados ya que son incultivables en medios de cultivo y son difíciles de aislar, por lo que la mayoría de sus estudios se basan en métodos moleculares (Bertaccini y Duduk, 2009).

Los fitoplasmas son patógenos de cultivos de importancia comercial incluyendo el cocotero (*Cocos nucifera*) (Vázquez *et al.*, 2011) y la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (Soufi y Komor, 2014), aunque también se han detectado en *Carica papaya* (Lebsky *et al.*, 2010), *Lycopersicon esculentum* (Tapia *et al.*, 2012), y en *Vitis vinifera* (Bulgari *et al.*, 2014) entre otras especies. Los fitoplasmas pueden causar una variedad de síntomas que van desde amarillamiento de la planta hasta la muerte. Contaldo *et al.* (2008), encontraron fitoplasmas en hojas de la orquídea *Sarcochilus hartmanii*, misma que presentaba virescencia.

Sin embargo, los fitoplasmas son especies poco referenciadas en orquídeas. Todas las plantas de *V. planifolia* que se tomaron para el presente trabajo tenían un aspecto sano, por lo que en este caso, la presencia de fitoplasmas no parece estar relacionada con alguna enfermedad. Aun con ello, un futuro estudio es la utilización de cebadores o *primers* específicos para fitoplasma y corroborar que, efectivamente, esté presente en las hojas de *V. planifolia*.

Respecto a los lugares donde se tomaron las muestras de *V. planifolia*, se ha reportado la presencia de fitoplasma en el estado de Yucatán, principalmente en las plantaciones de cocotero (Maust *et al.*, 2003). Vázquez y colaboradores (2011) detectaron la presencia del grupo de fitoplasmas 16SrIV en las palmas *Sabal mexicana* y *Pseudophoenix sargentii*, localizadas en la ciudad de Mérida y en los municipios de Chicxulub Puerto y Ticul. Por otro lado, también se ha detectado fitoplasma en plantaciones de tomate (*Lycopersicon esculentum*) que presentaban amarillamiento en sus hojas y enanismo, en los municipios de Tekax, Tizimín y Oxxkutzcab (Tapia *et al.*, 2012). Interesante es el hallazgo de fitoplasma en *Carica papaya* provenientes de Yucatán y Veracruz (Lebsky *et al.*, 2010) los mismos estados de donde provienen las plantas de *V. planifolia* utilizadas para este trabajo.

Y respecto al estado de Veracruz, de donde provienen las muestras de *V. planifolia* comercial, se ha reportado la presencia de fitoplasma en cultivos de maíz (Mendoza *et al.*, 2010), mismos que no presentaban síntomas de amarillamiento, y en hierbas silvestres (*Pennisetum* spp.) que sí presentaban síntomas de la infección por fitoplasma (López *et al.*, 2017). Estos estudios

demuestran la presencia de fitoplasma en las zonas tropicales y subtropicales de México (especialmente en los estados de Veracruz y Yucatán), siendo un acervo para la proliferación de este género, por lo cual, su presencia en las muestras de *V. planifolia* puede deberse a infecciones por un insecto vector del fitoplasma. Aunque otra posibilidad es que en *Vanilla*, el fitoplasma sea un simbiote normal, que ha coevolucionado con la planta. Es necesario realizar más investigaciones para aclarar esto.

Las muestras (tanto de la población silvestre como de la comercial) de *V. planifolia* no mostraban síntomas por la infección de fitoplasma, y es que no todas las especies de plantas infectadas con fitoplasma presentan síntomas de enfermedad (Bertaccini *et al.*, 2005). Por ejemplo: en cañas de azúcar (*Saccharum officinarum*) en plantaciones de Hawaii (Soufi *et al.*, 2014), en tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Kaminska *et al.*, 2010), en plantaciones de *Vitis vinifera* (Bulgari *et al.*, 2014) y en maíz (Mendoza *et al.*, 2010) no se presentaron síntomas a pesar de que había fitoplasmas en sus tejidos.

De acuerdo con Soufi y colaboradores (2014), que una planta sea asintomática se puede atribuir a diversos factores: bajas concentraciones del patógeno, cultivares con resistencia a la infección por fitoplasma, o un ambiente sin estrés biótico o abiótico.

En lo que respecta a las plantas de *V. planifolia* de este trabajo, el fitoplasma se encontraba en gran abundancia en las hojas (mayor al 90%) en ambas poblaciones. La presencia de fitoplasma quizás se pueda deber a que las plantas recolectadas se estén recuperando de la infección por el patógeno (aunque no se encontró signos de amarillamiento en los tejidos); o quizás *V. planifolia* sea un hospedero de fitoplasma, donde no causa un daño aparente y sirve como fuente de inóculo del patógeno o como hospedero de supervivencia, esta última hipótesis toma aún más fuerza debido a la ausencia de síntomas de infección por fitoplasma en las plantas, además, así se explicaría su presencia en ambas poblaciones (la silvestre proveniente de Yucatán y la comercial de Veracruz). De igual forma, la composición de la microbiota es otro factor que considerar en la infección por un patógeno, idea que se desarrollará mejor en los siguientes párrafos. Aun así, se requiere realizar estudios más precisos para entender las relaciones biológicas entre el fitoplasma y *V. planifolia*.

La salud de la planta está fuertemente influenciada por las íntimas interacciones con su microbiota y las relaciones de esta con posibles patógenos. La presencia de un patógeno en

una planta produce cambios en la microbiota de esta, generalmente, un decrecimiento en la diversidad bacteriana (Trivedi *et al.*, 2016).

Los patógenos obligados (como el fitoplasma) reestructuran las comunidades microbianas (Trivedi *et al.*, 2012). En respuesta a estos cambios, muchos microorganismos pueden ser desplazadas por otros que puedan tolerar y/o adaptarse a las condiciones de estrés e interactuar cercanamente con el patógeno. Cambios en la microbiota inducidos por la infección del fitoplasma son reportados por Trivedi y colaboradores (2010) que observaron una reducción significativa en la presencia de Proteobacterias en las raíces de cítricos infectados con fitoplasma y un incremento de bacterias del género *Sphingobacterium* en la microbiota de cítricos infectados con fitoplasma. Un resultado similar reporta Bulgari *et al* (2011) al estudiar la microbiota endófito de *Vitis vinífera* infectada por fitoplasma.

En *Cocos nucifera* con síntomas de infección por fitoplasma se encontraron los géneros *Arthrinium*, *Chaetomiun*, *Phialemonium*, *Fusarium*, *Klebsiella* y *Candida* (Morales *et al.*, 2017). Mientras que en el floema de *Ulmus leavis* infectado con fitoplasma, se observaron alteraciones y fluctuaciones en la comunidad endófito a lo largo de los órganos. Se identificaron las especies *Curtobacterium*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* y *Bacillus*. Investigaciones llevadas a cabo por Bulgari y colaboradores (2012) en *Malus domestica* compararon las bacterias endófitas presentes en las raíces en plantas sanas e infectadas por fitoplasma. La clase *Actinobacteria* solo estuvo presente en las raíces infectadas, mientras que *Alphaproteobacteria* fue la clase dominante en la microbiota infectada por fitoplasma. Además, concluyen que la diversidad bacteriana en las raíces sanas es mayor que en las infectadas, demostrando que el fitoplasma modifica la composición de la comunidad bacteriana endófito.

La microbiota y el hospedero interactúan de manera que afecta la salud del holobionte, incluyendo la resistencia a enfermedades (Trivedi *et al.*, 2016; Sagaram *et al.*, 2009). Las enfermedades fitoplasmáticas no son curables y el manejo de la infección está basado en el control de insectos vectores o en la remoción de los cultivos o maleza infectada. La búsqueda de nuevas alternativas para tratar esta infección ha llevado a probar si el uso de microorganismos endófitos podría representar una estrategia viable contra los fitoplasmas.

Se han aislado cepas del hongo *Epicoccum nigrum* en la endosfera de *Malus domestica* y se ha probado su efectividad como agente de biocontrol en *Catharanthus roseus* infectada con fitoplasma (Musetti *et al.*, 2011), los resultados demostraron una reducción en la gravedad de

los síntomas y una baja presencia de fitoplasma en los tejidos de *C. roseus* inoculados con *E. nigrum*. Este hallazgo es de gran relevancia, pues en las muestras evaluadas en este trabajo, el hongo con mayor presencia en las raíces de *V. planifolia* (tanto en las poblaciones silvestres como en las comerciales) fue *Epicoccum andropogonis* (28 – 18%), cuya presencia podría influir en la ausencia de fitoplasma en las raíces, aunque se requiere de diferentes estudios de aislamiento y pruebas *in planta* para corroborar esta hipótesis.

La especie *Sphingomonas* sp (fílum Proteobacteria, clase Alphaproteobacteria) se identificó tanto en las hojas de plantas silvestres como comerciales. Sin embargo, su abundancia fue mayor en las silvestres (13 – 38%) que en las comerciales (3 – 6%). *Sphingomonas* sp además fue también la especie más abundante en las raíces comerciales (41 – 53%) y en las raíces silvestres, aunque en estas últimas tuvo una menor abundancia (12 – 16%). Llama la atención que esta especie fue la única que se identificó (con un porcentaje mayor al 1%) en todas las muestras de *V. planifolia*. Esto apunta a que podría tratarse de una bacteria endófito y ubicada en la endosfera de las poblaciones de *V. planifolia*, siendo un componente esencial en la estructura de su comunidad bacteriana. Aunque se requerirá más investigación para corroborar esto, es una hipótesis sustentada en los resultados obtenidos.

El género *Sphingomonas* está conformado por bacterias Gram negativas, quimioheterótrofas y estrictamente aerobias. Su presencia se ha reportado en los sistemas radiculares de algunas orquídeas, como *Dendrobium*, o *Lophiaris* (Enya *et al.*, 2007; Adnika *et al.*, 2001), donde se ha visto que inducen elongación debido a la producción de auxinas (Tsavkelova *et al.*, 2007), y se ha usado como agente de biocontrol contra *Pseudomonas syringae* en *Arabidopsis thaliana* (Innerebner *et al.*, 2011). Esto sugiere que sea una especie con efectos positivos en las plantas de *V. planifolia* y que no se ha perdido en el paso de las especies silvestres a las comerciales. Aunque se debe corroborar que las especies de *Sphingomonas* sean las mismas en las plantas silvestres que en las comerciales. Este resultado sugiere que *Sphingomonas* es una especie perteneciente a la microbiota core de *V. planifolia*.

En las raíces, la segunda especie más abundante fue *Pseudonocardia* sp (fílum Actinobacteria, clase Actinobacteria). En las raíces de poblaciones silvestres estuvo en una proporción de 8 – 12%, y en cambio en las raíces de las comerciales se identificó con un porcentaje menor al 1%. *Pseudonocardia*, es un género de bacterias Gram positivas aeróbicas. Diversos estudios han reportado la presencia de *Pseudonocardia* en la endosfera de raíz en *Lobelia clavata* (Chen *et al.*, 2009), en *Oroxylum indicum* (Gu *et al.*, 2006) y en *Artemisia annua*, donde se han ligado

con la estimulación del sistema inmune de la planta (Li *et al.*, 2012). Cafaro y colaboradores (2006) observaron una asociación simbiótica entre hormigas y bacterias del género *Pseudonocardia*, que sugiere que estas últimas ofrecen protección contra hongos patógenos. Estos resultados apuntan a que, posiblemente, *Pseudonocardia* tenga un efecto positivo en el sistema de defensa de las plantas de *V. planifolia*, ya sea estimulando su sistema inmune o bien confiriendo una posible resistencia ante la infección de hongos patógenos. También parece ser que las condiciones de cultivo disminuyen drásticamente su población, quizás esto ocurra en las poblaciones comerciales, de modo que se disminuye el valor de adecuación que ofrece *Pseudonocardia*.

Actinomycetospora sp (fílum Actinobacteria, clase Actinobacteria) es la tercera especie más abundante en las raíces silvestres, con una proporción de 4 – 9%. De igual forma, se identificó en las hojas silvestres (8%) pero no en las comerciales. *Actinomycetospora* es una bacteria Gram positiva, aerobica (Yamamura *et al.*, 2011) que ha sido aislada en raíces de la orquídea silvestre *Podochilus microphyllus*, de igual forma, se ha reportado su presencia en el suelo de los bosques tropicales húmedos en el norte de Tailandia y Japón (Zhang *et al.*, 2015; Yamamura *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2008). La presencia de esta especie en las poblaciones silvestres de *V. planifolia* cobra especial sentido, debido al ambiente tropical húmedo en los que crecía esta población. Fu y MacMilan (2015) aislaron *Actinomycetospora chlora* en muestras marinas. Esta especie es capaz de producir Tiasporina A, un compuesto citotóxico que ha sido probado contra células cancerígenas en los pulmones, siendo una droga prometedora. Además, Wu y colaboradores (2019) reportan un efecto negativo en el desarrollo de *Magnolia officinalis* por la presencia de una especie del género *Actinomycetospora*.

El género *Rhizobium* (fílum Proteobacteria, clase Alphaproteobacteria) fue identificado en muestras de raíces, tanto comerciales como silvestres. Aunque se encontró en mayor proporción en las poblaciones comerciales (31 – 34%) que en las silvestres (7 – 9%). Las bacterias del género *Rhizobium* son bien conocidas por su capacidad de establecer simbiosis con plantas (especialmente leguminosas), donde reducen el nitrógeno atmosférico, haciéndolo accesible para las plantas (Sessitsch *et al.*, 2002). *Rhizobium* es catalogado como una bacteria promotora del crecimiento de plantas (Mehnaz y Lazarovits, 2006; Unno *et al.*, 2005), pues además se ha ligado a la producción de ácido indolacético, fitohormona que promueve el desarrollo radicular y elongación del tallo (Tsavkelova *et al.*, 2007). Tsavkelova y colaboradores (2005) aislaron cepas de *Rhizobium* en raíces epífitas de la orquídea *Dendrobium moschatum*, y observaron un aumento en la germinación en semillas de *D. moschatum* al ser cubiertas con

las cepas aisladas de *Rhizobium*. Esto sugiere que en *V. planifolia*, este género bacteriano constituye un simbiote importante para la obtención de nitrógeno.

Especies del género *Luteibacter* (fílum Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria) fueron identificadas en las raíces silvestres (4 – 5%) y en menor proporción en las raíces comerciales (2% – 3%). Johansen y colaboradores (2005), aislaron de la rizosfera de cebada (*Hordeum vulgare*) bacterias del género *Luteibacter*. Este mismo género ha sido reportado en suelos de invernaderos en China (Kim *et al.*, 2006) y en sangre humana (Kämpfer *et al.*, 2009). Guglielmetti (2013), caracterizó a la bacteria *L. rhizovicinus*, exhibiendo su capacidad de solubilizar fosfatos inorgánicos, así como la producción de ácido indolacético *in vitro*. Sin embargo, se deberán realizar nuevos estudios para corroborar si estas capacidades se mantienen al estar en el interior de las plantas, lo cual podría resultar en un efecto positivo en el crecimiento y nutrición de *V. planifolia*.

4.1.4. Análisis de la estructura de las comunidades fúngicas

En la figura 4.5 se muestra la comparación entre las abundancias relativas a nivel fílum para las comunidades fúngicas, en los tejidos de hojas y raíz de la población silvestre y comercial. Las gráficas representan el promedio de las tres muestras. En todos los casos el error estándar fue menor al 1%.

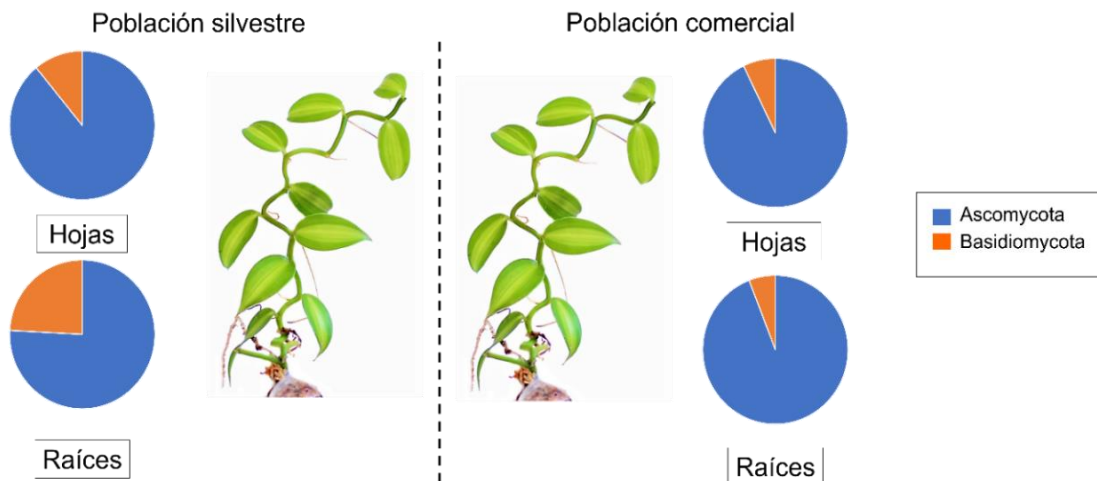


Figura 4.5. Comparación entre las abundancias relativas al nivel fílum de las comunidades fúngicas, para las poblaciones silvestres y comerciales de *V. planifolia* en los tejidos de hojas y raíces. Cada gráfica de pastel es el promedio de las tres muestras evaluadas con un error estándar menor al 1%.

El fílum más abundante fue Ascomycota con proporciones entre el 74% (raíces silvestres) a 98% (hojas comerciales). El segundo fílum presente en las muestras fue Basidiomycota, en una menor proporción que Ascomycota. Este patrón se ha visto en varios microbiomas de plantas (Trivedi *et al.*, 2020; Xiong *et al.*, 2016) por lo que puede considerarse como un patrón normal.

En la tabla 4.2, se resumen las especies fúngicas con mayor abundancia relativa de la microbiota de *V. planifolia*, y en la figura 4.6 se muestra la comparación de las abundancias relativas entre las muestras a nivel de especie para las comunidades fúngicas, en los tejidos de hojas y raíz de la población silvestre y de la comercial. Las gráficas representan el promedio de las tres muestras, el término “otros” engloba a todas las especies con una abundancia menor al 5%.

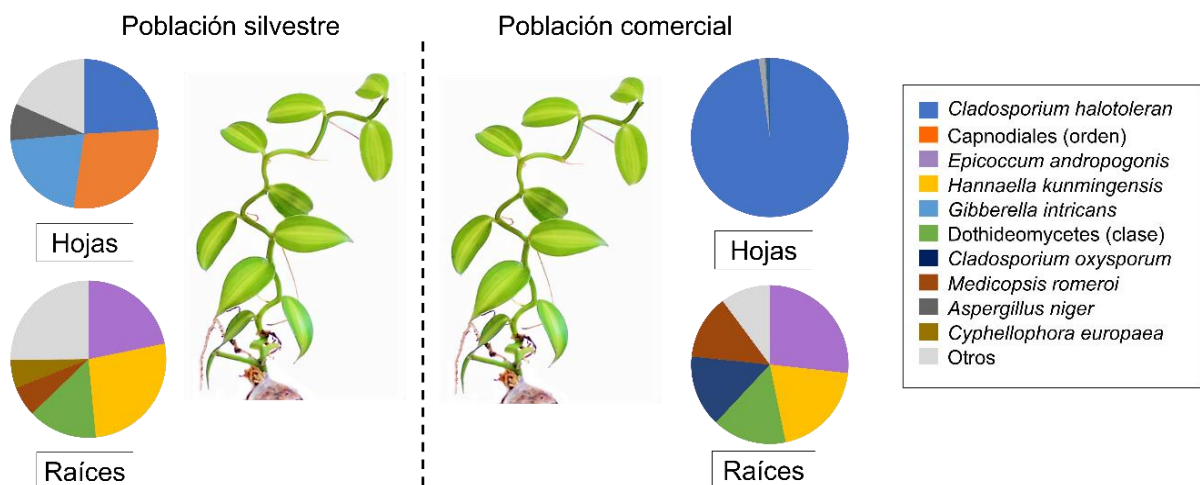


Figura 4.6. Comparación entre las abundancias relativas al nivel especie de las comunidades fúngicas, para las poblaciones silvestres y comerciales de *V. planifolia* en los tejidos de hojas y raíces. Cada gráfica de pastel es el promedio de las tres muestras evaluadas con un error estándar menor al 1%. El término “otros” engloba a todas las especies con una abundancia menor al 5%.

Pasando al análisis a nivel de especies, la especie fúngica más abundante en las hojas (95 – 97% en las hojas comerciales y 14 – 31% en las hojas silvestres) fue *Cladosporium halotolerans* (fílum Ascomycota, clase Dothideomycete). *C. halotolerans* no fue identificada en los tejidos de raíz, esto sugiere que esta especie puede ser específica de las hojas, o tal vez del tejido verde en general.

Tabla 4.2. Resumen de las 10 especies fúngicas con mayor abundancia relativa encontradas en la microbiota endófitas de *V. planifolia*. Los porcentajes reflejan el promedio de las tres muestras. Abreviaturas: (–) no identificado

Especie	Silvestres		Comerciales		Observaciones	Referencia
	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz		
<i>Cladosporium halotoleran</i>	24%	–	97%	–	Producción de policétidos. Especie encontrada solo en hojas.	Pan <i>et al.</i> , 2020
Capnodiales (orden)	28%	–	–	–	Orden encontrado solo en hoja silvestre.	–
<i>Epicoccum andropogonis</i>	–	21%	1%	26%	Producción de compuestos antifúngicos. Especie encontrada solo en raíces.	Elmer <i>et al.</i> , 2001
<i>Hannaella kunmingensis</i>	–	26%	–	19%	Reportado en la filosfera de maíz y arroz. Especie encontrada solo en raíces.	Landell <i>et al.</i> , 2014
<i>Gibberella intricans</i>	21%	–	2%	3%	Patógeno de leguminosas y cereales. Producción de citotóxicos.	Desjardins <i>et al.</i> , 1996
Dothideomycetes (clase)	–	14%	–	15%	Clase encontrada solo en raíz.	–
<i>Cladosporium oxysporum</i>	–	–	–	14%	Especie encontrada solo en raíz comercial.	–
<i>Medicopsis romeroi</i>	–	6%	–	13%	Especie encontrada solo en raíces.	–
<i>Aspergillus niger</i>	2%	3%	1%	1%	Producción de enzimas extracelulares. Especie encontrada solo en hoja.	Schuster <i>et al.</i> , 2012
<i>Cyphellophora europeae</i>	–	5%	–	–	Especie encontrada solo en raíz silvestre.	–

C. halotolerans ha sido encontrada en ambientes hipersalinos (Zalar *et al.*, 2007) y se cataloga como un hongo saprófito, patógeno para ciertas especies de orquídeas. Sun y colaboradores (2017), reportaron infección de *C. cladosporioides* en *Dendrobium officinale*, una orquídea nativa de Asia. También, *C. halotolerans* ha sido identificado como endófito en el mangle *Bruguiera gymnorrhiza* (Zhang *et al.*, 2019) y como simbionte de la esponja marina *Porites lutea* (Wang *et al.*, 2020). Probablemente el *C. halotolerans* que se encontró como endófito en las hojas de *V. planifolia* pertenezca a una cepa distinta de las hasta ahora reportadas y tenga propiedades diferentes. Debido a la alta abundancia en que estuvo presente, seguramente es una especie importante para las plantas de *Vanilla*.

Recientemente se descubrió que el género *Cladosporium* produce policétidos o macrólidos híbridos con propiedades antibacterianas (Pan *et al.*, 2020), antifúngicas (Zhang *et al.*, 2020), antivirales (Wu *et al.*, 2014) y citotóxicas (Riescher *et al.*, 2019), así como la capacidad de remover manganeso II en aguas residuales (Mota *et al.*, 2020) y la síntesis de benzopirranonas y derivados de xantonas (Wang *et al.*, 2020). Estos estudios realzan la importancia de *C. halotolerans* en la búsqueda de nuevos productos naturales y quizás sus capacidades antimicrobianas estén ejerciendo una influencia positiva en la salud de las plantas de *V. planifolia*.

Por otro lado, *C. oxysporum* se ha probado como un potencial agente de biocontrol contra algunas especies de *Pseudococcus* (cochinillas) (Samways y Grech, 1996). Se puede suponer que su capacidad de tolerar ambientes con alta presión selectiva le permite habitar el interior de las hojas de *V. planifolia*.

La especie más abundante en las raíces comerciales y silvestres fue *Epicoccum andropogonis*. Esta especie fue identificada exclusivamente en las raíces, por lo que parece una especie propia de las raíces de *V. planifolia* y que no se perdió en el paso a un ambiente controlado (como el caso de las poblaciones comerciales), aunque no hay un reporte previo en la literatura de su presencia. El género *Epicoccum* forma parte de las micorrizas de algunas orquídeas. Se ha aislado en raíces de *Catasetum*, *Encyclia* y *Epidendrum*, (Richardson, 1993). Siendo una especie importante en las comunidades fúngicas en las orquídeas y por ende, en *V. planifolia*. Además, Baute y colaboradores, 1978, reportan la producción de antibióticos por parte de *Epicoccum nigrum*, así como pigmentos naturales, aunque en el tejido no se observó coloración.

El género *Epicoccum* se ha reportado como productor de compuestos antifúngicos (Elmer *et al.*, 2001), síntesis de flavipinas con actividad antimicrobiana (Madrigal *et al.*, 1995), así como actividad inhibitoria de los hongos patógenos *Botrytis cinerea* (Fowler *et al.*, 1999), *Sclerotinia sclerotium* (Zhou *et al.*, 1991) y *Colletotrichum gloeosporoides* (Pieckenstain *et al.*, 2001). Y como se mencionó con anterioridad, se ha reportado el uso de *E. nigrum* como agente de biocontrol contra fitoplasma (Musetti *et al.*, 2011). Estos reportes apuntan a que *Epicoccum* es un género con un alto potencial para la búsqueda de compuestos antimicrobianos y el uso del propio hongo como agente de biocontrol contra muchos otros hongos patógenos; quizás *E. andropogonis* este ejerciendo una actividad antimicrobiana contra fitoplasma u otro hongo patógeno presente, aunque se requerirán de estudios *in vitro* e *in planta* para corroborar esta hipótesis.

Giberella intricans se identificó como la especie más abundante en hojas (tanto silvestres como comerciales), aunque también se identificó en menor medida en las raíces. *Giberella* es un género reportado como patógeno en leguminosas, cebada y avena (Desjardins, *et al.*, 1996). *G. intricans* es un hongo saprófito del suelo y se ha ligado a la producción de tricotecenos, potentes inhibidores de la síntesis proteica (Hont y Desjardins, 1992). Aunque, no se ha reportado como un hongo patógeno en el género *Vanilla*.

La única especie fúngica que se identificó en todas las muestras fue *Aspergillus niger*. *A. niger* se ha aislado en la endosfera de *Bulbophyllum neilgherrense*, *Vanda testacea*, y en la orquídea *Pomatocalpa decipiens* (Pawar *et al.*, 2018; Sahoo y Gupta, 2018; Sudheep *et al.*, 2012), despertando interés por ser patógeno para algunos cultivos de importancia económica como el trigo (*Triticum aestivum*) (Pawar *et al.*, 2018). *Aspergillus niger* es uno de los microorganismos más usados en la producción de enzimas extracelulares y en la producción de ácido cítrico y ácido glucónico (Schuster *et al.*, 2012; Roukas, 2000). Y ha sido ligado a la solubilización de fosfato *in vitro* (Gupta *et al.*, 2012). Su identificación en todas las muestras de *V. planifolia* apuntan a un hongo presente en todos los tejidos, siendo en la hoja, donde su tiene una mayor presencia.

Es de especial interés que algunas de los género fúngicos más abundantes en la microbiota endófito de *V. planifolia* sean patógenos para cultivos de gran importancia (como trigo, cebada o arroz). Ordoñez y colaboradores (2012) identificaron a los géneros *Bipolaris*, *Phoma*, *Phomopsis*, y *Trichoderma*, todos ellos reportados como patógenos en otras plantas, pero curiosamente formando parte de la microbiota en *V. planifolia*. Algunos patógenos suelen

permanecer en un estado de latencia o quizás puede que la microbiota de *V. planifolia* sea colonizado por cepas sin patogenicidad, y en un caso más complejo, puede que influyan en el mantenimiento de *V. planifolia*, aunque esto solamente es una hipótesis y habría que demostrarlo.

4.2. ESTABLECIMIENTO DE UNA METODOLOGÍA DE ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS DE *V. planifolia*

Se evaluó el efecto de los sistemas ventilados en el desarrollo de brotes múltiples, crecimiento de plántulas, y pre-adaptación *in vitro* con la finalidad de aumentar la tasa de supervivencia *ex vitro* durante la aclimatación de *V. planifolia*.

4.2.1. Efecto de la ventilación en el crecimiento y la multiplicación de *V. planifolia*

La presencia de un sistema ventilado mejoró el desarrollo de las plántulas. Con 90 días en incubación, las plántulas en sistemas ventilados mostraron un mayor crecimiento y mejor desarrollo de la raíz, aunque un análisis estadístico con medias de Tukey no observó diferencia significativa en el crecimiento de las plántulas. Aun con ello, la principal diferencia se hallaba en el desarrollo morfológico de las plantas, especialmente en el contenedor de 20 cm de alto con el sistema ventilado. Bajo las condiciones de ventilación, las plántulas desarrollaron raíces de mayor tamaño (5 ± 0.3 cm).

En el estudio de Xiao y Kozai (2004), observaron un mayor porcentaje de enraizamiento en el cultivo *in vitro* de *Zantedeschia elliptica* al someterla a un tratamiento de ventilación. Un comportamiento similar reporta Lucchesni y colaboradores (2004) con el cultivo *in vitro* de *Philyrea laticifolia* en frascos con ventilación. Estos resultados marcan una relación estrecha entre el desarrollo de raíces y la implementación de sistemas ventilados. El intercambio gaseoso promueve la fotosíntesis en los cultivos *in vitro*, y esta a su vez origina la formación de nuevas estructuras, como las raíces que se observó en las plántulas de *V. planifolia*.

La disminución de una fuente exógena de carbono permite que las plantas puedan desarrollar mejores raíces, pues los azúcares inhiben el desarrollo de sistemas radiculares en estadios tempranos de crecimiento (Jarvis, 1986). La disminución de sacarosa en los medios, en conjunto con el establecimiento de los sistemas ventilados, propició un desarrollo considerable en las raíces de *V. planifolia*.

Una mayor proliferación de brotes múltiples se obtuvo en el frasco de 20 cm de alto con el sistema ventilado con 9 ± 2.27 brotes por frasco al cabo de 90 días. Zobayed y colaboradores (1999) reportaron una mayor proliferación de brotes múltiples y el desarrollo de tejido calloso de coliflor (*Brassica oleracea*) en sistemas ventilados, mientras que una menor tasa de proliferación de brotes múltiples y de tejido calloso en contenedores sellados. Un resultado similar se observó en la proliferación de brotes en jojoba (*Simmondsia chinensis*) al ser cultivada con un sistema ventilado (Mills *et al.*, 2004). La disminución en el número de brotes múltiples puede deberse a la acumulación de gases en los sistemas cerrados. Por ejemplo, el etileno es un inhibidor del desarrollo de brotes y su acumulación en los sistemas cerrados explica el bajo número de brotes obtenidos (Lai *et al.*, 2005).

Sin embargo, una mayor cantidad de brotes no significa necesariamente un mejor sistema, pues gran parte de estos brotes se encontraban en agrupaciones muy estrechas, unidos por tejido calloso de aspecto poco friable, dificultando la escisión de los brotes. Algunos brotes presentaban zonas necróticas y oxidadas, con el medio de cultivo fenolizado. Por otro lado, aquellos brotes desarrollados en sistemas cerrados mostraron una menor incidencia de necrosis u oxidación, además de estar bien diferenciados, y sin tejido calloso que cubra a los brotes. En los sistemas ventilados, la aparición del tejido calloso y el necrosado de los tejidos se observó a los 45 días de cultivo. Con todas estas evidencias, el uso de un sistema ventilado con un frasco de 20 cm es una buena alternativa para la obtención de brotes múltiples, siempre y cuando estos sean escindidos y subcultivados al cabo de 45 días.

4.2.2. Aclimatación de plántulas de *V. planifolia*

La pre-adaptación *in vitro* con sistemas ventilados supuso una gran ventaja para la supervivencia *ex vitro* durante el proceso de aclimatación de *V. planifolia*. Las plantas se mostraban vigorosas, sin vitrificación en sus tejidos y con el desarrollo de raíces (tanto radicular como aéreas) alcanzando alturas promedio de 22.5 ± 2.5 cm al cabo de 90 días.

Es de esperar que la aclimatación de plántulas sea la etapa donde mayor pérdida se reporta de los cultivos, sin embargo, al utilizar los sistemas de pre-adaptación este porcentaje de pérdidas puede ser ampliamente reducido. Parte importante al momento de realizar la aclimatación es el desarrollo de nuevas estructuras *ex vitro*, especialmente de yemas apicales, así como del anclaje de las raíces al sustrato. En *V. planifolia* se destaca el rol imprescindible de la exposición adecuada a la luz solar, siendo condiciones de luz moderada la mejor para su

desarrollo. Por otro lado, el riego por aspersión funciona adecuadamente, aumentando el porcentaje de humedad en los alrededores de las plantas. Un segundo lote de 6 plantas provenientes de pre-adaptación *in vitro* mostraron una tasa de mortalidad del 0%, con un crecimiento ponderado de 1.27 cm semana y alcanzando una altura de 40.6 ± 7.71 cm al cabo de 120 días.

Con estos resultados, se construyó una línea del tiempo con la finalidad de establecer un protocolo para la multiplicación, el crecimiento y la aclimatación de *V. planifolia* cultivada *in vitro*, mismo que se resume en la figura 4.7.

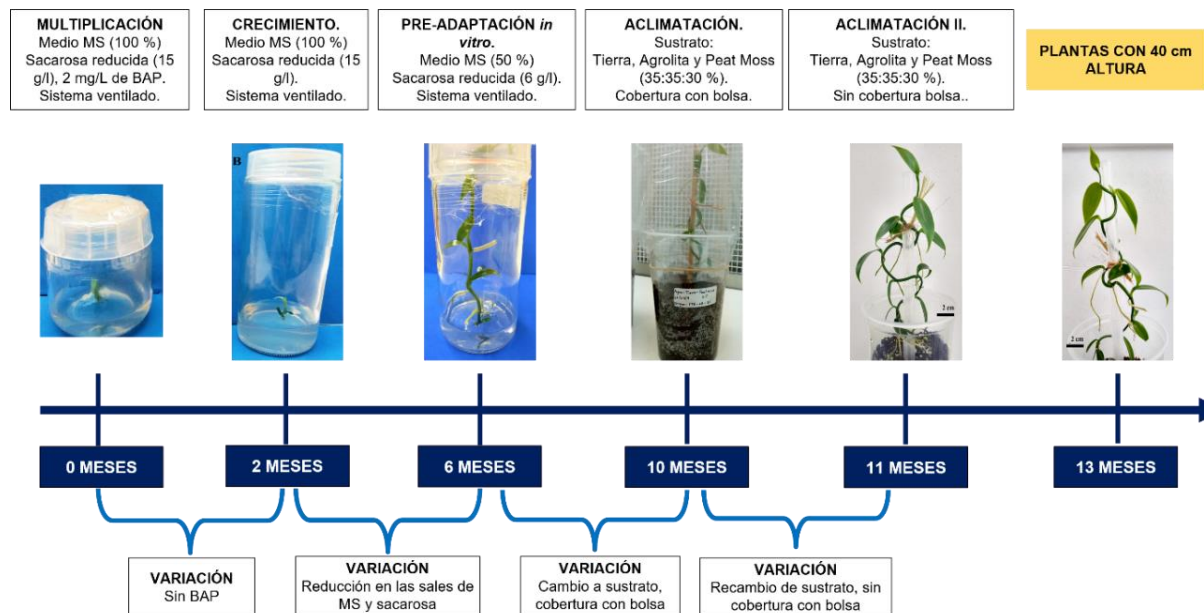


Figura 4.7. Línea del tiempo que muestra el protocolo de micropropagación de *V. planifolia*.

Es posible afirmar que la metodología ensayada en este documento es exitosa para la multiplicación de *V. planifolia*. Aun con ello, es necesario realizar más pruebas para corroborar que la metodología es reproducible, pues la multiplicación *in vitro* está en función de diversos factores, como el genotipo, edad de la planta, el tiempo de cultivo, etc. Sin embargo, este protocolo supone un gran paso para la multiplicación de *V. planifolia*.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1. CONCLUSIONES

5.1.1. Análisis comparativo de las comunidades microbianas endófitas en poblaciones silvestres y comerciales de *V. planifolia*

En el presente estudio, se observó una mayor riqueza de especies bacterianas y fúngicas en las raíces que en las hojas. Esto puede deberse a una gran variedad de factores, como la presión selectiva en la endosfera o la propia histología de las raíces aéreas, que permite un ambiente más propicio para el desarrollo de microorganismos.

De igual forma, las muestras de la población silvestre de *V. planifolia* presentaron una mayor riqueza de especies que las comerciales. Esto apunta a que tal como se hipotetizó, hay una menor cantidad de especies microbianas al pasar de un ambiente natural (sin interacción humana) a uno controlado, donde las plantas son tratadas con agroquímicos que merman la microbiota de las plantas.

De todas las muestras colectadas, se observó una mayor riqueza de especies y diversidad (tanto en las comunidades bacterianas como fúngicas) en las raíces de la población silvestre. Siendo este órgano la principal fuente de microorganismos con posibles aplicaciones biotecnológicas.

Se identificó la presencia de especies bacterianas tanto en la población silvestre como en la comercial (*Sphingomonas* sp, *Pseudonocardia* sp y *Rhizobium* sp), al igual que algunas especies fúngicas presentes en ambas poblaciones (*Cladosporium halotoleran*, *Epiccocum andropogonis* y *Giberrella intricans*). Los resultados sugieren que estas especies forman parte de la microbiota core de la endosfera de *V. planifolia*. Un resumen de las especies más relevantes se muestra en la tabla 5.1.

Las especies bacterianas encontradas en la endosfera de *V. planifolia* y, de acuerdo con la literatura, con posibilidad de aprovechamiento biotecnológico son: *Sphingomonas* sp, la cual se ha reportado como agente de biocontrol y productora de hormonas de crecimiento (auxinas); *Pseudonocardia* sp, con potencial utilidad en el control de hongos patógenos; *Rhizobium* sp, catalogado como una bacteria promotora del crecimiento, fijadora de nitrógeno; y finalmente

Luteibacter sp, por su capacidad de solubilizar fósforo inorgánico. En cuanto a las especies fúngicas, resaltan *Cladosporium oxysporum*, usada como agente de biocontrol, y *Epicoccum andropogonis*, productora de antibióticos.

Tabla 5.1. Resumen de las especies bacterianas y fúngicas con mayor abundancia relativa encontradas en la microbiota endófito de *V. planifolia*. Abreviaturas: HS hojas de poblaciones silvestres. RC raíz de poblaciones comerciales de las plantas. RS raíz de poblaciones silvestres; (+) presencia, (-) ausencia

	Especie	HS	RS	HC	RC
Bacterias	<i>Candidatus Phytoplasma</i>	+	-	+	-
	<i>Sphingomonas</i> sp.	+	+	+	+
	<i>Pseudonocardia</i> sp.	+	+	-	+
	<i>Actinomycetospora</i> sp.	+	+	-	-
	<i>Rhizobium</i> sp.	-	+	-	+
Hongos	<i>Cladosporium halotolerans</i>	+	-	+	-
	<i>Epicoccum andropogonis</i>	-	+	-	+
	<i>Gibberella intricans</i>	+	-	+	+
	<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	+
	<i>Colletotrichum karstii</i>	-	+	-	+

Si bien, no se sabe con certeza si las especies detectadas en la microbiota endófito de *V. planifolia* pueden jugar un papel benéfico, este estudio sienta las bases para la investigación de estas especies con potencial biotecnológico en el sector agrícola.

También resalta la presencia de *Candidatus Phytoplasma* en las hojas de *V. planifolia* tanto en la población silvestre como en la comercial. Este hallazgo supone el primer reporte de fitoplasma en la microbiota de *V. planifolia*, propiciando el inicio de nuevos estudios que caractericen a esta especie de fitoplasma. A la par, nuevos estudios orientados a entender el

comportamiento de la microbiota frente a un patógeno es de gran interés para futuras aplicaciones en el campo.

La presencia de hongos patógenos en las muestras de *V. planifolia* apunta a un posible mutualismo, donde los microorganismos viven de forma neutra en el interior de los tejidos de la planta, pues estos no han causado un daño aparente o mostrados signos de enfermedad por la infección. Sin embargo, se necesitan nuevos estudios para corroborar esta idea. Aun con ello, se debe recordar que no necesariamente un hongo que es patógeno para una especie, lo sea para todas las plantas. Cada cepa puede tener propiedades particulares y cumplir una nueva batería de funciones biológicas, que se deben explorar con el afán de profundizar en el conocimiento de las redes de microorganismos endófitos.

5.1.2. Establecimiento de una metodología de aclimatación de plántulas de *V. planifolia*

La utilización de un sistema ventilado en la propagación de plántulas de *V. planifolia* permitió obtener mejores rendimientos en el crecimiento y la multiplicación de brotes múltiples. A pesar de no tener una diferencia significativa en las alturas de los explantes en la línea de crecimiento, el desarrollo de las raíces se vio favorecido al utilizar sistemas ventilados, además de mostrar un mayor vigor y sin clorosis en los tejidos.

En lo que respecta a la multiplicación de brotes, los sistemas ventilados mostraron una mayor proliferación de brotes, especialmente el tratamiento del frasco de 20 cm y con ventilación. Aunque, al cabo de 45 días de incubación, se observó la proliferación de tejido callosos poco friable y tejido necróticos. Por lo cual, se recomienda escindir y sembrar los brotes al término de los 45 días de incubación, para evitar la formación de tejido callosos y la oxidación de los explantes.

La pre-adaptación *in vitro* mostró ser una sistema que aumenta la sobrevivencia *ex vitro* de las plántulas de *V. planifolia*, obteniendo un 100% de sobrevivencia tras 120 días. El paso por el sistema ventilado y la disminución de la concentración de sacarosa probaron ser factores que en conjunto aumentaron el número de plantas que fueron aclimatadas exitosamente. Sin embargo, aún es necesario realizar más pruebas con un mayor número de plantas para corroborar que este sistema de aclimatación sea fiable y eficiente.

Aun con ello, esta metodología probó ser adecuada y eficiente para la micropropagación de *V. planifolia*. Obteniendo altos rendimientos en la sobrevivencia *ex vitro* así como una alternativa para los procesos de propagación de *V. planifolia*.

5.2. PERSPECTIVAS

5.2.1. Análisis comparativo de las comunidades microbianas endófitas en poblaciones silvestres y comerciales de *V. planifolia*

La identificación de los microorganismos en la microbiota endófitas es un punto de partida para la búsqueda de nuevas cepas que puedan ser usadas para aplicaciones biotecnológicas. Por ejemplo, las especies *Sphingomonas*, *Pseudonocardia* o *Luteibacter*, mismas que pueden tener una aplicación biotecnológica, pueden ser aisladas con la finalidad de comprobar sus capacidades *in vitro* y ser aplicadas en otras plantas, evaluando su posibilidad de usarse como biofertilizantes. Este estudio provee un punto de partida para futuras investigaciones dirigidas a al estudio de estas especies y su posible aplicación en los sistemas agrícolas.

El tratamiento de poblaciones cultivadas comercialmente con microorganismos aislados de poblaciones silvestres puede suponer una gran ventaja para los productores, pues no solo aumentará su producción (ya sea protegiendo los cultivos contra el ataque de patógenos o mejorando la salud y vigor de las plantas) sino que además puede ser una alternativa amigable con el medio ambiente, y proveer una solución sostenible bastante atractiva.

Aun con ello, se debe tener especial cuidado con la manipulación de la microbiota endófitas, pues lo que para algunas especies puede ser benéfico, para otras puede ser un patógeno. De modo tal que aún es necesario identificar, aislar y probar estos microorganismos.

De igual forma, se sugiere realizar un estudio del microbioma del suelo donde se colectaron las poblaciones silvestres. Si bien, el suelo contiene una microbiota variable, esto permitirá tener un mejor panorama de las especies que están presentes en el suelo y si alguna de ellas es común a la endosfera de las raíces. Esto permitirá entender la compleja red simbiótica entre la planta huésped y su microbiota.

A igual, se sugieren futuros estudios que caractericen la especie de fitoplasma que se encontró en la microbiota de *V. planifolia*. Específicamente, la utilización de PCR y cebadores específicos a fitoplasma para corroborar su presencia en las hojas de otras accesiones, además de estudios orientados al entendimiento de las relaciones patógeno-microbiota-planta.

5.2.2. Establecimiento de una metodología de aclimatación de plántulas de *V. planifolia*

Los contenedores con el sistema ventilado mostraron ser una gran alternativa para la propagación y posterior aclimatación de las plántulas de *V. planifolia*. Las condiciones fotoautótrofas indujeron un crecimiento de las plántulas sin deformaciones anatómicas visibles, de modo que se logró instaurar una metodología de aclimatación eficiente.

Si bien, aún es necesario el estudio de estos sistemas a una escala mayor, con los resultados obtenidos en esta investigación podemos dibujar un panorama alentador para el desarrollo e implementación de los sistemas de ventilación en las metodologías de micropropagación de diversas plantas (incluidas *V. planifolia*). Estos sistemas, de costo relativamente bajo, muestran ser eficientes en tanto en el crecimiento y la inducción de brotes múltiples en *V. planifolia*, y se espera poder extrapolar estos aprendizajes a nuevas especies de la familia de las orquídeas.

Es imprescindible profundizar en el conocimiento de la fisiología de *V. planifolia* durante el cultivo en los sistemas de ventilación. Mediciones de la cantidad de CO₂, vapor de agua, así como el estudio de los aparatos fotosintéticos de las plántulas, permitirán la mejora continua de estos sistemas de ventilación. Dichos sistemas podrían usarse en el ámbito comercial, optimizando los procesos de propagación y disminuyendo las posibles pérdidas económicas durante la aclimatación de plántulas *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

- Alomía, Y. (2014). Hongos micorrízicos en *Vanilla* spp. (Orchidaceae) y su potencial para la germinación de semillas. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia, Colombia. pp. 12.
- Alvarez, C., Sáez, P., Sáez, K., Sánchez, M., Ríos, D. (2012). Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Gervuina avellana* mol. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 110 (1), 93-101.
- Amir, A., McDonald, D., Navas, J., Kopylova, E., Morton, J., Zech, Z., Kightley, E., Thompson, L., Hyde, E., Gonzales, A., Knight, R. (2017). Deblur rapidly resolves single-nucleotide community sequences patterns. *mSystems*, 2(2), 1-7.
- Andrews, S., Wingett, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. *F1000Research* 2018, 7, 1338
- Azofeifa, J., Paniagua, A., García, J. (2014). Importancia y desafíos de la conservación de *Vanilla* spp (Orquidaceae) en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*. 25 (1), 189-202.
- Bacci, G., Bani, A., Bazzicalupo, M., Ceccherini, M., Galardini, M., Nannipieri, P., Pietramellara, G., Mengoni, A. (2015). Evaluation of the performances of Ribosomal Database Project (RDP) Classifier for taxonomic assignment of 16S rRNA metabarcoding sequences generated from Illumina-Solexa NGS. *Journal of genomics*, 3, 36-39.
- Bayman, P., Otero, T. (2006). Microbial Endophytes of Orchid Roots, en: Soil Biology (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 153–177.
- Berendsen, R., Pieterse, C., Bakker, P. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*. 17 (8), 1360-1385.
- Blaalid, R., Kumar, S., Nilsson, R., Abarenkov, K., Kirks, P., Kauserud, H. (2013). ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Molecular Ecology*, 13, 218-224.
- Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R., Adebe, E. (2005). Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Biological Sciences*, 360 (1462), 1935-1943.

- Bokulich, N., Subramanian, S., Faith, J., Gevers, D., Gordon, J., Knight, R., Mills, D., Caporaso, G. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Natural Methods*, 10 (1), 57-59.
- Bolton, H., Elliott L., Turco, R., Kennedy, A. (1990). Rhizoplane colonization of pea seedlings by *Rhizobium leguminosarum* and a deleterious root colonizing *Pseudomonas* spp. and effect on plant growth. *Plant Soil*, 123, 121-129.
- Bolyen, E., Rideout, J., Dillon, M., Bokulich, N., Abnet, C., Al-Ghalith, G., Alexander, H., Alm, E., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Thompson, L., Torres, P., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P., Ul-Hasan, S., van der Hooft, J., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K., Xu, Z., Zaneveld, J., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R., Caporaso, J. (2019). Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37, 852–857.
- Bory, S., Grisoni, M., Duval, M., Besse, P. (2008). Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55 (4), 551-571.
- Buermans, H., den Dunnen, J. (2014). Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842, 1932-1941.
- Bulgarelli, D., Garrido, R., Münch, P., Weiman, A., Dröge, J., Pan, Y., McHardy, A., Schulze, P. (2015). Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host Microbe*, 17 (3), 392-403.
- Callahan, B., McMurdie, P., Rosen, M., Han, A., Johnson, A., Holmes, S. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581-583.
- Case, R., Boucher, Y., Dahlöf, I., Holmström, C., Doolittle, W., Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 278-288.
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connel, N., Alland, D. (2008). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbial Methods*, 69 (2), 330-339.

- Caporaso, J., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F., Costello, E., Fierer, N., Gonzalez, A., Goodrich, J., Gordon, J., Huttley, G., Kelley, S., Knights, D., Koenig, J., Ley, R., Lozupone, C., McDonald, D., Muegge, B., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J., Turnbaugh, P., Walters, W., Widmann, J., Yatsunenkom T., Zaneveld, J., Knight R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Natural Methods*, 7 (5), 335-336.
- Caporaso, J., Lauber, C., Walters, W., Berg-Lyons, D., Lozupone, C., Turnbaugh, P., Fierer, N., Knight, R. (2011). Global patterns of 16 rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *PNAS*, 108, 4516-4522.
- Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V., Chandra, R. (2010). Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters*, 32, 1199-1205.
- Cole, J., Wand, Q., Fish, J., Chai, B., McGarrell, D., Sun, Y., Brown, C., Porras, A., Kuske, C., Tiedje, J. (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 42, 633-642.
- DeSantis, T., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E., Keller, K., Andersen, G. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied Environmental Microbiology*, 72 (7), 5069-5072
- Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*. 19: 1349.
- El Meskaoui, A., Tremblay, F. (1999). Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the maturation of somatic embryos of black spruce with a special emphasis on the ethylene. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 56, 201-209.
- Erwing, B., Hillier, L., Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred I accuracy assesment. *Genome Research*, 8 (3), 175-185.
- Escobar, A., Ponce, A., Sanchez, A. (2015). The road to metagenomics: from microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. *Frontiers in Genetics*, 6, 34B.

- Ferreira, W., Suzuki, R., Pescador, R., Figueiredo-Ribeiro, R., Kerbauy, G. (2011) Propagation, growth, and carbohydrates of *Dendrobium* (Orchidaceae) *in vitro* as affected by sucrose, light, and dark. *In Vitro Cell Development Biology Plant*, 47, 420–427.
- Financiera Nacional de Desarrollo. (2014). Panorama de la Vainilla. Secretaria de Hacienda y Crédito Público, México, pp. 2.
- Finkel, O., Castrillo, G., Herrera, S., Salas, I., Dangl, J. (2017). Understanding and exploiting plant beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, 38, 155 – 163.
- Fouché, J., Jouve, L. (1999). *Vanilla planifolia*: history, botany, and culture in Reunion Island. *Agron.* 19, 689-703.
- Fuentes, G., Talavera, C., Oropeza, C., Desjardins, Y., Santamaria, J. (2005) Exogenous sucrose can decrease *in vitro* photosynthesis but improve field survival and growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro* plantlets. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 41,69–76.
- Fukamachi, K. (2019). Disease control of *Phytophthora infestans* using cyazofamid encapsulated in poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.*, 577, 315-322
- Gdanetz, K., Trail, F. (2017). The wheat microbiome under four management strategies, and potential for endophytes in disease protection. *Phytobiomes*, 1(3), 158-168.
- Gómez, P. (2008). *Vanilla planifolia*, the first Mesoamerican orchid illustrated, and notes on the de la Cruz-Badiano Codex, *Lankesteriana*, 8 (1), 81-88.
- Gopal, M., Gupta, A. (2016) Microbiome Selection Could Spur Next-Generation Plant Breeding Strategies. *Frontiers in Microbiology*, 7,1971.
- Guinazo, L., Andres, J., Del Papa, M., Pistorio, M., Rosas, S. (2010). Response of alfalfa (*Medicago sativa*) to single and mixed inoculations with phosphate-solubilizing bacteria and *Sinorhizobium meliloti*. *Biol. Fert. Soils*, 46, 185-190.
- Gürtler, V., Stanisich, V. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142, 3-16.

- Hardoim, P., van Overbeek, L., Berg, G., Pirttilä, A., Compant, S., Campisano, A., Sessitsch, A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293–320.
- Haas, B., Gervers, D., Earl, A., Feldgarde, M., Ward, D. (2011). Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Research*, 21, 494-504.
- Hane, J., Lowe, R., Solomon, P., Tan, K. (2007). Dothideomycete-plant interactions illuminated by genome sequencing and EST analysis of the wheat pathogen *Stagonospora nodurum*. *The Plant Cell*, 19, 3347-3368.
- Hernández, J. (2019). Handbook of Vanilla science and technology. John Wiley, México, pp. 25.
- Hetrick, B., Wilson, G., Cox, T. (1992). Mycorrhizal dependence of modern wheat varieties, landraces, and ancestors. *Canadian Journal Botany*, 70, 2032–2040.
- Hirsch, P., Mauchline, T., Clark, I. (2010). Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 878-887.
- Huang, C., Jian, F., Huang, H., Chang, W., Wu, W., Hwang, C., Lee, R., Chiang, T. (2014). Deciphering mycorrhizal fungi in cultivated *Phalaenopsis* microbiome with next generation sequencing of multiple barcodes. *Fungal Diversity*, 66, 77-88.
- Innerebner, G., Knief, C., Verholt, J. (2011). Protection of *A. thaliana* against leaf pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. *Applied and Environ. Micro.*, 77(10), 3202-3210.
- Iwen, P., Hinrichs, S., Rupp, M. (2002). Utilization of the internal transcribed spacers regions as a molecular target to detect and identify human fungal pathogens. *Medical Mycology*, 40, 87-109.
- Janda, J., Abbot, S. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory; pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (9), 2761-2764.

- Jaramillo, J., Hollander, M., Ramírez, C., Mendes, R., Raaijmakers, J., Carrión, V. (2019), Deciphering rhizosphere microbiome assembly of wild and modern common bean (*Phaseolus vulgaris*) in native and agricultural soils from Colombia. *Microbiome*, 7,114.
- Jarvis, B. (1986). Endogenous control of adventitious rooting in non-woody cuttings, en: New root formation in plants and cuttings. (Ed.). Martinus Nijhoff Publ, Dordrecht, Países Bajos, pp. 191-222.
- Jayasekhar, M., Manonmani, K., Justin, C. (2008). Development of integrated biocontrol strategy for the management of stem rots disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*) of *Vanilla*. *Agric. Sci. Dig. Abstr.*, 28, 109-111
- Karolina, F., Jaroslaw, G., Ann, G., Jacek, N. (2020). Prevalence of unclassified bacteria in the soil bacterial community from floodplain Meadows (fluvisols) under simulated flood conditions revealed by a metataxonomic approachss. *Catena*. 188, 104448.
- Keegan, K., Glass, E., Meyer, F. (2016). MG-RAST, a metagenomic service for analysis of microbial community structure and function. *Methods in Molecular Biology*, 1399, 207-233.
- Kiss, L. (2012). Limits of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences as species barcodes for Fungi. *PNAS*, 109 (27), 1-3.
- Khoyratty, S., Dupont, J., Lacoste, S., Palama, T., Kodja, H. (2015). Fungal endophytes of *Vanilla planifolia* across Réunion Island: isolation, distribution, and biotransformation *BMC Plant Biology*, 15,142.
- Kleczewski, N., Bauer, J., Bever, J., Clay, K., Reynolds. (2012). A survey of endophytic fungi of switchgrass (*Panicum virgatum*) in the Midwest, and their putative roles in plant growth. *Fungal ecology*, 5, 521-529.
- Knief, C. (2014). Analysis of plant microbe interactions in the era of next generation sequencing technologies. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1–23.
- Kordan, H. (1965) Simple tissue-culture vessel permitting gas exchange with low moisture. *Appl Microbiol.*, 13, 825–826

- Kozai, T., Kubota, C. (2001). Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. *Journal of Plant Res.*, 114, 525-537.
- Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W., González, A., Caporaso, G., Knight, R. (2011). Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Current Protocols in Bioinformatics*, 36 (1), 10-38.
- Kumar, M., Ashraf, S. (2017). Role of *Trichoderma* spp as a biocontrol agent of fungal plant pathogens, en: Probiotics and Plant Health. Springer, Singapore, pp 497-506.
- Lafontaine, D., Tollervey, D. (2001). The function and synthesis of ribosomes. *Molecular Cell Biology*, 2, 514-520.
- Lai, C., Lin, H., Nalawade, S., Fang, W., Tsay, H. (2005). Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels. *Journal of plant physiology*, 162, 355-361.
- Leff, J., Lynch, R., Kane, N., Fiere, N. (2017). Plant domestication and the assembly of bacterial and fungal communities associated with strains of the common sunflower, *Helianthus annuus*. *New Phytology*, 214, 412 – 423.
- Leray, M., Knowlton, N. (2016). Visualizing patterns of marine eukaryotic diversity from metabarcoding data using QIIME, en: Marine Genomics: Methods and Protocols. Springer (Ed.). United Kingdom, pp. 220-237.
- Lubinsky, P. (2003). Conservation of wild vanilla, en: Abstract of the first International Congress of the Vanilla Business. New Jersey, USA, 11-12 November 2003.
- Lubinsky, P., Bory, S., Hernández, J., Kim, S., Gómez, A. (2008). Origins and disperse of cultivated vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. [Orchidaceae]). *Economic Botany*, 62 (2), 127-138.
- Lucchesini, M., Mensuali, A. (2004). Influence of medium composition and vessel ventilation on *in vitro* propagation of *Philyrea lattifolia* L. *Scientia horticulturae*, 100, 117-125.
- Lynnaun, J. (2019). Investigating specificity and diversity of orchid mycorrhizal fungi of *Vanilla planifolia* and *Dendrophylax lindenii*. Tesis de Doctorado. Northwestern University, Estados Unidos. pp. 17.

- Mapula, K., Ramond, J., Trindade, M. (2015). Impact of metagenomic DNA extraction procedures on the identifiable endophytic bacterial diversity in *Sorghum bicolor* (L. Moench). *Journal of Microbiological Methods*, 112, 104-117.
- Méndez, D. (2014). La producción de vainilla en la finca La Palma, municipio San Rafael, estado de Veracruz. México. Tesis de maestría. Universidad Veracruzana., México. pp. 29.
- Millet, Y. (2010). Innate immune responses activated in *Arabidopsis* root by microbe-associated molecular patterns. *Plant Cell*, 22, 973-990.
- Mills, D., Yanquing, Z., Benzioni, A. (2004). Improvement of jojoba shoot multiplication *in vitro* by ventilation. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 40, 396-402.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Mutch, L., Young, P. (2004). Diversity and specificity of *Rhizobium leguminosarum* on wild and cultivated legumes. *Molecular Ecology*, 13(8), 2435-2444.
- Naseby, D., Pacual, J., Lynch, J. (2000). Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. *J. Appl. Microbiol.*, 88, 161-169.
- Navas, J., Peralta, J., Gonzáles, A., McMurdie, P., Vázquez, Y., Xu, Z., Ursell, L., Lauber, C., Zhou, H., Song, S., Huntley, J., Ackermann, G., Berg, D., Holmes, S., Caporaso, J., Knight, R. (2013). Advancing our understanding of the human microbiome using QIIME. *Methods Enzimology*. 531, 371-444.
- Nawrocki, E., Eddy, S. (2013). Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. *Bioinformatics*, 29, 2933-2935.
- Ordoñez, N. (2012). Efecto de hongos endófitos de orquídeas del grupo *Rhizoctonia* y otros endófitos cultivables sobre el desarrollo de plantas de *Vanilla planifolia* Jacks. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia, Medellín. pp. 54.

- Ohm, R., Feau, N., Henrissat, B., Schoch, C., Horwits, B. (2013). Diverse lifestyles and strategies of plant pathogenesis encoded in the genomes of eighteen Dothideomycetes fungi. *PLOS Pathogens*, 9(3), 24 – 36.
- Olsen, G., Overbeek, F., Larsen, N., Marsh, T., McCaughey, M., Maciukenas, M., Kuan, W., Macke, T., Xing, Y., Woese, C. (1992). The Ribosomal Database Project. *Nucleic Acids Research*, 20, 2199-2200.
- Oldroyd G., Murray, J., Poole, P., Downie, J. (2011). The rules of engagement in the legume rhizobial symbiosis. *Annuary Rev Genetics*, 45,119-144.
- Ossenbach C. (2005). History of orchids in Central America. Part I: from prehispanic times to the independence of the new republics. *Harvard Papers in Botany*,10 (2), 197-202.
- Palaniappan, P., Chauhan, P., Saravanan, V., Anandham, R., Ta, T. (2010). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. *Biol. Fertil. Soils.*, 46, 807-816
- Palaniyandi, S., Yang, S., Zhang, C., Suh, J. (2013). Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Applied Microbiol. Biotech.*, 97, 9621-9636
- Paniagua, A., García, J. (2009) Manual para el cultivo de vainilla en sistemas agroforestales, en: Paniagua, A., García, J. (Ed.). Instituto de Investigación y Servicios Forestales. Universidad Nacional de Costa Rica. pp. 76-89.
- Parnell, J., Berka, R., Young, H., Sturino, J., Kang, Y., Bamhart, D., DiLeo, M. (2016). From the lab to the farm: An industrial perspective of plant beneficial microorganisms. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1110.
- Pérez, J., Mendes, R., Raaijmakers, J. (2016). Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. *Plant. Mol. Biol.*, 90, 635-644.
- Pérez, J., Carrión, V., de Hollander, M., Raajmakers, J. (2018). The wild side of plant microbiomes. *Microbiome*, 6, 143.
- Poretzky, R., Rodríguez, L., Luo, C., Tsementzi, D., Konstantinidis, K. (2014). Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PLoS One*, 9(4), e93827.

- Quambusch, M., Winkelmann, T. (2018). Bacterial endophytes in plant tissue culture: Mode of action, detection, and control, en: Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology, Quambusch, M. (Ed.). Springer Science. pp. 69–88.
- Quast, C., Pruessem E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer. T., Yarza, P., Glöckner, F. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database Project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41, 590-596.
- Quince, C., Lanzén, A., Curtis, T., Davenport, R., Hall, N., Head, I., Read, F., Sloan, W. (2009). Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nature Methods*. 6 (9), 639-641.
- Ram, J., Karim, A., Sandler, E., Kato, I. (2011). Strategy for microbiome analysis using 16 rRNA gene sequence analysis on the Illumina sequencing platform. *Journal of Systems Biology in Reproductive Medicine*, 57 (3), 162-170.
- Ramirez, K., Craine, J., Fierer, N. (2012). Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. *Glob Chang Biology*, 18, 1918 – 1927.
- Remans, R. (2007). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on nodulation of *Phaseolus vulgaris* L. are dependent on plant P nutrition. *Eur. J. Plant Pathology*, 119, 341-351.
- Renvoisé, A., Brossier, F., Sougakoff, W., Jarlier, V., Aubry, A. (2013). Broad-range PCR: Past, present, or future of bacteriology? *Médecine et maladies infectieuses*, 43, 322-330.
- Reyes-López, D., Hernández-Leal, E., Bonilla, O., García-Zavala, J. (2016). Acimatación de híbridos intraespecíficos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews, obtenidos *in vitro*. *AgroProductividad*, 9(11), 72-77.
- Ribeiro, A., Picoli, E., Lani, E., Vendrame, W., Otoni, W. (2009) The influence of flask sealing on *in vitro* morphogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant.*, 45,421–428.
- Rodrigues, M., Costa, T., Festucci, R., Silva, L., Otoni, W. (2012) Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant.*, 48, 67–72.

- Rodriguez, R., White, J., Arnold, E., & Redman. (2008). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182, 314-330.
- Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., Dowling, D. N. (2008). Bacterial endophytes: Recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, 278(1), 1–9.
- SEMARNAT. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Diario Oficial de Federación. México. 30 de diciembre de 2010.
- Saldanha, C., Gomide, C., Laísca, J., Carnevalli, L., Monteiro, M., Campos, W. (2012). A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata* [Spreng.] Pedersen). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 10, 413-422.
- Sangabriel, W., Negrete, S., Maldonado, E., Trejo, D. (2012). Native maize landraces from Los Tuxtlas, Mexico show varying mycorrhizal dependency for P uptake. *Biol Fertil Soils.*, 50, 405–14.
- Santhanam, R., Luu, V., Weinhold, A., Goldberg, J. (2015). Native root-associated bacteria rescue a plant from a sudden-wilt disease that emerged during continuous cropping. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 112, 5013 – 5020.
- Sathiyadash, K., Muthukumar, T., Uma, E., Pandey, R. (2012). Mycorrhizal association and morphology in orchids. *Journal of Plant Interactions*, 7(3), 283–247.
- Silva, A., Wedge, D., Cantrell, C., Carvalho, C., Pan, Z., Moraes, R., Madoxx, V., Rosa, L. (2015). Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* from United States. *Microbiological Research*, 175, 67-77.
- Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J., Levesque, A., Chen, W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS*, 109(16), 6241-6246.
- Schlüter, P., Soto, M., Harris, S. (2007). Genetic variation in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Economic Botany*, 61(4), 328-336.

-
- Shavalli, P., Kozai, T., Nguyen, Q., Kubota, C., Dhawan, V. (2002) Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 71, 141–146.
- Shem, X., Cheng, Y., Cai, C., Fan, L., Gao, J., Hou, C. (2014). Diversity and antimicrobial activity of culturable endophytic fungi isolated from Moso Bamboo Seeds. *PLOS*, doi.org/10.1371/journal.pone.0095838.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology*. 31, 425-448.
- Spatafora, J., Owensby, C., Douhan, G., Boehm, E., Schoch, C. (2012). Phylogenetic placement of the ectomycorrhizal genus *Cenococcum* in *Gloniaceae* (Dothideomycetes). *Mycologia*, 104(3), 758-765.
- Suárez, J., WeiB, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F., Korrke, I. (2006). Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycology Research*, 110, 1257-1270.
- Tan, X., Chen, X., Wang, C., Jin, X., Cui, J., Chen, J., Guo, S., Zhao, L. (2011). Isolation and identification of endophytic fungi in roots of nine *Holcoglossum* plants (Orchidaceae) collected from Yunnan, Guangxi, and Hainan provinces of China. *Current Microbiology*, 64, 140-147.
- Teeling, H., Glöckner, F. (2012). Current opportunities and challenges in microbial metagenome analysis - a bioinformatic perspective. *Briefing in Bioinformatics*, 13(6), 728-742.
- Toju, H., Tanabe, A., Yamamoto, S., Sato, H. (2012). High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in environmental samples. *PLoS ONE*, 7 (7), 1-11.
- Trivedi, P., Leach, J., Tringe, S., Sa, T., Singh, B (2020). Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature Review Microbiology*, 18(11), 607 – 621.

- Trivedi, P., Schenk, P., Wallenstein, M., Singh, B. (2017). Tiny microbes, big yields: enhancing food crop production with biological solutions. *Microbial Biotechnology*, 10, 999-1003.
- Tsavkelova, E., Cherdyntseva, T., Botina, S., Nelson, L. (2007). Bacteria associated with orchids roots and microbial production of auxin. *Microbiol. Res.*, 162, 69-76.
- Valenzuela, F., Casillas, R., Villalpando, E., Vargas, F. (2015). The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*, 41(4), 297-313.
- Valero, C., Wilson, S., Kane, M., Philman, N. (2007) Influence of *in vitro* growth conditions on *in vitro* and *ex vitro* photosynthetic rates of easy- and difficult-to-acclimatize sea oats (*Uniola paniculata* L.) genotypes. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 43, 237–246.
- Vartoukian, S., Palmer, R., Wade, W. (2010). Strategies for culture of “uncultured” bacteria. *FEMS Microbiology Letter*, 309, 1-7.
- Villanueva, S., Hernández, M., Fernández, G., Dorantes, A., Dzib, G., Martínez, J. (2017). Wild *Vanilla planifolia* and its relatives in the Mexican Yucatan Peninsula: Systematic analyses with ISSR and ITS. *Botanical Science*, 95 (2), 169-187.
- Walters, W., Hyde, E., Lyons, D., Ackermann, G., Humphrey, G., Parada, A., Gilbert, J., Jansson, J., Caporaso, G., Fuhrman, J., Apprill, A., Knight, R. (2016). Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. *mSystem*, 1 (1), e00009-15.
- Wang, X., Yang, T., Meng, Q. (2016) The dual inoculation of endophytic fungi and bacteria promotes seedlings growth in *Dendrobium catenatum* (Orchidaceae) under *in vitro* culture conditions. *Plant Cell Tissue Org.*, 126, 523-531.
- Wang, Y., Huang, J., Zhou, Y., Almeida, A., Finn, R., Danchin, A., Sheng, L. (2020). Phylogenomics of expanding uncultured environmental Tenericutes provides insights into their pathogenicity and evolutionary relationship with *Bacilli*. *BMC Genomics*, 21 (408), 1 – 12.
- Weisburg, W., Barns, M., Pelletier, D., Lane, D. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogentic study. *Journal of Bacteriology*, 17, 697-703.

- Weese, D., Heath, K., Dentinger, B., Lau, J. (2015) Long-term nitrogen addition causes the evolution of less-cooperative mutualists. *Evolution*, 69(3), 631–642.
- White, J., Torres, M., Sullivan, R., Jarbour, R., Chen, Q., Tadych, M., Trizarry, I., Bergen, M., Havkin, D., Belanger, F. (2014). Occurrence of *Bacillus amyloliquefaciens* as a systematic endophyte of *Vanilla* orchids. *Microscopy Research & Tech*, 1, 1-13.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, en: PCR protocols: a guide to methods and applications. Academia Press., San Diego. pp. 315-322.
- Wooley, J., Ye, Y. (2010). Metagenomics: Facts and Artifacts, and computational challenges. *Journal of computer science and technology*, 25(1), 71-81.
- Xiao, Y., Niu, G., Kozai, T. (2011) Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell Tiss Org Cult.*, 105, 149–158.
- Xiong, W., Zhao, Q., Xue, C., Xun, W., Zhao, J., Wu, H., Li, R., Shen, Q. (2016). Comparison of fungal community in black pepper-vanilla and vanilla monoculture systems associated with vanilla *Fusarium* wilt disease. *Frontiers in Microbiology*, 7, 117-125.
- Xiong, W., Zhao, Q., Zhao, J., Xun, W., Li, R., Zhang, R., Wu, H., Shen, Q. (2015). Different continuous cropping spans significantly affect microbial community membership and structure in a vanilla-grown soil as revealed by deep pyrosequencing. *Microbial Ecology*, 70, 209-218.
- Xu, J. (2006). Microbial ecology in the age of genomes and metagenomics: concepts, tools and recent advances. *Molecular Ecology*, 15, 1713-1731.
- Yang, B., Wang, Y., Quian, P. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, 17, 135-143.
- Zachow, C., Müller, H., Ticher, R., Berg, G. (2014). Differences between the rhizosphere microbiome of *Beta vulgaris* ssp. Maritima-ancestor of all beet crops and modern sugar beets. *Frontiers in Microbiology*, 5, 415 – 423.
- Zamioudis, C., Pieterse, C. (2011). Modulation of Host Immunity by Beneficial Microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(2), 139–150.

BIBLIOGRAFÍA

Zobayed, S., Armstrong, J., Armstrong, J. (1999). Cauliflower shot culture: effects of different types of ventilation on growth and physiology. *Plant Science*, 141 (2), 209-217.

Zobayed, S., Afreen, F., Kozai, T. (2001). Physiology of *Eucalyptus* plantlets grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. *In vitro Cell Dev.Biol.*, 37, 807-813.