



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**BIOPROSPECCIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS EN  
CARICA PAPAYA Y SACCHARUM OFFICINARUM**

Tesis que presenta

**SANDI JULISSA REYES HERNÁNDEZ**

En opción al título de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

(Ciencias Biológicas: **OPCIÓN BIOTECNOLOGÍA**)

Mérida, Yucatán, México

**2022**

*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 **Sandi Julissa Reyes Hernández** titulado “**Bioprospección de bacterias endófitas en *Carica papaya* y *Saccharum officinarum*”**, **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** fue realizado en la **Unidad de Biotecnología**, dentro del Laboratorio de Fisiología Molecular y Transformación Genética de Plantas del **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.** bajo la dirección del **Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata** y la codirección del Dr. Alejandro Pereira Santana, 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 17 de noviembre de 2022

## 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 regirán 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.



---

M. en C. Sandi Julissa Reyes Hernández.

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado BASE BIOTECNOLÓGICA PARA LA INNOVACIÓN Y EL DESARROLLO DE VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR TOLERANTES A SEQUÍA PARA ZONAS DE TEMPORAL EN MÉXICO-Primera etapa (Clave del CONACyT: 215098); FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE PAPAYA (*CARICA PAPAYA* VAR. MARADOL COMO UNA PLATAFORMA MOLECULAR PARA MEJORAR SU TOLERANCIA A ESTRESSES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS (Clave del CONACyT: 155356); ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA Y PROTEOMA DE PAPAYA (*Carica papaya* L.) EN RESPUESTA A ESTRÉS HÍDRICO: IDENTIFICACIÓN DE GENES CON POTENCIAL PARA MEJORAR SU EFICIENCIA EN EL USO DE AGUA (Clave del CONACyT: 221208), bajo la dirección del Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata y el Dr. Alejandro Pereira Santana.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca brindada en correspondencia a los estudios del programa de doctorado.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán y personal, por los espacios y facilidades prestados.

A mi asesor, el Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata, por la dirección, las aportaciones y conocimientos sugeridos para el desarrollo de este trabajo.

A mi co-asesor, el Dr. Alejandro Pereira Santana, por el seguimiento, aportaciones y consejos dados para la realización del trabajo. Por el apoyo para darle estructura y definir el proyecto.

Al Dr. Mario Alberto Martínez Núñez, por el apoyo, colaboración y sugerencias en pro de mejorar el desarrollo del proyecto.

Al Dr. José Humberto Caamal Vázquez, por facilitar parte del material requerido para el proyecto.

Al comité tutorial, conformado por el Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata, el Dr. Alejandro Pereira Santana, el Dr. Mario Alberto Martínez Núñez y el Dr. Enrique Castaño de la Serna, por los comentarios objetivos y observaciones hechas en cada sesión evaluadora.

A los técnicos de laboratorio, el Ing. Miguel Ángel Keb Llanes, el M. en C. Miguel Ángel Herrera Alamillo y el Biól. Felipe Alonso Barredo Pool por proporcionarme parte del material biológico requerido para llevar a cabo el proyecto, así como por el apoyo técnico durante éste.

## LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS

Durante los estudios de doctorado se obtuvieron cuatro artículos con factor de impacto derivados del proyecto de tesis, así como de las colaboraciones con otros proyectos de investigación. Actualmente, se encuentra sometida una publicación en la revista *Archives of Microbiology*.

Sandi Julissa Reyes-Hernández, Alejandro Pereira-Santana\*, Jesús Alejandro Zamora-Briseño, Mario Alberto Martínez-Núñez, Diego Garfias-Gallegos, José Humberto Caamal-Velázquez, Enrique Castaño, Luis Carlos Rodríguez-Zapata\*. First insights into the bacterial endophytes of stalks of three Mexican *Saccharum officinarum* cultivars. *Archives of Microbiology*. (Sometido el 23 Junio)

Zamora-Briseño J.A., Pereira-Santana A., Reyes-Hernández S.J., Cerqueda-García D., Castaño de la Serna E., Rodríguez-Zapata L.C. Towards an understanding of the role of intrinsic protein disorder on plant adaptation to environmental challenges. *Cell Stress and Chaperones* (2021). <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01162-5>

Reyes-Hernández, S.J., Zamora-Briseño, J.A., Cerqueda-García, Castaño de la Serna E., Rodríguez-Zapata L.C. Alterations in the sap-associated microbiota of *Carica papaya* in response to drought stress. *Symbiosis* (2020). <https://doi.org/10.1007/s13199-020-00682-z>  
3

Lledías, F., Gutiérrez, J., Martínez-Hernández, A., García-Mendoza, A., Sosa, E., Hernández-Bermúdez, F., Dinkova, T. D., Reyes, S., Cassab, G.I., Nieto-Sotelo, J. Mayahuelin, a Type I Ribosome Inactivating Protein: Characterization, Evolution, and Utilization in Phylogenetic Analyses of *Agave*. *Front. Plant Sci* (2020). 11:573. doi: 10.3389/fpls.2020.00573.

Zamora-Briseño, J.A., Pereira Santana A., Reyes-Hernández S.J., Castaño de la Serna E., Rodríguez-Zapata L. C. Global Dynamics in Protein Disorder during Maize Seed Development. *Genes* (2019). [doi.org/10.3390/genes100705](https://doi.org/10.3390/genes100705).

## DEDICATORIAS

A mi hijo, Alejandro Josué.

---

---

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I .....	3
ANTECEDENTES .....	3
1.1 MICROORGANISMOS BENÉFICOS EN LAS PLANTAS .....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
1.2 BACTERIAS ENDÓFITAS .....	3
1.3 VÍAS DE COLONIZACIÓN DE ENDÓFITOS.....	5
1.4 CLASIFICACIÓN DE LOS ENDÓFITOS.....	8
1.5 FUNCIONES DE LAS BACTERIAS ENDÓFITAS EN LAS PLANTAS. ....	9
1.6 EL ROL DE LOS ENDÓFITOS BACTERIANOS EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS .....	9
1.7 ESTRATEGIAS PARA EL ESTUDIO DE ENDÓFITOS.....	11
1.8 BIOPROSPECCIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS. ....	12
JUSTIFICACIÓN. ....	13
OBJETIVO GENERAL. ....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	14
CAPÍTULO II .....	15
ALTERACIÓN DE LA MICROBIOTA ASOCIADA A SAVIA DE CARICA PAPAYA EN RESPUESTA AL ESTRÉS POR SEQUÍA.....	15
2.1. INTRODUCCIÓN. ....	15

---

---

<b>2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
2.2.1 MATERIAL VEGETAL Y DISEÑO EXPERIMENTAL. ....	16
2.2.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y ELABORACIÓN DE LIBRERÍAS GENÓMICAS. ....	17
2.2.3 PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS PARA SECUENCIACIÓN. ....	18
2.2.4 ANÁLISIS DE DATOS. ....	18
<b>2.3. RESULTADOS. ....</b>	<b>19</b>
2.3.1 CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INFLUENCIADO POR LA SEQUÍA. ....	20
2.3.2 GÉNEROS BACTERIANOS ASOCIADOS AL ESTRÉS POR SEQUÍA. ....	21
<b>2.4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>23</b>
2.4.1 EL ESTRÉS POR SEQUÍA INDUCE UN PROCESO DISBIÓTICO SOBRE LA MICROBIOTA ASOCIADA A SAVIA. ....	23
2.4.2 GÉNEROS BACTERIANOS ASOCIADOS CON EL ESTRÉS POR SEQUÍA Y SU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO.....	24
<b>2.5. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>27</b>
<b>PRIMERA DESCRIPCIÓN DE LOS ENDÓFITOS BACTERIANOS DE LOS TALLOS DE TRES CULTIVARES MEXICANOS DE SACCHARUM OFFICINARUM .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1. INTRODUCCIÓN. ....</b>	<b>27</b>
<b>3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
3.2.1 GERMOPLASMA DE CAÑA Y COLECTA DE MUESTRAS. ....	29
3.2.2 EXTRACCIÓN DE ADN, PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS Y SECUENCIACIÓN.....	29

---

---

---

<b>3.2.3 ANÁLISIS DE DATOS.</b> .....	<b>30</b>
<b>3.3. RESULTADOS.</b> .....	<b>31</b>
<b>3.3.1 INFLUENCIA DEL TIPO DE CULTIVAR SOBRE LA ESTRUCTURA DE LAS COMUNIDADES DE ENDÓFITOS.</b> .....	<b>31</b>
<b>3.3.2 ENDÓFITOS REPRESENTATIVOS E IDENTIFICADOS EN CADA CULTIVAR DE CAÑA.</b> .....	<b>33</b>
<b>3.3.3 ANÁLISIS DE PREDICCIÓN FUNCIONAL DE LAS COMUNIDADES ENDÓFITAS.</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4. DISCUSIÓN.</b> .....	<b>35</b>
<b>3.4.1 BACTERIAS ENDÓFITAS CON CARACTERÍSTICAS INTERESANTES.</b> .....	<b>35</b>
<b>3.4.2 PREDICCIÓN DEL METABOLISMO ENRIQUECIDO.</b> .....	<b>37</b>
<b>3.5. CONCLUSIÓN.</b> .....	<b>39</b>
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	<b>40</b>
<b>4 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b> .....	<b>40</b>
<b>4.1. DISCUSIÓN GENERAL.</b> .....	<b>40</b>
<b>4.2. CONCLUSIONES GENERALES.</b> .....	<b>43</b>
<b>4.3. PERSPECTIVAS.</b> .....	<b>44</b>
<b>5 BIBLIOGRAFÍA.</b> .....	<b>46</b>

---

---

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Esquema de las posibles rutas de colonización y transmisión de los endófitos. **A)** Mediante semillas, **B)** Durante la germinación de la semilla, **C)** A través del meristemo, **D)** Mediante la raíz, **E)** Mediante las estomas. **F-G)** Mediante vectores. ....7

Figura 1.2 Los endófitos pueden clasificarse como obligados, facultativos y pasivos, dependiendo del tipo de tejido o de las circunstancias que le permitan colonizar al hospedero. Los endófitos pueden internalizarse prácticamente en todos los tejidos vegetales.....8

Figura 1.3. Estrategia experimental general del proyecto ..... 14

Figura 2.1 Efecto del estrés por sequía en la morfología y fisiología de las plantas de papaya. **a)** Plantas de papaya de cuatro meses de edad en condiciones de buena irrigación, y a los 22 y 32 días después del estrés hídrico (DAS). **b)** Efecto de la sequía sobre la altura de la planta de papaya **c)** el contenido relativo de agua (RWC) **d)** la asimilación de CO<sub>2</sub> y **e)** las tasas de transpiración de las plantas de papaya. Gráficos con barras de error, se representan las medias y la desviación estándar (s.d.) de cuatro plantas independientes (n =4). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey p <0.05) ..... 19

Figura 2.2 Alteraciones en la diversidad alfa (índice Shannon) en respuesta al estrés por sequía. El estrés por sequía induce una reducción en la composición de la comunidad bacteriana a medida que avanza el estrés. \* diferencias significativas para la prueba de Wilcoxon (valor p <0.05). .....21

Figura 2.3 Efectos de la sequía en las plantas sobre la microbiota endofítica de savia en papaya. Según el análisis de presencia/ausencia y su relación filogenética no hay un enriquecimiento claro de un grupo bacteriano específico, pero a medida que el estrés avanza, se observa una reducción continua de las especies de bacterias, mientras que varias especies bacterianas aparecen. ....22

Figura 3.1 **a)** Diversidad observada, **b)** Índice Chao1, **c)** Índice Shannon, **d)** Índice Simpson. Los cultivares Mex69-290 y CP72-2086 presentaron valores altos de diversidad .....32

Figura 3.2 **a)** Composición comunitaria a nivel de phyla para cada cultivar de caña de azúcar. **b)** Abundancia relativa de bacterias endofíticas de diferentes comunidades a nivel de género. Diversidad alfa de tres cultivares de caña. ....33

---

---

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 3.3 Análisis de predicción funcional basado en el gen 16S de ARN ribosomal de las comunidades microbianas en tres cultivares de caña de azúcar. **a)** Perfil de abundancia relativa de las 53 principales rutas metabólicas predichas a partir del análisis 16S. **b)** Barplot de la ruta Glucose-1 enriquecida para cada cultivar. Dicha ruta se enriquece en el cultivar CP72-2086.....35

---

## ABREVIATURAS

<b>ACC</b>	1-AminoCyclopropane-1-Carboxylic
<b>ADNg</b>	Ácido Desoxirribonucleico genómico
<b>ARNr</b>	Ácido Ribonucleico ribosomal
<b>ASV</b>	Amplicon sequence variant
<b>Ca-P</b>	Producto calcio-fósforo
<b>CO2</b>	Dióxido de Carbono
<b>DADA</b>	Divisive Amplicon Denoising Algorithm
<b>DAS</b>	Días después del estrés
<b>Fe-P</b>	Producto hierro-fósforo
<b>IAA</b>	Indol Acetic Acid
<b>L.</b>	Linnaeus
<b>MAFFT</b>	For multiple alignment using fast Fourier transform
<b>N2</b>	Dinitrógeno gaseoso
<b>OTU</b>	Operational Taxonomic Unit
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PGPB</b>	Plant Growth Promoting Bacteria
<b>PGPE</b>	Plant Growth Promoting Endophyte
<b>PICRUST</b>	Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States
<b>QIIME</b>	Quantitative Insights Into Microbial Ecology
<b>RWC</b>	Relative Water Content
<b>s.d.</b>	Standard deviation
<b>STAMP</b>	Statistical Analysis of Metagenomic Profiles
<b>v.138</b>	Versión 138
<b>V3-V4</b>	Variable region V3-V4
<b>Var.</b>	Variedad

---

## RESUMEN

Las plantas representan un reservorio importante de endófitos bacterianos. Los endófitos al ser capaces de habitar los tejidos internos, mantienen una interacción más estrecha, que repercute positiva o negativamente en la salud, desarrollo y supervivencia del hospedero. Entre las funciones beneficiosas atribuidas a las bacterias endófitas está la promoción del crecimiento por suministro de nutrientes, la protección contra estrés abiótico y biótico, la desintoxicación de compuestos dañinos y la producción de compuestos bioactivos. Actualmente, varios endófitos se utilizan en la formulación de productos como biofertilizantes o biocidas, sin embargo, el estudio y el aprovechamiento de la gran diversidad de bacterias endófitas sigue siendo limitado. El objetivo de este trabajo fue hacer bioprospección de endófitos bacterianos en dos cultivos de importancia agrícola bajo diferentes escenarios: 1) se evaluó el impacto del estrés por sequía sobre las comunidades bacterianas en savia de *Carica papaya* y 2) se comparó la influencia del tipo de cultivar de *Saccharum officinarum* en la composición de endófitos, en el que también se abordó el potencial metabólico de las bacterias endófitas en caña. Se observó que la diversidad taxonómica encontrada está ligada intrínsecamente al genotipo y condiciones. Además, una gran variedad de especies bacterianas con características de interés fue resuelta, mientras que otras resultaron novedosas al no estar reportadas previamente en tales cultivos, como: *Aquabacterium*, *Blastococcus* y *Gaiella* en *Carica papaya*; y *Kocuria* y *Tumebacillus* en *Saccharum officinarum*. La comprensión en las interacciones endófito-planta es clave para el desarrollo de productos o estrategias que mejoren el rendimiento de los cultivos.

---

---

## ABSTRACT

Plants represent an important reservoir of bacterial endophytes. The endophytes, being able to inhabit the internal tissues, maintain a closer interaction, which has a positive or negative impact on the health, development and survival of the host. Among the beneficial functions attributed to endophytic bacteria are the promotion of growth by supply of nutrients, protection against abiotic and biotic stress, detoxification of harmful compounds and the production of bioactive compounds. Currently, several endophytes are used in the formulation of products such as biofertilizers or biocides, however, the study and exploitation of the great diversity of endophytic bacteria remains limited. The aim of this work was to bioprospect bacterial endophytes in two crops of agricultural importance under different scenarios: 1) the impact of drought stress on bacterial communities in sap of *Carica papaya* was evaluated and 2) the influence of the type of cultivar of *Saccharum officinarum* on the composition of endophytes was compared. The metabolic potential of endophytic bacteria in the host plant was also addressed. It was observed that the taxonomic diversity found is intrinsically linked to the genotype and adverse conditions. In addition, a variety of bacterial species with characteristics of interest were resolved, while others were novel because they were not previously reported in such crops, such as *Aquabacterium*, *Blastococcus* and *Gaiella* in *Carica papaya*; and *Kocuria* and *Tumebacillus* in *Saccharum officinarum*. Understanding endophyte-plant interactions is key to developing products or strategies that improve crop yield.

---

## INTRODUCCIÓN

La interacción planta-microbio es un área considerablemente estudiada y se remonta al siglo XIX. El espectro de interacciones planta-microbio es altamente complejo y comprende especies microbianas filogenéticamente diversas, ya que las plantas interactúan constantemente con una amplia variedad que van desde la rizósfera hasta la propia planta (Evangelisti *et al.*, 2014). La mayoría de las investigaciones relacionadas con la interacción planta-microbio se han centrado en la típica simbiosis entre plantas y micorrizas arbusculares, la fijación de nitrógeno por rizobios dentro de los nódulos de las raíces de las leguminosas, así como el manejo de enfermedades de las plantas por el uso de microorganismos antagonistas naturales (Sang *et al.*, 2013). Sin embargo, el papel de los endófitos, aún no se ha explorado en todo su potencial. Actualmente, los microorganismos endófitos y su papel en la salud de los cultivos ahora están atrayendo el interés de los investigadores.

Aunque se proponen diferentes definiciones, los endófitos se definen como microorganismos que viven dentro de las plantas huésped durante al menos parte de su vida y no causan ningún síntoma aparente de enfermedad. Estos microbios establecen una asociación íntima dentro de sus plantas hospedadoras, establecen una comunidad en la endosfera y están presentes en diferentes partes de la planta (Hardoim *et al.*, 2015). El impacto de los endófitos incluye la biorremediación, la herbivoría, la síntesis de metabolitos bioactivos contra patógenos de plantas, la resistencia sistémica inducida, además de mejorar características biométricas/atributos de rendimiento, así como el control de enfermedades. No obstante, la naturaleza o el tipo de endófitos que reside en las plantas varía y se diversifica según el hábitat del cultivo. Los diferentes nichos u orígenes de los endófitos incluyen raíces (rizosfera), tallo (caulosfera), zona del suelo que rodea los tallos de las plantas subterráneas (laimosfera), hojas (filósfera), flores (anósfera), frutos (carposfera), semillas (espermosfera), etc.

Existen diferentes aspectos como los factores climáticos o los edáficos que determinan la naturaleza de los endófitos en las plantas y su contribución a la agricultura. Para aprovechar los beneficios de los endófitos en los cultivos agrícolas, es un requisito previo comprender los simbiontes microbianos comúnmente asociados en un cultivo particular, las condiciones

de crecimiento a nivel ambiental para su establecimiento exitoso en el sistema fisiológico de las plantas y su rol en la promoción del crecimiento de las plantas, en el control de enfermedades y su capacidad para producir metabolitos bioactivos.

El objetivo general de los investigadores del área agrícola es identificar posibles endófitos que no solo son posibles endosimbiontes en un cultivo en particular, sino que también prosperan bien en diversas condiciones climáticas en las que se cultiva o que inclusive se adapten a otros tipos de cultivos.

## CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES

#### 1.1. Microorganismos benéficos en las plantas

Los microorganismos pueden proporcionar efectos favorecedores en las plantas, de manera directa al mejorar la nutrición de los cultivos o indirecta al reducir el daño causado por patógenos o por condiciones de estrés. Las plantas viven en asociación íntima con microorganismos que cumplen funciones importantes en los ecosistemas, sobre todo en los agrícolas. Las bacterias pueden existir como organismos de vida libre en los suelos, encontrarse en la superficie de las raíces y otros tejidos, o bien internalizarse en los tejidos y establecer de esta forma una efectiva relación simbiótica (Trivedi et al., 2017).

El crecimiento de las plantas por efecto de determinados microorganismos es evidente y se han identificado algunos con estas características. En el caso particular de bacterias, se cita el efecto positivo de *Bacillus mojavensis* sobre el crecimiento del maíz (monocotiledónea) y el frijol (dicotiledónea), aunque los factores responsables de las mejoras de crecimiento son desconocidos, se apunta la posible producción de hormonas, ya que se han demostrado para varias otras especies (Arshad y Frankenberger, 1991). También se han observado mejoras en el crecimiento en plantas de maíz cuando son infectadas con *Bacillus mojavensis* cultivadas en presencia del patógeno de *Fusarium verticillioides*. Otros de los beneficios que se obtienen de los microorganismos son una mayor absorción de minerales, como la solubilización del hierro y del fósforo del suelo, la producción de sideróforos y la fijación de nitrógeno, por mencionar algunos (Surette et al., 2003). Por ejemplo, la capacidad de secreción de sideróforos de *Bacillus mojavensis* se ha demostrado, pero el mecanismo de interacción a nivel de la raíz no se ha determinado (no publicado).

#### 1.2. Bacterias endófitas

El término "endófito" se deriva de las palabras griegas "endon" que significa dentro, y "phyton" que significa planta (Kandel et al., 2017). Las bacterias endófitas son una clase de microorganismos endosimbióticos que viven en las estructuras internas de los tejidos de plantas hospederas aparentemente sanas. A diferencia de los fitopatógenos, tales bacterias normalmente no causan ningún signo de enfermedad significativo (Nair & Padmavathy, 2014). Algunos autores han propuesto una definición funcional respecto al comportamiento endófito,

considerando a cualquier bacteria como endófito si es aislado de tejido vegetal que ha sido desinfectado de su superficie previamente a su aislamiento, o bien, si ha sido extraído desde el interior de la planta, sin haber generado un daño visible en su hospedero (Hallman et al., 1997). En términos de comunidad, no está claro si residir dentro de los tejidos vegetales es una ventaja para los endófitos bacterianos, en oposición a vivir libremente en áreas externas, como sucede con las bacterias rizosféricas (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2004). Sin embargo, es claro que los endófitos bacterianos pueden ofrecer varios beneficios a la planta huésped, ya que, bajo diversos escenarios ambientales por la condición de ser endófitos, pueden comunicarse e interactuar con la planta de manera más directa y eficiente que el resto de las bacterias asociadas (Santoyo et al., 2016).

Los endófitos colonizan a la planta en diferentes compartimentos (**Figura 1.1**) como el apoplasto, que incluye las paredes celulares y espacios intercelulares, también son encontradas en menor frecuencia intracelularmente y en los elementos del sistema vascular como el floema y xilema de las raíces, tallos y hojas, también se encuentran en los tejidos de flores, frutas y semillas, sin embargo, es importante señalar que la colonización exitosa de endófitos también implica la posible interacción con una planta huésped compatible (Lodewyckx et al., 2002; Miliute et al., 2015). Siguiendo el contexto, se ha visto especificidad en arroz, donde la bacteria *Azoarcus* sp. cepa BH72, es un endófito obligado fijador de nitrógeno, que dentro de las raíces expresa los genes de la nitrogenasa (*nif*), facilitando la asimilación de nitrógeno a la planta. En ese mismo cultivo se encontró que hay algunos endófitos como *Novosphingobium* sp. PS5, *Klebsiella* sp. SS2 y *Burkholderia* sp. SS5 que se movilizan desde la raíz hasta el tejido foliar, ocasionando una extendida colonización y por tanto favoreciendo algunos procesos fisiológicos de su huésped (Rangjaroen et al., 2017). Otro ejemplo de endófito que coloniza los espacios inter e intracelulares desde la superficie de la raíz a los tejidos aéreos de la vid es *Burkholderia* sp. PsJN (Waghunde et al., 2017).

Por otro lado, independiente de la especie del hospedero, aunque los endófitos son ubicuos, es común encontrar una mayor densidad de poblaciones endófitas en raíces y otros tejidos subterráneos en comparación con los que se encuentran en los tejidos del sistema aéreo, de esta manera se ha establecido que las raíces son el principal punto de entrada de los endófitos, ya que proporcionan un alojamiento base para la colonización de otros órganos. No obstante, se ha visto que las bacterias endófitas también se internalizan a través de los estomas, lenticelas

(poros para el intercambio gaseoso) e hidatodos (poros que secretan agua), los cuales se distribuyen en hojas y a lo largo del tallo de la planta (Lata et al., 2018).

Las bacterias endófitas cumplen con diversos papeles durante su estancia en las plantas, por ejemplo, promueven la disponibilidad y la captación de nutrientes, lo que mejora el crecimiento y desarrollo de su hospedero. Estas bacterias suelen ser conocidas como endófitos promotores del crecimiento vegetal (PGPE; Hassan et al., 2017). Entre sus habilidades destacan solubilizar el fosfato, solubilizar potasio, fijar nitrógeno (lo que les permite convertir el dinitrógeno gaseoso (N<sub>2</sub>) en formas utilizables de nitrógeno como el amonio y el nitrato) y producir sideróforos, por citar algunas (Hamilton et al., 2012). Aquellos fila que están relacionados con estas características incluyen a *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Se sabe del incremento en la biomasa y la talla de plantas como resultado de la colonización de miembros en los géneros: *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Gluconobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Herbaspirillum*, *Rahnella* y *Pseudomonas* (Kendel et al., 2017).

Entre otras cualidades, los endófitos influyen sobre la modulación de la señalización de fitohormonas. Se ha visto que son capaces de sintetizar hormonas vegetales como las citoquininas y el ácido indol acético, y regular otras como las auxinas, el ácido abscísico, las giberelinas y el etileno (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006; Tamosiune et al., 2017). Se ha demostrado que estos microorganismos también ofrecen a su huésped protección ante enfermedades al producir compuestos como antibióticos y enzimas líticas que inhiben el crecimiento de fitopatógenos.

### 1.3. Vías de colonización de los endófitos

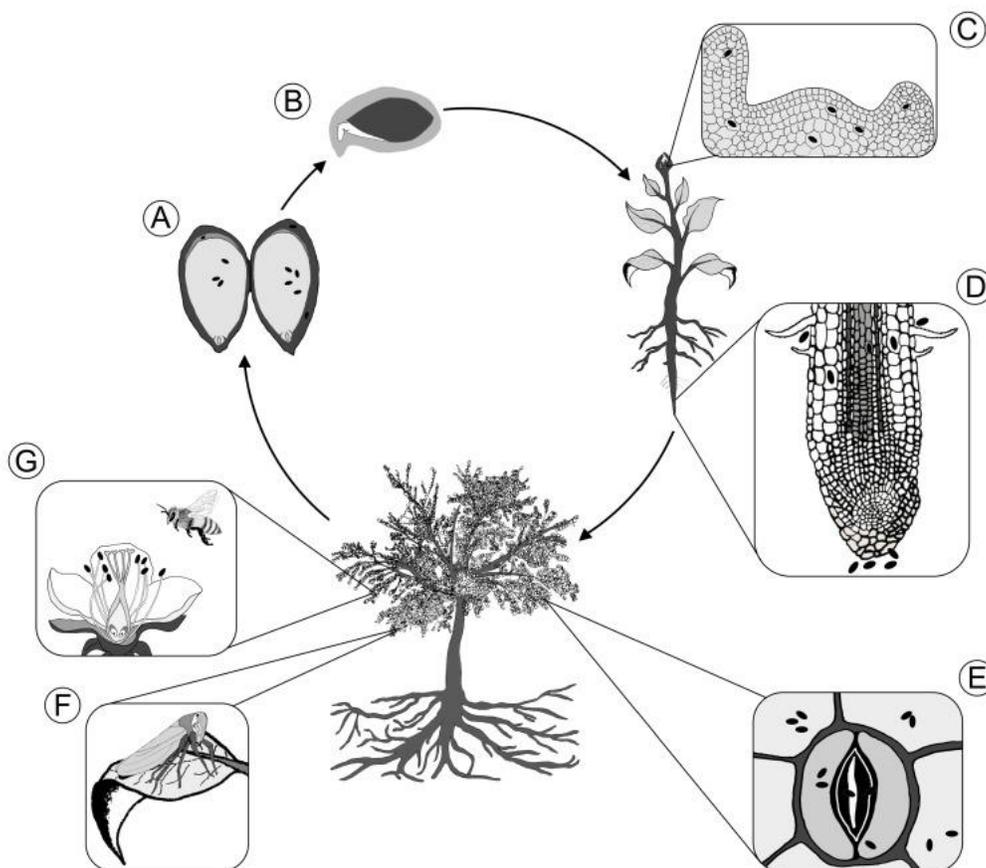
La colonización endofítica puede ocurrir de dos maneras, puede adquirirse del medio ambiente, con cada nueva generación (transmisión horizontal) o de generación en generación a través de las semillas (transmisión vertical), pero también pueden darse ambas situaciones.

A continuación, se mencionan las rutas potenciales de transmisión que siguen los endófitos (**Figura 1.1**). La transmisión vertical de bacterias a través de la semilla y el polen probablemente ocurra, ya que se han identificado bacterias dentro de la semilla de muchas especies de plantas. Los endófitos que se transfieren de manera consistente entre generaciones deben tener una ruta desde las semillas a los órganos reproductivos, ya sea a través de los vasos del xilema o

---

mediante el meristemo apical del brote que se diferencia en órganos reproductivos. Por otra parte, el suelo se considera el medio dominante del que parten los endófitos bacterianos (del suelo a la raíz es la ruta de transmisión horizontal más estudiada). Las bacterias del suelo pueden colonizar el interior de la semilla (espermosfera) cuando ésta se encuentra en proceso de germinación, o bien durante los diferentes estadios de la planta, ya sea cuando son plántulas o adultas. Por otro lado, la superficie de la planta (filósfera) se coloniza con una comunidad diversa, siendo los estomas una ruta de entrada alternativa, pero menos estudiada, ya sea que los endófitos provengan del agua de lluvia, de bioaerosoles, del suelo circundante o del polvo, así como de otras partículas en el entorno. Es posible que los estomas sirvan como una ruta de transmisión para plantas en todas las etapas de la vida, pero pueden ser especialmente importantes para los endófitos foliares de los árboles. Además, los insectos u otros artrópodos pueden servir como vectores para las bacterias que colonizan el interior de las plantas.

En muchos casos, cuando los simbioses son transmitidos verticalmente, el endófito es obligado y pasa todo su ciclo de vida dentro del hospedero, y es incapaz de sobrevivir en el medio externo. Las relaciones ecológicas y evolutivas afectan el modo de transmisión y viceversa, por ejemplo, se postula que la transmisión vertical evoluciona cuando los socios simbióticos son mutualistas, como una forma de asegurar la transmisión fiel del simbionte beneficioso de una generación a la siguiente (Herre et al., 1999).



**Figura 1.1** Esquema de las posibles rutas de colonización y transmisión de los endófitos. **A)** Mediante semillas, **B)** Durante la germinación de la semilla, **C)** A través del meristemo, **D)** Mediante la raíz, **E)** Mediante las estomas. **F-G)** Mediante vectores. Tomado de Frank et al., 2017.

La transmisión vertical de simbiontes bacterianos de progenitores a la descendencia es, de hecho, común en sistemas donde el simbionte proporciona una función indispensable, como en las simbiosis nutricionales ampliamente estudiadas entre bacterias e insectos.

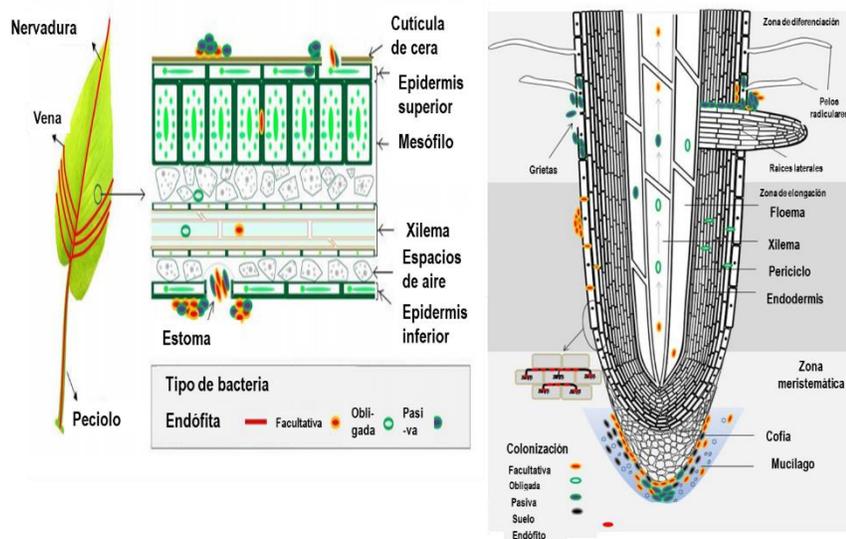
La transmisión horizontal de bacterias beneficiosas puede ser lo mejor para la planta. La capacidad de reclutar un conjunto diverso de simbiontes del ambiente puede ser ventajosa para organismos sésiles como las plantas, proporcionando un medio para responder a un entorno cambiante (Schlaeppli et al., 2015). De hecho, se sugiere que las plantas parecen ser capaces de albergar una gran diversidad de endófitos generalistas cuya presencia o ausencia en un

momento determinado depende mucho más del entorno de la planta que su genotipo (Bulgarelli et al., 2012), sin embargo, se requieren más estudios que lo sustente.

Es probable que algunos endófitos bacterianos se transmitan tanto vertical como horizontalmente. También es probable que si un endófito resulta beneficioso para su huésped en una circunstancia particular (por ejemplo, estrés biótico) puede transmitirse a la descendencia a través de la semilla (Shahzad et al., 2018).

#### 1.4. Clasificación de los endófitos

La asociación de los endófitos en la planta suele ser obligada, facultativa o pasiva, dependiendo del tipo de tejido vegetal que requieren para vivir y reproducirse (**Figura 1.2**). En el caso de los endófitos obligados, estos dependen estrictamente de la planta huésped para su crecimiento y supervivencia, siendo que la transmisión de estos ocurre verticalmente, a través de vectores o mediante las semillas, a diferencia de los facultativos quienes pueden mantener o cumplir con alguna etapa de su ciclo de vida fuera de su hospedero (Hardoim et al., 2008), de manera que los facultativos permanecen dentro de la corteza, pero algunas también entran en el floema central y el xilema (Compant et al., 2010). Las bacterias que carecen de la capacidad de colonizar e infectar por sí mismas, pero pueden ingresar a la planta a través de heridas y grietas en la planta, se les conoce como endófitos pasivos.



**Figura 1.2.** Los endófitos pueden clasificarse como obligados, facultativos y pasivos, dependiendo del tipo de tejido o de las circunstancias que le permitan colonizar al

hospedero. Los endófitos pueden internalizarse prácticamente en todos los tejidos vegetales. Tomado de Liu et al., 2017.

### **1.5. Funciones de las bacterias endófitas en las plantas**

Las bacterias endófitas son una fuente rica y particular de metabolitos, donde se estima una considerable cantidad de metabolitos bioactivos que influyen en el rendimiento y supervivencia tanto de ellas como del hospedero, sin embargo, su potencial metabólico ha sido poco investigado, comparado con los hongos u otras bacterias no endófitas, por ejemplo. Las bacterias endófitas se han adaptado a un entorno específico de la planta, y es probable que difiera con la contraparte que habita en el suelo, hablando en cuanto a la competitividad por recursos. La rizosfera representa un ambiente extremadamente competitivo, y en un medio así, rico en competencia y en depredadores (tanto para el endófito como para la planta huésped), las bacterias necesitan sobrevivir, por ello es más que probable que la microbiota de la rizosfera produzca un arsenal considerable de compuestos como antibióticos y otros metabolitos a diferencia de los endófitos, los cuales aunque se enfrentan a una menor competencia y por tanto ofrecen una cantidad menor de metabolitos, también pueden producir otro tipo de metabolitos específicos que son requeridos para la interacción con el hospedero. Además, dichos metabolitos también podrían mediar procesos de señalización a nivel intra y interespecies (Davie et al., 2008; Raaijmakers et al., 2012). Es importante señalar que algunos metabolitos sólo pueden encontrarse en nichos específicos o a bajas concentraciones dentro de la planta, ello dificulta su identificación o detección, sin embargo, los análisis genómicos y otros enfoques pueden apuntar hacia genes potenciales y ser de gran utilidad para la predicción de esos metabolitos o rutas metabólicas involucradas.

### **1.6. El rol de los endófitos en la respuesta al estrés**

El estrés es entendido como una restricción en las funciones normales que un organismo enfrenta en algún momento durante su ciclo de vida (Ferreira et al., 2017). Por ejemplo, en el caso del estrés por déficit hídrico o por sequía que se produce en las plantas en respuesta a un ambiente escaso en agua, el crecimiento y la productividad de las plantas se ven marcadamente afectados, por lo que, la obtención de plantas con mayor capacidad de supervivencia y crecimiento, o con mejor capacidad de adaptación durante estas condiciones sigue siendo un objetivo a perseguir.

Las bacterias endófitas mejoran la adaptación al estrés abiótico en efecto conjunto con otras de sus propiedades; al estimular el crecimiento, inducir una respuesta en el metabolismo de las plantas y modular la señalización de fitohormonas. Dentro de este contexto, la aplicación de endófitos para mejorar los rendimientos en los cultivos bajo situaciones de estrés como frío, sequía, salinidad o contaminación por metales, resulta de especial interés para mejorar el manejo de los sistemas agrícolas (Tamosiune et al., 2017; Waghunde et al., 2017).

Ejemplos sobre cómo los endófitos bacterianos enfrentan situaciones adversas incluyen a la cepa *Burkholderia phytofirmans* PsJN, la cual mejora la tolerancia al frío en las plantas de vid, promoviendo un menor daño celular, una mayor actividad fotosintética y la acumulación de metabolitos relacionados con el estrés, como almidón, prolina y compuestos fenólicos (Barka et al., 2006). Del mismo modo, se ha demostrado un efecto positivo de esta bacteria sobre plantas de trigo cultivadas en condiciones de riego limitadas (Naveed et al., 2014). Verma et al. (2015) constataron el efecto positivo de *Bacillus amyloliquefaciens* (aislada de trigo y crecida en el Noreste del Himalaya) en plántulas de trigo expuestas a condiciones de frío. Así también, se demostró que la bacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* induce la acumulación de mayores concentraciones de glicina, aliviando significativamente el estrés por salinidad (Jha et al., 2011). Por otra parte, Kim et al. (2014) probaron el inóculo de *Enterobacter* sp. EJ01 aislado de *Dianthus japonicus* (una planta que crece en suelos salinos), sobre plantas de *Arabidopsis* y tomate dispuestas en condiciones de salinidad, en donde se observó el incremento en la producción de ACC desaminasa y ácido indol acético, aumento en la altura, aumento del peso fresco y seco, que fue visiblemente relacionado a la tolerancia presentada.

A pesar de que bacterias endófitas están adaptadas para vivir dentro de genotipos específicos de plantas, estudios indican que la estructura de la comunidad endófito está influenciada por factores abióticos y bióticos, así como por las interacciones planta-microbio y las interacciones microbio-microbio.

La mayoría de las investigaciones sobre bacterias asociadas a plantas se ha centrado en fitopatógenas, diazotróficas (fijadoras de nitrógeno) y en bacterias asociadas a la rizosfera, el interés en conocer la diversidad de organismos asociados con las plantas se ha incrementado a medida que las herramientas tecnológicas para evaluarla se han actualizado (Beattie, 2007).

### **1.7. Estrategias para el estudio de las comunidades bacterianas de endófitos**

Las plantas se asocian naturalmente con un continuo de microorganismos, de los cuales la mayoría son endófitos bacterianos. Las densidades de población de estas bacterias varían considerablemente de acuerdo a la especie hospedera, así como del tipo de tejido que se trate (Chi et al., 2005). Y aunque las comunidades de endófitos pueden colonizar a la planta entera, usualmente las raíces tienen el mayor número de especies.

Los primeros estudios de diversidad de las comunidades endófitas se basaron principalmente en técnicas clásicas de cultivo microbiano, en tanto que, el aislamiento de las bacterias endófitas de cultivos de importancia agronómica fue a partir del uso de métodos de desinfección superficial como paso preliminar (Rakotoniriana et al., 2013). No obstante, hoy en día, el uso de las tecnologías de secuenciación masiva a través de un enfoque metagenómico, permiten explorar desde una perspectiva más amplia a las comunidades microbianas que se encuentran *in planta*, lo que permite profundizar en los conocimientos de composición y estructura de las putativas bacterias endófitas.

Recientemente, una gran cantidad de información sobre la diversidad de la microbiota endófitas en diferentes especies vegetales se ha recopilado derivado de este enfoque, sobre todo al acceder a aquellos microorganismos endófitos que no son cultivables. Con ello, la amplificación directa de ADN de bacterias a partir de muestras vegetales, usando las regiones hipervariables del gen ARN ribosomal (16S ARNr) de la subunidad pequeña y la aplicación de herramientas bioinformáticas, resultan ser un compendio útil para la secuenciación y análisis de los grupos funcionales bacterianos (Turner et al., 2013).

Los métodos para el enriquecimiento microbiano de los tejidos vegetales pueden llevar a una sobre representación de especies bacterianas que se encuentran en gran abundancia y una representación reducida de especies de baja abundancia. Por lo tanto, una combinación en el uso de técnicas convencionales de cultivo microbiano y métodos independientes de cultivo como el análisis metagenómico proporciona una perspectiva más completa de la diversidad de endófitos (Tamosiune et al., 2017).

### **1.8. Bioprospección de bacterias endófitas**

La bioprospección es una actividad dirigida hacia la búsqueda de aquellos microorganismos con características interesantes o bien, deseables, que puedan ser aplicados en los diferentes sectores, y que además podría otorgársele un valor comercial o potencial.

Los endófitos pueden ser utilizados en forma de bioinoculantes o biocidas en la agricultura como alternativa para promover el crecimiento y la salud de las plantas. Una cantidad de patentes registradas están relacionadas principalmente con la aplicación de bacterias endófitas para promover el crecimiento, mientras que en menor cantidad se encuentran aquellos que mejoran la resistencia a patógenos y a estreses ambientales (Mei & Flin, 2010). Aunque los endófitos asociados a las plantas son una fuente atractiva y prometedora para este fin, no han sido explorados y explotados. La bioprospección de microbiomas de plantas cada vez está ganando más atención, ya que representan una reserva genética altamente especializada y co-evolucionada, además de albergar un rico repertorio de actividad metabólica (Müller et al., 2016).

El uso de “Ómicas” representa un enfoque combinatorio robusto hacia los descubrimientos de varias entidades biológicas que no se pudieron descubrir en las últimas décadas debido a la cobertura limitada y la resolución de los métodos convencionales. El efecto combinado de estos métodos garantiza el cribado de alto rendimiento y el descubrimiento de nuevas entidades biológicas con una visión de sus diversidades filogenéticas, abundancia, distribución y función ecológica de cada miembro de la comunidad, incluyendo aquellos que antes difícilmente podrían cultivarse.

## **JUSTIFICACIÓN**

Resulta sugestivo explorar las comunidades de endófitos bacterianos provenientes de cultivos de importancia agrícola y comercial, con el propósito de identificar endófitos clave, así como funciones metabólicas de interés para ser empleados como estrategias en pro del desarrollo de un sistema de producción agrícola más amigable, o bien para ser aprovechados con otros fines biotecnológicos. Aunque se tiene conocimiento de una considerable cantidad de microorganismos con características deseables, aun es poca la información que se tiene sobre los endófitos, sus dinámica, función y mecanismos de interacción, por lo que la búsqueda y bioprospección de éstos, resulta un área atractiva de estudio.

## **OBJETIVO GENERAL**

Bioprospección e identificación de comunidades de endófitos bacterianos en cultivos de importancia agrícola mediante herramientas metagenómicas y bioinformáticas.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Identificar bacterias endófitas clave asociadas con la respuesta al estrés por sequía moderada y severa en savia de *Carica papaya*, las cuales podrían tener potencial para ser empleadas en el desarrollo de biofertilizantes.

Identificar y comparar las comunidades bacterianas endófitas presentes en tres cultivares mexicanos de caña de azúcar, con el fin de ser implementados en la elaboración de bioinoculantes, así como inferir las capacidades metabólicas de los endófitos encontrados y su posible rol en caña.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

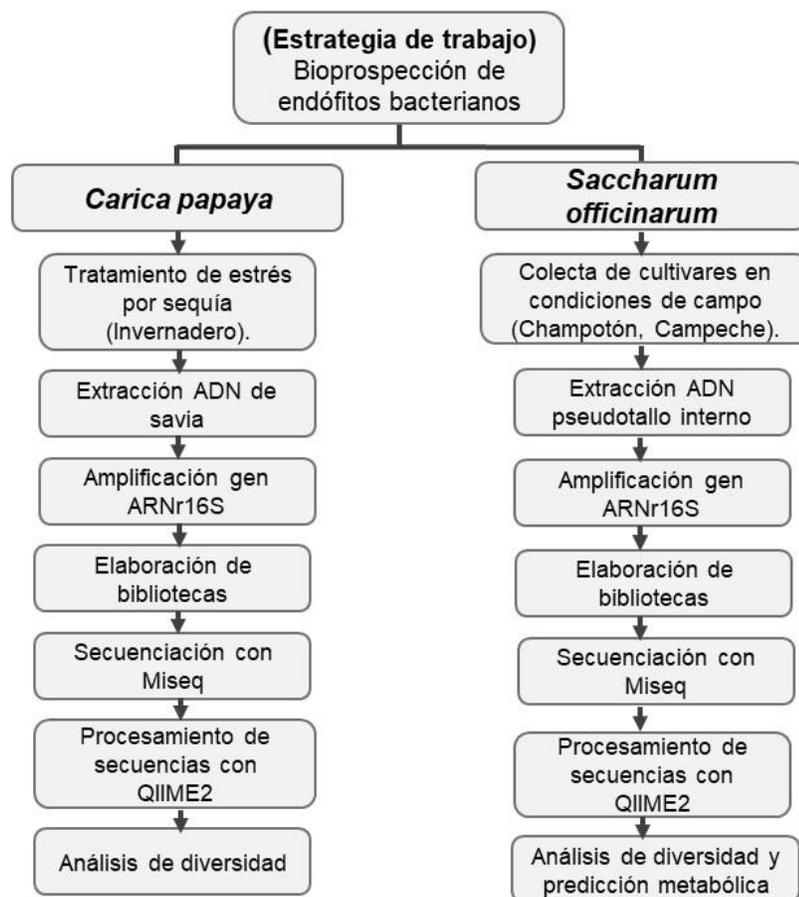


Figura 1.3. Estrategia experimental general del proyecto.

## CAPÍTULO II

### **Alteración de la microbiota asociada a savia de *Carica papaya* en respuesta al estrés por sequía**

#### **2.1. INTRODUCCIÓN**

Las bacterias endofíticas habitan en los tejidos internos de las plantas hospedadoras y generalmente no causan enfermedades (Lundberg et al., 2012). Una bacteria puede ser considerada un endófito si: a) se aísla del tejido vegetal desinfectado, o, b) se extrae de la parte interna de la planta, sin haber generado daño visible en su huésped (Hallmann et al., 1997). En términos de comunidad, no está claro si residir dentro de tejidos vegetales tiene una ventaja para los endófitos bacterianos, a diferencia de los que crecen libres en áreas externas (Rosenblueth y Martínez-Romero 2006). Los endófitos bacterianos pueden proporcionar varios beneficios a la planta huésped ya que tienen una interacción más íntima y cercana que otras bacterias asociadas (Santoyo et al., 2016).

Los endófitos pueden desempeñar varias funciones, incluyendo la mejora de la absorción de nutrientes, la producción de sideróforos, la solubilización de fosfatos, la fijación de nitrógeno y la modulación/producción de fitohormonas. Estas características pueden mejorar el crecimiento y desarrollo de la planta anfitrión (Rosenblueth y Martínez-Romero 2006; Hamilton et al., 2012; Hassan 2017; Tamosiune et al., 2017). Los endófitos están presentes en diferentes compartimentos de las plantas, como el apoplasto y los elementos vasculares, y con menor frecuencia en las partes internas de las células (Luo et al., 2019). Para lograr una colonización exitosa, los endófitos requieren una planta huésped compatible (Miliute et al., 2015).

La intensidad y duración del estrés por sequía juega un papel importante en el crecimiento, desarrollo y metabolismo de las plantas, pero también podría influir en la microbiota asociada a las plantas (Naylor et al., 2017; Jones et al., 2019). Es probable que la microbiota endofítica vegetal se ajuste en respuesta al estrés hídrico, contribuyendo a la fisiología y el rendimiento de la planta. En las angiospermas, la sequía reduce la diversidad bacteriana en la endosfera radicular y la rizosfera, aumentando la proporción de *Proteobacterias* y *Actinobacterias* (Fitzpatrick et al., 2018). En el sorgo, la falta de riego causa alteraciones en la microbiota asociada a la raíz, reduciendo su diversidad, pero llevando a un aumento

considerable en la abundancia relativa de *Actinobacteria* y *Firmicutes* (Xu et al., 2018). En este contexto, la aplicación de endófitos para la protección de cultivos en condiciones de estrés es una estrategia prometedora. Se han publicado ejemplos de su uso exitoso (Ruiz-Herrera et al., 2015; Gagné-Bourque et al., 2016; Esmaeel et al., 2018; Ribeiro et al., 2018).

Sin embargo, tales trabajos se basan en la selección aleatoria de microorganismos previamente identificados y los datos sobre el ajuste de la microbiota endofítica son escasos. La planta de la papaya (*Carica papaya* L.) es un cultivo frutal sembrada en regiones tropicales y subtropicales. Aunque la escasez de agua puede limitar su rendimiento, las plantas de papaya se consideran relativamente resistentes a la sequía (Mahouachi et al., 2006, 2007, 2012).

En el presente estudio, se empleó una estrategia metagenómica para estudiar la dinámica de la microbiota asociada a la savia en plantas de papaya después de 22 y 32 días de estrés por sequía. El objetivo fue identificar bacterias clave asociadas con la respuesta al estrés por sequía, que podrían ser útiles para el desarrollo de fertilizantes basados en el uso de algunos de estos endófitos.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1. Material vegetal y diseño experimental**

Las semillas de papaya (*Carica papaya* var. "Maradol" roja de Semillas del Caribe, Guadalajara, México), se germinaron en algodón durante 5 días y luego fueron trasplantadas a macetas llenas de una mezcla 1:1 de tierra de la región local y sustrato Sunshine Mix 3 (Sun Growth Horticulture). Las plántulas de papaya se cultivaron en condiciones de invernadero a 33-38 °C y 70% de la luz solar. El riego se aplicó cada 2 días. La sequía se impuso a plantas de cuatro meses de edad por retención de agua durante 22 y 32 días, mientras que las plantas bien regadas de la misma edad se utilizaron como controles. Estas condiciones sirvieron para analizar el efecto de una exposición intensiva a la sequía, pero representan condiciones en las que las plantas siguen siendo activas. En todos los tratamientos se utilizaron cuatro plantas para cada condición.

Se registraron las evaluaciones visuales y mediciones fisiológicas. Las mediciones fisiológicas incluyeron: tasas de fotosíntesis (A), transpiración (T) y determinación del contenido relativo de agua (RWC). Todas las mediciones se realizaron en la segunda hoja completamente expandida. A y T se determinaron con un sistema portátil Li-6400 (Li-Cor, Lincoln, NE, EE.UU.). RWC fue estimado siguiendo el protocolo de Barrs y Weatherley (Barrs y Weatherley, 1962). La significación estadística se estimó utilizando una prueba de Tukey con un valor  $p < 0.05$  en cada caso.

### **2.2.2. Procesamiento de las muestras y preparación de las librerías metagenómicas**

Con el fin de identificar la microbiota bacteriana presente en la savia de las plantas de papaya, los brotes fueron esterilizados en la superficie por tres lavados de alcohol (70% de etanol), seguido por la quema con fuego utilizando etanol al 96%. Las muestras de savia se obtuvieron de cada planta por corte  $\frac{3}{4}$  de la parte superior del brote. Luego, la savia se recogió pipeteando y se fijó inmediatamente en 1 ml de reactivo de TRIzol (Invitrogen, EE.UU.) en una proporción de 1:10. De esto, el gADN fue aislado siguiendo las instrucciones del fabricante. Los gADN aislados fueron resuspendidos en agua libre de nucleasas y repurificados con el Kit Universal Zymo Research Quick-DNA (Zymo Research, EE.UU.). La integridad del gADN fue verificada por electroforesis de gel de agarosa al 1% y cuantificado usando un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA).

Para el análisis del metabarcoding, una amplificación de la región V3-V4 del gen bacteriano 16S rARN del gADN aislado fue realizada de cada muestra usando el 16S rRNA Forward Primer = 5' TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG y el 16S rRNA Reverse Primer = 5' GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT ATA GAC AGA AGG ACT ACH VGG GTA TCT AAT CC, para generar amplicones de 550 bp (Klindworth et al. 2013). Se realizaron reacciones de PCR 25- $\mu$ L que contenían 12.5  $\mu$ L de DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, EE.UU.), 125 nM cada uno de los cebadores de genes rARN 16S hacia adelante y reversos y 2  $\mu$ l (65-140 ng) de gADN. Los PCR se ejecutaron en un C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories Inc., EE.UU.) con un programa de ciclos térmicos como sigue: desnaturalización inicial durante 3 min a 95 °C; 30 ciclos de desnaturalización de 15 s a 95 °C, alineamiento de 30

s a 53 °C, extensión de 60 s a 72 °C, y una extensión final de 7 min a 72 °C. Los productos de PCR se resolvieron en electroforesis de gel de agarosa al 1,8%.

### **2.2.3. Preparación de las librerías para secuenciación**

La preparación de las bibliotecas se llevó a cabo siguiendo las instrucciones de acuerdo al kit 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation de Illumina. La concentración de las bibliotecas fue evaluada mediante el Fluorómetro Qubit 2.0 (Thermo Scientific, EE.UU.). La limpieza de los amplicones se realizó utilizando perlas AMPure XP. Los amplicones fueron indexados con los adaptadores de secuenciación Illumina utilizando el Nextera XT Index Kit (Illumina, EE.UU.), purificados y cuantificados como se describió anteriormente. La calidad de cada biblioteca se evaluó con el Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Scientific Instruments, EE.UU.). Los amplicones indexados se secuenciaron en un formato de enfriamiento por pares (2x300 bp) con un kit de reactivo MiSeq V3 (600 ciclos), utilizando la plataforma MiSeq (Illumina, EE.UU.). La secuenciación fue realizada por la Unidad de Secuenciación y Detección de Polimorfismos, INMEGEN, México.

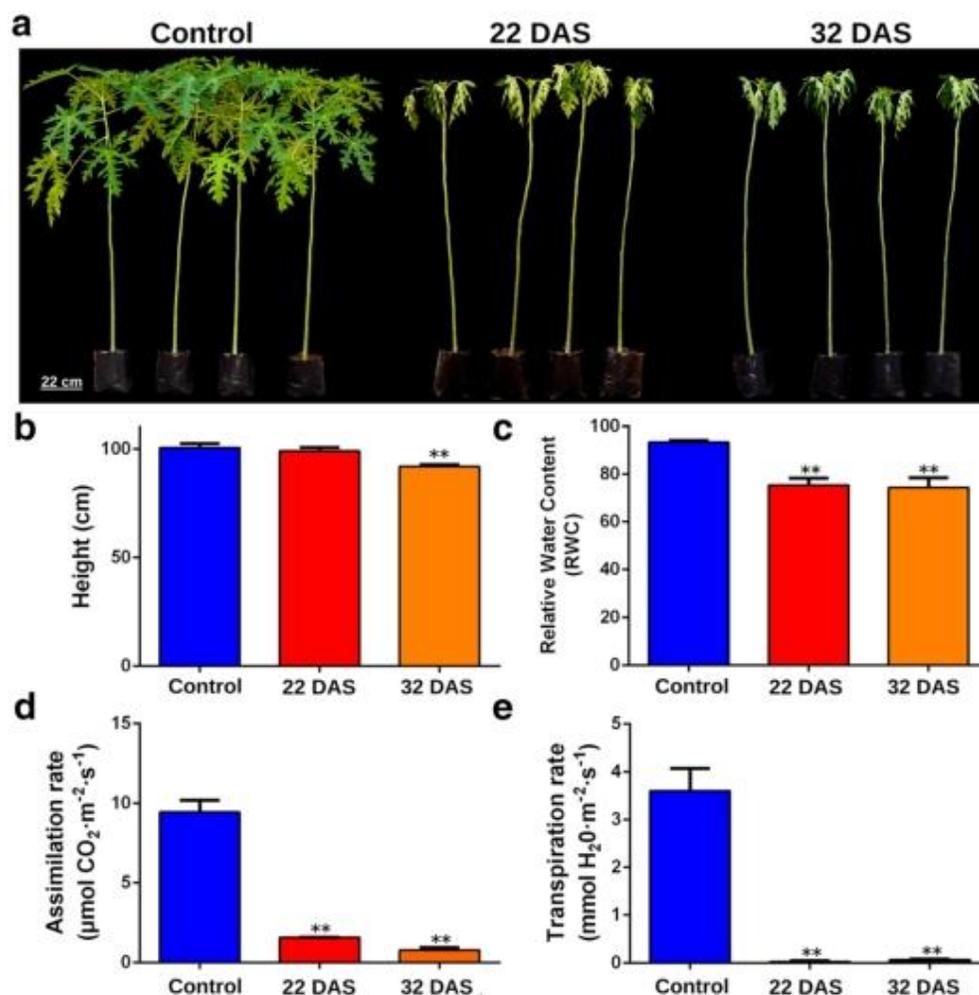
### **2.2.4. Análisis de datos**

Las lecturas pareadas 2x300 se procesaron con el pipeline de QIIME2 (2019.1; Bolyen et al., 2018). Los archivos fastq demultiplexados fueron procesados con el plugin DADA2 (Callahan et al., 2016), recortando en la posición 20 en el extremo 5', y truncando en la posición 270 en el extremo 3' tanto del forward y del reverse en ambas secuencias. Después se realizó el *deinosing* de las lecturas, los amplicones de secuencia variante (ASVs) fueron resueltas, y las secuencias quiméricas fueron eliminadas con el método "consenso". La taxonomía de las secuencias representativas de los ASVs fue asignada usando el plugin qiime *feature-classifier classify-consensus-vsearch* (v 2.9.0), usando la base de datos SILVA como referencia (v. 132; Quast et al., 2013). Se eliminaron los ASVs de mitocondria y cloroplasto, y la tabla de características se normalizó con el método de escala de suma acumulada (Paulson et al., 2013) o por presencia-ausencia. La tabla de características se exportó al ambiente R (<http://www.R-project.org/>), y se realizaron los análisis estadísticos con phyloseq (McMurdie y Holmes 2013) y el paquete ggplot2 (Ginestet, 2011). El árbol exportado fue visualizado con iTOL v3.4 (<https://itol.embl.de/>). Se calculó la riqueza con el

índice de Shannon, y la significación estadística se estimó utilizando la prueba de Wilcoxon con un valor  $p < 0.05$ .

### 2.3. RESULTADOS

El flujo de savia proporciona un mecanismo para la señalización a larga distancia, el transporte de nutrientes y el movimiento de microorganismos en las plantas. Se evaluó el impacto del estrés por sequía en plantas de papaya de cuatro meses de edad y su microbiota asociada a la savia.



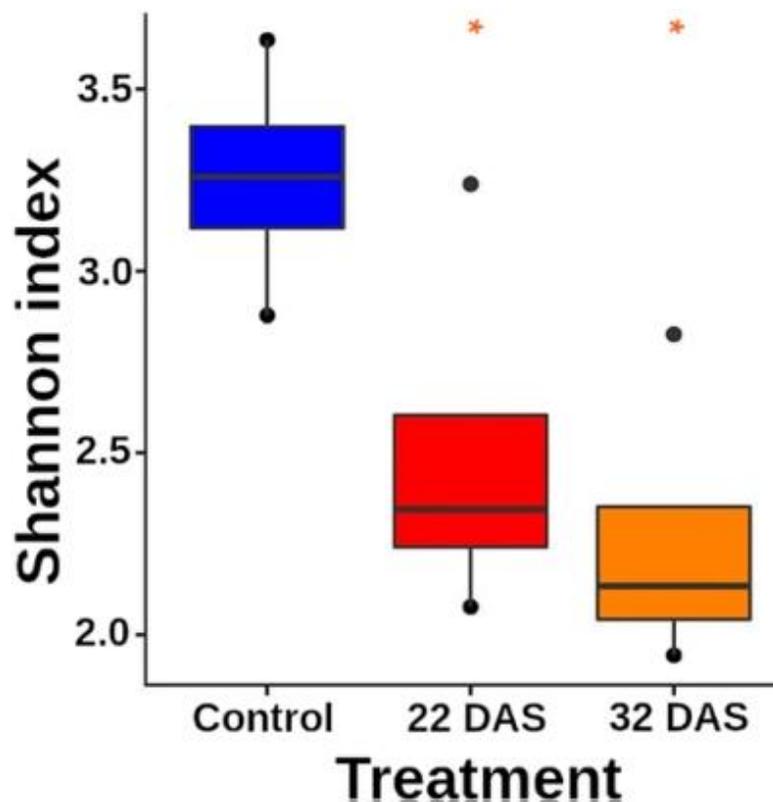
**Figura 2.1.** Efecto del estrés por sequía en la morfología y fisiología de las plantas de papaya. **a** Plantas de papaya de cuatro meses de edad en condiciones de buena irrigación y a los 22 y 32 días después del estrés hídrico (DAS). **b**, Efecto de la sequía

sobre la altura de la planta de papaya **c**, el contenido relativo de agua (RWC); **d**, la asimilación de CO<sub>2</sub> y **e**, las tasas de transpiración de las plantas de papaya. Gráficos con barras de error, se representan las medias y la desviación estándar (s.d.) de cuatro plantas independientes (n =4). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey p <0.05).

Bajo condiciones de irrigación, la apariencia de las plantas era saludable, con hojas turgentes, vigorosas, de color verde oscuro. A los 22 DAS, las plantas aún conservaban la mayoría de sus hojas, pero estaban rizadas y marchitas. A los 32 DAS, las plantas de papaya presentaban una reducción de altura, y habían perdido la mayoría de sus hojas, mientras que las hojas que quedaban estaban muy rizadas y marchitas (**Figura 2.1a**). En ambos tratamientos, también se observó una reducción significativa de los parámetros de RWC (**Figura 2.1c**), y las tasas de asimilación de CO<sub>2</sub> (A) y transpiración (T) mostraron alteraciones dramáticas (**Figura 2.1de**).

### **2.3.1. Cambios en la composición de la microbiota influenciados por la sequía**

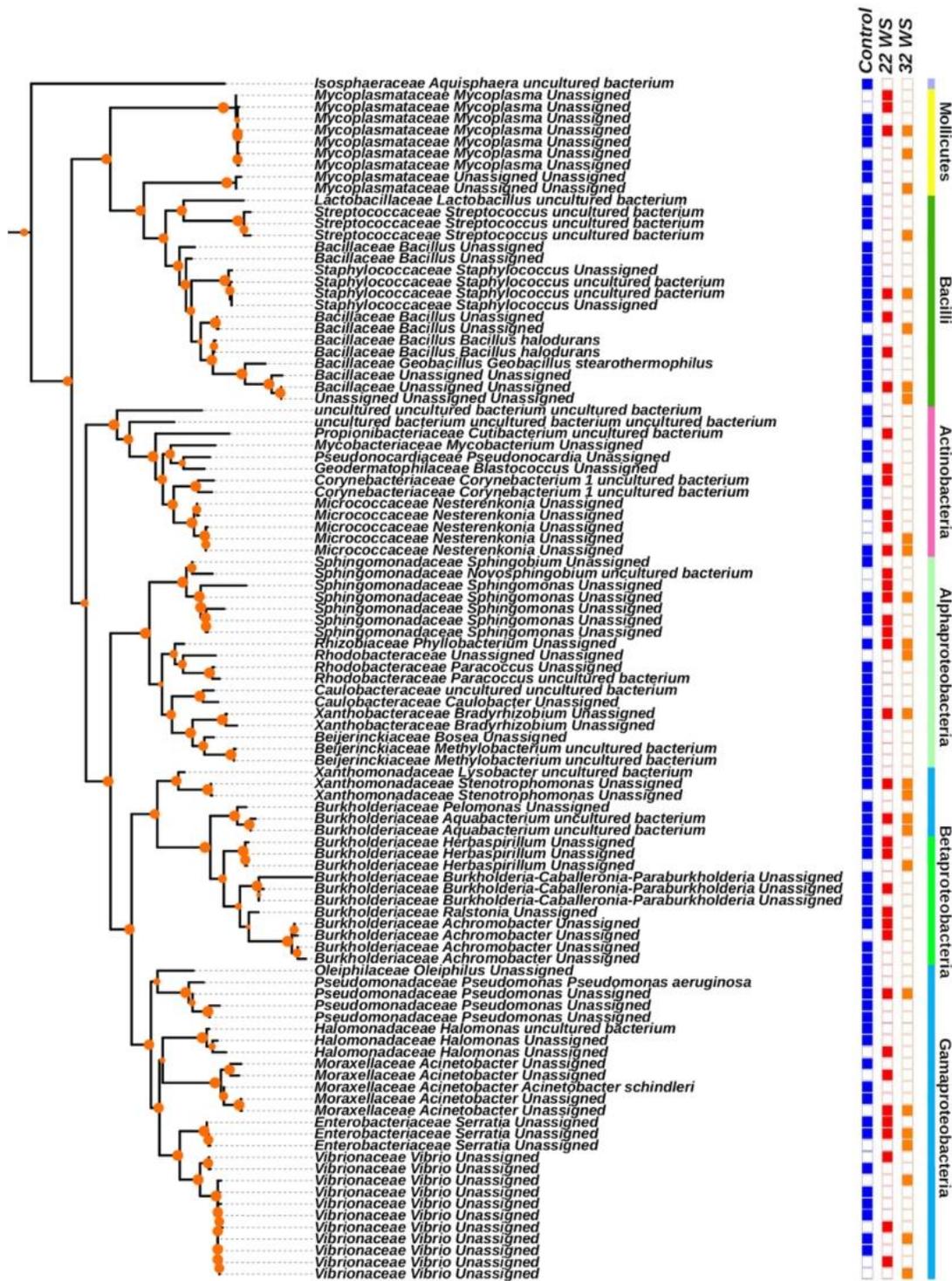
En este estudio se observó una reducción de la diversidad de microbios inducidos por el estrés (**Figura 2.2**). La reducida diversidad alfa encontrada en las plantas estresadas puede reflejar la implicación de la comunidad bacteriana en la respuesta al estrés. La microbiota central (géneros identificados en todas las condiciones) estaba compuesta por los géneros *Bacillus*, *Nesteronkonina*, *Sphingomonas*, *Phyllobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Stenotrophomonas*, *Paraburkholderia*, *Aquabacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus* y *Mycoplasma*. Fue interesante que varias especies no fueron detectadas en condiciones de riego, mientras que otras fueron detectadas solo en condiciones estresantes, sin embargo, las alteraciones no parecen estar relacionadas con una clase bacteriana específica (**Figura 2.3**).



**Figura 2.2.** Alteraciones en la diversidad alfa (índice Shannon) en respuesta al estrés por sequía. El estrés por sequía induce una reducción en la composición de la comunidad bacteriana a medida que avanza el estrés. \* diferencias significativas para la prueba de Wilcoxon (valor  $p < 0.05$ ).

### 2.3.2. Géneros bacterianos asociados al estrés por falta de agua

Se ha informado de que varios grupos bacterianos identificados en este estudio tienen un efecto beneficioso en las plantas hospedadoras bajo estrés por sequía. Los miembros de los géneros *Nesterenkonia*, *Novosphingobium*, *Achromobacter*, *Sphingomonas*, *Halomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Blastococcus* y *Vibrio* fueron identificados exclusivamente en 22 DAS. A su vez, algunos miembros de los géneros *Streptococcus*, *Bacillus*, *Nesteronkonia*, *Vibrio*, *Herbaspirillum* y *Stenotrophomatum* fueron identificados únicamente en 32 DAS. Una explicación podría ser que los cambios en los subconjuntos de los géneros identificados, ocurren debido a alteraciones en las condiciones de sus huéspedes, afectando la colonización por los diversos endófitos.



**Figura 2.3.** Efectos de la sequía en las plantas sobre la microbiota endofítica de savia en papaya. Según el análisis de presencia/ausencia y su relación filogenética no hay un

enriquecimiento claro de un grupo bacteriano específico, pero a medida que el estrés avanza, se observa una reducción continua de las especies de bacterias, mientras que varias especies bacterianas aparecen.

## 2.4. DISCUSIÓN

### 2.4.1 El estrés por sequía induce un proceso disbiótico sobre la microbiota asociada a savia

A nivel fisiológico, las plantas de papaya, sometidas a estrés por sequía mostraron una reducción en su altura, hojas rizadas y pérdida de vigor (medida como RWC), así como una reducción en sus parámetros fisiológicos. Tales alteraciones son consecuencias típicas del estrés hídrico (Zamora-Briseño y de Jiménez, 2016; Pereira-Santana et al., 2017; Gamboa-Tuz et al., 2018). La reducción de la tasa de asimilación exhibida en las plantas estresadas indica la disminución en la fijación de carbono (Lafta y Lorenzen, 1995), mientras que la reducción de la tasa de transpiración es una consecuencia directa del cierre de estomas. Estas son comunes respuestas al estrés por sequía (Brodribb y Holbrook, 2003). Estas respuestas fisiológicas indican que las plantas estresadas estaban respondiendo al estrés, pero todavía eran biológicamente funcionales. Como parte del core microbiano, varios endófitos interesantes con actividades biológicas ya demostradas en plantas fueron encontrados, como los géneros *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, y *Serratia*, que han sido reportados para suprimir el crecimiento de patógenos (Kandel et al., 2017). *Pseudomonas* y *Sphingomonas* son géneros con miembros que tienen características de bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPB) (Ali et al., 2018).

Dos géneros principales encontrados fueron *Staphylococcus* y *Burkholderia*. Muchas especies de *Staphylococcus* han sido reportadas colonizando diferentes especies de plantas. Algunos ejemplos son *S. warneri*, *S. equorum*, *S. cohnii* y *S. hominis* que se encuentran en el arroz y poseen genes implicados en las respuestas al estrés osmótico y oxidativo, así como genes relacionados con la biosíntesis de auxinas y sideróforos (Chaudhry et al., 2017). También se identificó el género *Aquabacterium*, pero no hay información sobre el papel de este endófito (Sauvêtre y Schröder, 2015). Mientras tanto, *Burkholderia* puede fijar el nitrógeno como simbionte en las raíces y las hojas. Algunas cepas también tienen actividad antifúngica y las plantas que los albergan muestran

tolerancia a la mejora contra la sequía, estrés por frío, calor y sal, porque producen osmolitos y compuestos fenólicos compatibles (Fernandez et al., 2012; Frank et al., 2017; da Silva et al., 2018; Esmaeel et al., 2018; Pacifico et al., 2019).

En el presente estudio se observó una importante reducción de la biodiversidad alfa a medida que avanzaba la sequía. Este es un hallazgo muy importante, ya que la pérdida de diversidad de la microbiota (estimada por la diversidad alfa) parece ser el dato más consistente de disbiosis (alteraciones en la estructura de la comunidad microbiana), al menos en modelos no vegetales (Mosca et al., 2016; Lezutekongetal et al., 2018). Por lo tanto, consideramos que el estrés por sequía produce una disbiosis en la microbiota endofítica, que puede asociarse con disfunciones sistémicas. La disbiosis podría ser la causa de varios procesos fisiopatológicos que afectan el bienestar del huésped (Kamo et al., 2017; Lezutekong et al., 2018). Sin embargo, en las plantas, la contribución colectiva a nivel comunitario de la microbiota sobre el crecimiento, el desarrollo y la salud de las plantas aún no está bien comprendido (Chen et al., 2020).

Hay dos vías complementarias para explicar la alteración en la diversidad alfa. En primer lugar, bajo condiciones de sequía, las condiciones bioquímicas podrían ser alteradas provocando cambios en el interior de las plantas que, a su vez, podrían modificar la microbiota *per se*. Por otro lado, el hospedador de la planta también puede promover la selección de ciertas especies bacterianas modulando la composición microbiana. Esto último es posible desde el hecho que gran parte de las bacterias en la endósfera de la planta tienen un estilo de vida opcional, lo que implica que alguna etapa de su ciclo de vida transcurre fuera de su anfitrión (Hardoim et al., 2008). Esto hace que la entrada de los endófitos sea un proceso altamente dinámico. En este sentido, la colonización endofítica y el movimiento de los microorganismos pueden influir en su microambiente, así como en el desarrollo y otros factores ambientales (Marag y Suman, 2018; Deyett y Rolshausen, 2019).

#### **2.4.2 Géneros bacterianos asociados con el estrés por sequía y su potencial biotecnológico**

Se identificaron varios géneros que pueden contribuir a la respuesta al estrés causado por la sequía. Por ejemplo, se han investigado bacterias endófitas pertenecientes a los géneros *Herbaspirillum*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Sphingomonas* y *Serratia* en otras especies

de plantas por sus actividades beneficiosas en términos de disponibilidad de nutrientes, hormonas de crecimiento y control de patógenos (Compant et al., 2005; Asaf et al., 2017; Khan et al., 2017). Algunas cepas de *Sphingomonas* acumulan Zn y producen ácido giberélico y ácido indol acético (IAA) durante el estrés salino en tomates (Asaf et al. 2017). *Sphingomonas* sp. Cra20 afecta la arquitectura de la raíz en *Arabidopsis*, aumentando la capacidad de absorción de agua, y promoviendo la formación de hojas (Luo et al., 2019); *Serratia* sp. solubiliza el fosfato y produce IAA (Khan et al., 2017). Algunas especies de *Bacillus* aisladas de savia, hojas y raíces de maíz pueden disolver complejos de Ca-P y Fe-P, producir sideróforos e IAA (Ferreira et al., 2018; de Lima et al., 2019). *Bacillus* también puede mejorar el crecimiento de las plantas bajo estrés por sequía (Ullah et al., 2019). Dos géneros son particularmente interesantes: *Blastococcus*, que se ha identificado en los manglares (*Rhizophora apiculata* Blume; Golinska et al., 2015) y en la planta happy tree (*Camptotheca acuminata* Decne; Dinesh et al., 2017), y *Gaiella*, que se ha encontrado en cacahuete (*Arachis hypogaea* L.; Chen et al., 2014). Estos géneros no han sido reportados como parte del microbioma de ninguna otra planta. Por lo tanto, se fomenta la investigación adicional.

Dado que cada taxón bacteriano probablemente realiza funciones biológicas específicas, y que el perfil funcional general de una comunidad bacteriana surge de su composición, una reducción en la diversidad alfa podría implicar una pérdida generalizada de funciones. En este sentido, la comunidad bacteriana presente en condiciones de estrés podría ser controlada por la comunidad central, bacterias oportunistas, y por los géneros bacterianos que mejoran la aptitud fisiológica de la planta en tales condiciones. Una serie de candidatos podrían someterse a pruebas con fines biotecnológicos, como el desarrollo de biofertilizantes o bioestimulantes.

Varios estudios han intentado identificar los biofertilizantes apropiados utilizados en especies bacterianas que pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Ralstonia*, *Burkholderia* y *Klebsiella* con el fin de mejorar los efectos del estrés abiótico en muchas especies de plantas como maíz, tomate y trigo, ya que muchas de estas especies actúan como promotores del crecimiento y potenciadores de la tolerancia al estrés (Bhardwaj et al., 2014; Bokhari et al., 2019; Dong et al., 2019).

## **2.5. CONCLUSIÓN**

La estrategia que se plantea es la de ofrecer una plataforma responsable, basada en datos para el rápido descubrimiento de un gran número de candidatos nuevos y específicos que podrían ser útiles como biofertilizantes. Un aspecto importante que debe ser tratado en un futuro trabajo es la caracterización de las redes metabólicas de la microbiota vegetal afectadas por tensiones abióticas, utilizando enfoques del tipo transcriptómico, metatranscriptómico y metabolómico.

## CAPÍTULO III

### Primera descripción de los endófitos bacterianos de tallos de tres cultivares mexicanos de *Saccharum officinarum*

#### 3.1. INTRODUCCIÓN

Las plantas albergan una microbiota taxonómicamente diversa, incluyendo bacterias, hongos, arqueobacterias, oomicetes, protozoos, algas, nemátodos y virus (Dastogeer et al., 2020). Sin embargo, las bacterias están entre las comunidades más abundantes que se encuentran en las plantas. La interacción entre plantas y bacterias puede ser positiva, negativa o neutra. Los efectos positivos surgen de las relaciones simbióticas, donde las plantas proporcionan recursos en forma de fuentes de carbono como alimento, mientras que las bacterias proporcionan beneficios que van desde facilitar la adquisición de nutrientes, promover el crecimiento de las plantas, estimular la producción de hormonas, aumentar la tolerancia a diferentes tensiones abióticas, o proporcionar defensa contra patógenos (Liaqat & Eltem, 2016; Kendal et al., 2017; Eid et al., 2019; Papik et al., 2020). Específicamente, la participación de los endófitos bacterianos (microorganismos que se alojan dentro de las plantas; Hardoim et al., 2015) es de especial interés, ya que mantienen una interacción íntima con la planta huésped.

Los endófitos bacterianos se han definido como aquellas bacterias que viven en el interior, se aíslan de órganos vegetales esterilizados en superficie o se extraen de tejidos internos y que no causan daño aparente a la planta huésped (Lacava & Azevedo, 2013; Hardoim et al., 2015; Liagat & Eltem, 2016), sin embargo, estudios indican que los endófitos se definen en términos del nicho ecológico que ocupan, siendo que algunos endófitos pueden ser patógenos o beneficiosos dependiendo de la especie vegetal y circunstancia en cuestión (Brader et al., 2017; Hardoim et al., 2018). Las interacciones entre los endófitos y las plantas hospedadoras son complejas, por lo que explorar la diversidad y la dinámica de las comunidades bacterianas que componen al hospedador es útil para entender cómo estos endófitos contribuyen a la función de la planta hospedadora (Vandenkoornhuysen et al., 2015; Fitzpatrick et al., 2018).

La diversidad de endófitos bacterianos ha sido reportada en diferentes especies de plantas, particularmente aquellas con interés agronómico (Souza et al., 2014; Bertani et al., 2016; Ali et al., 2018; Zaho et al., 2018; Kuźniar et al., 2020). La estructura comunitaria de las

bacterias endófitas en una planta es multifactorial, dependiendo del tipo de endófito (cepa o especie), los rasgos vegetales (especie, cultivar, etapa de crecimiento, tejido vegetal y ubicación geográfica) y el medio ambiente (clima, tipo de suelo, estación, factores abióticos y bióticos; Afzal et al., 2019; Wu et al., 2021). El crecimiento de los endófitos resulta fuertemente restringido por las plantas, sin embargo, el huésped recluta aquellas bacterias que los benefician en un determinado nicho o situación (Dudeja et al., 2012; Afzal et al., 2019).

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es uno de los cultivos económicamente más significativos debido a su uso generalizado en la industria alimentaria y bioenergética. Poco más del 85% de la producción mundial de azúcar está dada por la caña de azúcar (Kruasuwan & Thamchaipenet, 2016). Los principales productores y consumidores son Brasil, India, China, Tailandia, Pakistán, México y Colombia (de Miranda & Fonseca, 2020). Por otra parte, en el país se ha realizado un trabajo previo en el que se evaluaron 56 cultivares mexicanos de caña de azúcar bajo las condiciones edafoclimáticas de Campeche, México (Carrillo et al. 2008). Se encontró que las variedades MEX69-290 y CP72-2086 (que son dos de los principales cultivares de caña de azúcar mexicanos) fueron las más productivas bajo condiciones de manejo agronómico (120 a 200 toneladas/ha), adaptabilidad al suelo local (vertisol), y tolerancia a la *Ustilago scitaminea*. Aquí se describe a los endófitos bacterianos presentes en MEX69-290 y CP72-2086 cultivados en condiciones de campo en comparación con un cultivar local menos productivo ATMEX69-79 (CONADESUCA 2016).

La creciente demanda de este y otros cultivos comerciales lleva a la implementación de estrategias que ayuden a aumentar los rendimientos o mantener la integridad de las plantas, y el desarrollo de bioformulaciones es una de esas herramientas complementarias. Aunque se han explorado comunidades bacterianas endofíticas en otras especies de gramíneas (Naylor et al., 2017), se sabe poco sobre la naturaleza y composición de las bacterias endofíticas en la caña de azúcar, ya que la mayoría de las bacterias endofíticas han sido aisladas e identificadas por métodos dependientes de cultivo. En la caña de azúcar se han aislado endófitos con características prometedoras, principalmente especies diazotróficas (Boddey et al., 2003; Muangthong et al., 2015; Dos Santos et al., 2020).

Los enfoques cultivo-independiente, como las técnicas de nueva generación en conjunto con las herramientas bioinformáticas, permiten profundizar en la composición de las comunidades bacterianas, detectar endófitos clave y dilucidar el posible papel que tienen en la planta huésped. Según lo anterior, el objetivo de este trabajo es localizar endófitos con valor biotecnológico que puedan ser utilizados para el desarrollo de nuevas formulaciones microbianas y su aplicación en el campo agrícola de la caña de azúcar y otras especies agronómicas.

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1. Germoplasma de caña y colecta de muestras**

Se recolectaron tallos de tres cultivares comerciales de caña de azúcar (MEX69-290, ATMEX69-79 y CP72-2086) en el Banco de Germoplasma COLPOS en Champotón, Campeche, México (19° 498' 068" N, 90° 546' 334" O). El campo experimental consiste en un suelo Luvisol, que se fertiliza con triple 17 una vez al año, justo después de la cosecha. El riego dado a las plantas de caña de azúcar es cada dos días. La cosecha se realiza una vez al año, en el mes de diciembre y la recolección de plantas se llevó a cabo en el año de 2018, correspondiendo a la segunda "resoca".

Para cada cultivar se seleccionaron tres plantas y se tomaron tres muestras de tallo de cada planta. Los tallos fueron cortados con solución de Tween 20 al 0,05% y lavados con agua destilada tres veces. Luego, los tallos fueron esterilizados superficialmente por tres lavados de alcohol (70% de etanol), seguido por la quema de fuego con etanol al 96%. Se tomó tejido interno de la porción media del tallo y se procesó en condiciones estériles. Las muestras para análisis de secuenciación se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

### **3.2.2. Extracción de ADN, preparación de librerías y secuenciación**

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit DNeasy Plant Mini (Qiagen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las directrices del fabricante. La región V3-V4 del 16S rARN fue amplificada usando como Forward primer: 5' - TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG - 3' y Reverse primer: 5' -GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C - 3', generando amplicones con una longitud ~ 550 pb (Klindworth et al., 2013). Las reacciones de PCR se

---

realizaron en un volumen de 25  $\mu\text{L}$  que contenía 12,5  $\mu\text{l}$  de Dream Taq Green PCR Master Mix (2X; Thermo Scientific), 125 nM cada uno de los cebadores de ARNr 16S y 2  $\mu\text{L}$  (150 ng) de plantilla, y las reacciones se realizaron en C1000 Touch<sup>TM</sup> thermalcycler (Bio-Rad Laboratories). El rendimiento y la calidad de los productos de PCR se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1,8%) y la relación OD260/280 se midió mediante espectrofotometría.

Los amplicones del gen rARN 16S fueron procesados con protocolos estándar y secuenciados usando la plataforma MiSeq Illumina en el formato de 300 bases emparejadas en la unidad de Servicios Genómicos de Langebio, México.

### **3.2.3. Análisis de datos**

Las secuencias fueron procesadas con el pipeline Quantitative Insights into Microbial Ecology 2 v2021.2 (QIIME 2; Boylen et al., 2019). El demultiplexado de las lecturas de secuenciación se realizó con CASAVA (*Consensus Assessment of Sequence and Variation*) y los archivos fastq demultiplexados se procesaron con el plugin Amplicon Denoising Algorithm 2 (DADA 2) para obtener variantes de secuencia de amplicón (ASVs; Callahan et al., 2016). Las lecturas secuenciales fueron descartadas con puntuaciones de calidad promedio de <20. En este contexto, las lecturas recortadas, las lecturas combinadas y las quimeras eliminadas se llevaron a cabo utilizando el método "consenso". Las lecturas fueron truncadas en la posición 260 y 240 en el extremo 3' río abajo y arriba, respectivamente, y en la posición 25 en el 5' extremo en ambos. Las secuencias representativas de ASVs fueron asignadas taxonómicamente con la herramienta *classify-sklearn* del plugin clasificador de características QIIME2 (Bokulich et al. 2018), usando la base de datos SILVA v138 99% como referencia. La tabla de características se filtró para los ASVs mitocondriales, cloroplastos y eucariotas. Los ASVs representativos se alinearon con el algoritmo MAFFT (Kato, 2002) y la filogenia se realizó con el algoritmo FastTree2 (Price et al., 2010).

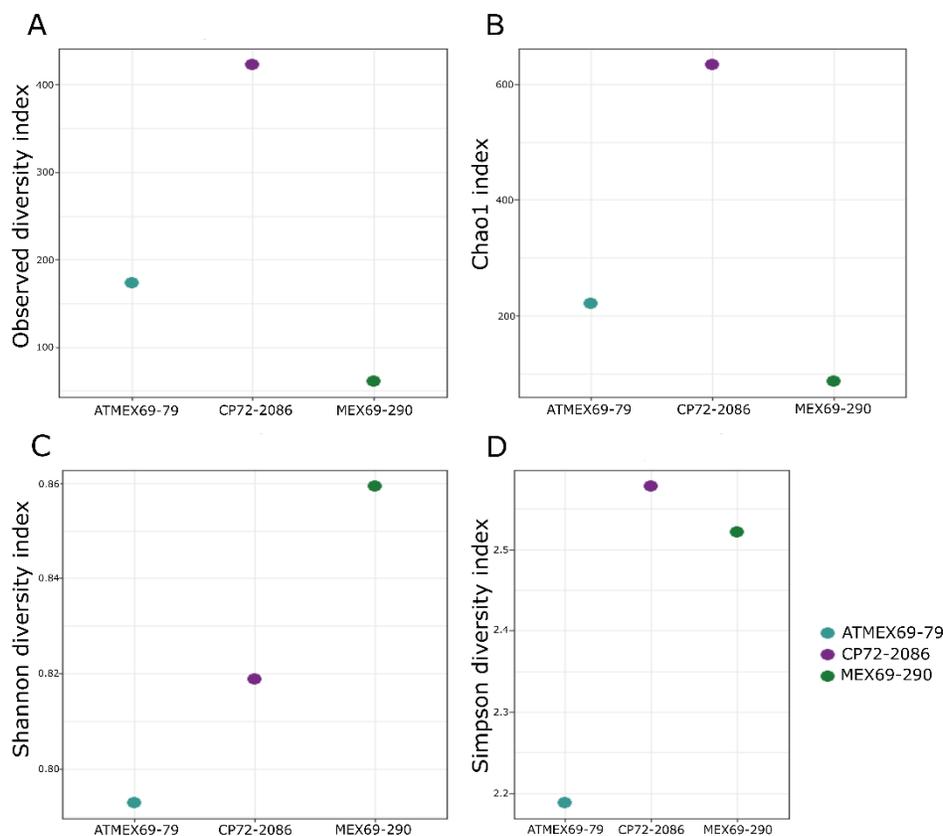
Las métricas de diversidad se calcularon utilizando el paquete QIIME2. Se detectó abundancia relativa de cada ASV entre las muestras con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y se utilizaron valores alfa de 0.05.

La predicción metagenómica se realizó con la Investigación Filogenética de Comunidades por Reconstrucción de Estados no Observados 2 (PICRUST2; Douglas et al., 2019). Las predicciones funcionales de los endófitos hallados fueron comparadas usando una prueba no paramétrica de dos grupos de White en STAMP para detectar el metabolismo enriquecido entre cultivares de caña de azúcar.

### 3.3. RESULTADOS

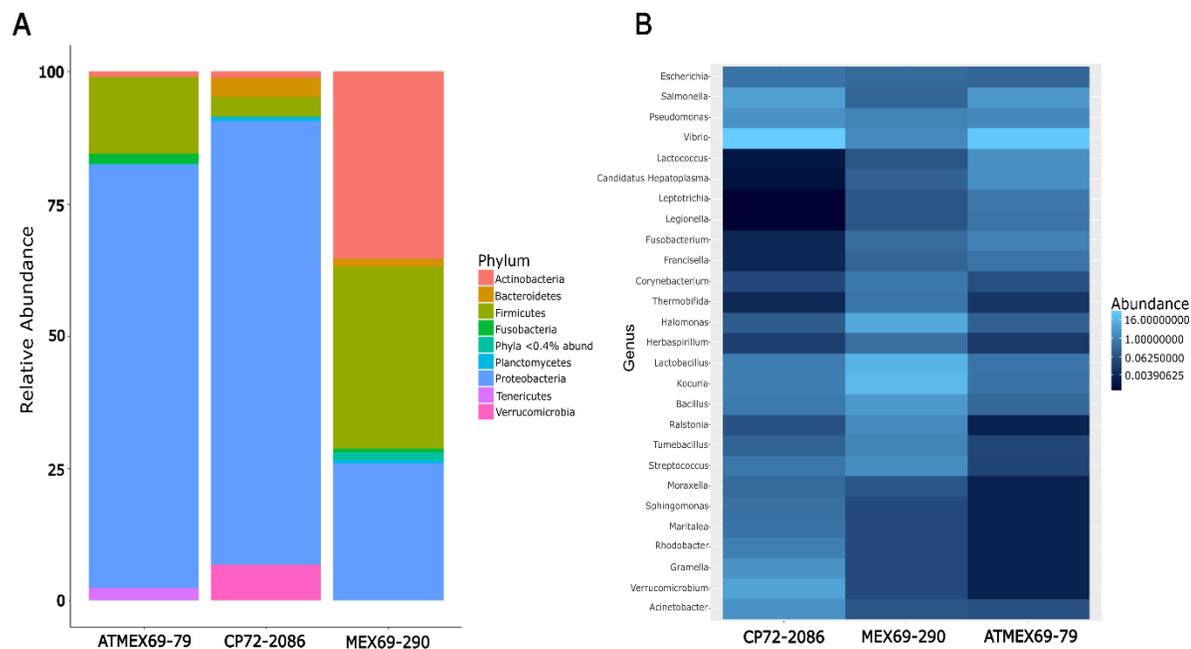
#### 3.3.1. Influencia del tipo de cultivar sobre la estructura de las comunidades endófitas

Este estudio analizó la diversidad y composición de endófitos bacterianos en tres cultivares de caña de azúcar muestreados en condiciones de campo natural y actualmente comercializados en México. Un total de 541 ASVs se resolvieron con una secuencia de identidad del 99% correspondiente al nivel de filo. El análisis de todas las secuencias registró la presencia de 7 filos principales (**Figura 3.1A**). Los filos predominantes en orden descendente fueron *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria* para todos los cultivares (**Figura 3.1A**). Se observó que el tipo de cultivo tiene una influencia significativa en los perfiles de las comunidades microbianas identificadas. Los valores de diversidad alfa se obtuvieron sobre la base de la tabla OTU. En general, el índice de Shannon alcanzó valores más altos para los cultivares CP72-2086 y MEX69-290 en relación al cultivar ATMEX69-79 (**Figura 3.2C**), por lo que el cultivar con menos diversidad fue ATMEX69-79. Asimismo, los otros parámetros aplicados como diversidad observada (**Figura 3.2A**), Chao (**Figura 3.2B**) y Simpson (**Figura 3.2D**), indicaron resultados similares.



**Figura 3.1.** Métricas de diversidad alfa. A) Diversidad observada. B) Índice de Chao. C) Índice de Shannon. D) Índice de Simpson. Los cultivares MEX69-290 y CP72-2086 presentan los más altos valores de diversidad. Todas las medidas son similares. Se utilizó un nivel de significación  $p < 0.05$ .

El análisis de la estructura microbiana endofítica a nivel de géneros indicó la presencia de 27 géneros diferentes de bacterias en general (**Figura 3.1B**). El heatmap en azul oscuro y azul claro indica la abundancia relativa de baja a alta, respectivamente. Dentro del phyla *Proteobacteria*, los más representativos fueron *Sphingomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Herbaspirillum*, *Rhodobacter*, *Ralstonia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Escherichia coli*, *Legionella*, *Francisella*, *Moraxella*, y géneros *Maritalea*. También se identificaron bacterias endofíticas como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Tumebacillus* y *Streptococcus* pertenecientes a phyla *Firmicutes*. Mientras que los clasificados en *Actinobacteria* fueron *Corynebacterium*, *Kocuria* y *Thermobifida*. Otros géneros como *Leptotrichia*, *Fusobacterium*, *Verrucomicrobium* y *Gramella* fueron descifrados. El patrón de abundancia de cada taxón se asoció con el tipo de cultivar (**Figura 3.1B**).



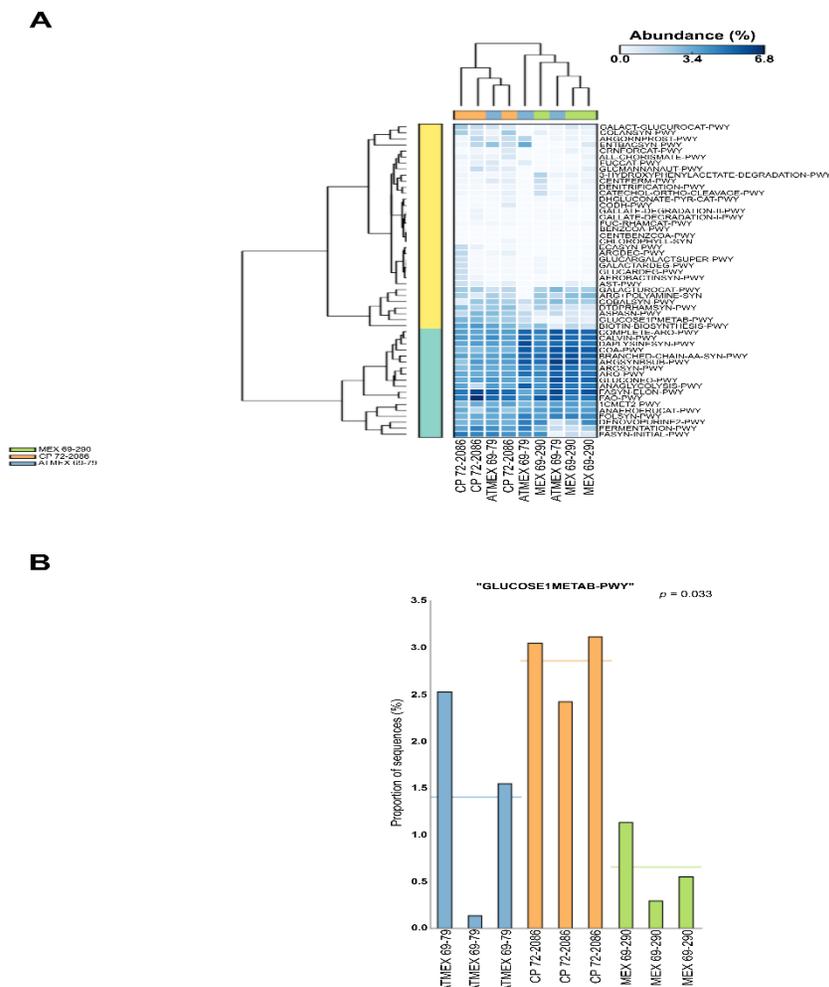
**Figura 3.2.** A) Composición comunitaria a nivel de phyla para cada cultivar de caña de azúcar. B) Abundancia relativa de bacterias endofíticas de diferentes comunidades a nivel de género.

### 3.3.2. Endófitos representativos e identificados en cada cultivar de caña

Una mayor abundancia de endófitos pertenecientes a los géneros *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Kocuria*, *Bacillus*, *Tumebacillus*, *Thermobifida*, *Vibrio* y *Streptococcus* se relacionó con el cultivar MEX69-290. Además, el cultivar CP72-2086 mostró una mayor abundancia en la mayoría de los endófitos detectados, como *Acinetobacter*, *Verrucomicrobium*, *Gramella*, *Rhodobacter*, *Sphingomonas*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Kocuria*, *Lactobacillus*, *Salmonella*, *Maritalea*, *Pseudomonas* y *Vibrio*. Aunque ATMEX69-79 mostró menos abundancia en la mayoría de los géneros en comparación con los otros cultivares, se observó que los géneros *Salmonella*, *Vibrio*, *Lactococcus*, *Fusobacterium*, *Francisella*, *Lactobacillus* y *Kocuria* tenían un ligero predominio. Finalmente, bacterias como el género *Verrucomicrobium* fue observado con una abundancia en orden creciente: ATMEX69-79 > MEX69-290 > CP72-2086. Varios estudios han reportado que los distintos rasgos genéticos y morfológicos del cultivar vegetal pueden afectar la estructura y composición de las diferentes comunidades bacterianas (Compant et al., 2010; Manter et al., 2010; Hardoim et al., 2011; Shi et al., 2014; Ding y Melcher, 2016).

### 3.3.3. Análisis de predicción funcional de las comunidades endófitas

Los endófitos bacterianos son una fuente de diversidad genética y funcional no descubierta (Woźniak et al., 2019), por lo tanto, el origen del microbioma, la dinámica y los patrones de ensamblaje son importantes para la elucidación de su rol putativo en la planta huésped (de Souza et al., 2016). Mediante la predicción funcional de genes PICRUSt2 y el análisis STAMP, fue posible identificar algunas vías metabólicas que podrían estar asociadas a la presencia y actividad de los endófitos en los diferentes cultivares de caña. Todos los procesos fueron estadísticamente representativos con una  $p < 0.05$ , y el heatmap muestra la abundancia relativa de las funciones con cambios de color, que aumenta (azul oscuro) o disminuye (azul claro) (**Figura 3.3**). En este estudio se identificaron 53 vías diferentes. Este análisis también sugiere rasgos metabólicos que podrían reportar efectos beneficiosos sobre la planta, como la vía Glucosa-1 (**Figura 3b**).



**Figura 3.3.** Análisis de predicción funcional basado en el gen 16S de ARN ribosomal de las comunidades microbianas en tres cultivares de caña de azúcar. **a)** Perfil de abundancia relativa de las 53 principales rutas metabólicas predichas a partir del análisis 16S. **b)** Barplot de la ruta Glucose-1 enriquecida para cada cultivar. Dicha ruta se enriquece en el cultivar CP72-2086.

### 3.4 DISCUSIÓN

#### 3.4.1. Bacterias endofíticas con características interesantes

Muchas de las comunidades bacterianas encontradas en este estudio podrían tener una función biológica importante y propiedades beneficiosas en la planta huésped. Fue interesante identificar endófitos como *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Sphingomonas* y

*Pseudomonas*, que poseen rasgos Promotores del Crecimiento de las Plantas (PGP) (Manter et al., 2010; Khan et al., 2017; Pacifico et al., 2019; Orozco-Mosqueda et al., 2021; Vandana et al., 2021).

Se identificaron endófitos pertenecientes al filo *Proteobacteria* como *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter* y *Herbaspirillum* en todos los cultivares. Estas bacterias tienen actividad ACC deaminasa; producen ácido indolacético (IAA), auxinas, exopolisacáridos y sideróforos; solubilizan fosfato y fijan nitrógeno (Curá et al., 2017; Mukherjee et al., 2019; De Hita et al., 2020; Wang et al., 2021; Eid et al., 2021). Recientemente se ha demostrado que este tipo de bacterias podría aliviar el daño de la sequía en las plantas de *Arabidopsis* y promover el crecimiento en condiciones salinas en el sorgo (Rolli et al., 2015; Gamalero et al., 2020). También se demostró en plantas de pimienta que tienen la capacidad de activarse a sí mismas hasta que el huésped entra en una situación de estrés (Rolli et al. 2015). De manera similar, en un estudio de la savia vegetal de *Carica papaya* se observó que estas mismas comunidades bacterianas prevalecen o aparecen cuando el hospedante está sujeto a condiciones severas de sequía (Reyes-Hernández et al., 2020). Además, estos endófitos también pueden tolerar el estrés por metales y otras tensiones oxidativas (Farh et al., 2017; Lee et al., 2015; Curá et al., 2017; Bilal et al., 2018; Etesami et al. 2018; Mukherjee et al., 2019). Microbios bacterianos como el *Rhodobacter* llevan a cabo la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos, la remediación de metales pesados, el secuestro de CO<sub>2</sub>, incluyendo la mitigación de las emisiones de metano (Sakarika et al., 2019; Kang et al., 2020). *Thermobifida* es una bacteria termofílica con actividad antioxidante y capaz de mejorar el crecimiento de las plantas a través de la síntesis de sideróforos como las fuscachelinas (Huang et al., 2013; Shivilata y Satyanarayana, 2015). En este sentido, MEX69-290 y CP72-2086 son cultivares desarrollados con alta y media tolerancia a la sequía, por lo que este fenotipo también podría estar asociado con la composición intrínseca de las comunidades endófitas.

La presencia de *Actinobacteria* podría potencialmente mejorar la salud y la resistencia de la planta huésped (Zhao et al., 2018; Ou et al., 2019). En este trabajo, se determinó *Corynebacterium* y *Kocuria*. Particularmente, se observó una alta abundancia de *Kocuria* en cultivar MEX69-290. Los endofitos de *Kocuria* muestran una influencia significativa en la promoción del crecimiento de las plantas, la producción de fitohormonas y la acumulación de metales (Haidar et al., 2018; Mukherjee et al., 2018; Husain et al., 2019), sin embargo,

hasta este momento no se había reportado en caña de azúcar. Los endófitos de *Corynebacterium* pueden actuar como antagonistas de algunos patógenos como *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Cercospora* y *Helminthosporium*, y se han localizado en frutos de rambután, plantas de maíz, tubérculos de patata y raíces de limón (Suhandono et al., 2016).

Dentro del filo *Firmicutes*, los miembros de *Lactobacillus* y *Lactococcus* se han distinguido por una adaptación temprana a ambientes nutritivamente ricos. Son productores de compuestos antimicrobianos que les permiten sobrevivir en comunidades microbianas complejas (Sharmin et al., 2013; Khalaf et al., 2018). *Tumebacillus* es un género recientemente descrito y localizado en el suelo y las raíces, pero sus funciones en la endosfera de las plantas son desconocidas (Wemheuer et al., 2017; Carper et al., 2020). Un gran número de endófitos pertenecían al género *Bacillus* promoviendo el crecimiento de las plantas y proporcionando protección contra enfermedades y plagas vegetales. Las especies de bacilos forman esporas y resisten condiciones desfavorables (Lopes et al., 2018; Khan et al., 2020), por lo que han sido uno de los géneros de bacterias que más atención ha recibido.

Por otro lado, algunas bacterias como *Moraxella* se han encontrado previa y únicamente en la endosfera de las hojas de cítricos, sin embargo, su papel todavía se desconoce (Munir et al., 2020), mientras que otras especies como *Maritalea* y *Gramella* se han detectado en entornos marinos o regiones costeras (Fukui et al., 2012; Tang et al., 2017), pero no habían sido reportados en las plantas hasta ahora. Sobre *Verrucomicrobium*, hay pocos estudios relacionados con el papel ecológico o sus adaptaciones a determinado nicho de acuerdo a las interacciones microbio-planta, y un número muy pequeño de cepas están disponibles (Wertz et al., 2012; Navarrete et al., 2015; Bünger et al., 2020).

#### **3.4.2. Metabolismo enriquecido de los endófitos encontrados en los cultivares de caña**

Acorde al análisis de funcionalidad que arrojó la actividad de 53 rutas metabólicas, se distinguió que las más abundantes incluyen el metabolismo de carbohidratos, compuestos aromáticos y metabolismo de ácidos grasos; aminoácidos, folatos, biotina, vitamina B12 y la biosíntesis de *novo* de purinas; además de los asociados a la fermentación, glicólisis, ciclo de Calvin, procesos celulares y vías de señalización. Entre otras de las funciones están las relacionadas con la síntesis de clorofila, el metabolismo del corismato, la vía de la N-

---

acetilglucosamina, el proceso de desnitrificación, la degradación del azúcar, la producción de exopolisacáridos, la degradación de compuestos aromáticos y la producción de sideróforos como enterobactina y aerobactina, principalmente. Se observó que los perfiles metabólicos involucrados también varían dependiendo del tipo de cultivar de caña de azúcar.

La predicción metabólica de las bacterias endofíticas presentes en los cultivares de caña indicó la existencia de rasgos de interés que podrían tener un efecto beneficioso sobre la planta. Por ejemplo, el corismato se ha considerado como un "nodo metabólico en acción" (Dosselaere y Vanderleyden, 2001), ya que representa un importante punto de ramificación que conecta el metabolismo primario y secundario en bacterias, hongos, arqueas y plantas (Hubrich et al., 2021). El corismato está implicado en la síntesis de ubiquinona, menaquinona, sideróforos como la enterobactina, folatos y aminoácidos aromáticos; por ejemplo, triptófano, fenilalanina y tirosina. Otros derivados reportados recientemente a partir del corismato son el antibiótico estravidina, el inmunosupresor rapamicina, y los agentes anticancerígenos como las antimicinas, y los terpenoides como el merosterol (Hubrich et al., 2021). Haciendo énfasis en aquellos procesos donde se observó mayor abundancia, también destaca la síntesis de folatos, los cuales sirven como donantes y aceptores en reacciones de transferencia de un carbono (C1), y participan en la biosíntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos y vitamina B5 (Gorelova et al., 2017). En las plantas por ejemplo, los folatos son importantes para la biosíntesis de biomoléculas como la lignina, los alcaloides y la clorofila (Jha et al., 2020). Otro de los procesos identificados fue el ciclo de Calvin, el cual es utilizado por algunos endófitos encontrados en este trabajo, tales como *Rhodobacter*, *Herbaspirillum* y *Ralstonia* (Gayathri et al., 2021). Endófitos de este tipo pueden ayudar a incrementar la fotosíntesis en las plantas, al incrementar el secuestro de CO<sub>2</sub>, lo que podría verse reflejado en plantas con mejor salud y rendimiento (Harman et al., 2021). También se ha reportado que especies pertenecientes al género *Bacillus* tienen la capacidad de mejorar la integridad celular a nivel de estructura del cloroplasto y mitocondria, fomentando el aumento en el contenido de clorofila, los parámetros fotosintéticos y la eficiencia en el uso del agua (Zhang et al., 2019).

Particularmente, uno de los procesos con mayor preponderancia fue el de la Glucosa 1 fosfato, esto podría indicar una alta actividad metabólica por parte de los endófitos bacterianos presentes en los cultivares de caña, siendo más notorio en el cultivar CP72-

2086. En este contexto, es posible que la glucosa existente en el medio junto con otros azúcares además de ser la principal fuente de carbono usada por los endófitos, también actúen como moléculas señalizadoras durante la interacción endófito-planta, que permiten el mantenimiento de esta misma (Jang & Sheen, 1997; Ramón et al., 2008; Rho et al., 2018). Relacionado con lo anterior, en un estudio que implicó el uso de dos cepas endófitas con características PGP e inoculadas en un hospedero halófito, se observó que el metabolismo de la glucosa 1 fosfato se incrementó considerablemente (Kataoka et al., 2021). Los endófitos tienen preferencia por los monosacáridos y oligosacáridos, por lo que el tipo de comunidades que se establezcan en la planta dependerá de la capacidad adaptativa de las vías metabólicas de estas en favor del aprovechamiento de la fuente de carbono (Gunina & Kuzyakov, 2015). Se ha observado que la aplicación de endófitos en forma de biofertilizantes puede estimular la microbiota nativa e intensificar la conversión de los carbohidratos, según las necesidades metabólicas de los endófitos (Maçik et al., 2020). Análisis en genomas bacterianos indican que los reguladores transcripcionales de la familia LacI se enriquecen durante la interacción planta-endófito, lo que se asocia con un aumento en el control de regulones, los cuales están implicados en el metabolismo y transporte de carbohidratos (Levy et al., 2018).

### **3.5 CONCLUSIÓN**

Este trabajo es el primer acercamiento en el estudio de endófitos bacterianos en variedades mexicanas de caña de azúcar que actualmente son usadas para su cultivo y comercialización. La identificación de comunidades microbianas con características atractivas podría tener el potencial para ser usadas en el diseño de nuevas formulaciones microbianas e implementarlas con fines biotecnológicos. Una mayor comprensión de la interacción planta-endófito es vital para la introducción viable de endófitos clave con miras a mejorar las condiciones y características de los cultivos, lo que podría resultar en un aumento tangible de la salud y el rendimiento.

## CAPÍTULO IV

### DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

#### 4.1. DISCUSIÓN GENERAL

Gran parte de los estudios hechos sobre endófitos en cultivos de importancia agronómica están centrados en conocer y describir aquellos encontrados en raíz, o en aislar y caracterizar bacterias diazótrofes. Si bien es cierto que la raíz representa la principal entrada de éstos, es necesario abordar otras secciones de la planta para saber cómo esta selecciona o decide cuáles comunidades endofíticas le aportan un beneficio o cómo los endófitos colonizan y se adaptan a un nicho determinado. La denominación de los endófitos se ha hecho de acuerdo con el lugar, zona o tejido que alberga dentro de una planta, por ejemplo, endófitos radiculares, endófitos de brotes, endófitos foliares, etc. Un endófito de la raíz, aunque prevalece en la zona de la raíz, también puede existir en otras partes de la planta o puede desencadenar impactos beneficiosos en la salud de la planta huésped en lugares distantes de su nicho. Ejemplo de esto es que se ha encontrado que algunos endófitos foliares exclusivos, regulan la expresión génica del huésped afectando las respuestas fisiológicas y las vías de defensa de ésta en todos los tejidos de la planta (Khare et al., 2018). Cabe recalcar también que entre las variables que inciden de manera importante sobre la composición microbiana de endófitos son el genotipo de la planta huésped y las condiciones de estrés a la que se ve expuesta, sin embargo, el proceso de transición/adaptación a una condición determinada de estrés es además un factor a considerar durante la formación de las comunidades de endófitos (Walitang et al., 2018).

En *Carica papaya* se ha investigado poco sobre endófitos. Hasta ahora, uno de los primeros estudios acerca de endófitos bacterianos que han empleado métodos de secuenciación masiva fue hecho a partir de semilla (Patil et al., 2021), mientras que otros estudios en este mismo cultivo han consistido solamente en el aislamiento y secuenciación parcial del 16S de algunas cepas bacterianas de brotes *in vitro*, de mesocarpio del fruto y de hojas (Thomas et al., 2007; Krishnan et al., 2012; Sarjono et al., 2020). De manera general, los análisis hechos en savia de papaya en estado basal y en sequía mostraron que los grupos taxonómicos predominantes fueron *Gamaproteobacteria*, *Bacilli* y *Alphaproteobacteria*, destacando la presencia de endófitos con propiedades beneficiosas sobre las plantas como *Sphingomonas*, *Halomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, por citar algunos. De manera similar Patil y colaboradores (2021) observaron que las

---

principales clases que se encontraron en semilla fueron *Betaproteobacteria*, *Bacilli* y *Alphaproteobacteria*, e hicieron énfasis en el género *Bacillus* debido a que se ha demostrado que un gran número de especies de estas bacterias tienen una participación crucial durante las primeras etapas de desarrollo del hospedero y durante situaciones de estrés.

De acuerdo a los tratamientos evaluados en savia, gran parte de las comunidades endofíticas de los diferentes grupos taxonómicos identificados podrían tener una contribución positiva en la planta. Conforme avanzó el tiempo de exposición a la sequía, la reducción de la diversidad se asoció a una disbiosis notable, y aunque la actividad microbiana pudo verse comprometida por este hecho, es posible que la simbiosis de los grupos de endófitos aún presentes en savia de papaya podrían haber ayudado a disminuir la distancia en el transporte de moléculas, lo que aumentaría la posibilidad y frecuencia del envío de señales, y por ende podría mejorar la respuesta al estrés impuesto, así como mantener o inducir la formación de biomasa y/o conseguir una mayor eficiencia en el uso del agua.

Por otra parte, en el caso de *Saccharum officinarum* los resultados de secuenciación evidenciaron que el tipo de cultivar repercute sobre la abundancia de las comunidades de bacterias endófitas en tallo, tratándose de plantas colectadas en campo. Las principales comunidades microbianas encontradas para todos los cultivares pertenecen a los fila *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*. De acuerdo a los perfiles de abundancia y composición de las comunidades microbianas observados, estos podrían influir en los rasgos fisiológicos y adaptativos de los cultivares de caña analizados, ya que MEX69-290 y CP72-2086 (cultivares más productivos) fueron las que tuvieron una mayor abundancia de endófitos con atributos deseables, y mostraron una mayor actividad en el metabolismo de éstos. La mayoría de los estudios en caña al igual que los hechos en otros cultivos, se han remitido al aislamiento e inoculación de cepas ya conocidas. Sin embargo, el interés por ahondar en este rubro ha incrementado y para ello, se han implementado nuevas estrategias de secuenciación, las cuales han permitido discernir una parte de la vasta diversidad de bacterias endófitas que aún se encuentran sin explotar, y que da pauta a continuar con la búsqueda de nuevos prospectos. Por ejemplo, Souza y colaboradores (2016) exploraron las comunidades microbianas de bacterias y hongos en el cultivar brasileño SP80-3280, no obstante, el enfoque estuvo dirigido a aquellas asociadas a los

procesos de fermentación. Parte de los datos arrojaron que los miembros de las familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae* son los colonizadores preferenciales de tallos y hojas. Hasta ahora, existen otros trabajos siguiendo la misma perspectiva, en la que se contempla la búsqueda de bacterias descomponedoras con miras a ser usadas en la producción de bioenergía (Weiss et al., 2021). Otros trabajos se han enfocado en profundizar sobre la estructura microbiana de la filósfera (Khoiri et al., 2021), así como el impacto del manejo agrícola sobre el cultivo (Teherán-Sierra et al., 2021). Finalmente, dichos estudios en el microbioma de distintos cultivares de caña demuestran que la diversidad de bacterias endófitas sigue siendo desconocida o indeterminada, lo que representa un recurso biotecnológico valioso.

En cuanto a la caracterización a nivel funcional que se realizó, muchas de las rutas enriquecidas estuvieron relacionadas con procesos biológicos comunes y componentes estructurales, sin embargo, el perfilado metabólico también indicó una considerable abundancia de posibles genes involucrados en rutas del metabolismo secundario que podrían repercutir positivamente en el huésped, tales como el ciclo de Calvin, el metabolismo de la glucosa, de la clorofila, del corismato, entre otros, en el que algunos de los cambios y diferencias observados podrían deberse al cultivar *per se*. El uso de Picrust2 como método de inferencia resultó muy útil ya que a través de las composiciones taxonómicas permitió discernir una aproximación del comportamiento endofítico de los cultivares.

Resulta esencial comprender a los endófitos asociados en un cultivo particular, las condiciones de crecimiento a nivel ambiental o microambiental para su establecimiento exitoso en el sistema fisiológico de los huéspedes vegetales y su rol en la promoción del crecimiento de las plantas, en el control de enfermedades y su capacidad para producir metabolitos bioactivos. El objetivo a perseguir de las investigaciones de este tipo en el sector agrícola es identificar posibles endófitos que no solo puedan adaptarse a un cultivo en particular, sino que también tengan la habilidad para prosperar adecuadamente en otros tipos de cultivos o bien, se adecuen a diversas condiciones climáticas.

En su conjunto, los enfoques metabólicos y metagenómicos pueden revelar puntos de comunicación y respuesta críticos entre la planta huésped y las comunidades endófitas (Xia et al., 2022). Aunque se tienen en cuenta los beneficios de los endófitos en las plantas es

---

importante señalar que muchos de ellos no se han aislado e identificados, no se tienen disponibles bases de datos exhaustivas sobre endófitos y sus metabolitos, no se conoce a precisión los mecanismos moleculares que se da en la interacción endófito-planta y finalmente, falta un mayor entendimiento en el manejo de los efectos de los endófitos a nivel de campo, por lo que es necesario aumentar la bioprospección de los endófitos y sus metabolitos a nivel multiómico como parte de una investigación holística y prometedora. Además, resulta interesante descubrir entre sus mecanismos de interacción cuáles son las estrategias que emplean las plantas para distinguir y seleccionar a los endófitos beneficiosos de los que no lo son. En este contexto, se ha hecho la sugerencia que plantea un sistema inmunitario innato de la planta, el cual podría reclutar o permitir la entrada a los tejidos vegetales y descifrar los mecanismos de cómo los endófitos prosperan dentro de la planta huésped (Fessel & Zuccaro, 2016; Uroz et al., 2019; Xia et al., 2022).

Este es el primer estudio que emplea tecnologías de secuenciación masiva para elucidar la composición de endófitos en savia de *Carica papaya*, así también representa el primer acercamiento sobre la estructura y caracterización funcional de las comunidades bacterias endofíticas de cultivares de *Saccharum officinarum* comercializados en el país. Cabe mencionar que estos trabajos podrían ser útiles para entender la naturaleza de las bacterias endofíticas que residen dentro de las plantas modelo usadas aquí, ya que pueden servir como un indicador de la medida adaptativa para incorporar rasgos deseables en las variedades cultivadas de caña, papaya u otras especies vegetales. Así como hacer bioprospección en estos cultivos resulta promisorio para el desarrollo de bioformulaciones a base de endófitos determinados o consorcios de éstos en un futuro inmediato.

## **4.2. CONCLUSIONES GENERALES**

En el presente estudio se analizaron dos cultivos de importancia agronómica y comercial en el país. Bajo dos escenarios distintos se evaluó la diversidad de endófitos, la composición y su posible rol. En el primer escenario se determinaron los cambios que sufren las comunidades bacterianas de endófitos en *Carica papaya* bajo estrés por sequía, evidenciando una disbiosis como consecuencia. No obstante, resultó interesante observar las diferencias entre las especies de endófitos presentes en savia según el grado de exposición a sequía, así como la función que cumplen en el hospedero, encontrando que gran parte de las comunidades microbianas podrían proveer de beneficios a la planta. En

el caso de caña de azúcar, se constató principalmente que la abundancia de endófitos está en función del tipo de cultivar, y que aquellos cultivares con las mejores características por mejoramiento genético convencional poseen una mayor abundancia en la totalidad de los endófitos bacterianos determinados, pero sobre todo de los endófitos con propiedades benéficas, por lo que se especula que parte del desempeño de los cultivares de caña mejorados también se deba a las comunidades de endófitos que albergan.

En *Carica papaya* se distinguieron especies de endófitos que no habían sido reportados con anterioridad en plantas, tales fueron las bacterias pertenecientes a los géneros *Aquabacterium*, *Blastococcus* y *Gaiella*. Por otra parte, en *Saccharum officinarum*, los géneros *Kocuria* y *Tumebacillus*, aunque ya habían sido identificados en algunas otras especies vegetales, este es la primera vez que se identificó en caña de azúcar, no obstante, para todos estos nuevos grupos bacterianos, el papel que tienen en su hospedero aún resulta desconocido. De esta manera, indagar sobre el posible rol de estos endófitos novedosos es de particular atención.

Este estudio representa el primer acercamiento de la microbiota endofítica de las principales variedades de caña de azúcar y papaya que se cultivan en México. La identificación de bacterias con influencia positiva en estos cultivos es pauta para adentrarse en su estudio, especialmente con el fin de aprovecharlas como potencial alternativa en forma de biofertilizante, así también, este trabajo contribuye como base en el entendimiento de su interacción.

#### **4.3. PERSPECTIVAS**

La descripción de los endófitos encontrados en *Carica papaya* y cultivares de *Saccharum officinarum* puede ayudar a la selección de candidatos bacterianos útiles para la obtención de nuevas bioformulaciones. De acuerdo a estudios en el área, la contribución de los endófitos como fertilizantes biológicos es altamente favorable debido a sus propiedades y su aclimatación metabólica en la planta huésped.

Así también, se sugiere realizar un estudio holístico que implique el uso de otros enfoques del tipo multiómico para profundizar en la caracterización de las redes metabólicas de la microbiota endofita y su impacto sobre el metabolismo de la planta huésped (y viceversa),

---

sobre todo de las comunidades microbianas que están expuestas a tensiones abióticas o en la que la planta o cultivo posee una cualidad atractiva como ser altamente productivo o ser tolerante a una condición dada.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Ali, S., Isaacson J., Kroner, Y., Saldias, S., Kandasamy, S., Lazarovits, G. (2018). Corn sap bacterial endophytes and their potential in plant growth-promotion. *Environ Sustain* 1:341–355. <https://doi.org/10.1007/s42398-018-00030-4>.
- Asaf, S., Khan, A.L., Khan, M.A., et al. (2017). Osmoprotective functions conferred to soybean plants via inoculation with *Sphingomonas* sp. LK11 and exogenous trehalose. *Microbiol Res*. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.009>.
- Afzal, I., Shinwari, Z.K., Sikandar, S., Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*. 221: 36-49.
- Barrs, H., Weatherley, P. (1962). A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Aust J Biol Sci* 15: 413. <https://doi.org/10.1071/bi9620413>.
- Barka, E., Nowak, J. Clément, C. (2006). Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(11): 7246-7252.
- Beattie, G. (2007). *Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advance*, Springer, ISBN 978-1-4020-4538-7.
- Bertani, I., Abbruscato, P., Piffanelli, P., Subramoni, S., Venturi, V. (2016). Rice bacterial endophytes: isolation of a collection, identification of beneficial strains and microbiome analysis. *Environ Microbiol Rep*. 8(3): 388-98.

- 
- Bhardwaj, D., Ansari, M., Sahoo, R., Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key players in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microb Cell Factories* 13:66. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-66>.
- Bilal, S., Shahzad, R., Khan, A.L., Kang, S.M., Imran, Q.M., Al-Harrasi, A., ... Lee, I.J. (2018). Endophytic Microbial Consortia of Phytohormones-Producing Fungus *Paecilomyces formosus* LHL10 and Bacteria *Sphingomonas* sp. LK11 to *Glycine max* L. Regulates Physio-hormonal Changes to Attenuate Aluminum and Zinc Stresses. *Frontiers in Plant Science*. 9.
- Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppi, K., Ver Loren van Themaat, E., Ahmadinejad, N., Assenza, F., Rauf, P., Huettel, B., Reinhardt, R., Schmelzer, E., et al. Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*. 2012;488:91–95. doi: 10.1038/nature11336.
- Boddey, R.M., Urquiaga, S., Alves, B.J. et al. (2003). Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant and Soil*. 252: 139–149.
- Bokhari, A., Essack, M., Lafi, F., Andres-Barrao, J.R., Alamoudi, S. ... Saad, M. (2019). Bioprospecting desert plant *Bacillus* endophytic strains for their potential to enhance plant stress tolerance. *SciRep*9:18154. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54685-y>.
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R. et al. (2018). QIIME 2: reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. *PeerJ*. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.27295v2>.
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., et al. (2019). Reproducible,
-

- interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol* 37: 852-857
- Brader, G., Compant, S., Vescio, K., Mitter, B., Trognitz, F., Ma, L., Sessitsch, A. (2017). Ecology and Genomic Insights into Plant-Pathogenic and Plant-Nonpathogenic Endophytes. *Annual Review of Phytopathology*. 55(1): 61-83.
- Brodribb, T.J., Holbrook, N.M. (2003). Stomatal closure during leaf dehydration, correlation with other leaf physiological traits. *Plant Physiol* 132:2166–2173. <https://doi.org/10.1104/pp.103.023879>.
- Bünger, W., Jiang, X., Müller, J. et al. (2020). Novel cultivated endophytic Verrucomicrobia reveal deep-rooting traits of bacteria to associate with plants. *Sci Rep*. 10: 8692.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J. et al. (2016). DADA2: high- resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 13:581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.386>.
- Chandra, A., Gaur, V., Tripathi, P. (2021). Microbiome analysis of rhizospheres of plant and winter-initiated ratoon crops of sugarcane grown in sub-tropical India: utility to improve ratoon crop productivity. *3 Biotech*. 11(34).
- Chaudhry, V., Sharma, S., Bansal, K., Patil, P.B. (2017). Glimpse into the genomes of rice endophytic bacteria: diversity and distribution of firmicutes. *Front Microbiol* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02115>.
- Chen, M., Li, X., Yang, Q., et al. (2014). Dynamic succession of soil bacterial community during continuous cropping of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101355>.
-

- 
- Chen, T., Nomura, K., Wang, X., Sohrabi, R., Xu, J., Yao, L., Paasch, B.C., MaL., Kremer J., Cheng, Y., Zhang, L., Wang, N., Wang, E., Xin, X.F., He, S.Y. (2020). A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere. *Nature*. 580:653–657. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2185-0>.
- Chi, F., Shen, S., Cheng, H., Jing, Y., Yanni, Y., Dazzo, F. (2005). Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (11): 7271–7278.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J. et al. (2005). Use of plant growth- promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol* 71:4951–4959. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>.
- Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*. 42(5): 669–678.
- Compant, S., Saikkonen, K., Mitter, B. et al. (2016). Editorial special issue: soil, plants and endophytes. *Plant Soil*. 405: 1–11.
- da Silva, P.R.A., Vidal, M.S., Soares, C de P., et al. (2018). Sugarcane apoplast fluid modulates the global transcriptional profile of the diazotrophic bacteria *Paraburkholderia tropica* strain Ppe8. *PLoS One* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207863>, 13, e0207863.
- Cordero, J., de Freitas, R., Germida, J. (2019). Bacterial microbiome associated with the rhizosphere and root interior of crops in Saskatchewan, Canada. *Canadian Journal of Microbiology*. 66(1): 71-85.
-

- 
- Curá, J.A., Franz, D.R., Filosofía, J.E., Balestrasse, K.B., Burgueño, L.E. (2017). Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. bacteria increases the tolerance of maize to drought stress. *Microorganisms*. 5(3):41.
- Dastogeer, K., Tumpa, F., Sultana, A., Akter, M., Chakraborty, A. (2020). Plant microbiome— an account of the factors that shape community composition and diversity. *Current Plant Biology*. 100161.
- de Lima, B.C., Moro, A.L., Santos, A.C.P., Bonifacio, A., Araujo, A.S.F., de Araujo, F.F. (2019) *Bacillus subtilis* ameliorates water stress tolerance in maize and common bean. *J Plant Interact* 14:432–439. <https://doi.org/10.1080/17429145.2019.1645896>.
- De Miranda, E.E., Fonseca, M.F. (2020). Sugarcane: food production, energy, and environment. *Sugarcane Biorefinery, Technology and Perspectives*. 67–88.
- De Souza, R., Okura, V., Armanhi, J, Jorrín, B, Lozano, N, da Silva, M, ... Arruda, P. (2016). Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. *Scientific Reports*. 6(1).
- Deyett, E., Rolshausen, P.E. (2019). Temporal dynamics of the sap microbiome of grapevine under high pierce's disease pressure. *Front Plant Sci* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01246>.
- Dinesh, R., Srinivasan, V., Sheeja, T.E. et al. (2017). Endophytic actinobacteria: diversity, secondary metabolism and mechanisms to unsilence biosynthetic gene clusters. *Crit Rev Microbiol* 43: 546–566. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1270895>.
-

- 
- Ding, T., Melcher, U. (2016). Influences of Plant Species, Season and Location on Leaf Endophytic Bacterial Communities of Non-Cultivated Plants. *PLoS One*. 11(3): e0150895.
- Dong, L., Li, Y., Xul, J., et al. (2019). Biofertilizers regulate the soil microbial community and enhance *Panax ginseng* yields. *Chin Med* 14:20. <https://doi.org/10.1186/s13020-019-0241-1>.
- Dong, M., Yang, Z., Cheng, G., Peng, L., Xu, Q., Xu, J. (2018). Diversity of the bacterial microbiome in the roots of four *Saccharum* species: *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi*, and *S. officinarum*. *Frontiers in Microbiology*. 9.
- Dosselaere, F., Vanderleyden, J. A. (2001). Metabolic Node in Action: Chorismate-Utilizing Enzymes in Microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*. 27(2): 75-131.
- De Hita, D., Fuentes, M., Zamarreño, A., Ruiz, Y., Garcia-Mina, J. (2020). Culturable Bacterial Endophytes From Sedimentary Humic Acid-Treated Plants. *Front. Plant Sci*. 11: 837
- Dudeja, S., Giri, R., Saini, R., Suneja-Madan, P., Kothe, E. (2012). Interaction of endophytic microbes with legumes. *J. Basic Microbiol*. 52(3): 248–260.
- Eid, A., Fouda, A., Abdel-Rahman, M., Salem, S., Elsaied, A., Oelmüller, R., Hijri, M., Bhowmik, A., Elkelish, A., Hassan, S. (2021). Harnessing Bacterial Endophytes for Promotion of Plant Growth and Biotechnological Applications: An Overview. *Plants*. 10(5): 935.
- Esmaeel, Q., Miotto, L., Rondeau, M., Leclère, V., Clément, C., Jacquard, C., Sanchez, L., Barka, E.A. (2018). *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN- plants interaction: from
-

- 
- perception to the induced mechanisms. *Front Microbiol* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02093>.
- Etesami, H., Beattie, G.A. (2018). Mining Halophytes for Plant Growth-Promoting Halotolerant Bacteria to Enhance the Salinity Tolerance of Non-halophytic Crops. *Frontiers in Microbiology*. 9.
- Farh, M.E.A., Kim, Y.J., Sukweenadhi, J., Singh, P., Yang, D.C. (2017). Aluminium resistant, plant growth promoting bacteria induce overexpression of Aluminium stress related genes in *Arabidopsis thaliana* and increase the ginseng tolerance against Aluminium stress. *Microbiological Research*. 200: 45–52.
- Fernandez, O., Vandesteene, L., Feil, R., Baillieul, F., Lunn, J.E., Clément, C. (2012). Trehalose metabolism is activated upon chilling in grapevine and might participate in *Burkholderia phytofirmans* induced chilling tolerance. *Planta*. 236:355–369. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1611-4>.
- Ferreira, T., Tsunada, M., Bassi, D., Araújo, P. Mattiello, L., Guidelli, G., Righetto, G., Goncalvez, V., Lakshmanan, P. Menossi, M. (2017). Sugarcane water stress tolerance mechanisms and its implications on developing biotechnology solutions. *Frontiers in Plant Science*. 8: 1-18.
- Ferreira, N.C., Mazzuchelli, R. de C.L., Pacheco, A.C., et al. (2018). *Bacillus subtilis* improves maize tolerance to salinity. *CiencRural* <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170910>, 48.
- Fesel, P. H., & Zuccaro, A. (2016). Dissecting endophytic lifestyle along the parasitism/mutualism continuum in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Microbiology*. 32: 103–112. doi:10.1016/j.mib.2016.05.008
-

- 
- Fitzpatrick, C.R., Copeland, J., Wang, P.W., Guttman, D.S., Kotanen, P.M., Johnson, M.T.J. (2018). Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E1157–E1165. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717617115>.
- Frank, A., Saldierna Guzmán, J., Shay, J. (2017). Transmission of bacterial Endophytes. *Microorganisms*. 5. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040070>
- Gagné-Bourque F, Bertrand A, Claessens A, et al (2016) Alleviation of drought stress and metabolic changes in timothy (*Phleum pratense* L.) colonized with *Bacillus subtilis* B26. *Front Plant Sci*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00584>.
- Gamalero, E., Favale, N., Bona, E., Novello, G., Cesaro, P., Massa, N., Glick, B, Orozco-Mosqueda, M., Berta, G., Lingua, G. (2020). Screening of Bacterial Endophytes Able to Promote Plant Growth and Increase Salinity Tolerance. *Appl. Sci.* 10(17): 5767.
- Gamboa-Tuz, S.D, Pereira-Santana, A., Zamora-Briseño, J.A., et al. (2018). Transcriptomics and co-expression networks reveal tissue-specific responses and regulatory hubs under mild and severe drought in papaya (*Carica papaya* L.). *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32904-2>.
- Gayathri, R., Mahboob, S., Govindarajan, M., Al-Ghanim K.A., Ahmed, Z., Al-Mulhm, N., Vodovnik, M., Vijayalakshmi, S. (2021). A review on biological carbon sequestration: A sustainable solution for a cleaner air environment, less pollution and lower health risks. *Journal of King Saud University – Science*. 33 (2). doi:10.1016/j.jksus.2020.101282
- Ginestet, C. (2011). ggplot2:elegantgraphicsfordataanalysis.*JRStatSoc Ser A (Statistics Soc.* [https://doi.org/10.1111/j.1467-985x.2010.00676\\_9.x](https://doi.org/10.1111/j.1467-985x.2010.00676_9.x).
-

- 
- Golinska, P., Wypij, M., Agarkar, G., et al. (2015). Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. *Antonie van Leeuwenhoek. Int J Gen Mol Microbiol* <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0502-7>.
- Gorelova, V., Ambach, L., Rébeillé, F., Stove, C., Van Der Straeten, D. (2017). Folates in Plants: Research Advances and Progress in Crop Biofortification. *Front Chem.* 5: 21.
- Gunina, A., Kuzyakov, Y. (2015) Sugars in soil and sweets for microorganisms: Review of origin, content, composition and fate. *Soil Biol. Biochem.* 90: 87–100.
- Haidar, B., Ferdous, M., Fatema, B., Ferdous, A., Islam, M., Khan, H. (2018). Population diversity of bacterial endophytes from jute (*Corchorus olitorius*) and evaluation of their potential role as bioinoculants. *Microbiol Res.* 208: 43–53.
- Hallmann, J., Quadts-Hallmann, A., Mahaffee, W.F., Kloepper, J.W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol* 43: 895–914. <https://doi.org/10.1139/m97-131>.
- Hamilton, C.E., Gundel, P.E., Helander, M., Saikkonen, K. (2012). Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants: a review. *Fungal Divers* 54:1–10. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0158-9>.
- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., van Elsas, J.D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol* 16:463–471. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008>.
- Hardoim, P., Andreote, F., Reinhold-Hurek, B., Sessitsch, A., van Overbeek, L., van Elsas, J. (2011). Rice root-associated bacteria: insights into community structures across 10 cultivars. *FEMS Microbiol. Ecol.* 77: 154–164.
-

- 
- Hardoim, P., Overbeek, L.S., Berg, G., Pirttilä, A., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., 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.
- Harman, G., Khadka, R., Doni, F., Uphoff, N. (2021). Benefits to Plant Health and Productivity From Enhancing Plant Microbial Symbionts. *Front. Plant Sci.* 11:610065. doi: 10.3389/fpls.2020.610065.
- Hassan, S.E.D. (2017). Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. *J Adv Res* 8:687–695. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.09.001>.
- Herre, E.A., Knowlton, N., Mueller, U.G., Rehner, S.A. (1999). The evolution of mutualisms: Exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends Ecol. Evol.* 14:49–53. doi: 10.1016/S0169-5347(98)01529-.
- Huang, Y., et al. (2013). Production and antioxidant properties of the ferulic acid rich destarched wheat bran hydrolysate by feruloyl esterases from thermophilic actinomycetes. *BioResources*. 8(4): 4981–4991.
- Hubrich, F., Müller, M., Andexer, J.N. (2021). Chorismate- and isochorismate converting enzymes: versatile catalysts acting on an important metabolic node. *Chemical Communications*. 57(20).
- Hussain, A., Amna, Kamran, M., Javed, M., Hayat, K., Farooq, M., ... Chaudhary, H. (2018). Individual and combinatorial application of *Kocuria rhizophila* and citric acid on phytoextraction of multi-metal contaminated soils by *Glycine max* L. *Environmental and Experimental Botany*. 159: 23-33.
-

- 
- Jang, J.C., Sheen, J. (1997). Sugar Sensing in Higher Plants. *Trends Plant Sci.* 15:773–785. doi: 10.1016/S1360-1385(97)89545-3.
- Jha, Y., Subramanian, R.B. and Patel, S. (2011). Combination of endophytic and rhizospheric plant growth promoting rhizobacteria in *Oryza sativa* shows higher accumulation of osmoprotectant against saline stress. *Acta Physiologiae Plantarum*.
- Jha, A.B., Warkentin, T.D. (2020). Biofortification of Pulse Crops: Status and Future Perspectives. *Plants*. 9(1): 73.
- Jones, P., Garcia, B.J., Furches, A., Tuskan, G.A., Jacobson, D. (2019). Plant host-associated mechanisms for microbial selection. *Front Plant Sci* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00862>.
- Kamo, T., Akazawa, H., Suda, W., Saga-Kamo, A., Shimizu, Y., Yagi, H., Liu, Q., Nomura, S., Naito, A.T., Takeda, N., Harada, M., Toko, H., Kumagai, H., Ikeda, Y., Takimoto, E., Suzuki, J.I., Honda, K., Morita, H., Hattori, M., Komuro, I. (2017). Dysbiosis and compositional alterations with aging in the gut microbiota of patients with heart failure. *PLoS One* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174099>.
- Kang, S.M., Adhikari, A., Lee, K.E., Khan, M.A., Khan, A.L., Shahzad, R., Dhungana, S.K., Lee, I.J. (2020). Inoculation with Indole-3-Acetic Acid-Producing Rhizospheric *Rhodobacter sphaeroides* KE149 Augments Growth of Adzuki Bean Plants Under Water Stress. *J. Microbiol. Biotechnol.* 30: 717-725.
- Kandel, S., Joubert, P., Doty, S. (2017). Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms*. 5. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040077>.
-

- 
- Kataoka, R., Akashi, M., Taniguchi, T., Kinose, Y., Yaprak, A.E., Turgay, O.C. (2021). Metabolomics Analyses Reveal Metabolites Affected by Plant Growth-Promoting Endophytic Bacteria in Roots of the Halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 11813. <https://doi.org/10.3390/ijms222111813>
- Khan, A.R., Park, G.S., Asaf, S., Hong, S.J., Jung, B.K., Shin, J.H. (2017). Complete genome analysis of *Serratia marcescens* RSC-14: a plant growth- promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. *PLoS One* 12:e0171534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171534>.
- Khan, M.A., Waqas, M., Asaf, S., Kamran, M., Shahzad, R., Bilal, S., ... Lee, I. (2017). Plant growth-promoting endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 alleviates salinity stress in *Solanum pimpinellifolium*. *Environmental and Experimental Botany*. 133: 58–69
- Khan, M.A., Asaf, S., Khan, A.L., Jan, R., Kang, S.M., Kim, K.M., Lee, I.J. (2020). Thermotolerance effect of plant growth-promoting *Bacillus cereus* SA1 on soybean during heat stress. *BMC Microbiology*. 20(1).
- Khare, E., Mishra, J., Arora N.K. (2018). Multifaceted Interactions Between Endophytes and Plant: Developments and Prospects. *Frontiers in Microbiology*, 9: 2732–. [doi:10.3389/fmicb.2018.02732](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02732)
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing- based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 41:e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>.
- Krishnan, P., Bhat, R., Kush, A., Ravikumar, P. (2012). Isolation and functional characterization of bacterial endophytes from *Carica papaya* fruits. *Journal of Applied Microbiology*, 113(2): 308–317. [doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05340.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05340.x)
-

- 
- Kruasuwan, W., Thamchaipenet, A. (2016). Diversity of Culturable Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes Associated with Sugarcane Roots and Their Effect of Growth by Co-Inoculation of Diazotrophs and Actinomycetes. *J Plant Growth Regul.* 35: 1074–1087.
- Kraut-Cohen, J., Shapiro, O.H., Dror, B., Cytryn, E. (2021). Pectin Induced Colony Expansion of Soil-Derived Flavobacterium Strains. *Front Microbiol.* 12: 651891.
- Khoiri, A.N., Cheevadhanarak, S., Jirakkakul, J., Dulsawat, S., Prommeenate, P., Tachaleat, A., Kusonmano, K., Wattanachaisaereekul, S., Sutheworapong, S. (2021). Comparative Metagenomics Reveals Microbial Signatures of Sugarcane Phyllosphere in Organic Management. *Front Microbiol.* 12: 623799. doi: 10.3389/fmicb.2021.623799.
- Kuźniar, A., Włodarczyk, K., Grządziel, J., Goraj, W., Gałązka, A., Wolińska, A. (2020). Culture-independent analysis of an endophytic core microbiome in two species of wheat: *Triticum aestivum* L. (cv. 'Hondia') and the first report of microbiota in *Triticum spelta* L. (cv. 'Rokosz'). *Systematic and Applied Microbiology.* 43(1): 126025.
- Lacava, P.T., Azevedo, J.L. (2013). Endophytic Bacteria: A Biotechnological Potential in Agrobiological System. *Bacteria in Agrobiological System: Crop Productivity.* 1–44.
- Lata, R., Chowdhury, S., Gond, S., White, J. (2018). Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. *Letters in Applied Microbiology,* 66: 268—276.
- Lafta, A.M., Lorenzen, J.H. (1995). Effect of high temperature on plant growth and carbohydrate metabolism in potato. *Plant Physiol* 109: 637–643. <https://doi.org/10.1104/pp.109.2.637>.
-

- 
- Lee, G.W., Lee, K.J., Chae, J.C. (2015). *Herbaspirillum* sp. strain GW103 alleviates salt stress in *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*. *Protoplasma*. 253(3): 655–661.
- Li, O., Xiao, R., Sun, L., Guan, C., Kong, D., Hu, X. (2017). Bacterial and diazotrophic diversities of endophytes in *Dendrobium catenatum* determined through barcoded pyrosequencing. *PLoS ONE*. 12(9): e0184717. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184717>
- Levy, A., Gonzalez I.S., Mittelviehhaus, M., Clingenpeel, S., Paredes, S.H., Miao, J., Wang, K., Devescovi, G., Stillman, K., Monteiro, F. (2018). Genomic features of bacterial adaptation to plants. *Nat. Genet.* 50:138. doi: 10.1038/s41588-017-0012-9.
- Lezutekong, J.N., Nikhanj, A., Oudit, G.Y. (2018). Imbalance of gut microbiome and intestinal epithelial barrier dysfunction in cardio-vascular disease. *Clin Sci* 132:901–904. <https://doi.org/10.1042/cs20180172>.
- Liaqat, F., Eltem, R. (2016). Identification and characterization of endophytic bacteria isolated from in vitro cultures of peach and pear rootstocks. *3 Biotech*. 6(2): 120.
- Liu, H., Carvalhais, L. C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P. G., Pieterse, C. M. J., Schenk, P. M. (2017). Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.02552.
- Lopes, R., Tsui, S., Gonçalves, P. J. R. O., de Queiroz, M. V. (2018). A look into a multifunctional toolbox: endophytic *Bacillus* species provide broad and underexploited benefits for plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 34(7).
- Lundberg, D.S., Lebeis, S.L., Paredes, S.H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., Tremblay, J., Engelbrektson, A., Kunin, V., Rio, T.G., Edgar, R.C., Eickhorst, T.,
-

- 
- Ley, R.E., Hugenholtz, P., Tringe, S.G., Dangl, J.L. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*.488:86–90. <https://doi.org/10.1038/nature11237>.
- Luo, Y., Wang, F., Huang, Y., et al. (2019). *Sphingomonas* sp.Cra20 increases plant growth rate and alters rhizosphere microbial community structure of *Arabidopsis thaliana* under drought stress. *Front Microbiol*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01221>.
- Mączik, M., Gryta, A., Sas-Paszt, L., Frąc, M. (2020). The Status of Soil Microbiome as Affected by the Application of Phosphorus Biofertilizer: Fertilizer Enriched with Beneficial Bacterial Strains. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 8003. <https://doi.org/10.3390/ijms21218003>
- McCoy, A.J., Adams, N.E., Hudson, A.O., Gilvarg, C., Leustek, T., Maurelli, A.T. (2006). L,L-diaminopimelate aminotransferase, a trans-kingdom enzyme shared by *Chlamydia* and plants for synthesis of diaminopimelate/lysine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(47): 17909–17914.
- Maghembe, R., Damian, D., Makaranga, A., Nyandoro, S.S., Lyantagaye, S.L., Kusari, S., Hatti-Kaul, R. (2020). Omics for Bioprospecting and Drug Discovery from Bacteria and Microalgae. *Antibiotics*. 9(5): 229. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050229>
- Mahouachi, J., Socorro, A.R., Talon, M. (2006). Responses of papaya seedlings (*Carica papaya* L.) to water stress and re-hydration: growth, photosynthesis and mineral nutrient imbalance. *Plant Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-3935-3>.
- Mahouachi, J., Arbona, V, Gómez-Cadenas, A. (2007). Hormonal changes in papaya seedlings subjected to progressive water stress and re-watering. *Plant Growth Regul* 53:43–51. <https://doi.org/10.1007/s10725-007-9202-2>.
-

- 
- Mahouachi, J., Argamasilla, R., Gómez-Cadenas, A. (2012). Influence of exogenous glycine betaine and abscisic acid on papaya in responses to water-deficit stress. *J Plant Growth Regul* 31:1–10. <https://doi.org/10.1007/s00344-011-9214-z>.
- Manter, D., Delgado, J., Holm, D., Stong, R. (2010). Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots. *Microb. Ecol.* 60(1): 157–166.
- Marag, P.S., Suman, A. (2018). Growth stage and tissue specific colonization of endophytic bacteria having plant growth promoting traits in hybrid and composite maize (*Zea mays* L.). *Microbiol Res.* <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.05.016>.
- Mei, C., Flinn, B. S. (2010). The use of beneficial microbial endophytes for plant biomass and stress tolerance improvement. *Recent Patents on Biotechnology*, 4(1): 81–95 <http://dx.doi.org/10.2174/187220810790069523>.
- McMurdie, P.J., Holmes, S. (2013). Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8:e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.
- Miliute, I., Buzaitė, O., Baniulis, D., Stanys, V. (2015). Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review. *Zemdirbyste.* <https://doi.org/10.13080/z-a.2015.102.060>.
- Moran, N.A. Symbiosis. (2006). *Curr. Biol.* 16: R866–R871. doi: 10.1016/j.cub.2006.09.019.
- Mosca, A., Leclerc, M. Hugot, J.P. (2016). Gut microbiota diversity and human diseases: should we reintroduce key predators in our ecosystem? *Front Microbiol* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00455>.
-

- 
- Muangthong, A., Youpensuk, S., Rerkasem, B. (2015). Isolation and Characterisation of Endophytic Nitrogen Fixing Bacteria in Sugarcane. *Tropical life sciences research*. 26(1): 41–51.
- Mukherjee, G., Saha, C., Naskar, N., Mukherjee, A., Mukherjee, A., Lahiri, S., Majumder, A.L., Seal, A. (2018). An Endophytic Bacterial Consortium modulates multiple strategies to improve Arsenic Phytoremediation Efficacy in *Solanum nigrum*. *Sci Rep*. 8(1): 6979. Erratum in: *Sci Rep*. 8(1): 16365.
- Mukherjee, P., Mitra, A., Roy, M. (2019). *Halomonas rhizobacteria* of *Avicennia marina* of Indian Sundarbans Promote Rice Growth Under Saline and Heavy Metal Stresses Through Exopolysaccharide Production. *Frontiers in microbiology*. 10: 1207.
- Müller, C.A., Obermeier, M.M., Berg, G. (2016). Bioprospecting plant-associated microbiomes. *J Biotechnol*. 10 (235):171-180. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.03.033.
- Nafis, A., Raklami, A., Bechtaoui, N., El Khalloufi, F., El Alaoui, A., Glick, B., ... Hassani, L. (2019). *Actinobacteria* from Extreme Niches in Morocco and Their Plant Growth-Promoting Potentials. *Diversity*. 11(8): 139.
- Navarrete, A., Soares, T., Rossetto, R., van Veen, J., Tsai, S., Kuramae, E. (2015). Verrucomicrobial community structure and abundance as indicators for changes in chemical factors linked to soil fertility. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 108(3): 741-752.
- Naveed, M., Hussain, M.B., Zahir, Z.A., Mitter, B. and Sessitsch, A. (2014). Drought stress amelioration in wheat through inoculation with *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Plant Growth Regulation*. 73(2): 121-131.
-

- Naylor, D., Degraaf, S., Purdom, E., Coleman-Derr, D. (2017). Drought and host selection influence bacterial community dynamics in the grass root microbiome. *ISME J* 11:2691–2704. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.118>.
- Orozco-Mosqueda, MdC., Flores, A., Rojas-Sánchez, B., Urtis-Flores, C.A., Morales-Cedeño, L.R., Valencia-Marin, M.F., Chávez-Avila, S., Rojas-Solis, D., Santoyo, G. (2021). Plant Growth-Promoting Bacteria as Bioinoculants: Attributes and Challenges for Sustainable Crop Improvement. *Agronomy*. 11(6):1167.
- Ou, T., Xu, W., Wang, F., Strobel, G., Zhou, Z., Xiang, Z., et al. (2019). A microbiome study reveals seasonal variation in endophytic bacteria among different Mulberry cultivars. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 17: 1091–1100.
- Pacifico, D., Squartini, A., Crucitti, D., Barizza, E., Lo Schiavo, F., Muresu, R., Carimi, F., Zottini, M. (2019). The role of the endophytic microbiome in the grapevine response to environmental triggers. *Front Plant Sci* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01256>.
- Papik, J., Folkmanova, M., Polivkova-Majorova, M., Suman, J., Uhlík, O. (2020). The invisible life inside plants: Deciphering the riddles of endophytic bacterial diversity. *Biotechnol Adv.* 15(44): 107614.
- Patil, B.L., Narayan, K.S., Gopalkrishna, A.M. (2021). Diversity Profiling of Seed Associated Endophytic Microbiome in Important Species of Caricaceae Family. *Microbiol. Res.* 12, 779–792. <https://doi.org/10.3390/microbiolres12040057>
- Paulson, J.N., Colin Stine, O., Bravo, H.C., Pop, M. (2013). Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nat Methods* 10: 1200–1202. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2658>.
-

- 
- Pereira-Santana, A., Alvarado-Robledo, E.J., Zamora-Briseño, J.A., Ayala- Sumuano, J.T., Gonzalez-Mendoza, V.M., Espadas-Gil, F., Alcaraz, L.D., Castaño, E., Keb-Llanes, M.A., Sanchez-Teyer, F., Rodriguez- Zapata, L.C. (2017) Transcriptional profiling of sugarcane leaves and roots under progressive osmotic stress reveals a regulated coordination of gene expression in a spatiotemporal manner. PLoS One 12:e0189271. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189271>.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41:D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
- Raaijmakers, J.M, Mazzola, M. (2012). Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* 50:403-424.
- Rakotoniriana, E.F., Rafamantanana, M., Randriamampionona, D., Rabemanantsoa, C., Urveg Ratsimamanga, S., El, J.M., Munaut, F., Corbisier, A.M., Quetin-Leclercq, J., Declerck, S. (2013). Study in vitro of the impact of endophytic bacteria isolated from *Centella asiatica* on the disease incidence caused by the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum higginsianum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 103:121–133.
- Ramon, M., Rolland, F., Sheen, J. (2008). Sugar Sensing and Signaling. *Arab. Book.* 6:e0117. doi: 10.1199/tab.0117.
- Reyes-Hernández, S.J., Zamora-Briseño, J.A., Cerqueda-García, D., Castaño, E., Rodríguez-Zapata, L.C. (2020). Alterations in the sap-associated microbiota of *Carica papaya* in response to drought stress. *Symbiosis.* 81(1): 93–100.
- Ribeiro, V.P., Marriel, I.E., de Sousa, S.M., et al. (2018). Endophytic *Bacillus* strains enhance pearl millet growth and nutrient uptake under low-P. *Braz J Microbiol* 49:40–46. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.005>.
-

- Rho, H., Doty, S.L., Kim, S.H. (2018). Estimating microbial respiratory CO<sub>2</sub> from endophytic bacteria in rice. *Plant Signal Behav.* 213(8): e1500067.
- Rodionov, D.A., Vitreschak, A.G., Mironov, A.A., Gelfand, M.S. (2003). Regulation of lysine biosynthesis and transport genes in bacteria: yet another RNA riboswitch?. *Nucleic Acids Res.* 31(23): 6748-6757.
- Rolli, E., Marasco, R., Vigani, G., Ettoumi, B., Mapelli, F., Deangelis, M.L., et al. (2015). Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. *Environ. Microbiol.* 17(2): 316–331.
- Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol Plant-Microbe Interact* 19:827– 837. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0827>.
- Ruiz-Herrera, J., León-Ramírez, C., Vera-Nuñez, A., Sánchez-Arreguín, A., Ruiz-Medrano, R., Salgado-Lugo, H., Sánchez-Segura, L., Peña- Cabriales, J.J. (2015). A novel intracellular nitrogen-fixing symbiosis made by *Ustilago maydis* and *Bacillus* spp. *New Phytol* 207:769– 777. <https://doi.org/10.1111/nph.13359>.
- Sakarika, M., Spanoghe, J., Sui, Y., Wambacq, E., Grunert, O., Haesaert, G., ... Vlaeminck, S.E. (2019). Purple non-sulphur bacteria and plant production: benefits for fertilization, stress resistance and the environment. *Microbial Biotechnology.* 13(5): 1336-1365.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen, O-M.M., Glick, B.R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol Res* 183: 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>.

- 
- Sauvêtre, A., Schröder, P. (2015). Uptake of carbamazepine by rhizomes and endophytic bacteria of *Phragmites australis*. *Front Plant Sci* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00083>.
- Schlaeppli, K., Bulgarelli, D. (2015). The Plant Microbiome at Work. *Mol. Plant Microbe Interact.* 212: 212–217. doi: 10.1094/MPMI-10-14-0334-FI.
- Shahzad, R., Khan, A. L., Bilal, S., Asaf, S., Lee, I. J. (2018). What Is There in Seeds? Vertically Transmitted Endophytic Resources for Sustainable Improvement in Plant Growth. *Frontiers in Plant Science.* 9. doi:10.3389/fpls.2018.00024.
- Sharmin, F., Wakelin, S., Huygens, F., Hargreaves, M. (2013). *Firmicutes* dominate the bacterial taxa within sugar-cane processing plants. *Scientific Reports.* 3(1): 3107.
- Shi, Y., Yang, H., Zhang, T., Sun, J., Lou, K. (2014). Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity and space-time dynamics in sugar beet on the north slope of Tianshan mountain. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 98(14): 6375–6385
- Shivlata, L., Satyanarayana, T. (2015). Thermophilic and alkaliphilic *Actinobacteria*: biology and potential applications. *Front. Microbiol.* 6: 1014.
- Souza, A., Cruz, J.C., Sousa, N.R., Procópio, A.R., Silva, G.F. (2014). Endophytic bacteria from banana cultivars and their antifungal activity. *Genet Mol Res.* 13(4): 8661-8670.
- Souza, R.S.C. *et al.* (2016). Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. *Sci. Rep.* 6, 28774; doi: 10.1038/srep28774.
- Suhandono, S., Kusumawardhani, M.K., Aditiawati, P. (2016). Isolation and molecular identification of endophytic bacteria from rambutan fruits (*Nephelium lappaceum* L.) cultivar Binjai. *HAYATI Journal of Biosciences.* 23(1): 39–44.
-

- Tamosiune, I., Baniulis, D., Stanys, V. (2017). Role of endophytic bacteria in stress tolerance of agricultural plants: diversity of microorganisms and molecular mechanisms. *Probiotics Agroecosyst.* [https://doi.org/10.1007/978-981-10-4059-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-10-4059-7_1).
- Trivedi, G., Shah, R., Patel, P., Saraf, M. (2017). Role of endophytes in agricultural crops under drought stress: current and future prospect. *Journal of Advance Microbiology*, 3(4): 174-188.
- Turner, T., James, E., Poole, P. (2013) The plant microbiome. *Genome Biology*, 14 (6):209.
- Ullah, A., Nisar, M., Ali, H., Hazrat, A., Hayat, K., Keerio, A.A., Ihsan, M., Laiq, M., Ullah, S., Fahad, S., Khan, A., Khan, A.H., Akbar, A., Yang, X. (2019). Drought tolerance improvement in plants: an endophytic bacterial approach. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:7385–7397. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10045-4>.
- Uroz, S., Courty, P. E., Oger, P. (2019). Plant Symbionts Are Engineers of the Plant-Associated Microbiome. *Trends in Plant Science*. doi:10.1016/j.tplants.2019.06.008
- Vandana, U., Rajkumari, J., Singha, L., Satish, L., Alavilli, H., Sudheer, P., Chauhan, S., Ratnala, R., Satturu, V., Mazumder, P., Pandey, P. (2021). The Endophytic Microbiome as a Hotspot of Synergistic Interactions, with Prospects of Plant Growth Promotion. *Biology*. 10(2): 101.
- van den Bergh, E.R., Baker, S.C., Raggars, R.J., et al. (1996). Primary structure and phylogeny of the Calvin cycle enzymes transketolase and fructose bisphosphate aldolase of *Xanthobacter flavus*. *J Bacteriol.* 178(3): 888-893.

- 
- Vandenkoornhuysse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*. 206(4): 1196–1206.
- Verma, P., Yadav, A.N., Shukla, L., Saxena, A.K., Suman, A. (2015). Hydrolytic enzymes production by thermotolerant *Bacillus altitudinis* IARI-MB-9 and *Gulbenkiania mobilis* IARI-MB-18 isolated from Manikaran hot springs. *International. J Adv Res* 3(9):1241–1250.
- Walitang, D. I., Kim, C.-G., Kim, K., Kang, Y., Kim, Y. K., Sa, T. (2018). The influence of host genotype and salt stress on the seed endophytic community of salt-sensitive and salt-tolerant rice cultivars. *BMC Plant Biology*. 18(1). doi:10.1186/s12870-018-1261-1
- Wang, P., Kong, X., Chen, H., Xiao, Y., Liu, H., Li, X., Zhang, Z., Tan, X., Wang, D., Jin, D., Deng, Y., Cernava, T. (2021). Exploration of Intrinsic Microbial Community Modulators in the Rice Endosphere Indicates a Key Role of Distinct Bacterial Taxa Across Different Cultivars. *Front Microbiol*. 12: 629852.
- Wemheuer, F., Kaiser, K., Karlovsky, P., Daniel, R., Vidal, S., Wemheuer, B. (2017). Bacterial endophyte communities of three agriculturally important grass species differ in their response towards management regimes. *Scientific reports*. 7: 40914.
- Wertz, J., Kim, E., Breznak, J., Schmidt, T., Rodrigues, J. (2012). Genomic and physiological characterization of the *Verrucomicrobia* isolate *Diplosphaera colitermitum* gen. nov., sp. nov., reveals microaerophily and Nitrogen fixation genes. *Appl Environ Microbiol*. 78: 1544–1555.
- Woźniak, M., Gałązka, A., Tyśkiewicz, R., Jaroszuk-Ścisiel, J. (2019). Endophytic Bacteria Potentially Promote Plant Growth by Synthesizing Different Metabolites and their
-

- 
- Phenotypic/Physiological Profiles in the Biolog GEN III MicroPlate™ Test. *Int J Mol Sci.* 20(21): 5283.
- Wu, W., Chen, W., Liu, S., Wu, J., Zhu, Y., Qin, L., Zhu, B. (2021). Beneficial Relationships Between Endophytic Bacteria and Medicinal Plants. *Frontiers in plant science.* 12: 646146.
- Xia, Y., Liu, J., Chen, C., Mo, X., Tan, Q., He, Y., Wang, Z., Yin, J., Zhou, G. (2022) The Multifunctions and Future Prospects of Endophytes and Their Metabolites in Plant Disease Management. *Microorganisms.* 10: 1072. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10051072>
- Xu, L., Naylor, D., Dong, Z., Simmons, T., Pierroz, G., Hixson, K.K., Kim, Y.M., Zink, E.M., Engbrecht, K.M., Wang, Y., Gao, C., DeGraaf, S., Madera, M.A., Sievert, J.A., Hollingsworth, J.L, Birdseye, D., Scheller, H.V., Hutmacher, R., Dahlberg, J., Jansson, C., Taylor, J.W, Lemaux, P.G., Coleman-Derr, D. (2018). Drought delays development of the sorghum root microbiome and enriches for monoderm bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: E4284–E4293. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717308115>.
- Zamora-Briseño, J.A., de Jiménez, E.S. (2016). A LEA4 protein up-regulated by is involved in drought response in maize roots. *Mol Biol Rep* 43: 221–228. <https://doi.org/10.1007/s11033-016-3963-5>.
- Zhang, W., Xie, Z., Zhang, X., Lang, D., Zhang, X. (2019). Growth-promoting bacteria alleviates drought stress of *G. uralensis* through improving photosynthesis characteristics and water status. *Journal of Plant Interactions.* 14(1): 580–589. doi:10.1080/17429145.2019.1680752
-

Zhao, K., Li, J., Zhang, X., Chen, Q., Liu, M., Ao, X., ... Penttinen, P. (2018). *Actinobacteria* associated with *Glycyrrhiza inflata* Bat. are diverse and have plant growth promoting and antimicrobial activity. *Scientific Reports*. 8(1).

Zhao, L., Xu, Y., Lai, BS X. (2018). Antagonistic endophytic bacteria associated with nodules of soybean (*Glycine max* L.) and plant growth-promoting properties. *Braz J Microbiol*. 49(2): 269-278.