

**APROXIMACIÓN METAGENÓMICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
BACTERIAS ENDÓFITAS DE LA RAÍZ DE YUCA (*Manihot esculenta*
Crantz) BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO**

**Alexandra Fernández Gaviria
Valentina Herrera Arbeláez**

**Director (a)
Alba Rocío Corrales Ducuara
PhD en Biotecnología Vegetal**

**Codirector (a):
Diana Carolina López Álvarez
PhD en Ciencias Agrarias y del Medio Natural**

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas,
Programa de Microbiología
Cali, Colombia
2019**

**APROXIMACIÓN METAGENÓMICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
BACTERIAS ENDÓFITAS DE LA RAÍZ DE YUCA (*Manihot esculenta*
Crantz) BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO**

**Alexandra Fernández Gaviria
Valentina Herrera Arbeláez**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título
de:
Microbiólogo**

**Director (a): Alba Rocío Corrales Ducuara
PhD en Biotecnología Vegetal**

**Codirector (a):
Diana Carolina López Álvarez
PhD en Ciencias Agrarias y del Medio Natural**

**Grupo de Investigación en Microbiología Industria y Ambiente (GIMIA)
Línea de Investigación en Microbiología Ambiental**

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas,
Programa de Microbiología
Cali, Colombia
2019**

ACTA DE SUSTENTACIÓN
ACTA DE SUSTENTACIÓN No. __-2019

En Santiago de Cali, a los () días del mes de _____ del 2019; en el salón _____ de la Universidad Santiago de Cali, se reunieron _____ en calidad de Director del Programa de Microbiología, _____ en calidad de Director del Trabajo, _____ quien actuó como jurado calificador del estudiante **Alexandra Fernández Gaviria** identificado (a) con cédula de ciudadanía No 1.112.489.951 de Jamundí (VALLE) y **Valentina Herrera Arbeláez** identificado (a) con cédula de ciudadanía No 1.144.099.562 de Cali (VALLE) autores del trabajo de grado titulado “ **Aproximación Metagenómica para la Identificación de bacterias endófitas de la raíz de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) bajo Condiciones de Estrés Abiótico.**”

Inicialmente el estudiante realizo una exposición de su trabajo explicando el contenido y el método investigativo; luego el jurado interrogó ampliamente al estudiante acerca del tema y sus **respuestas fueron satisfactorias**, razón por la cual les fue dada la aprobación al trabajo y declarado debidamente sustentado.

Se declara entonces cumplido con el requisito legal de trabajo de grado.

Director del Programa de
Microbiología

Director Trabajo de Grado

Director del Trabajo de Grado

Jurado Calificador

IMPACTOS

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico		
Responsabilidad social		
Científico	Nuevo conocimiento	USC, Alexandra Fernández, Valentina Herrera
Indicadores de Gestión		
Tecnológico		
Técnico		
Ambiental	Conocimiento para el mejoramiento en la producción de cultivos	Comunidad agrícola
Social		
Cultural		

APROXIMACIÓN METAGENÓMICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS DE LA RAÍZ DE YUCA (*Manihot esculenta* Crantz) BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO

Alexandra Fernández Gaviria ¹, Valentina Herrera Arbeláez ¹, Alba Rocío Corrales Ducara ¹, Diana Carolina López Álvarez²

¹Grupo de Investigación en Microbiología Industria y Ambiente (GIMIA). Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Santiago de Cali. Campus Pampalinda Calle 5 # 62-00. Santiago de Cali. Colombia.

²Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira.

RESUMEN

La yuca (*M. esculenta*) es el cuarto cultivo más importante a nivel mundial. Es considerado un alimento básico en la dieta de millones de personas en áreas tropicales y subtropicales del mundo. Sin embargo, su productividad se ha visto afectada a causa de condiciones ambientales adversas como; las altas y bajas temperaturas. En este sentido, es importante estudiar nuevos mecanismos de tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico. Conocer la diversidad microbiana endófitas de la raíz puede influir de manera positiva o negativa en el desarrollo, productividad y salud del cultivo bajo condiciones de estrés abiótico. Plantas de yuca (*M. esculenta*) variedad MCOL1734 fueron sometidas a estrés por déficit hídrico por un periodo de 20 días. El análisis metagenómico de comunidades endófitas permitió identificar cuatro Phylum; Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria, los cuales son catalogados como endófitos en raíz de plantas. Especies como; *Clostridium* sp. *Acinetobacter Iwoffii* y *Acinetobacter* sp. las cuales son bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), son candidatas para implementar en programas de mejora para aumentar la tolerancia al déficit hídrico en el cultivo de la yuca (*M. esculenta*).

Palabras clave: *Manihot esculenta*; yuca; metagenómica; endófitas; estrés abiótico; PGPR.

METAGENOMIC APPROXIMATION FOR THE IDENTIFICATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA OF THE ROOT OF YUCA (*Manihot esculenta* Crantz) UNDER ABIOTIC STRESS CONDITIONS

Alexandra Fernández Gaviria ¹, Valentina Herrera Arbeláez ¹, Alba Rocío Corrales Ducara ¹, Diana Carolina López Álvarez²

¹Grupo de Investigación en Microbiología Industria y Ambiente (GIMIA). Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Santiago de Cali. Campus Pampalinda Calle 5 # 62-00. Santiago de Cali. Colombia.

²Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira.

ABSTRACT

Cassava (*M. esculenta*) is the fourth most important crop in the world. It is considered a basic food in the diet of millions of people in tropical and sub-tropical areas. However, its productivity has been affected by adverse environmental conditions such as: low and high temperatures. In this regard, it is important to study new tolerant mechanisms to different types of abiotic stress. Knowing the endophyte microbial diversity of the root may influence positively or negatively in its development, productivity and crop health under abiotic stress conditions. Cassava plants *M. esculenta* of the variety MCOL1734 were subjected to stress by hydric deficit for a 20-day period. In the metagenomic analysis of endophyte bacteria there were four Phylum; Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes and Actinobacteria, which are cataloged as endophytes in root of plants. Species like; *Clostridium sp.*, *Acinetobacter lwoffii* and *Acinetobacter sp.* which are PGPR bacteria, are candidates to implement in improvement programs to increase tolerance to water deficit in cassava cultivation (*M. esculenta*).

Keywords: *Manihot esculenta*, metagenomic, cassava, endophytic, abiotic stress, PGPR.



1. INTRODUCCIÓN

El estrés abiótico es uno de los principales factores que afecta la productividad de cultivos en el mundo [1], [2]. Dentro de los diferentes tipos de estrés abiótico, el estrés por déficit hídrico más conocido como sequía, es el que causa mayor impacto en el rendimiento y productividad. En los últimos años se han presentado constantes cambios de temperatura a nivel global, causando un gran impacto en la agricultura en zonas áridas y semiáridas del mundo [3]. Del área cultivada a nivel mundial se ha observado que el 64% es afectado a causa de este fenómeno [1]. El estrés por déficit hídrico afecta la calidad del suelo, el crecimiento de la planta durante su desarrollo, la adsorción de nutrientes, la tasa fotosintética y su capacidad de absorción de CO₂, por otra parte, disminuye el potencial de agua en el área foliar y la apertura de estomas. Lo cual genera un gran impacto fisiológico en la planta [4], [5].

Durante los últimos años se han abordado diferentes estrategias para aumentar la tolerancia a estrés por déficit hídrico, dentro de estas se ha estudiado, el mejoramiento genético, la ingeniería genética y la agricultura de precisión. Sin embargo, estos métodos han sido poco exitosos al implementarlos en sistemas agrícolas. Una estrategia para aumentar el crecimiento de plantas bajo condiciones ambientales adversas es el uso de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), que es un grupo de microorganismos que se encuentran en asociación con las raíces de las plantas, tanto en la zona radicular como de forma endófitas, ocasionando así un efecto simbiótico (bacteria-planta), que le permite a la planta obtener un mejor crecimiento y adaptabilidad en diferentes ambientes [6]. Las bacterias PGPR cumplen un papel de intercambio de información con el hospedero (planta), dando así un beneficio para el desarrollo y crecimiento de las plantas, estas bacterias contribuyen en diferentes procesos fisiológicos de la planta como; la fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas incluidas auxinas y la solubilización de fosfatos minerales [7]. Por otro lado, las PGPR se encuentran involucradas en el catabolismo de moléculas relacionadas con la señalización de estrés como la 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC). Asimismo, se ha demostrado que muchas PGPR alivian los efectos de estrés por sequía en las plantas, dado que tiene la capacidad de reducir los niveles de etileno, lo que generalmente aumenta cuando la planta está sometida a un determinado tipo de estrés abiótico [4].

Estudios metagenómicos realizados en especies modelo y de interés económico como; *Arabidopsis thaliana* [8], *Oryza sativa* [9], *Lycopersicon esculentum* [10] y *Setaria itálica* [4] han mostrado una gran diversidad de especies endófitas y rizosféricas que interactúan con la planta promoviendo su crecimiento y desarrollo. Sin embargo, son pocos los estudios metagenómicos realizados en cultivos tolerantes a el déficit hídrico como la yuca (*M. esculenta*) [11].

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es considerado el cuarto cultivo más importante después del trigo, maíz y arroz, ya que es la principal fuente de alimento para más de 800 millones de personas en las zonas tropicales y subtropicales de África, Asia y América Latina [12]. Este tubérculo de origen Americano, se encuentra ampliamente extendido en el trópico Americano desde Colombia hasta el Noroeste de Brasil [13]. Es un cultivo que se adapta naturalmente a la sequía, esto se debe a los mecanismos fisiológicos presentes ante condiciones adversas, como lo es el cierre de los estomas, la reducción de la lámina foliar, la disminución considerable de la transpiración y un aumento significativo en las raíces con el fin de mejorar el almacenamiento de agua [14]. Además, la yuca (*M. esculenta*) se beneficia de las relaciones con las comunidades endófitas de la raíz que desempeñan un papel importante en las funciones fisiológicas y productividad [15]. En este sentido puede ser un cultivo élite en zonas áridas y semiáridas del mundo y su crecimiento puede ser beneficiado por comunidades endófitas que promueven su crecimiento tanto en condiciones normales como bajo estrés por déficit hídrico [16].



Por lo anterior, el presente trabajo busca identificar las comunidades endófitas de la raíz de yuca (*M. esculenta*) bajo condiciones de estrés por déficit hídrico a partir de un análisis metagenómico e identificar especies bacterianas que puedan contribuir a la tolerancia estrés abiótico en plantas.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Obtención del material vegetal

Plantas de yuca *M. esculenta* variedad MCOL1734 de cuatro semanas, proporcionadas por el banco de recursos genéticos del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), fueron mantenidas bajo condiciones de invernadero a 28°C, 12 horas luz/oscuridad, durante 60 días.

2.2 Ensayo de estrés por déficit hídrico en yuca *M. esculenta*

Para realizar el ensayo de estrés por déficit hídrico, fueron empleadas 10 plantas de yuca variedad MCOL1734 de cuatro semanas crecidas en condiciones de invernadero 28°C 12 horas luz/oscuridad. Posteriormente, fue suspendido el riego por un periodo de 20 días y reanudado durante dos semanas. Como control se emplearon plantas mantenidas con riego continuo.

2.2.1 Recolección del material vegetal

Para la recolección de bacterias endófitas. Se colectó 2g de tejido de la raíz principal y las raíces adventicias de cada una de las plantas, retirando el suelo adherido. Luego, se realizaron tres lavados con agua destilada y un lavado con 15 mL de etanol al 70% durante 1 minuto, adicionalmente se realizó un lavado con 10 mL de NaClO al 1,2% durante 15 minutos. Finalmente, se realizó un lavado con agua destilada hasta tener las raíces libres de residuos de suelo.

2.3 Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos

La extracción del ADN se realizó según el método descrito por Doyle [17]. A partir de 1g de raíz principal y adventicias previamente maceradas en mortero estéril con nitrógeno, fue resuspendido 600 µL del buffer de extracción (Tris – HCl 1 M; NaCl 5 M; EDTA 5 mM; 2% CTAB; 0.2% β-mercaptoetanol) previamente calentado a 65°C. Posteriormente fue incubada a 65°C durante 1 hora con agitación constante. Luego, se adicionaron 600 µL de una mezcla de cloroformo/isoamil:alcohol 24: 1, agitándose suavemente por un periodo de 30 minutos y se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 minutos. Posteriormente fue transferida la parte acuosa a un nuevo tubo y se adicionó isopropanol en proporción 1:1, seguido, se realizó una centrifugación a 12.000 rpm por 30 minutos. El precipitado fue lavado con 500 µL de etanol al 70% y centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, fue resuspendido en 50 µL de TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM) y almacenado a -20°C. La calidad del ADN fue visualizada en un gel de agarosa al 1% y cuantificada en (NanoDrop™).

2.3.1 Amplificación del gen ribosomal 16S

Para la amplificación del gen 16S ribosomal se realizó una PCR de la región hipervariable V3-V4 del gen ribosomal 16S, empleando los cebadores 515F- 806R la reacción se llevó a cabo con Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs). El producto de PCR fue visualizado en geles de agarosa al 2%. Los productos obtenidos entre 400 pb - 450 pb fueron purificados con el kit Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Alemania).



La librería se generó usando NEBNext® Ultra TM DNA Library Prep Kit para Illumina siguiendo las recomendaciones del fabricante. La calidad de la librería se evaluó en el fluorómetro Qubit @ 2.0 (Thermo Scientific) y el sistema Agilent Bioanalyzer 2100. Finalmente, la librería fue secuenciada en una plataforma Illumina y se generaron lecturas de 250 pb.

2.4 Análisis bioinformático

La calidad de las secuencias obtenidas fue evaluada con el programa FASTQ. Posteriormente se realizó la identificación del barcode de cada una de las secuencias obtenidas evaluando la calidad de estas, empleando el programa FLASH (V1.2.7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>). Para la eliminación de quimeras se empleó como referencia la base de datos Silva, utilizando el algoritmo UCHIME. Asimismo, fueron eliminadas las secuencias clasificadas como; Arqueas, Cloroplastos y Eucariotas.

2.4.1 Agrupación de las secuencias según el porcentaje de similitud

Para la agrupación de las secuencias según el porcentaje de similitud. Se seleccionaron aquellas con un porcentaje de similitud mayor al 97% corresponden a una misma especie o género. Se empleó una aproximación tipo k-mer para identificar las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU). Adicionalmente se realizó un análisis de similitud empleando el software Uparse (Uparse v7.0.1001) y se empleó el algoritmo UPARSE-OTU [18].

Para estudiar la relación filogenética entre OTUs y la diferencia de las especies dominantes en diferentes muestras (grupos), se realizó la alineación de secuencias múltiples utilizando el software MUSCLE (Versión 3.8.31).

2.5 Análisis Filogenético

El análisis filogenético se realizó a partir de un alineamiento múltiple de 37 secuencias obtenidas con el programa Clustal Omega utilizando el formato CLUSTALW [18]. El árbol se construyó utilizando el programa MEGA X [19], mediante el algoritmo de máxima verosimilitud el cual permitió por medio del análisis estadístico, agrupar las diferentes secuencias de los microorganismos (bacterias) endófitos de la raíz de yuca (*M. esculenta*), el árbol fue construido a partir de un bootstrap de 10.000 repeticiones según el modelo planteado por Kimura 2, donde este modelo se basó en la probabilidad de modelos evolutivos.

2.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados por el índice de alfa-diversidad, que evalúa la riqueza de microorganismos y la uniformidad de la distribución de la abundancia de los mismos, a partir de curvas de rarefacción, estimadores de riqueza, índices de diversidad y equitatividad (como Índice de Shannon, Índice de Simpson e Índice de Chao1). Todos estos índices en las muestras se calcularon con QIIME2 (Versión 1.7.0) [20] y se visualizaron con el software R (Versión 2.15.3) [21]. Se emplearon diagramas de Venn para caracterizar las comunidades bacterianas compartidas entre todas las muestras el cual se realizó en el complemento Jvonn [22].

El análisis de beta-diversidad, el cual evaluó la similitud (o diferencia) en la composición de microorganismos entre las muestras a través de PCoA el cual se mostró mediante el paquete



WGCNA, entre otros. El software QIIME (versión 1.7.0) [20] calculó la diversidad beta en unifrac ponderado y no ponderado.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las comunidades endófitas juegan un importante papel en la ecología, evolución y promoción del crecimiento vegetal [23], [24], [25]. Sin embargo, la diversidad y abundancia de estas comunidades en condiciones de estrés abiótico ha sido poco estudiado en cultivos de importancia económica [7]. En el presente estudio se evidencia la diversidad de comunidades endófitas en raíces de yuca (*M. esculenta*) sometidas a estrés por déficit hídrico y su rol en la tolerancia a estrés abiótico.

Un total de ocho plantas de yuca (*M. esculenta*) variedad MCOL1734, fueron sometidas a estrés por déficit hídrico por un periodo de 20 días en condiciones de invernadero, muestras de raíz principal y raíces adventicias fueron colectadas de cada una de las plantas al inicio (T0) y final del tratamiento (T20), al igual que plantas control. La región hipervariable V3 - V4 del gen 16S ribosomal fue amplificada a través de la plataforma (NovaSP PE250 Illumina). El análisis metagenómico arrojó 354.422 lecturas con una longitud promedio de 407 pb (Tabla 1) por muestra y 55,64% de contenido de GC. El número de lecturas generadas para cada una de las muestras fue suficiente para describir la composición taxonómica de las comunidades endófitas. Las secuencias procedentes de ADN de plantas, Arqueas y Eucariotas fueron eliminadas [8], [26].

Tabla 1. Tabla de datos de procesamiento de las secuencias de las diez muestras.

Muestra	Datos crudos (#)	Tags crudos (#)	Tags limpios (#)	Tags efectivos (#)	Base (nt)	Longitud (pb)	Q20	Q30	GC%
1C6T0	70487	64954	62953	61349	25187103	411	96,74	90,94	55,04
2C7T0	81696	76157	74.33	73793	29962136	406	96,97	91,26	55,83
3T2T0	53398	49.240	47768	47599	19311758	406	96,86	91,15	55,76
4T3T0	86286	80010	78029	77658	31532041	406	96,89	91,21	55,92
5T8T0	87682	80732	79032	78818	31988615	406	96,96	91,29	55,98
6C6T20	88488	82074	79465	78508	32510096	414	96,64	90,77	54,69
7C7T20	78057	70849	68618	68040	27643709	406	97,08	91,38	55,74
8T2T20	91020	84711	82802	82217	33370622	406	96,95	91,28	55,91
9T3T20	91048	84391	82394	81803	33210144	406	96,99	91,36	55,91
10T8T20	80085	73515	71594	70939	28827994	406	96,99	91,4	55,65



En la figura 1, se muestra la curva de rarefacción donde se evidencia que las lecturas tienden a una asíntota a las 50.000 lecturas (Figura 1), lo cual indica un procesamiento adecuado de cada una de las muestras [9]. Basándose en los niveles de calidad de Phred se obtuvo un promedio de 96,9% en el nivel Q20 y un promedio de 91,2% en el nivel Q30, indicando buena calidad en el nivel de secuencia. La caracterización de las comunidades endófitas permitió identificar 72072 tags, la calidad de los tags totales en FasQC se obtuvieron 70935 tags, los cuales se emplearon para la asignación taxonómica de OTUs con el programa QIIME2 [20].

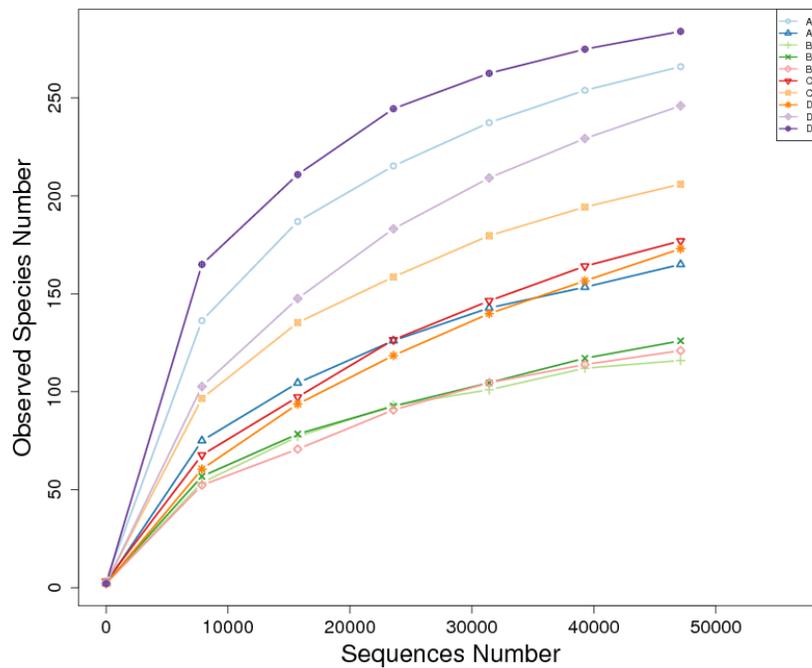


Figura 1. Curva de rarefacción de las diez muestras analizadas de las plantas control y tratamiento al inicio y al finalizar el ensayo. La curva que tiende a la asíntota indica el número de lecturas suficientes para describir las OTUs que representan la comunidad endófito bacteriana.



Composición de comunidades endófitas asociadas a la raíz de yuca (*M. esculenta*) sometidas a estrés por déficit hídrico

El análisis metagenómico permitió identificar dos grandes dominios; Bacteria y Archaea, 18 Phylum, 38 clases, 68 órdenes, 110 familias, 198 géneros y 80 especies. Para determinar la asignación taxonómica de las comunidades endófitas en raíces de yuca, se realizó una selección de secuencias con porcentajes de similitud mayor o igual a 97%. A partir de este análisis se obtuvo cuatro Phylum representativos: Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria. El análisis de abundancia relativa mostró que en las plantas control predominan los Phylum; Proteobacteria (54,74%) seguido de Firmicutes (40,39%) al inicio del ensayo (T0). Sin embargo, al final del ensayo (T20) el Phylum Firmicutes predominó (57,09%) en plantas control (Figura 2). Lo cual indica que estos grupos bacterianos son abundantes en raíces de yuca bajo condiciones de crecimiento normal.

En contraste, plantas sometidas a estrés por déficit hídrico durante un periodo de 20 días, mostraron diferencias en la abundancia relativa al inicio y final del ensayo. Al inicio del tratamiento el Phylum Proteobacteria (92,68%) fue significativamente abundante, seguido de Firmicutes (4,36%), Bacteroidetes (0,65%) y Actinobacteria (2,31%). En contraste, al final del periodo de estrés por déficit hídrico (T20) se observó variaciones en la abundancia relativa, mostrando que el Phylum Proteobacteria (86,16%) fue el más abundante, seguido de Firmicutes (7,86%), Bacteroidetes (3,46%) y Actinobacteria (2,50%). Resultados similares se han observado en análisis metagenómicos realizados en *Solanum lycopersicum*, *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*, donde estas comunidades predominan en raíz y suelo [8], [27], [28]. La identificación de las comunidades endófitas microbianas que habitan en la raíz de la yuca (*M. esculenta*) concuerda con estudios de metagenómica de raíz, quienes mostraron que el Phylum con mayor prevalencia es el de Proteobacteria [29], estos resultados sugieren la posible relación e influencia de las comunidades endófitas bacterianas en la respuesta a estrés por déficit hídrico. Otras investigaciones demuestran que la tolerancia a ciertas condiciones de estrés abiótico no sólo está asociada con el genotipo de la planta, sino también a una resistencia conferida por la estructura de una comunidad endofítica bacteriana [30], [31]. En este sentido la variedad de yuca MCOL1734 es un excelente candidato para realizar estudios de inoculación con diferentes consorcios endófitos para conferir tolerancia a sequía.

Estos resultados concuerdan con estudios metagenómicos realizados por Sengupta y colaboradores [32] donde han estudiado comunidades endófitas asociadas a raíz de arroz (*Oryza sativa L*) en condiciones normales y han observado alrededor de 843 OTU, pertenecientes a cuatro Phylum Proteobacteria, Firmicutes, Cyanobacteria y Actinobacteria. Este estudio reveló que el género *Bacillus* es uno de los principales grupos de bacterias endófitas en el cultivo de arroz (*O. sativa*), desempeñando un importante rol en la fijación de nitrógeno en este cultivo [32]. Asimismo, otros trabajos metagenómicos han identificado grupos bacterianos que contribuyen al metabolismo de plantas como; Firmicutes, Proteobacterias, Actinobacteria y Bacteroidetes, los cuales han sido catalogados como PGPR [16]. Indicando que estos Phylum contribuyen al metabolismo de la planta.

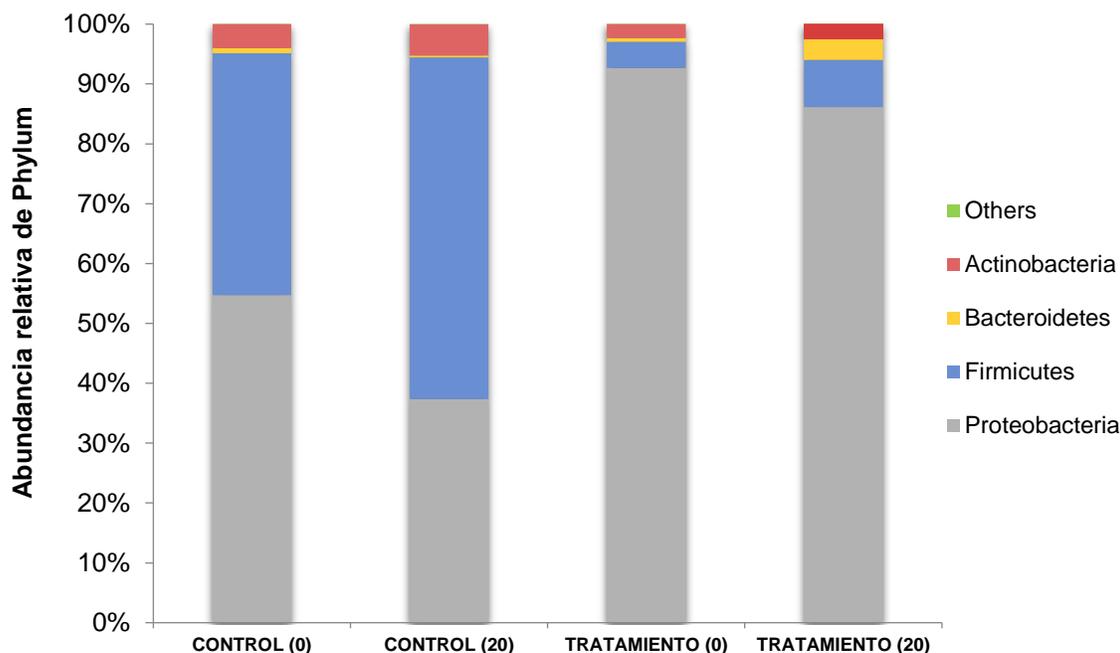


Figura 2. Abundancia relativa de Phylum bacterianos aislados de raíz de yuca (*M. esculenta*) de plantas control y expuestas al tratamiento al inicio T0 y final T20 del ensayo.

En la tabla 2 se observa la asignación taxonómica correspondiente a género. Del Phylum Actinobacteria el género *Streptomyces* es el más abundante, teniendo un incremento en plantas control y sometidas a estrés por déficit hídrico al final del ensayo (T20). El género *Streptomyces* ha sido considerado como PGPR por su capacidad de inducir ácido indolacético (IAA), proteasas extracelulares, antibióticos, sideróforos y solubilizan fosfato [33]. Otros estudios en cultivos de interés económico como; arroz, tomate y trigo han mostrado que este género aumenta el crecimiento y desarrollo de la planta bajo diferentes tipos de estrés abiótico como; sequía y salinidad [34]. Lo cual indica que especies de este género cumplen un papel benéfico en el desarrollo vegetal frente a condiciones ambientales adversas.

Por otra parte, del Phylum Bacteroidetes el género más representativo es *Bacteroides*, estudios realizados en arroz (*O. sativa*) han mostrado que este es exclusivo de comunidades endófitas en raíz de plantas [9]. Asimismo, este género puede desempeñar un papel importante en la degradación de diferentes tartratos, el cual es un oligoelemento característico del suelo en la descomposición de materia orgánica [35].

Del Phylum Firmicutes se destaca el género *Bacillus*, este ha sido estudiado debido a que presenta una capacidad de sintetizar antibióticos y la resistencia sistémica inducida en el huésped, por lo que le confiere propiedades relacionadas con el control de enfermedades, además de su capacidad de ser PGPR [33]. *Bacillus* ha sido catalogado como un género endófito, por su capacidad de ser fijador de nitrógeno [36]. Al igual que se le ha atribuido actividades antimicrobianas [37].



Finalmente, dentro del Phylum Proteobacteria el cual, fue el Phylum más abundante, predominaron los géneros: *Acinetobacter*, *Devosia*, *Ensifer*, *Novosphingobium*, *Pseudomonas*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, los cuales se encuentran comúnmente en suelo [16], [9]. Trabajos recientes han mostrado que estos géneros presentan un gran potencial como inoculantes bacterianos para el control de estrés por déficit hídrico en plantas, esto debido a un aumento en la producción de fitohormonas como el ácido abscísico, giberélico, indol-3-acético (IAA), citocininas, enzimas como la Acetil-CoA carboxilasa (ACC), producción de exopolisacáridos bacterianos que promueven los niveles de expresión de genes asociados a las rutas de señalización de respuesta a estrés por déficit hídrico en plantas [38], [39]. Estos resultados sugieren que estos géneros bacterianos pueden ser candidatos para contribuir la tolerancia a estrés abiótico en cultivos de importancia económica.

Tabla 2. Abundancia relativa en porcentajes de los géneros aislados de raíz de yuca (*M. esculenta*) de plantas control y sometidas a estrés por déficit hídrico al inicio del tratamiento (T0) y final del tratamiento (T20).

Actinobacteria				
Género	CTRL* (T0)	CTRL (T20)	TMNTO* (T0)	TMNTO (T20)
<i>Rhodococcus</i>	56,7%	7,8%	52,8%	39,0%
<i>Streptomyces</i>	42,2%	90,6%	41,6%	57,0%
Otros	1,0%	1,6%	5,6%	4,0%
Bacteroidetes				
Género	CTRL (T0)	CTRL (T20)	TMNTO (T0)	TMNTO (T20)
<i>Bacteroides</i>	97,8%	100,0%	98,9%	47,3%
Otros	2,2%	0,0%	1,1%	52,7%
Firmicutes				
Género	CTRL (T0)	CTRL (T20)	TMNTO (T0)	TMNTO (T20)
<i>Bacillus</i>	94,3%	94,6%	41,5%	26,6%
<i>Lactobacillus</i>	4,6%	5,2%	45,3%	7,0%
<i>Ruminococcaceae</i>	1,0%	0,2%	11,6%	65,5%
Otros	0,09%	0,08%	1,61%	0,86%
Proteobacteria				
Género	CTRL (T0)	CTRL (T20)	TMNTO (T0)	TMNTO (T20)
<i>Acinetobacter</i>	0,8%	0,8%	1,4%	3,8%
<i>Devosia</i>	3,6%	3,3%	1,4%	1,5%
<i>Ensifer</i>	8,7%	13,0%	17,8%	40,2%
<i>Novosphingobium</i>	0,8%	3,6%	29,1%	6,4%
<i>Pseudomonas</i>	2,3%	8,4%	2,8%	4,6%
<i>Sphingobium</i>	73,6%	62,3%	21,3%	29,2%
<i>Sphingomonas</i>	0,5%	1,3%	7,1%	1,5%
Otros	9,8%	7,4%	19,1%	12,8%

*(CTRL) Plantas control y (TMNTO) Plantas sometidas a estrés por déficit hídrico por 20 días.



Estimación de alfa diversidad.

La alfa diversidad de las comunidades endófitas presentes en la raíz de la yuca (*M. esculenta*) se calculó utilizando los índices de Shannon, Simpson y Chao1. El índice de diversidad de Chao1 para las plantas sometidas al ensayo fue de 161,529 en T0 y de 317,963 en T20; lo anterior indica que las plantas sometidas al ensayo de estrés por déficit hídrico tienen mayor riqueza de especies en T20, en comparación con las especies presentes al inicio del ensayo T0. Por otro lado, en las plantas control se obtuvo un valor para el índice de Chao1 de 267,560 en T0 y de 259,758 en T20, lo cual sugiere que la riqueza de especies en las plantas control en ambos tiempos es similar.

El índice de Shannon para las plantas sometidas a estrés al inicio del ensayo T0 fue de 1,029 y al final T20 fue de 1,358. Se puede concluir que al inicio del ensayo se presentó menos diversidad bacteriana y uniformidad en comparación con las plantas sometidas a estrés al final del ensayo T20. En contraste, los valores del índice de Shannon para las plantas control fue 1,702 en T0 y de 1,437 en T20, sin embargo, dado que el índice de Shannon no supera el valor de 2, se deduce que las muestras presentan una diversidad relativamente baja [9]. El índice de diversidad de Simpson de las comunidades endófitas para las plantas sometidas a estrés al inicio del ensayo T0 fue 0,371 y 0,422 al final T20, estos valores indican la riqueza y la probabilidad de dominancia de una especie dentro de la muestra, por otro lado, el índice de diversidad de Simpson para las plantas control fue de 0,495 en T0 y de 0,422 en T20, los valores del índice de Simpson resultantes son estables, lo que demuestra abundancia bacteriana [40].

El análisis de OTUs se realizó a partir de la selección de 37 especies con un porcentaje de similitud <97% presentes durante todo el ensayo (Figura 3). De las 37 especies evaluadas, 16 estuvieron presentes tanto en el grupo de plantas control como en aquel sometidas al estrés por déficit hídrico al inicio y final del ensayo. Las especies dentro de este grupo fueron identificadas como bacterias promotoras de crecimiento vegetal PGPR como; *P.alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. monteilii* y *P. mexicana*, se ha demostrado que miembros pertenecientes a este género son solubilizadoras de fosfato [41] y presentan gran capacidad de síntesis de fitohormonas como; ácido indolacético (IAA), ácido abscísico (ABA) y giberelinas, acelerando la disponibilidad y la asimilación de nutrientes del suelo mediante diferentes mecanismos como la fijación del nitrógeno atmosférico, la solubilización del fósforo y la síntesis de sideróforos [42], [43]. Por otra parte, *Streptomyces mutabilis* fue encontrada tanto en el grupo de plantas control como en las sometidas al estrés por déficit hídrico al inicio y final del ensayo, *Streptomyces mutabilis* favorece la fertilidad del suelo ya que produce sideróforos y solubiliza fosfato, produce enzimas, que incluyen amilasa, quitinasa, celulasa, invertasa, lipasa, queratinasa, peroxidasa, pectinasa, proteasa, fitasa y xilanasas, que convierte los nutrientes complejos en formas minerales simples, esta capacidad de ciclo de nutrientes los convierte en candidatos ideales para fertilizantes naturales [44].

Por otra parte, *Clostridium* sp., *Acinetobacter lwoffii* y *Acinetobacter* sp, se encontraron exclusivamente en plantas sometidas a estrés por déficit hídrico, estas especies bacterianas son catalogadas como PGPR, puesto que son productoras de hormonas vegetales como; IAA el cual estimula el crecimiento de las plantas, el alargamiento y desarrollo de las raíces lo que ayuda a la absorción de nutrientes esenciales y agua [45]. Asimismo, *Acinetobacter* son solubilizadores de fosfato, le proporcionan fosfatos solubles a partir de fósforos insolubles y son productoras de sideróforos [43]. Estos resultados sugieren que estas especies pueden ser candidatos para implementarse como inóculos en programas de mejora para mitigar la tolerancia a estrés abiótico en plantas.

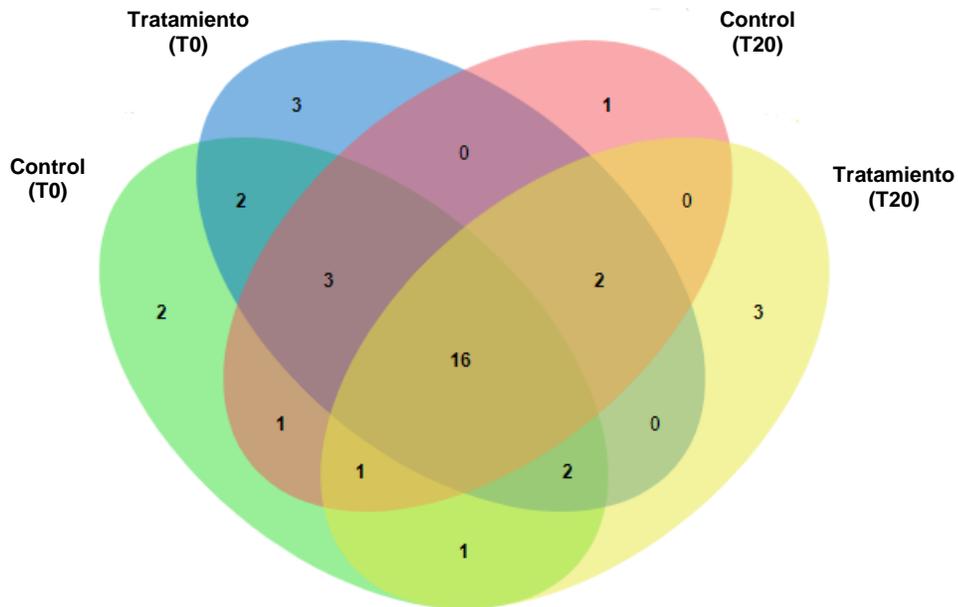


Figura 3. Diagrama de Venn de especies bacterianas endófitas analizadas en la raíz de yuca (*M. esculenta*) al inicio T0 y al final T20 del ensayo. Los valores se representan en abundancia relativa como número absoluto de aislamientos.



Tabla 3. Principales especies bacterianas endófitas encontradas en la raíz de la yuca (*M. esculenta*)

PHYLUM	FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE	ASIGNACIÓN (%)
Actinobacteria	Actinomycetaceae	<i>Actinomyces</i>	<i>A. odontolyticus</i>	100
Actinobacteria	Nocardiaceae	<i>Nocardia</i>	<i>N. veterana</i>	99
Actinobacteria	Nocardioideaceae	<i>Nocardioides</i>	<i>N. simplex</i>	100
Actinobacteria	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i>	<i>R. erythropolis</i>	100
Actinobacteria	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>	<i>S. mutabilis</i>	100
Bacteroidetes	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>	<i>B. barnesiae</i>	100
Bacteroidetes	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>	<i>B. dorei</i>	100
Bacteroidetes	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>	<i>B. salanitronis</i>	100
Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	<i>Chryseobacterium</i>	<i>C. indologenes</i>	97
Bacteroidetes	Cytophagaceae	<i>Siphonobacter</i>	<i>S. aquaeclarae</i>	100
Firmicutes	Lachnospiraceae	<i>Anaerostipes</i>	<i>A. hadrus</i>	100
Firmicutes	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>B. anthracis</i>	97
Firmicutes	Lachnospiraceae	<i>Blautia</i>	<i>B. producta</i>	97
Firmicutes	Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Clostridium</i> sp.	97
Firmicutes	Bacillaceae	<i>Geobacillus</i>	<i>G. toebii</i>	100
Firmicutes	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. agilis</i>	100
Firmicutes	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. aviarius</i>	100
Firmicutes	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. iners</i>	100
Firmicutes	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. salivarius</i>	100
Proteobacteria	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. lwoffii</i>	100
Proteobacteria	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. schindleri</i>	98
Proteobacteria	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	100
Proteobacteria	Xanthomonadaceae	<i>Arenimonas</i>	<i>A. donghaensis</i>	100
Proteobacteria	Bradyrhizobiaceae	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. elkanii</i>	99
Proteobacteria	Caulobacteraceae	<i>Brevundimonas</i>	<i>B. diminuta</i>	100
Proteobacteria	Neisseriaceae	<i>Deefgea</i>	<i>D. chitinilytica</i>	99
Proteobacteria	Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i>	<i>D. cuneatus</i>	100
Proteobacteria	Hyphomicrobiaceae	<i>Devosia</i>	<i>D. riboflavina</i>	97
Proteobacteria	Rhizobiaceae	<i>Ensifer</i>	<i>E. adhaerens</i>	97
Proteobacteria	Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium</i>	<i>M. adhaesivum</i>	100
Proteobacteria	Sphingomonadaceae	<i>Novosphingobium</i>	<i>N. aromaticivorans</i>	97
Proteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. montellii</i>	97
Proteobacteria	Xanthomonadaceae	<i>Pseudoxanthomonas</i>	<i>P. mexicana</i>	100
Proteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. alcaligenes</i>	97
Proteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. pseudoalcaligenes</i>	97
Proteobacteria	Sphingomonadaceae	<i>Sphingobium</i>	<i>S. chungbukense</i>	98
Proteobacteria	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	<i>S. melonis</i>	100



Análisis filogenético de bacterias endófitas en yuca (*M. esculenta*)

El Análisis filogenético se realizó con las 37 especies con un valor de > 97% presentes en todo el ensayo, el análisis mostro cuatro grandes clados; Proteobacterias, Firmicutes, Actinobacteria y Bacteroides.

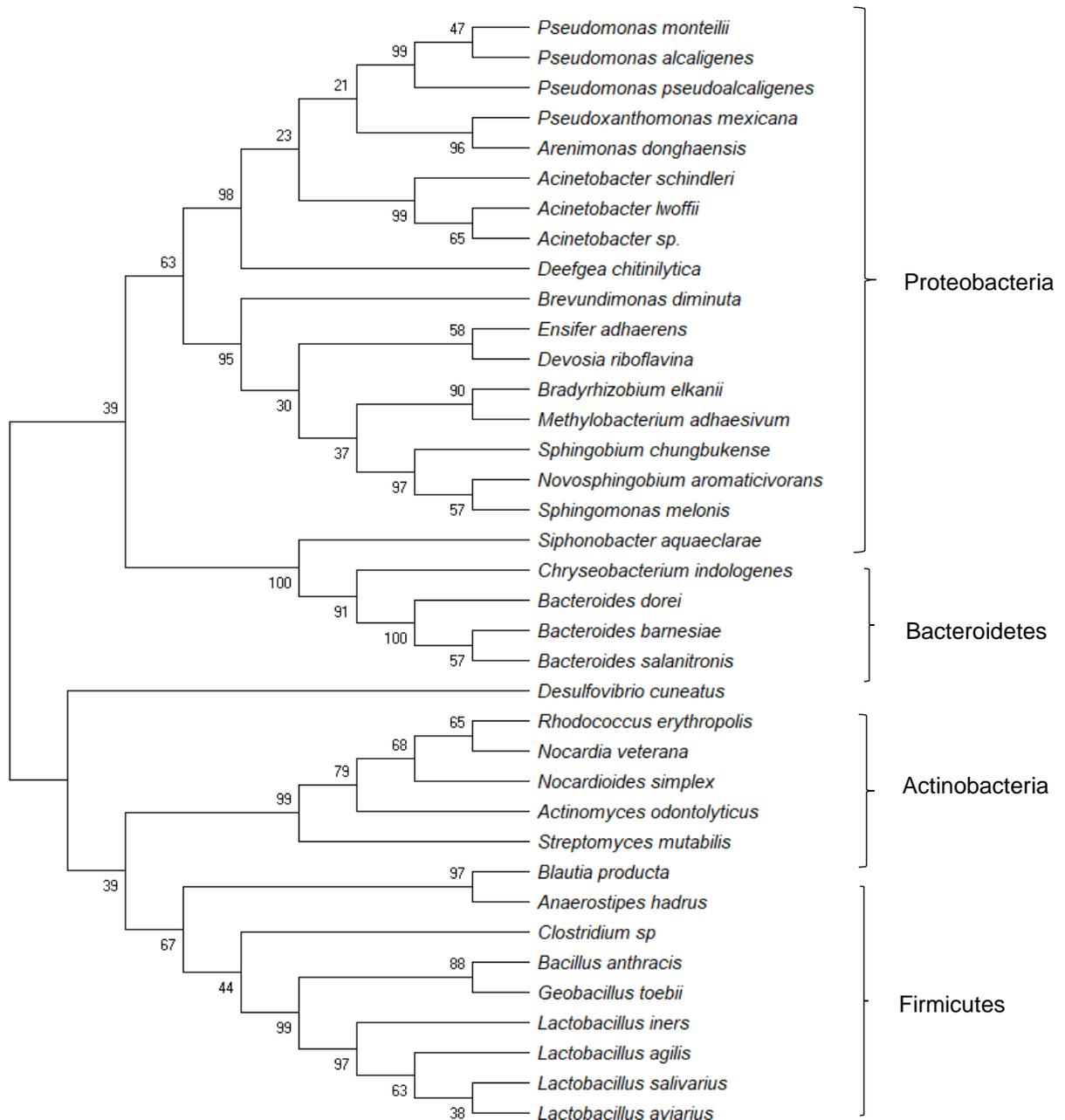


Figura 4. Árbol filogenético de bacterias endófitas asociadas a la raíz de yuca (*M. esculenta*). Según el método Kimura 2. El árbol fue realizado en el programa MEGA X [19].



El análisis filogenético de las 37 especies identificadas fue agrupado principalmente en 4 clados, dentro de los cuales fueron, Proteobacterias, Firmicutes, Actinobacteria y Bacteroidetes. El clado de Proteobacterias es el grupo que incluye el mayor número de bacterias PGPR (48,64%) y están directamente asociadas a la tolerancia a estrés por déficit hídrico [38], dentro de las principales bacterias encontradas asociadas al Phylum Proteobacteria se destacan; *E. adhaerens*, *D. riboflavina*, *S. chungbukense*, *N. aromaticivorans*, *S. melonis*, *Acinetobacter* sp. estas se encuentran normalmente en el suelo y están relacionadas con un gran potencial para el control de estrés por déficit hídrico ya que, en condiciones de estrés aumentan la producción de fitohormonas, enzimas y exopolisacáridos las cuales están asociadas a las rutas de señalización de respuesta a estrés por déficit hídrico [38], [39]. En el árbol filogenético (Figura 4), *Desulfovibrio cuneatus* se encuentra en un clado diferente a la agrupación de Proteobacterias y es la única Deltaproteobacteria, esta clase es la más homogénea dentro del grupo de las Proteobacterias, lo que sugiere su posición en el árbol filogenético [46].

En el segundo clado se encontraron bacterias pertenecientes al Phylum Bacteroidetes, estos están asociados principalmente con la degradación de materia orgánica y compuestos que puedan ser asimilados por las plantas [35], dentro de las especies encontradas se destacaron *B. Dorei*, *B. barnesiae*, *B. Salanitronis*, una de las características de estas es endófitos en plantas y son microorganismos que se encuentran mayormente en periodos donde la planta tiene mayor disponibilidad de nutrientes [47].

El tercer clado pertenece al Phylum Actinobacteria, este Phylum es importante ya que tiene la capacidad de solubilizar fosfatos, lo cual es un gran beneficio para el metabolismo de la planta, en este Phylum se destaca el género *Streptomyces* ya que son consideradas como PGPR, por su capacidad de producir IAA que es la principal auxina de las plantas y esta está involucrada en el crecimiento y desarrollo de las plantas [48], dentro de las especies encontradas se destaca *S. Mutabilis* esta especie estimula el crecimiento de la planta, realiza producción de indol-3-acético (IAA) y fijación de nitrógeno [49].

El cuarto clado pertenece al Phylum Firmicutes, el cual se destaca por ser tener especies que son catalogadas como endófitas en plantas y tienen la capacidad de sintetizar algunos antibióticos, otra característica de este grupo es son fijadoras de nitrógeno, lo cual es un elemento esencial para el desarrollo de la planta [10]. Investigaciones demuestran que géneros de este Phylum como lo es *Bacillus* están relacionados con la producción de fitohormonas lo que es importante en la ingeniería metabólica de las plantas para inducir a la tolerancia del huésped al estrés abiótico [50], dentro de este Phylum se destaca la especie *B. Anthracis*, esta hace parte de la rizosfera de las plantas y está asociada las PGPR ayudándole a la planta al biocontrol y crecimiento [51].



Estimación de beta diversidad.

Las diferencias entre las comunidades endófitas de la raíz de la yuca se observan con un análisis de componentes principales (PCoA), el cual se realizó con los datos de la abundancia relativa de las OTU obtenidas, basado en la comparación de la distancia filogenética ponderada de Unifrac que se le asigna a cada muestra (Figura 5). La gráfica de PCoA define cuatro agrupaciones de las comunidades endófitas bacterianas procedentes de plantas control al inicio T0 y final del ensayo T20 y tratamiento (T0, T20), lo que indica diferencias en la composición de las comunidades endófitas bacterianas. La diferencia entre los grupos de la gráfica se relaciona principalmente con la diferencia observada entre los principales Phylum [52]. Los controles T0, tratamiento T0 y control T20 se encuentran a menor distancia lo que indica una mayor similitud en la composición endófitas bacteriana, a diferencia del tratamiento T20, el cual se encuentra a mayor distancia de los otros tratamientos.

La gráfica presenta la densidad poblacional, la cantidad de microorganismos que se encuentran en controles y tratamientos, según la PCoA (Figura 5), se puede observar que la mayor densidad poblacional de microorganismos fue obtenida durante el final del tratamiento (T20), ya que está en contra posición del tratamiento T0, en la gráfica D3 y D2 (tratamiento T20) presentan valores más elevados que los de B1 y B2 (tratamiento T0), además el control de T20 también muestra mayor densidad poblacional del control T0, indicando de esta manera que a mayor tiempo de estrés hídrico hay mayor presencia de Phylum asociados a resistencia por déficit hídrico y PGPR.

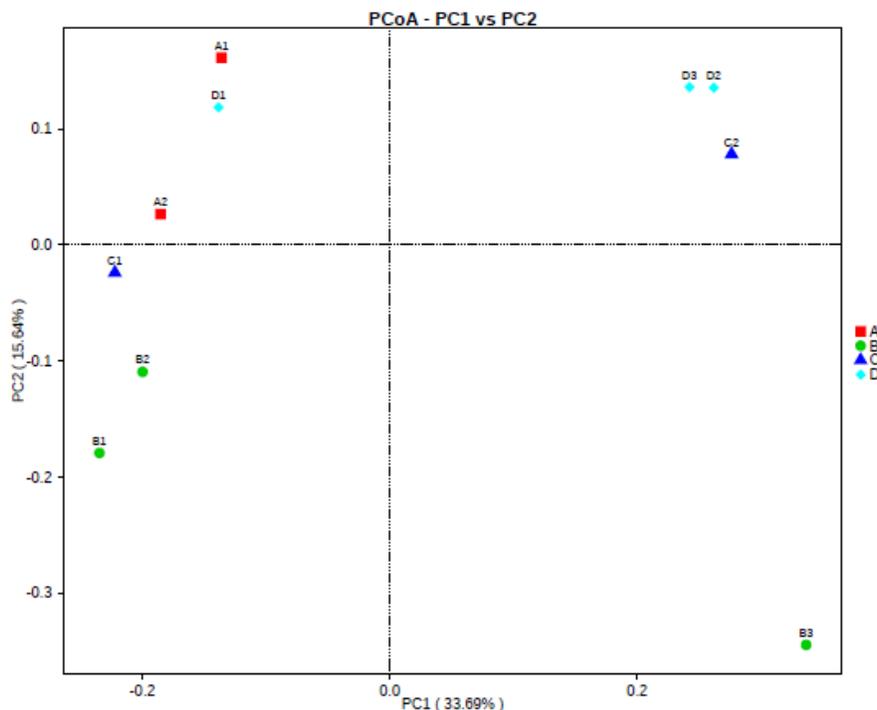


Figura 5. Coordenadas del análisis de PCoA realizada con los datos de la abundancia relativa de los OTUs obtenidas de las muestras: **A)** control T0, **B)** tratamiento T0, **C)** control T20 y **D)** tratamiento T20.



4. CONCLUSIONES

El presente estudio buscaba identificar las comunidades endófitas de raíz de yuca (*M. esculenta*), bajo condiciones de estrés por déficit hídrico que puedan emplearse como estrategia biotecnológica en la tolerancia a estrés abiótico en cultivos de interés económico como la yuca.

- Los cuatro Phylum con mayor prevalencia bajo condiciones de estrés por déficit hídrico fueron; Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, y Actinobacteria, los cuales fueron importantes debido a que estos pertenecen al grupo de PGPR y son catalogados como endófitos en raíz de plantas.
- Los géneros *Bacillus*, *Bacteroides*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* catalogados como PGPR, presentaron mayor abundancia tras someter a las plantas al estrés abiótico.
- El análisis metagenómico mostro que especies como; *Clostridium* sp. *Acinetobacter lwoffii* y *Acinetobacter* sp, son bacterias PGPR, que pueden contribuir a la tolerancia a estrés por déficit hídrico en el cultivo de la yuca (*M. esculenta*).

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Santiago de Cali por la financiación de este proyecto y al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) por proporcionar el material vegetal.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] K. K. Meena *et al.*, "Abiotic Stress Responses and Microbe-Mediated Mitigation in Plants: The Omics Strategies," *Front. Plant Sci.*, vol. 8, Feb. 2017.
- [2] J. Padgham, "Agricultural Development Under a Changing Climate: Opportunities and Challenges for Adaptation.," no. 1, 2009.
- [3] D. Naylor and D. Coleman-Derr, "Drought Stress and Root-Associated Bacterial Communities," *Front. Plant Sci.*, vol. 8, no. January, pp. 1–16, 2018.
- [4] X. Niu, L. Song, Y. Xiao, and W. Ge, "Drought-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria associated with foxtail millet in a semi-arid and their potential in alleviating drought stress," *Front. Microbiol.*, vol. 8, no. January, pp. 1–11, 2018.
- [5] W. Antonio and A. Acevedo, "Respuestas fisiológicas, bioquímicas y rendimiento en tres variedades de papa criolla (*Solanum tuberosum* grupo Phureja) en déficit hídrico," 2017.
- [6] J. Perez C, Alexander; Rojas S, Johanna; Fuentes C, "Endophytes Diversity of Bacteria Associated with Roots of Colosua (*Bothriochloa pertusa*) Pasture in Three Locations of Sucre Depart," *Acta Biológica Colomb.*, vol. 15, pp. 219–228, 2010.
- [7] Q. Zhang *et al.*, "Endophytic Bacterial Communities Associated with Roots and Leaves of Plants Growing in Chilean Extreme Environments," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–12, 2019.
- [8] D. Bulgarelli *et al.*, "Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota," *Nature*. pp. 91–95, 2012.
- [9] P. Kunda, P. K. Dhal, and A. Mukherjee, "Endophytic bacterial community of rice (*Oryza sativa* L.) from coastal saline zone of West Bengal: 16S rRNA gene based metagenomics approach," *Meta Gene*, vol. 18, no. March, pp. 79–86, 2018.



- [10] D. P. Singh, H. B. Singh, and R. Prabha, "Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity: Vol. 1: Research perspectives," *Microb. Inoculants Sustain. Agric. Product. Vol. 1 Res. Perspect.*, no. February, pp. 1–343, 2016.
- [11] R. P. Singh, V. Kothari, P. G. Koringa, and S. P. Singh, "Understanding host-microbiome interactions - an omics approach: Omics of host-microbiome association," *Underst. Host-Microbiome Interact. - An Omi. Approach Omi. Host-Microbiome Assoc.*, no. November, pp. 1–368, 2017.
- [12] FAO, "La yuca tiene gran potencial como cultivo del siglo XXI," *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*, 2013. [Online]. Available: <http://www.fao.org/news/story/es/item/176821/icode/>.
- [13] M. S. Villa and J. A. Arguello, "El Cultivo de la Yuca," *InfoAgro*, 2012.
- [14] M. A. El-Sharkawy, "Stress-Tolerant Cassava: The Role of Integrative Ecophysiology-Breeding Research in Crop Improvement," *Open J. Soil Sci.*, vol. 02, no. 02, pp. 162–186, 2012.
- [15] J. W. Kloepper and C. Ryu, "Bacterial Endophytes as Elicitors of Induced Systemic Resistance," *Microb. Root Endophytes*, vol. 9, p. 367, 2006.
- [16] B. Y. Tian, Y. Cao, and K. Q. Zhang, "Metagenomic insights into communities, functions of endophytes, and their associates with infection by root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, in tomato roots," *Sci. Rep.*, vol. 5, no. November, pp. 1–15, 2015.
- [17] J. J. Doyle and J. L. Doyle, "A rapid total DNA preparation procedure for small quantities of fresh leaf tissue," *Focus Phytochem. Bull.*, vol. 8, pp. 11–19, 1990.
- [18] F. Sievers and D. G. Higgins, "Clustal Omega," *Curr. Protoc. Bioinforma.*, 2014.
- [19] M. X. M. E. G. A. across computing platforms. M. B. and E. 35:1547-1549. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K, "Caption." Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K, MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549, 2018.
- [20] J. G. Caporaso *et al.*, "QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data," *Nature Methods*. 2010.
- [21] Rs. Team, "RStudio: Integrated Development for R studio Inc," *R For Beginners*. 2005.
- [22] P. Bardou, J. Mariette, F. Escudié, C. Djemiel, and C. Klopp, "Jvenn: An interactive Venn diagram viewer," *BMC Bioinformatics*, 2014.
- [23] P. Vandenkoornhuyse, A. Quaiser, M. Duhamel, A. Le Van, and A. Dufresne, "The importance of the microbiome of the plant holobiont," *New Phytol.*, vol. 206, no. 4, pp. 1196–1206, 2015.
- [24] P. R. Hardoim *et al.*, "The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 79, no. 3, pp. 293–320, 2015.
- [25] G. Santoyo, G. Moreno-Hagelsieb, M. del Carmen Orozco-Mosqueda, and B. R. Glick, "Plant growth-promoting bacterial endophytes," *Microbiol. Res.*, vol. 183, pp. 92–99, 2016.
- [26] S. Ikeda *et al.*, "Community- and genome-based views of plant-associated bacteria: Plant-bacterial interactions in soybean and rice," *Plant Cell Physiol.*, 2010.
- [27] A. Sessitsch *et al.*, "Functional Characteristics of an Endophyte Community Colonizing Rice Roots as Revealed by Metagenomic Analysis," *Mol. Plant-Microbe Interact.*, vol. 25, no. 1, pp. 28–36, 2012.
- [28] F. I. de Santi Ferrara, Z. M. Oliveira, H. H. S. Gonzales, E. I. S. Floh, and H. R. Barbosa, "Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances," *Plant Soil*, 2012.
- [29] P. S. Sarr, A. Sugiyama, A. D. B. Begoude, K. Yazaki, S. Araki, and E. Nawata, "Molecular assessment of the bacterial community associated with Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivation in Cameroon," *Microbiol. Res.*, vol. 197, pp. 22–28, 2017.
- [30] A. Sánchez-Bautista *et al.*, "Bacterias endófitas de la raíz en líneas de maíces tolerantes y susceptibles a sequía," *Rev. Mex. Fitopatol. Mex. J. Phytopathol.*, vol. 36, no. 1, 2018.



- [31] J. D. Cordero-Ramírez *et al.*, “Microorganismos asociados a la rizosfera de jitomate en un agroecosistema del valle de Guasave, Sinaloa, México,” *Rev. Mex. Biodivers.*, vol. 83, no. 3, pp. 712–730, 2012.
- [32] S. Sengupta, S. Ganguli, and P. K. Singh, “Metagenome analysis of the root endophytic microbial community of Indian rice (*O. sativa* L.),” *Genomics Data*, vol. 12, pp. 41–43, 2017.
- [33] M. P. Dias, M. S. Bastos, V. B. Xavier, E. Cassel, L. V. Astarita, and E. R. Santarém, “Plant growth and resistance promoted by *Streptomyces* spp. in tomato,” *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 118, pp. 479–493, 2017.
- [34] B. Asghari, R. Khademian, and B. Sedaghati, “Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) confer drought resistance and stimulate biosynthesis of secondary metabolites in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) under water shortage condition,” *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 263, no. December 2019, p. 109132, 2020.
- [35] Y. H. Li, Q. F. Liu, Y. Liu, J. N. Zhu, and Q. Zhang, “Endophytic bacterial diversity in roots of *Typha angustifolia* L. in the constructed Beijing Cuihu Wetland (China),” *Res. Microbiol.*, vol. 162, no. 2, pp. 124–131, 2011.
- [36] B. Tian *et al.*, “Beneficial traits of bacterial endophytes belonging to the core communities of the tomato root microbiome,” *Agric. Ecosyst. Environ.*, vol. 247, no. 2, pp. 149–156, 2017.
- [37] A. Hashem, B. Tabassum, and E. Fathi Abd Allah, “*Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress,” *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 26, no. 6, pp. 1291–1297, 2019.
- [38] A. Sánchez-Bautista *et al.*, “Bacterias endófitas de la raíz en líneas de maíces tolerantes y susceptibles a sequía,” *Rev. Mex. Fitopatol. Mex. J. Phytopathol.*, vol. 36, no. 1, pp. 35–55, 2018.
- [39] J. I. Vilchez, C. García-Fontana, D. Román-Naranjo, J. González-López, and M. Manzanera, “Plant drought tolerance enhancement by trehalose production of desiccation-tolerant microorganisms,” *Front. Microbiol.*, vol. 7, no. September, pp. 1–11, 2016.
- [40] M. Adewale, J. Kheng, S. Ping, A. Su, and Y. Ting, “Genomics Data Metagenomics study of endophytic bacteria in Aloe vera using next-generation technology,” *GDATA*, vol. 6, pp. 159–163, 2015.
- [41] U. De Sevilla and D. Benjumbeda Muñoz, “Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones,” vol. 1, pp. 10–19, 2017.
- [42] P. Vega-Celedón, H. Canchignia Martínez, M. González, and M. Seeger, “Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias,” *Cultiv. Trop.*, 2016.
- [43] P. Kumari, M. Meena, and R. S. Upadhyay, “Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Characterization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) isolated from the rhizosphere of *Vigna radiata* (Mung bean),” *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 16, no. June, pp. 155–162, 2018.
- [44] S. S. K. P. Vurukonda, D. Giovanardi, and E. Stefani, “Plant growth promoting and biocontrol activity of *streptomyces* spp. As endophytes,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 4, 2018.
- [45] B. Mohite, “Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth,” vol. 13, no. 3, pp. 638–649, 2013.
- [46] W. Ludwig and H.-P. Klenk, “Overview: A Phylogenetic Backbone and Taxonomic Framework for Prokaryotic Systematics,” in *Bergey’s Manual® of Systematic Bacteriology*, 2001.
- [47] I. H. Forte, M. C. N. García, and B. M. Mena, “Caracterización de rizobia isolates from soybean nodules *Glycine max* (L .) Merrill with potenciality to promote the plant growth,” *Cultiv. Trop.*, vol. 36, no. 1, pp. 65–72, 2015.
- [48] P. Vega, H. Canchignia, M. González, and M. Seeger, “Review Biosynthesis of indole-3-acetic acid and plant growth promoting by bacteria,” *Cultiv. Trop.*, vol. 37, no. especial, pp. 33–39, 2016.
- [49] A. R. El-Shanshoury, “Interactions of *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense* and *Streptomyces mutabilis*, in Relation to their Effect on Wheat Development,” *J. Agron. Crop*



La Santiago
transforma
tu mundo



- Sci.*, vol. 175, no. 2, pp. 119–127, Sep. 1995.
- [50] A. Ricroch *et al.*, “Desafíos de la agricultura europea y posibles soluciones biotecnológicas. Challenges facing European agriculture and possible biotechnological solutions,” *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2015.
- [51] C. Keswani *et al.*, “Re-addressing the biosafety issues of plant growth promoting rhizobacteria,” *Science of the Total Environment*. 2019.
- [52] D. M. Ceccon, H. Faoro, P. da C. Lana, E. M. de Souza, and F. de O. Pedrosa, “Metataxonomic and metagenomic analysis of mangrove microbiomes reveals community patterns driven by salinity and pH gradients in Paranaguá Bay, Brazil,” *Sci. Total Environ.*, vol. 694, p. 133609, 2019.