

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA**



“Selección de líneas clonales micropropagadas y uso de bacterias endófitas y lantánidos como activadores del microbioma endófito: estrategias futuras de conservación y restauración del *Agave marmorata* Roezl (Tepextate)”

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

América Martínez Rodríguez

DIRECTOR:

Dr. Miguel Juan Beltrán García

CODIRECTOR:

Dr. Benjamín Valdez Salas

Mexicali, Baja California

Enero, 2025

**AGRADEZCO A CONACYT POR EL FINANCIAMIENTO
OTORGADO PARA REALIZAR ESTA TESIS, MEDIANTE EL
APOYO DE LOS SIGUIENTES PROYECTOS:**

Fortalecimiento y ampliación de las capacidades analíticas de quipo de espectrometría de masas **MALDI-TOF a MALDI-IMAGING** para su uso en grupos de investigación de las áreas agro- biotecnológicas, microbiológicas y de biotecnología farmacéutica. Apoyo al fortalecimiento y desarrollo de la infraestructura científica y tecnológica. **CONVOCATORIA 2016-269607.**

Tierras raras + bacterias endófitas: Innovación sostenible y mitigación del impacto ambiental en la fertilización, estimulación y protección de cultivos de Jalisco. Convocatoria del fondo de Desarrollo Científico de Jalisco para Atender Retos Sociales “**FODECIJAL**” – **COECyTJAL 10602-2023.**

Por la beca otorgada para el programa de posgrado **Doctorado en Ciencias**, del Instituto de Ingeniería, en la Universidad Autónoma de Baja California, Campus Mexicali. Durante el periodo de 2020- 2024, CVU: **720754**

La inspiración para luchar por lo que amamos, lo encontramos de personas que luchan a nuestro costado, y el amor por lo que lo hacemos, lo tomamos de aquello que buscamos proteger para restaurar y conservar.

M. R. América, 2019.

El maguey era, para los mexicanos, alimento, bebida, vestido y material para escribir. Seguramente la naturaleza jamás ha reunido en una planta tantos elementos con que satisfacer lo que exige la necesidad, la comunidad y la civilización.

W.H. Prescott, 1843.

AGRADECIMIENTOS

HISTORIA...

Ahora se culmina un gran sueño, que se (comenzo/inicio) formo desde hace 15 años, que llegaba a este punto de obtener el grado de Doctor en Ciencias. Este es el principal objetivo desde que estaba pequeña, uno de los mayores sueños que me propuse a cumplir en mi vida. Y aunque en la vida se llegan a tener muchos obstáculos, también se abren puertas, aparecen escalones para seguir caminando hacia el. Es por eso que estas palabras de agradecimiento son tan largas como el mismo camino que tuve que cruzar y son para todas las personas que estuvieron involucradas en el.

Primeramente agradecer a mi Papá, la persona que siempre estuvo conmigo, llevandome a continuar de forma infinita, una persona que me inspira a seguir adelante en cada sueño formado y me apoya en cada proceso. Me enseñó a no rendirme nunca, continuar aun con las adversidades, hacer lo que mas amas y te apasiona; me brindo su apoyo al decidir estudiar biología, seguir con los posgrados y hoy en día a desempeñarme en la vida. Papá, hemos platicado infinidades de veces con nuestras charlas de adulto, me acompañaste en desvelos y en los triunfos. No hay palabras que expresen todo el agradecimiento y amor que siento hacia ti, pero quiero decir ¡Gracias! por estar en este largo camino conmigo y estar ahí para mí. Siempre orgullosa de ti, de la persona que eres y que tu seas mi papá. Te dedico esta tesis con el alma y el corazón, este gran logro también es tuyo, trabajo de tu esfuerzo y los frutos colectados de todo tu sacrificio.

Hermano, ni que decir, estuviste en mis momentos más significativos para llegar hasta este punto, sé de tu apoyo, de tus animos para llegar hasta aquí, no hacian falta las palabras para saber que estabamos el uno para el otro, te toco sufrir mis desvelos y cansancio, pero también estaba feliz de compartir contigo cada uno de los logros para llegar a este punto, felices avanzamos cada vez para salir adelante, gracias por ser mi familia y todo el apoyo.

Agradecimiento a mi mamá, que me ha impulsado desde pequeña para seguir con mis estudios, dando un ejemplo de seguir trabajando día a día para salir adelante, su cariño, su amor, su apoyo y forma de siempre alentarme a dar más.

Gracias totales al Dr. Miguel J. Beltrán García, este gran sueño, objetivo, meta y logro, es también gracias a el y se lo dedico de corazón, me dio la gran oportunidad de entrar al laboratorio, aprender todo lo posible y hasta desarrollarme en el campo de mayor interés para mí, darle el aspecto ecológico, porque siempre seré bióloga de recursos naturales. Descubrí muchas cosas al pasar el tiempo, sobre todo ¡el mundo científico!, y cuando me preguntan, ¿quién es la persona que admiras como

científico?, la respuesta siempre será que Miguel Beltrán, una persona con gran convicción, sueños, ganas de trabajar y hacer ciencia de verdad, aquella persona que en una pequeña isla puede hacer ciencia de primer nivel. Le debo cada tesis que hice, estuvo siempre atrás de ellas, dandome su apoyo, aliento, motivando y hasta regañandome. Es una persona a quien considero: gran inspiración, siendo mi guía en el día a día por el camino de la ciencia, pero también de la vida, llegamos a convivir hasta 9 años en el laboratorio, quien lo diría no!, que me aguantaría todo este tiempo. Así que, Gracias!, se que no fue nada fácil en ningún momento. Hoy puedo decir que todo el esfuerzo se ha consolidado en lo más grande, esta tesis, gracias por no dejarme caer y acompañarme en las locas ideas. Ahora seremos colegas!, emociona y preocupa, pero haremos cosas grandes, eso se lo puedo asegurar.

Dr. Benjamín Valdez Salas, sin duda este objetivo se esta cumpliendo gracias a usted, que me dio la oportunidad de poder estudiar la Maestría y el Doctorado en el programa de Mexicali, me abrió las puertas en el Instituto de Ingeniería. Mi completa admiración y respeto por usted, la persona que es, lo que luchó, todo lo que trabajó para salir adelante y como hoy aun sigue de pie, su carácter y su liderazgo para fincar todo lo que hoy se conoce por ciencia en el instituto. Mi admiración a la ciencia que hace, la formación de su equipo de trabajo y segunda familia, una inspiración para continuar en mi vida científica y forma personal, aprendí muchas cosas que puedo confirmar aplicaré siempre.

Dr. Ernesto Beltrán, Dr. Mario Curiel y Maestro Jorge, quiero agradecer su apoyo incondicional proporcionado en cada uno de los trayectos que se han tenido durante todo este proceso, desde la maestría y hasta ahora, la culminación.

A cada una de las personas del laboratorio que estuvieron durante mis tres etapas de preparación para llegar hasta este punto, trabajamos en equipo, nos reímos, comimos todo lo que pudimos, festejamos, jugamos y hasta lloramos, sentí su apoyo siempre y creyendo en mi. Sus abrazos alegraron mi corazón y aumentaron mis ganas de seguir. En este largo camino me encontré con ustedes, increíbles personas que siempre llevaré en mente y corazón. Agradezco a cada uno de ustedes, por absolutamente todo, dejaron una huella en mi, siendo algo invaluable. Mi última etapa en el laboratorio no puede dejarse pasar fácil, cada uno de ustedes estuvo conmigo, llorando juntos y dandome tanto apoyo para sacar este gran proyecto, me animaron cuando estaba pasando por momentos difíciles, sacaron carcajadas que me alientaron a continuar, gracias por soportar el mal humor, los regaños, las lagrimas y su preocupación ante todo, no tengo muchas palabras para expresar todo lo que les agradezco, que esten en mi vida, aún en la más mínima parte.

Elizabeth Dávalos (Eli), Fernanda Aguilar (Fer), Vicente Miranda (Chente), Alejandro García (Alex), Juan Pablo Plascencia (J.P), Paul Montaña (Pol), Samantha Ornelas (Sam), Santiago Torres, Victor (Vector) y Danahe Osuna.

Mi lista es inmensa y espero no dejar a nadie fuera:

Yuryenova Chávez (Yur), Esteban Beltrán, Angeles Vazquez (Angi), Mariana Check, Layna Osuna, Gloria Macedo, Jhovana Lozano (Jhovis), Ana Mejia, Thania Claustro, Daniela Guzmán (Dani), Itzel Zaizar, Gisela Barraza, Boramy Lee, Sandra Andrade, Sofía Villaseñor, Jessica Badillo, Cristina Retamoza (Ana), Jessica Silva (Jessy), Ilena Olmos (Ile), Amanda Gutierrez, Fernanda Gabriel, Luis E. Castañeda, Nicolás Montes (Nico), Luis F. Kong, Carolina Castillo (Carito), Alexis Zárate, Ulises López, María José Pedrin (Majo), Jocelyn Gutiérrez (Joce), Marilú Manjarrez, Armando Herrera, Carlos Siqueiros, Guadalupe Solis (Lupita), María, Zaíra, Carolina Ramirez (Caro), Félix Rivera

Quiero agradecer de igual forma las personas que estuvieron involucradas conmigo desde la escuela y fuera de ella, con todo su apoyo, animos y alegría de estar caminando para culminar este sueño, con palabras de aliento para no caer. Personas que jamás pense tener en mi vida, mi día a día y de las que he aprendido sobre la ciencia, la docencia y la vida.

MC. Priscilla Quintana, Dr. Juan Villafaña, Dr. Carlos Escudero, Ing. Josúe Mercado, Mtra. Mariana Garay, Mtro. José Luis Campos, Ing. Fernando Guzman, QFB. Mario Hernández, MC. Froylan Rabelo, Dr. Fernando Santacruz.

Edna Araujo, Manuel Chávez, Esteban Gottfried, Flavio De Anda, Pablo González, Ernesto Santa, Diego Diaz, Daniel Torres, Edgar Antonio, A. J. Diego Espinosa, Jesús González, Javier Legaspi, José

Gracias a todos mis estudiantes que me motivaron a seguir adelante, se alegraron por mis avances y me alentaban a ir por más, apoyaron todo el proceso para llegar hasta aquí. Fueron una parte fundamental de la formación de mi carrera docente.

Mis queridos amigos, siempre los llevo en el corazón, fueron un gran pilar en cada momento del proceso para llegar hasta la finalización de la tesis, siempre luchando conmigo. Gracias por la infinidad de palabras de apoyo, hasta regañarme y cuidarme en todo, preocuparse por mi, pero más que nada su cariño. Esto, se logró gracias a todos ustedes.

Karla Robles, Alejandro Orozco, Denisse Ruvalcaba, Miguel Muñoz, Moises Servin, Luis González, Angélica Soria, Montserrat Cajero, Fabiola Rivera, Yanett Galindo, Pablo Hernandez, Saúl Jara, Alejandro Castellanos, Gricelda Valdez, Alejandra García, Diego Romero.

Este espacio quise dejarlo para los profesores que me motivaron en cada etapa de mi vida a perseguir mi sueño, fueron pilares durante toda mi formación como estudiante, desde la primaria, secundaria, preparatoria y en la universidad, su esperanza me dio fuerza.

Maestra Irene, Maestra de ingles en secundaria, Maestro Carlos Bautista, Maestro Jaime Rodríguez, Maestro Mario, Maestra Alma Pacheco, Maestro Zamudio, Dr. José Aquileo Lomelí, Dr. José Luis Zavala, Biol. German Flores, Biol. Paulino Ponce.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a las personas que se encuentran en el City market, me ayudaron mucho a levantar el animo con sus sonrisas, abrazos y buenas vibras, preocupaciones a una niña extraña que llegaba a trabajar mientras tomaba un cafecito, felices por mis avances y proyectos finalizados, sin duda ese lugar se siente tan amigable por ustedes.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Capítulo 1	13
1. Resumen	14
1.1 Abstract	16
Capítulo 2	19
Capítulo 3	26
3.1 Hipótesis	27
3.2 Objetivos	27
3.3.1 Objetivo general.....	27
3.3.2 Objetivos específicos	27
Capítulo 4	29
4. Antecedentes generales del proyecto	30
4.1 El cultivo del <i>Agave</i> , ¿Una estrategia para contender contra el cambio climático?.....	30
4.2 ¿Como se cultivan los agaves?	33
4.3 Micropropagación de especies de <i>Agave</i>	37
4.4. Requerimientos básicos para una propagación efectiva	39
4.5. Micropropagación <i>in vitro</i> una alternativa para la restauración y conservación genética.....	41
4.6. La fertilización nitrogenada causa un estrés químico y altera la diversidad microbiana en suelos y plantas (Fragmento del artículo publicado en <i>Symbiosis</i> 84, 379–390 (2021))	45
4.6.1. Las aplicaciones a largo plazo y excesivas de N-fertilizantes influyen en la diversidad microbiana	49
4.6.2. La agricultura organica también altera la diversidad microbiana	53
4.6.3. La diversidad endófito de los microbios también se ve afectada por la fertilización orgánica y convencional	55
4.7. Estrés multifactorial y su impacto en las plantas y sus microorganismos (fragmento del capítulo de libro Beltran-Garcia MJ., Martinez-Rodriguez, A. <i>et al.</i> , 2024 in <i>Sustainable Agricultural Practices</i> , Editor(s): Ajay Kumar, James F. White, Joginder Singh).....	59
4.7.1. Respuestas de las plantas a la combinación de estrés multifactorial	60
4.7.2. Microbioma vegetal: la vida invisible que ayuda a las plantas contra el estrés	62
4.7.3. Retroalimentación reactiva de especies de oxígeno/antioxidantes para la modulación del microbioma, simbiosis, mitigación del estrés vegetal y más: muchas preguntas que requieren estudios adicionales	66
4.8. Situación del <i>Agave marmorata</i> o tepextate	76
Capítulo 5	79

5. Inducción de la respuesta de propagación de líneas clonales de <i>A. marmorata</i> por diferentes concentraciones de 6-benzilaminopurina (BAP)..	80
5.1 Resumen.....	80
5.2 Métodos	81
5.2.1 Índice de Brotación inducido por 6-BAP	81
5.3 Resultados.....	81
5.3.1 Respuestas de brotación en líneas clonales de <i>A. marmorata</i> a concentraciones de 6 Benzilamino purina.	81
5.4 Discusión.....	84
Capítulo 6.....	91
6.1 Acumulación de metabolitos secundarios: flavonoides, compuestos fenolicos y antocianinas como un diferenciador entre las líneas de mayor índice de brotación Am32, Am31 y Am33; publicado en Martínez-Rodríguez A, et al., <i>Micropropagation of Seed-Derived Clonal Lines of the Endangered Agave marmorata</i> Roezl and Their Compatibility with Endophytes. <i>Biology</i>. 2022; 11(10):1423.	92
6.1 Resumen	92
6.2 Métodos	93
6.2.1 Análisis de compuestos fitoquímicos de líneas clonales seleccionadas de <i>A. marmorata</i>	93
6.2.2 Preparación de las muestras para obtener extractos derivados de las líneas clonales e hijuelo de <i>A. marmorata</i>	94
6.2.3 Cuantificación de la saponina total de flavonoides, fenólicos y esteroideos.....	94
6.2.4 Análisis/colecta de fracciones por técnicas de HPLC-PDA y UHPLC-UV	96
6.2.5 Análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF	98
6.3 Resultados	99
6.3.1 Análisis comparativo del contenido total de flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas en líneas clonales con mayor índice de brotación	99
6.3.2 Perfil cromatográfico e identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF de fracciones separadas y colectados por HPLC-UV de extractos de las líneas clonales de <i>A. marmorata</i>	100
6.4 Discusión	107
6.4.1 Análisis comparativo del contenido total de metabolitos en líneas clonales con mayor índice de brotación.....	107
6.4.2 Identificación de compuestos fitoquímicos acumulados en las líneas clonales	109
Capítulo 7.....	114
7. Capacidades de promoción de crecimiento de plantas y características antifúngicas de la cepa endófito <i>A. xylooxidans</i> contra cepas fitopatógenas de <i>Fusarium</i>.	115
7.1 Resumen.....	115
7.2 Métodos	115

7.2.1 Identificación del producto de PCR del 16s ADNr de la cepa N (AX) de <i>A. xylooxidans</i>	115
7.2.2 Prueba de Skim Milk – para la determinación de Proteasas.....	118
7.2.3 Prueba de producción de auxinas.....	119
7.2.4 Metodología de la prueba de antifúngicas.....	120
7.2.5 Material Biológico: Cepas fúngicas y bacterianas utilizadas en los ensayos	123
7.3 Resultados.....	123
7.4 Discusión.....	127
Capítulo 8.....	131
8. Compatibilidad de <i>Achromobacter xylooxidans</i> en líneas clonales AM31, AM32 y AM33 de <i>A. marmorata</i>. Publicado en Martínez-Rodríguez A, et al., <i>Micropropagation of Seed-Derived Clonal Lines of the Endangered Agave marmorata</i> Roehl and Their Compatibility with Endophytes. <i>Biology</i>. 2022; 11(10):1423.....	132
8.1 Resumen.....	132
8.2 Métodos	133
8.2.1 Adaptación de la planta al sustrato de Arena-Vermiculita en microcosmos libre de nitrógeno	133
8.2.2 Estimulación del crecimiento de las plantas con bacterias endófitas	134
8.2.3 Parámetros de crecimiento de las plantas y compatibilidad de tres líneas clonales con bacterias endófitas	136
8.2.4 Evaluación del crecimiento, biomasa producida en las plantas por inoculación de bacterias en <i>A. marmorata</i>	137
8.2.5 Análisis de la estructura (arquitectura) de la raíz en plantas de <i>A. marmorata</i> y <i>A. tequilana</i> inoculadas con bacterias.....	138
8.3 Resultados.....	139
8.4 Discusión.....	142
Capítulo 9.....	150
9. Estimulación de parámetros biométricos (acumulación de total de biomasa vegetal, raíces, emergencia y tamaño de hojas) de plantas micropropagadas de <i>A. marmorata</i> en respuesta a aplicaciones de bacterias endófitas, nitrato de lantano y nitrato de amonio.....	151
9.1 Metodología.....	151
9.2 Resultados.....	153
9.3 Discusión.....	158
9.5 Preguntas que deben ser respondidas	166
Capítulo 10.....	167
10. Determinación del efecto de la adición de AX, BV, ML y Nitrato de Lantano sobre la activación del microbioma: UFC's y diversidad.....	168
10.1 Resultados.....	168

10.1.1 Unidades formadoras de colonias inducibles por tratamientos químico y biológicos	168
10.1.2 Activación del microbioma	172
10.2 Discusión.....	176
10.2.1 Activación de un microbioma cultivable en plantas por aplicaciones de químicos y biológicos.....	176
Capítulo 11.....	184
11. Conclusiones.....	185
Capítulo 12.....	187
12. Bibliografía citada.....	188

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. MORFOLOGÍA DE LAS PLANTAS DE AGAVE. ESTRUCTURAS DE REPRODUCCIÓN: INFLORESCENCIA GENERADA A PARTIR DEL MERISTEMO APICAL. SE REPRODUCE SEXUALMENTE POR LA PRODUCCIÓN DE FLORES, QUE BAJO POLINIZACIÓN GENERAN UN FRUTO TIPO CÁPSULA Y SUS SEMILLAS FÉRTILES SON DE COLOR NEGRO.	36
FIGURA 2. EFECTOS DE LA INTERRUPCIÓN DE LA SIMBIOSIS EN LA PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y LOS CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA MICROBIANA DE LAS COMUNIDADES CAUSADOS POR EL MANEJO AGRÍCOLA (N-INORGÁNICO Y N-ORGÁNICO A LARGO PLAZO, RIEGO HÍDRICO, ETC.).	48
FIGURA 3. RELACIÓN PLANTA-MICROBIOMA PARA LA MODULACIÓN MICROBIANA PARA MEJORAR LA RESISTENCIA DE LAS PLANTAS VINCULADA A ROS-ANTIOXIDANTE RETROALIMENTACIÓN. EL ESTRÉS DE LAS PLANTAS ACTIVA LA PRODUCCIÓN DE ROS Y ESTIMULA DIRECTAMENTE UNA RESPUESTA ANTIOXIDANTE EN LAS PLANTAS O ACTIVA MICROBIOS QUE ATENÚAN EL ROS. BAJO UN ASA DE RETROALIMENTACIÓN, LAS PLANTAS PERMITEN LA COLONIZACIÓN, ESTABLECEN SIMBIOSIS Y SOPORTAN EL ESTRÉS.	68
FIGURA 4. RECLUTAMIENTO MICROBIANO INDUCIDO POR LAS VÍAS DE RESPUESTA AL ESTRÉS COMO FITOHORMONAS Y DERIVADOS DE ROS DE LA ACTIVIDAD DE NADPH OXIDASA (RBOHD). LA DIVERSIDAD DEL MICROBIOMA DURANTE EL ESTRÉS DE LAS PLANTAS PUEDE ALTERARSE DEBIDO A UNA “PÉRDIDA TRANSITORIA DE MICROORGANISMOS” QUE PERJUDICA LA SALUD DE LAS PLANTAS. EN COMPENSACIÓN, LAS RAÍCES DE LA PLANTA ACTIVAN EL RECLUTAMIENTO COMENAL DESDE EL SUELO HASTA LA ENDOSFERA, LLAMADO ESTRATEGIA “CRY FOR HELP” PARA LIBERAR METABOLITOS SECUNDARIOS. LOS COMENSALES QUE REEMPLASAN A LOS ENDÓFITOS “ORIGINALES” FUERON SELECCIONADOS EN DIFERENTES GRADIENTES DE ROS Y LUEGO RESTAURAN GRADUALMENTE EL ESTADO DE SALUR DE LAS PLANTAS.	74
FIGURA 5. INDUCCIÓN DE LA BROTAÇÃO DE LÍNEAS CLONALES DE A. MARMORATA POR 6 BAP. SE UTILIZARON CONCENTRACIONES DE 2.5, 5 Y 10 PPM EN UN SEGUIMIENTO DURANTE 2 MESES. LAS LÍNEAS CLONALES AM32 Y AM33 TUVIERON LA MAYOR RESPUESTA EN TODAS LAS CONCENTRACIONES CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE ELLAS.	83
FIGURA 6. ESPECTROS DE MASA POSITIVOS DEL ION MALDI-TOF DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE LAS TRES LÍNEAS CLONALES EN MODO REFLECTRÓN. (A) AM31, (B) AM32 Y (C) AM33. LA CONCENTRACIÓN DE CADA EXTRACTO SE AJUSTÓ A 10 MG/ML. LOS FRAGMENTOS DE IONES A M/Z 254.425 Y 294.758 SE CORRELACIONAN CON LA MATRIZ DHB [M+H] ⁺ Y [M+K] ⁺	107
FIGURA 7. VALORACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA DE ACHROMOBACTER XYLOSOXIDANS (AX) CONTRAS CEPAS FITOPATÓGENAS DE FUSARIUM. SE USO COMO CONTROL UNA CEPA DE BACILLUS VELEZENSIS (P1VB) AISLADA DE HOJAS DE BANANA. LA CEPA AX NO PRESENTA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA, ASÍ MISMO NO CAUSA ALGUNA INHIBICIÓN EN LAS CEPAS DE HONGOS ANALIZADAS.	125
FIGURA 8. PRUEBA DE ANTAGONISMO DUAL PARA VALORACIÓN DE CAPACIDAD ANTIFÚNGICA DE LA CEPA N (AX) DE A. MARMORATA. LA INOCULACIÓN DE LA CEPA CADA 24 HORAS, CONCLUYE QUE A. XYLOSOXIDANS CARECE DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA... 126	126
FIGURA 9. REPRESENTACIÓN ESTRUCTURAL DE LA RAÍZ, ESQUEMA A SEGUIR PARA EL CONTEO DE PELOS RADICULARES, ALTURA Y PRESENCIA DE RAÍCES SECUNDARIAS EN 1 CM BAJO HOJA MILIMÉTRICA.	139
FIGURA 10. LAS BACTERIAS ENDÓFITAS AFECTAN EL CRECIMIENTO DE LAS LÍNEAS CLONALES AM31, AM32 Y AM33 BAJO LIMITACIÓN DE NUTRIENTES. EL GRUPO CONTROL DE LA PLANTA FUE TRATADO CON UNA SOLUCIÓN SALINA-GLUCOSA. LOS EFECTOS POSITIVOS Y NEGATIVOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS DEBEN ATRIBUIRSE DIRECTAMENTE A LA INOCULACIÓN BACTERIANA. LOS DATOS SE PRESENTAN COMO LA MEDIA Y EL ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA DE LAS PLANTAS INOCULADAS EN LA	

FORMACIÓN DE NUEVAS HOJAS, RAÍCES, LONGITUD DE RAÍZ Y PESO SECO 30 D POST-INOCULACIÓN. LOS VALORES Y LAS MEDIAS REPRESENTAN TRES EXPERIMENTOS REPLICADOS. C = CONTROL, AX = A. XYLOSOXIDANS, PA = P. AERUGINOSA, BT = B. TEQUILENSIS Y EC = E. CLOACAE.....140

FIGURA 11. RESPUESTA DE LAS LÍNEAS CLONALES DE A. MARMORATA A LA INOCULACIÓN CON BACTERIAS ENDÓFITAS. LA FIGURA RESUME EL MEJOR TRATAMIENTO ENTRE INOCULACIÓN BACTERIANA Y CONTROL, DONDE A. XYLOSOXIDANS FUE EL MEJOR TRATAMIENTO PARA AM31 Y AM32, Y P. AERUGINOSA FUE EL MEJOR TRATAMIENTO PARA AM33.....147

FIGURA 12. REPRESENTACIÓN DE LOS CORTES HECHOS EN LAS PLANTAS DE AGAVE MARMORATA. SECCIÓN DE RAÍCES, PSEUDOTALLO Y HOJAS: BASE, CENTRO Y PUNTA. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL PARA ANÁLISIS DE BIOMASA SECA Y RECUPERACIÓN DE MICROORGANISMOS.152

FIGURA 13. ACUMULACIÓN DE BIOMASA VEGETAL INDUCIDA POR APLICACIONES DE BACTERIAS ENDÓFITAS Y NITRATO DE LANTANO. A) EMISIÓN DE HOJAS NUEVAS; B) EMISIÓN DE RAÍCES NUEVAS; C) BIOMASA SECA FINAL. SE PRESENTA EL SEGUIMIENTO DURANTE 15 SEMANAS CON 8 APLICACIONES TOTALES. LOS TRATAMIENTOS CON EL LANTÁNIDO Y LAS BACTERIAS A. XYLOSOXIDANS Y B. VELEZENSIS INFLUYEN EN EL CONTENIDO DE BIOMASA FINAL CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS EN LA EMISIÓN DE HOJAS Y RAÍCES.....155

FIGURA 14. ASPECTOS MACROSCÓPICOS DE PLÁNTULAS DE A. MARMORATA TRATADAS CON BACTERIAS ENDÓFITAS Y UN LANTÁNIDO. SE OBSERVA UNA CORRELACIÓN NEGATIVA ENTRE EL PASO SECO Y LA APARIENCIA DE LA PLÁNTULA FRESCA. LO OBSERVADO SUGIERE ACUMULACIÓN INDUCIDA DE AGUA POR EL TRATAMIENTO.163

FIGURA 15. DINÁMICA DE UFC'S EN PLANTAS TRATADAS CON LANTANO Y BACTERIAS ENDÓFITAS. LA ADAPTACIÓN DE LAS PLANTAS A UN SUSTRATO CON LIMITACIÓN DE NUTRIENTES INCREMENTA EL MICROBIOMA CULTIVABLE EN DIFERENTES TEJIDOS. NO SE OBSERVA UN EFECTO SIGNIFICATIVO EN LAS UFC'S EN LAS PLANTAS TRATADAS VERSUS EL CONTROL.....171

FIGURA 16. FILOGENIA DEL MICROBIOMA ACTIVADO EN CADA UNA DE LAS SECCIONES DE LA PLANTA DE AGAVE MARMORATA: RAÍZ, PSEUDOTALLO Y LAS HOJAS SE SECCIONARON EN 3: BASE, CENTRO Y PUNTA, ADEMÁS SE ANALIZÓ LA ARENA DONDE ESTABA ESTABLECIDA LA PLANTA EN EL MICROCOSMOS. ESTE ESTUDIO REPRESENTA EL TOTAL DE LAS 15 SEMANAS POR TRATAMIENTO: AGUA (C-), ACHROMOBACTER XYLOSOXIDANS (AX), BACILLUS VELEZENZIS (BV), MICROCOCCUS LUTEUS (ML) Y 10 PPM DE LA(NO3)3, FINALIZANDO CON 8 INOCULACIONES DE CADA UNO.175

Capítulo 1

Resumen

Abstract

1. Resumen

Este trabajo muestra nuestro progreso experimental dirigido a la conservación y restauración las poblaciones de Agave, especialmente *Agave marmorata*, una especie de agave amenazada por su uso generalizado en la producción de mezcal "tepeextate". Combinamos la micropropagación de líneas vegetales clonales y técnicas bacteriológicas, en particular el uso de bacterias endófitas derivadas de sus propias semillas (Martinez-Rodriguez et al., 2019), para reforzar la adaptabilidad y la capacidad de supervivencia de las plantas mediante su inoculación cuando se trasladan a una siguiente condición de cultivo para luego ser reintroducida. Una de nuestras principales preocupaciones es cómo el cambio climático y la gestión de fertilizantes afectan a las plantas en la naturaleza y en las tierras cultivadas. Por lo tanto, para mejorar nuestros conocimientos se hicieron dos revisiones integrales que nos permitieron identificar el estado actual de ambos temas (Beltran-García et al., 2021; Beltran-García et al., 2024).

En esta disertación, primero presentamos la respuesta de las líneas clonales a 6-benzimolopurina (BAP), una citocinina que aumenta la proliferación de brotes. Las líneas clonales AM32 y AM33 fueron seleccionadas porque respondieron con hasta 90 brotes, el mayor número de brotes inducidos por la adición de BAP. Las diferencias inducidas por el BAP entre las líneas podrían utilizarse para producir plantas de alta calidad con diferentes capacidades, p. ej., proliferación rápida, mejor adaptación al estrés y crecimiento bajo limitación de nutrientes. El análisis de la composición vegetal de los compuestos fenólicos, flavonoides y saponinas se realizó, pero no mostró diferencias significativas entre las líneas clónicas. Los extractos tienen perfiles similares de fragmentos iónicos (m/z) con ligeras

variaciones de intensidad y apariencias de señales en m/z 1361.978 en la línea AM33.

También encontramos que el endófito *Achromobacter xylosoxidans* NAX tiene la mayor compatibilidad con las líneas de *Agave marmorata* (Martínez-Rodríguez et al., 2022). Sin embargo, la inoculación de las plantas con *Enterobacter cloacae* dio lugar a la muerte de la planta. Es difícil determinar si *E. cloacae* se comporta como un patógeno o no soporta el crecimiento de las plantas, ya que no se observaron signos de enfermedad y no hubo diferencias significativas en la muerte inducida entre las tres líneas clonales. La cepa *A. xylosoxidans* mostró propiedades de crecimiento vegetal (PBPP). La actividad de deaminasa del ACC, una enzima relacionada con la degradación del etileno bajo condiciones de estrés, es la PBPP más evidente. A diferencia de otros *Achromobacter* endófitos previamente reportados, NAX no tiene actividad antifúngica. En contraste, encontramos una promoción intrigante del crecimiento de hongos fitopatógenos; se necesitan más estudios para comprender estos resultados.

Por otro lado, se determinó el efecto de la aplicación de 3 bacterias endofíticas (*B. velezensis* [BV], *Micrococcus luteus* [ML] y *A. xylosoxidans* [NAX]) y lantano sobre el crecimiento de las plantas bajo nutrición restringida. La cepa NAX estimula la formación de nuevas hojas y raíces después de 15 semanas y provoca la mayor acumulación de biomasa seca, que fue hasta tres veces superior a la del control, seguida por la aplicación de 10 ppm $\text{La}(\text{NO}_3)_3$. Se observaron diferencias en la ubicación de la biomasa seca. Los tratamientos bacterianos con BV, AX y ML mostraron que la biomasa vegetal se acumuló principalmente en las hojas, pero el mayor porcentaje de biomasa inducida por el lantánido se observó en las raíces.

Los tratamientos bacterianos con BV, AX y ML mostraron que la biomasa vegetal se acumuló principalmente en las hojas, pero el mayor porcentaje de biomasa inducida por el lantano se observó en las raíces. El contenido de unidades formadoras de colonias (UFC) en el tejido vegetal aumenta hasta 7 logs cuando las plantas se transfieren a un sustrato de arena del desierto sin nutrientes. Los tratamientos con 10 ppm de $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ y las bacterias endófitas también conducen a cambios en el número de UFCs del microbioma endófito cultivable, aunque no se observaron diferencias significativas, pero existe una diferencia en la diversidad filogenética del microbioma activado, que incluye como principales filos a los Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria.

1.1 Abstract

This work shows our experimental progress aimed at the conservation and restoration of the agave landscape, especially of *Agave marmorata*, an agave species threatened due to its widespread use in the production of mezcal “tepehstate”. We combine both micropropagation of clonal plant lines and bacteriological techniques, in particular the use of endophytic bacteria derived from their own seeds (Martinez-Rodriguez et al., 2019), to strengthen the adaptability and survivability of plants through their inoculation when they are moved to the next culture condition and then reintroduced. One of our main concerns is how climate change and fertilizer management affect plants in the wild and on cultivated land. Therefore, to improve our knowledge in this area, two comprehensive reviews have been produced that allow us to identify the current state of the science on both topics (Beltran-Garcia et al., 2021; Beltran-García et al., 2024). In this dissertation, we first present the

response of clonal lines to 6-benzylaminopurine (BAP), a cytokinin that increases shoot proliferation. The clonal lines AM32 and AM33 were selected because they responded with up to 90 shoots, the highest number of shoots induced by BAP addition. The BAP-induced differences between the lines could be used to produce high quality plants with different capabilities, e.g. fast proliferation, better adaptation to stress and growth under nutrient limitation. The analysis of the plant composition of phenolic compounds, flavonoids and saponins was performed but showed no significant differences between the clone lines. However, interesting molecules related to plant defense are enriched. The whole plant extracts of the 3 clonal lines showed similar profiles of ion fragments (m/z), with slight variations in the intensity and appearance of the signal at m/z 1361.978 associated with saponins in AM33 in MALDI-TOF mass spectrometry analysis. It was also found that the endophytic *Achromobacter xylosoxidans* NAX has the greatest compatibility with *Agave marmorata* lines (Martínez-Rodríguez et al., 2022). However, inoculation of the plants with *Enterobacter cloacae* resulted in plant death. It was difficult to determine whether *E. cloacae* behaved like a pathogen or did not promote plant growth, as no signs of bacterial blight or disease were observed and there were no significant differences in induced dieback between the three clonal lines. The *A. xylosoxidans* strain showed plant growth-promoting properties (PBPP), with ACC deaminase activity, an enzyme related to the degradation of ethylene under stress conditions, being the most obvious PBPP. In contrast to other endophytic *Achromobacter* previously reported, NAX has no antifungal activity. In contrast, we found an intriguing promotion of phytopathogen fungal growth; further studies need to be conducted to understand these results.

On the other hand, the effect of the application of 3 endophytic bacteria (*B. velezensis* [BV], *Micrococcus luteus* [ML] and *A. xylosoxidans* [NAX]) and lanthanum on plant growth under restricted nutrition was determined. The NAX strain was confirmed once by stimulating the formation of new leaves and roots after 15 weeks and causing the highest dry biomass accumulation, which was up to three times higher than that of the control, followed by the application of 10 ppm $\text{La}(\text{NO}_3)_3$. Differences were observed with respect to the location of dry biomass. The bacterial treatments with BV, AX and ML showed that plant biomass accumulated mainly in the leaves, but the highest percentage of biomass induced by lanthanide was observed in the roots. The content of colony forming units (CFU) in the plant tissue increases by up to 7 logs when the plants are transferred to a desert sand substrate without nutrients. Treatments with 10 ppm $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ and endophytic bacteria also lead to changes in the number of CFU of the culturable endophytic microbiome, although no significant differences were observed, but there is a difference in the phylogenetic diversity of the activated microbiome, including the major phyla Firmicutes, Actinobacteria and Proteobacteria. El nitrato de lantano hace que Actinobacteria aparezca como la principal filo bacteriano en todos los tejidos vegetales, lo que indica una respuesta del microbioma al estrés vegetal causado por el lantano y la deficiencia de nutrientes. Existe una ligera correlación entre la UFC y la estimulación del crecimiento de los tejidos por *Bacillus*, *Achromobacter* y nitrato de lantano. Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar el mecanismo de estos cambios inducidos en el comportamiento del crecimiento de las plantas.

Capítulo 2

Introducción

2. Introducción

La investigación en el laboratorio con *Agave marmorata* inicio en el 2015, con el objetivo de rescatar una planta que se encontraba amenazada, debido a la sobreexplotación hasta llegar al punto de estar en peligro de extinción por el alto número de individuos que están desapareciendo de su estado silvestre, todo por el alza en la producción de Mezcal, aumentando la demanda de su producción y consumo. Un problema adicional es el tiempo que tardan las plantas en madurar, cercano a los 35 años.

Durante estos años de investigación se ha implementado tecnología para el desarrollo de métodos que ayuden a nuestro objetivo principal. Se ha generado conocimiento y nuevos métodos para el cultivo de este *Agave*. Hemos fusionado la microbiología y la propagación vegetal. Nuestros primeros hallazgos fue conocer el microbioma endófito de las semillas, seguida de la caracterización de sus propiedades agronómicas e identificación por ADNr16s. Por otro lado, se generaron líneas clonales en laboratorio a partir de la germinación de semillas colectadas en ambientes silvestres de Oaxaca, estas con el fin de seleccionar tejidos vegetales idóneos para la multiplicación, basados en la idea de reintroducir estas plantas en campo, obteniendo así una reforestación efectiva, con nueva genética hasta llegar a la conservación de la misma especie y su ecosistema.

En la tesis de Maestría, abordamos como tema principal el conocimiento del microbioma endófito derivada de semilla, comprendimos su dinámica de sucesión en las fases de desarrollo y crecimiento de la planta desde 10, 20, 30 días, hasta plantas de 1 año. Con el establecimiento de las líneas clonales en sistema *in vitro*,

probamos la adaptación a la arena de desierto, donde evaluamos la capacidad de crecimiento en un sistema carente de nutrientes y que la única fuente de alimentación fueran las células microbianas. Las bacterias que seleccionamos presentaron propiedades de promoción de crecimiento atractivas para las condiciones de estrés. Parte de estas bacterias se utilizaron en este trabajo doctoral. En este periodo hemos culminado nuestros acercamientos de propagación al utilizar la citocinina BAP, que induce la multiplicación eficiente de brotes contribuirá para generar material vegetal para la reintroducción del agave. Las líneas clonales seleccionadas tienen la mejor capacidad de multiplicación y la formación estable de tejidos entre las diferentes líneas clonales. Las diferencias entre las líneas más adelante podrían explotarse para la producción de plantas de alta calidad con diferentes capacidades, tales como una rápida propagación, una mayor adaptación al estrés y un crecimiento bajo limitación de nutrientes, pero permitirá mantener las diferencias genéticas en las plantaciones para satisfacer la demanda de plantas sin poner en riesgo un recurso natural.

En este trabajo mostramos que la línea AM32 fue la que presentó la mayor formación de brotes inducidos por BAP y presentó menos tejido senescente después de 60 días de cultivo. Nuestros resultados revelan diferencias en la inducción y multiplicación de brotes entre las líneas clonales, incluso bajo condiciones idénticas de cultivo *in vitro*. También se seleccionaron las líneas clonales AM31 y AM33, como posibles alternativas de variación genética al momento de la reintroducción. Desde una perspectiva de la producción vegetal, las tres líneas clonales seleccionadas (AM31, AM32 y AM33) toleraron un entorno libre de nutrientes como vermiculita y arena de playa cuando fueron trasladadas *ex vitro*.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las líneas en cuanto al contenido fitoquímico y solo pequeñas diferencias en el contenido de flavonoides en la línea AM31. El contenido de saponina esteroideal fue ligeramente elevado en AM32 (12,71 3,87 mg Diosgenina/g extracto seco). El análisis cromatográfico de los extractos crudos de las líneas clonales de *A. marmorata* mostró la separación de 23 fracciones totales. En la longitud de onda de 275 nm se separaron diecisiete fracciones a (F2, F5, F7, F8, F12, F15, F22, F28, F29-F32, F37, F42, F44, F47, F48); tres fracciones a 205 nm (F1, F14, F62), dos a 390 nm (F25 y F66) y tres a 518 nm (F18, F23, F24). Pudimos identificar algunas moléculas bioactivas por espectrometría de masas MALDI-TOF, entre estas la catequina, ácido gálico, ácido cafeico, ácido sinápico como los compuestos fenólicos más abundantes. Respecto a los flavonoides se identificaron la isorhamnetina rutinósido, la isorhamnetina-glucurónido, la isorhamnetina 3-glucosido, la isorhamnetina-3-O-diglucosido, Miricetina Glucósido, Miricetina 3-O-Glucuronido, Miricetina 3-O-Rutinósido, Rutina, Quercetina-3-O-Glucósido, quercetina-3-glucósido o isoquercetina, kaempferol diglucósido, kaempferol rutinosido, Isorhamnetina Rutinosido. En el componente, el acercamiento de espectrometría de masas indicó la probabilidad de moléculas similares a las saponinas tigogenina y hecogenina. La línea AM31 tenía el mayor contenido de antocianinas como la cianidina 3,5 diglucósido en comparación con AM32 (NA% 23,08) y AM33 (NA% 21,66). Delfinidina 3,5-O-diglucosido fue ligeramente más alta en la línea AM31. La delfinidina-3-O-glucósido fue ligeramente elevada en AM32. Los resultados de la HPLC fueron consistentes con los análisis del contenido fitoquímico total, ya que las concentraciones ajustadas a la normalización de área fueron similares entre las

líneas clonales. Los extractos tienen perfiles similares de fragmentos iónicos (m/z) con ligeras variaciones de intensidad y apariencias de señales en m/z 1361.978 en la línea AM33.

Las plantas bajo condiciones de estrés pueden adquirir un microbioma y modificar su composición, sin embargo, bajo estas condiciones se experimenta primero un efecto de disbiosis, es decir la pérdida en número y diversidad de microorganismos. Tal y como se explicó en Beltran-Garcia et al., 2024, las plantas para defenderse después de la pérdida de sus microbios activan un mecanismo de atracción del suelo o la rizosfera hacia sus compartimentos, seleccionando aquellos microorganismos útiles. Este comportamiento se ha acuñado como “Cry for help” (Rolfe et al., 2019). Sin embargo, en este trabajo las plantas de *A. marmorata* no experimentan un fenómeno de atracción, sino más bien ocurre una activación del microbioma, ya que las plantas transferidas de medio Murashige & Skoog inicialmente carecen de un microbioma cultivable. La transferencia a un medio de arena de desierto estéril sin nutrición (estrés por nutrientes) después de 5 semanas experimenta un incremento de hasta 7 unidades logarítmicas en sus tejidos, corroborando un fenómeno de estrés por deficiencia nutricional base. El efecto más claro sobre el comportamiento del microbioma de la planta por la limitación nutricional se observa en todas las secciones de la planta en la semana 10, especialmente en el pseudotallo donde el control está aparentemente 1.5 ordenes de magnitud logarítmica por encima del tratamiento con *Bacillus* y el Lantano. El tratamiento con *M. luteus* se encuentra 2 ordenes abajo y *Achromobacter* 2 ordenes logarítmicos.

El tratamiento de lantano está por debajo del control en las hojas y las raíces 1 orden en el contenido de UFCs. En todas las secciones de las plantas el microbioma es oscilante. Se ha establecido que, bajo condiciones de limitación de nutrientes, cambios en el metabolismo de las plantas conllevan a cambios en el tipo y composición de exudados de las raíces afectando las comunidades microbianas asociadas a las raíces (Singh et al., 2022; Enagbonma et al., 2023).

La aplicación de nitrato de lantano es la que menos UFCs presentan y los cambios entre tiempos de muestreo no son significativos, ya que como mencionamos anteriormente el cambio es de 1 orden logarítmico aproximadamente. Esto se debe quizás a que la planta está utilizando el NO_3 como fuente de nutriente y el estrés nutricional sea reducido, influyendo que la planta no active un suficiente número de bacterias disuadiendo a las plantas a la necesidad de activar microbios útiles, por ejemplo, fijadores de nitrógeno (Beltran-Garcia et al., 2021; Singh et al., 2022; Dixon et al., 2022). Por otra parte, en condiciones inoculantes microbianas son capaces de restaurar la disbiosis por compensación o reducción de los cambios microbianos inducidos por patógenos (Berg et al., 2021). En este trabajo discretamente se observa este fenómeno. La aplicación de *B. velezensis* y *A. xylooxidans*, *M. luteus* en hojas y raíces son ligeramente mayores que el control, sin embargo, no es significativo ya que el número de UFCs están en el mismo rango que el control. Es intrigante el significado de las oscilaciones en el número de bacterias en los tejidos. En un estudio previo Beltran-Garcia et al., 2014 usando al agave azul como modelo mostró que las condiciones de limitación de nutrientes obligan a las plantas a consumir bacterias y que el nitrógeno microbiano es incorporado a la estructura vegetal, soportando un crecimiento sostenido de la planta. Por otro lado, la hipótesis

de las rizofagia, formulada por primera vez por Paungfoo-Lohienne et al. (2013), postula que los nutrientes importantes de las plantas pueden adquirirse en las raíces mediante un proceso por el cual las bacterias endófitas cierran su ciclo entre el suelo y las raíces.

Hemos creado a partir de los resultados un panorama de la diversidad filogenética que presenta la planta bajo condiciones de estrés inducido. Este conocimiento en un futuro permitirá desarrollar comunidades bacterianas sintéticas, como una alternativa para el desarrollo de tecnología no solo para este agave mezcalero, si no para otros que han cobrado particular importancia.

En resumen, como parte de este trabajo doctoral se tienen como productos principales 1 artículo publicado en *Biology* como autor principal, 2 revisiones publicadas en *Symbiosis* y *Microorganisms* publicadas en 2021 y 1 capítulo de libro publicado recientemente como co-autor (2024).

Capítulo 3

Hipótesis
Objetivo general
Objetivos específicos

3.1 Hipótesis

Las tierras raras y las bacterias endófitas bajo condiciones de estrés nutricional impulsarán la activación de un microbio endófito que soportara el desarrollo de las plantulas de agave.

3.2 Objetivos

3.3.1 Objetivo general

Determinar el impacto de las bacterias endófitas y tierras raras sobre líneas clonales establecidas de *Agave marmorata* desde acercamientos microbiológicos y biométricos de las plantas bajo condiciones de estrés nutricional.

3.3.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la respuesta de las líneas clonales de *A. marmorata in vitro* en medio MS para producción de material vegetal a distintas concentraciones de 6-Benzilaminopurina para estimular la brotación.
2. Determinar la acumulación de metabolitos secundarios: flavonoides, compuestos fenólicos y antocianinas como un diferenciador entre las líneas de mayor índice de brotación Am32, Am31 y Am33 por métodos de HPLC-Espectrometría de masas MALDI-TOF.
3. Evaluar las capacidades de promoción de crecimiento de plantas (PGP) y potencial antifúngico contra cepas de *Fusarium* de las bacterias endófitas de *A. marmorata*: *A. xylosoxidans*.
4. Determinar la compatibilidad de *Achromobacter xylosoxidans* en líneas clonales de *A. marmorata* midiendo parámetros biométricos.

5. Evaluar el efecto de la aplicación de bacterias endófitas, nitrato de lantano y nitrato de amonio sobre parámetros biométricos (acumulación de biomasa vegetal, raíces, emergencia y tamaño de hojas) de plantas micropropagadas de *A. marmorata*.
6. Determinar el efecto de la adición de nitrato de lantano y *A. xylooxidans* sobre la activación del microbioma.

Capítulo 4

Antecedentes generales del proyecto

4. Antecedentes generales del proyecto

4.1 El cultivo del *Agave*, ¿Una estrategia para contender contra el cambio climático?

Los agaves son plantas que eran esenciales en las poblaciones mesoamericanas y de las zonas áridas para el mantenimiento de su alimentación especialmente en los periodos de sequía. El género *Agave* comprende 211 especies pertenecientes al orden *Asparagales*, de las cuales en México se encuentran el 75% de las especies totales reportadas a nivel mundial, correspondientes a 159 especies endémicas en el país (García-Mendoza, 2011). Es probable que este linaje de plantas surgió hace 10 millones de años en el territorio del Altiplano Mexicano (Narváez y Sánchez, 2009). Actualmente se reconocen 70 usos tradicionales para estas especies como fuente de alimentos, materia prima para crear fibras, ropa, cuerdas, material de construcción y bebidas alcohólicas como el pulque, tequila y mezcal. El uso intensivo ha puesto en riesgo de extinción a algunas especies de *Agave* (Alducin et al., 2023), entre estas al *A. marmorata*. Por ejemplo, el reciente aumento de la producción de mezcal ha dado lugar a la sobreexplotación de las poblaciones de agave silvestre y la producción de tequila ha condenado al *Agave tequilana* a ser un monocultivo para la producción de tequila. Recientemente el *Agave angustifolia* para la producción del mezcal espadín está experimentando algunos efectos negativos en la diversidad genética en las especies cultivadas (Klimova et al., 2023).

Por otro lado, el cambio climático afecta a todos los seres del planeta, incluyendo microorganismos, plantas, hongos, animales y humanos. Esta registrado que los cambios drásticos en la temperatura afectan la fotosíntesis de las plantas y la presión vapor entre el aire y las hojas. Los agaves han sufrido adaptaciones evolutivas en respuesta a modificaciones en el planeta, permitiendo una aclimatación efectiva en los ambientes áridos y semiáridos (desiertos), bosques, selvas. Los agaves pueden desarrollarse desde el nivel del mar hasta en la montaña a altitudes de 3,400 metros, llegando incluso colonizar suelos escasos de nutrientes (Huerta-Lovera *et al.*, 2018). Los agaves naturalmente tienen una alta capacidad de sobrevivir en condiciones extremas u hostiles como sequía, fluctuación de altas temperaturas y condiciones de iluminación, así como la eficiente toma de CO₂ y el manejo de la evapotranspiración a través del metabolismo del ácido de crasuláceo (CAM por sus siglas en inglés), una alternativa fotosintética en la vegetación desértica donde las temperaturas llegan hasta los 60°C (Abraham *et al.*, 2015). El metabolismo CAM es un modo de fotosíntesis que evolucionó en respuesta a la disminución de los niveles de CO₂ en la atmósfera hace unos 20 millones de años. Una relación elevada de O₂ con respecto al CO₂ hizo que muchas plantas se vieran sometidas a un mayor estrés por la foto respiración, proceso que ocurre en las plantas que viven a altas temperaturas o en entornos con escasez de agua.

En 1996, Park Nobel predijo los cambios en la concentración de CO₂ en la atmosfera, las bajas temperaturas y las condiciones áridas implicarían que el cultivo de agaves y plantas con metabolismo CAM serían las idóneas y de alta rentabilidad para la producción de biomasa vegetal, además de que se convertirían en una estrategia para el consumo del CO₂ atmosférico (Nobel, 1996). En su publicación

en Journal of Arid Environments mostro que los agaves son plantas absorben eficientemente CO_2 atmosférico hasta en un 36% para *A. salmiana* y *S. queretaroensis*. El aumento de la absorción diaria de CO_2 por las plantas CAM bajo concentraciones atmosféricas elevadas de CO_2 , reflejan un incremento tanto en la absorción diurna de CO_2 mediada por la enzima Rubisco (Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa) así como en la captación nocturna de CO_2 mediada por la carboxilasa de fosfoenolpiruvato (PEPCase), la actividad de esta enzima da lugar a una mayor acumulación de malatos nocturnos. Los contenidos de clorofila y las actividades de Rubisco y PEPCase disminuyen bajo un CO_2 atmosférico elevado, pero el porcentaje activado para Rubisco aumenta y la K_m (HCO_3^-) para PEPCase disminuye, lo que resulta en una fotosíntesis más eficiente (Drennan and Nobel, 2000).

Bajo esta conceptualización, se espera que las plantas CAM tengan una ventaja potencial sobre otros grupos, en particular las plantas C3, y que también se vea reforzada por los climas más cálidos, ya que las plantas CAM suelen presentar una temperatura óptima más alta para la fotosíntesis con tasas de foto respiración más bajas, y así evitan un alto estrés atmosférico diurno por agua (Drennan & Nobel, 2000). Otro aspecto importante de las plantas CAM, en especial los agaves, es la succulencia en las hojas. Se espera que el aumento de la succulencia favorezca la fase 1 de captura de carbono por PEPC (fotosíntesis C4) debido al aumento de vacuolas y tamaño de células disponibles para la síntesis del ácido málico y su almacenamiento durante la noche, seguido de la decarboxilación fase 3 del ácido málico, ácido esencial para el ciclo de Calvin (fotosíntesis C3) vía Rubisco durante el día. Además, la succulencia de células CAM es típicamente asociado con un

espacio aéreo intercelular reducido (IAS) y la reducción de la superficie mesófila expuesta a IAS (Ripley et al. 2013). Esto aparentemente crea barreras físicas para la difusión del CO₂.

Algunos investigadores sugieren que la expansión de la superficie de terrenos cultivados con especies de agave pueden ser útiles como una estrategia de mitigación del cambio climático dada su adaptación al calor, condiciones secas y gestión eficiente del agua (Davis & Ortiz-Cano, 2023); los agaves se vuelven candidatos para proveer alimentos, producir bioenergía, la captura de carbono y la estabilidad del suelo en tierras marginales o degradadas, especialmente, porque la producción de plantas CAM en tierras marginales y degradadas no competiría por tierras cultivables con plantas C3 o C4. Se espera que la ventaja potencial de las plantas CAM sobre otros grupos funcionales, en particular las plantas C3, también se vea reforzada por los climas más cálidos, ya que las plantas CAM suelen presentar una temperatura óptima más alta para la fotosíntesis, tasas de fotorespiración más bajas, y evitar un alto estrés atmosférico diurno por el agua (Drennan and Nobel, 2000, Yu et al., 2024).

4.2 ¿Cómo se cultivan los agaves?

En México desde hace siglos las plantaciones de *Agave* han sido establecidas por los brotes que se forman desde su rizoma, mejor conocidos como “hijuelos” mediante reproducción asexual (Figura 1). Este tipo de reproducción es eficiente y rápida para el establecimiento de las plantas. Hoy en día se sigue

usando, especialmente por el beneficio económico; sin embargo, la planta tiene más variantes de esta reproducción, generando brotes (bulbillos) en la inflorescencia de la planta, cuando esta no fue exitosamente polinizada, asegurando su propagación, colonización y la sobrevivencia como una especie competitiva.

Sin embargo, la propagación asexual genera poblaciones clónales y esto pone en riesgo la diversidad de las especies debido a que las plantas son propensas a la susceptibilidad de plagas y enfermedades de las poblaciones como en el caso de *Agave tequilana*, que además se ve afectado por los factores climáticos (García-Mendoza, 2007, Huerta-Lovera et al, 2018).

El agave también se reproduce sexualmente. Son plantas semélparas (que llegan a florecer solo una vez en su vida), producen una inflorescencia conocida como “quiate” el cual marca el fin de su ciclo de vida (Figura 1). Esta estructura puede aparecer entre 4 y 25 años, dependiendo de la especie de *Agave*. Durante el crecimiento de la planta se almacenan azúcares en su pseudotallo (piña) que una vez que la planta llega a su maduración son utilizados para el desarrollo del quiate partiendo del meristemo apical de la planta. La multiplicación a través de las semillas aumenta la variabilidad genética y pueden llegar a disminuir el daño que puede ser ocasionado por plagas y enfermedades (Valenzuela-Zapata y Nabhan, 2003). El 46.3% del territorio de México mantiene numerosos endemismos gracias a la plasticidad genética del agave y las relaciones bióticas con otros organismos, tales como sus polinizadores (García-Mendoza, 2007). Estudios realizados en las flores de los agaves sugieren una adaptación a la polinización de murciélagos conocida como quiropterofilia. Las flores llegan a producir un polen rico en proteínas y

abundante néctar, por lo cual en la noche huelen a fruta madura y amoníaco, un olor atractivo para abejas, colibríes y murciélagos (Slauson, 2000; Trejo-Salazar *et al.*, 2015; Bonbón-Palomares *et al.*, 2018).

Sin embargo, la sobreexplotación de las diferentes estructuras de las plantas antes y durante la floración, en especial la eliminación del quíote no permite la generación del fruto, por lo que no se producen semillas con la variación genética para tener una mayor adaptación a condiciones climáticas, obteniendo una baja variación en sus poblaciones (García-Moya *et al.*, 2011; Huerta-Lovera *et al.*, 2018). Este fenómeno es de gran importancia ya que afecta a terceros con la destrucción de hábitats naturales de las especies que son polinizadores y cuya supervivencia depende del consumo de néctar de agave. Factores antropogénicos como el uso excesivo de fertilizantes, el uso de fungicidas e insecticidas alteran la estabilidad y el comportamiento de los agaves provocando la degradación de los suelos, la erosión y pérdida de la microbiota del suelo (bacterias y hongos), la contaminación de mantos acuíferos, saturación de metales pesados, alteración de ciclos biológicos de insectos, aves y mamíferos lo cual provoca un desequilibrio ecológico en el ambiente donde el agave se desarrolla.

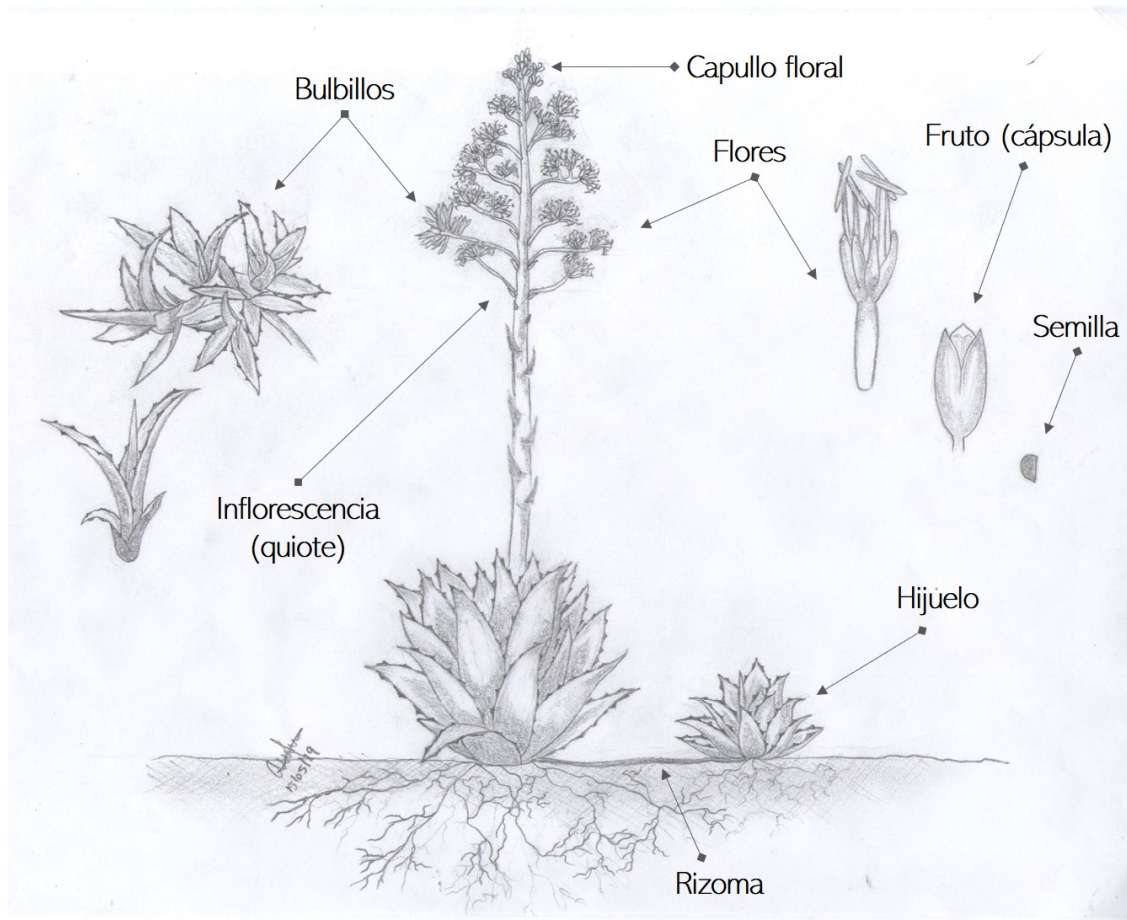


Figura 1. Morfología de las plantas de agave. Estructuras de reproducción: inflorescencia generada a partir del meristemo apical. Se reproduce sexualmente por la producción de flores, que bajo polinización generan un fruto tipo cápsula y sus semillas fértiles son de color negro.

El quiote alcanza los 6 metros de alto. Las flores tienen diferentes grados de succulencia, son bisexuales, tubulares y con el ovario ínfero, tienen 6 tépalos los cuales pueden ser de color verdoso-amarillo, amarillo o incluso rojizos dependiendo de la especie, posee 6 estambres y el estilo muy largo debido a que sobre pasan

los tépalos. La base del tubo tiene 3 nectarios. (García-Mendoza, 2007; Martínez-Rodríguez, 2017 tesis de licenciatura).

4.3 Micropropagación de especies de *Agave*

Se han establecido diversas metodologías para la micropropagación del género *Agave*, considerando así el cultivo de tejidos como la tecnología más eficiente para la mejora continua de la agricultura, ante la eliminación de enfermedades y producción de metabolitos secundarios, generando variantes somaclonales y gametoclonales, a través de semillas, cortes, injertos o estratificaciones libres de virus (García-González *et al.*, 2010). Estas técnicas pueden realizarse a través de tres vías de regeneración: brotación de yemas adventicias preexistentes, producción de yemas de *novo* y embriogénesis somática. Sin embargo, la gran controversia es que se generan plantas iguales (clones) que suelen ser más susceptibles a enfermedades ya que en esas plantas no existe variabilidad genética, por lo que son más frágiles a cambios medioambientales y las especies sin variaciones genéticas son propensas a que no se mejore la especie poblacional, provocando su extinción.

La proliferación a través de brotes axilares es una garantía de estabilidad genética (debido a la presencia de tejido meristemático); sin embargo, su rendimiento es limitado debido a la necesidad de utilizar explantes meristemáticos. La organogénesis adventicia es mucho más eficiente, ya que se puede usar para producir brotes de cualquier explante (pétalos, raíz, hojas, etc.). La embriogénesis

somática, es un proceso durante el cual las células vegetales no cigóticas, incluidas las células haploides, forman embriones, y en la última estancia plantas fértiles. Dado que las plantas presentan millones de células somáticas que pueden adquirir competencia para realizar la embriogénesis, el rendimiento de la técnica es enorme. Ante los resultados, se cree que la embriogénesis somática es el método de propagación más eficiente (Lema-Ruminska and Kulus, 2012). A la fecha se han desarrollado protocolos eficientes con respecto a la micropropagación de *Agave tequilana* mediante técnicas de embriogénesis somática, así como la producción de individuos haploides, triploides y trisómicos útiles para los diversos procesos de mejoramiento, de estudios genéticos y de totipotencia de las células y tejidos en el género agave (Rodríguez-Garay y Rodríguez-Domínguez, 2018).

Dado que las condiciones *in vitro* son muy diferentes de las condiciones en la naturaleza, algunas plantas muestran problemas de aclimatación a condiciones *ex vitro*. Por ejemplo, para *A. victoria-reginae*, el 90% de los brotes axilares sobrevivieron a la aclimatación y se convirtieron en plantas sanas (Martínez-Palacios *et al.*, 2003). Otras especies de *Agave* han sido micropropagadas exitosamente, aunque no están aún amenazadas de la extinción, entre estas: *Agave parrasana* Berger (Santacruz *et al.*, 1999). En otras especies de agave que aún no se encuentran amenazadas o en peligro de extinción como: *A. cantala* Rob. (Binh *et al.*, 1990), *A. sisalana* Perrine (Bihn *et al.*, 1990), *A. victoria-reginae* Moore (Rodríguez-Garay *et al.*, 1996), *A. salmiana* Otto ex. Sal, *A. mapisaga* Trel utilizando como explante semillas y rizomas, *A. tequilana* Weber (Portillo *et al.*, 2007), *A. inaequidens* Koch (Aureoles-Rodríguez *et al.*, 2008), *A. americana* (Chen *et al.*,

2014), *A. angustifolia* Haw (Monja-Mio *et al.*, 2015), *A. potatorum* Zucc (Luna-Luna *et al.*, 2017) y *A. marmorata* (Aguilar y Rodríguez, 2018).

4.4. Requerimientos básicos para una propagación efectiva

El medio de cultivo. - Debe contener todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas. Está compuesto principalmente de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, otros componentes orgánicos, reguladores de crecimiento como auxinas, citoquininas y giberelinas, fuentes de carbono como la sacarosa y agentes gelificantes como el agar para medios sólidos. El medio de Murashige y Skoog (MS) es el más usado para la propagación vegetativa de diversas especies de plantas. Este es considerado la base para la propagación de una infinidad de plantas, donde las modificaciones principalmente esta relacionadas con las concentraciones de hormonas y otros estimulantes del crecimiento.

Los reguladores del crecimiento de las plantas (PGRs). - Este tipo de moléculas juegan un rol esencial en este tipo de ensayos, ya que determinan la vía de crecimiento de las células y tejidos vegetales que son inducidos mediante el medio de cultivo. Por ejemplo, las citoquininas promueven la división celular e induce la formación de raíz, incluyendo la proliferación de brotes axilares, en este grupo de PGR's se encuentran moléculas ampliamente usadas en los cultivos vegetales, entre estas: 2,4-D (Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético), BAP (6-Bencilaminopurina), NAA (Ácido 1-Naftalenacético), BA (6-Benciladenina), KIN (Kinetin), ZEA (Zeatina), 2iP (6- γ , γ -dimetilaminopurina), TDZ (Thidiazurón). Las

auxinas son utilizadas para la formación de tejido radicular y crecimiento las más utilizadas son: ANA (Ácido 1-naftalenacético), 2,4-D (Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético), AIA (Ácido indol-3-acético), AIB (Ácido 4-indol-3-butírico), NOA (Ácido naftoxi-2-acético), Dicamba y el Picloram mayormente usadas. En el grupo de las giberelinas se utiliza GA3 (Ácido giberélico 3) para amentar el crecimiento y para promover el alargamiento de las células (Hussain *et al.*, 2012).

Tabla 1. Técnicas de micropropagación más usadas a partir de diferentes explantes de especies de *Agave*.

Espece	Fuente de explante	Técnica de micropropagación	Referencia
<i>A. fourcroydes</i>	Rhizoma y tejido del tallo	Organogénesis indirecta	Robert et al., 1987.
<i>A. arizonica</i>	Bulbos	Organogénesis indirecta	Powers et al., 1989.
<i>A. sisalana</i> , <i>A. fourcroydes</i> , <i>A. cantala</i>	Estolones	Organogenesis directa	Binh et al., 1990.
<i>A. victoria-reginae</i> <i>Moore</i>	Hojas jóvenes de plantas <i>in vitro</i>	Embriogenes somática directa	Rodríguez-Garay et al., 1996.
<i>A. perrasana</i>	Ramas de multiplicación <i>in vitro</i>	Organogenes directa	Santacruz-Ruvalcaba et al., 1999.
<i>A. sisalana</i>	Hojas y rizoma inmaduro <i>in vitro</i>	Embriogenes somática Organogénesis indirecta	Hazra et al., 2002.
<i>A. vera-cruz Mill</i>	Ápices: cotiledones y segmentos de hojas, semillas	Brotación Embiogenes somática indirecta	Tejavathi et al., 2007
<i>A. grijalvensis</i>	Germinación de semillas <i>in vitro</i>	Brotación Organogénesis directa	Sánchez-Urbina et al., 2008

<i>A. tequilana var. Azul</i>	Callo de plantas <i>in vitro</i>	Organogénesis indirecta: callo Embriogenes somática Embiogenes somática indirecta	Santacruz-Ruvalcaba et al., 2009.
<i>A. salmiana</i>	Plantas formadas de germinación <i>in vitro</i>	Brotos axilares Organogénesis directa	Puente-Garza et al., 2015.
<i>A. americana</i>	Meristemo	Callo y brotación Organogénesis indirecta	Lecona-Guzmán et al., 2017.
<i>A. americana</i>	Brotos extraídos de rizomas	Embriogenes somática, callo Embiogenes somática indirecta	Naziri et al., 2019.
<i>A. peacockii</i>	Brotos de rizoma	Brotación Organogénesis directa	Delgado-Aceves et al., 2022.
<i>A. angustifolia</i>	Plantas <i>in vitro</i>	Brotación Organogénesis directa	Monja-Mio et al., 2021.
<i>A. guiengola</i>	Segmentos de tallo	Brotos axilares Organogénesis directa	Chávez-Ortiz et al., 2021.
<i>A. tequilana</i>	Hijuelos	Organogénesis directa	Angeles-Espino et al., 2012.

4.5. Micropropagación *in vitro* una alternativa para la restauración y conservación genética.

La técnica de cultivo de tejidos *in vitro* de plantas usa células, tejidos, órganos o plantas completas libre de microorganismos patógenos, donde éstas se encuentran bajo condiciones nutricionales y ambientales controlados (Thorpe, 2007) y es ampliamente utilizada para producir clones de los tejidos. La técnica depende de la totipotencia que tengan las células vegetales para expresar el genoma completo (Haberlandt 1902). La multiplicación del tejido resulta de inducir continuas divisiones

celulares mitóticas y la organogénesis ocurre a partir de tejidos somáticos, yemas o meristemas (Miguel-Luna *et al.*, 2014).

Una alternativa de uso de la micropropagación se enfoca a multiplicar plantas *in vitro* de importancia económica (Martínez-Palacios *et al.*, 2003) y para la conservación de germoplasma (Pedrosa-Manrique *et al.*, 2008), debido a que varias especies están disminuyendo por su explotación no planificada (Semarnat, 2010). La micropropagación presenta cuatro etapas principales: 1) establecimiento del cultivo, 2) desarrollo y multiplicación, 3) enraizamiento y 4) aclimatación de las plántulas. A estas se añade una etapa previa, considerada como la etapa 0 que implica la preparación de los explantes para el establecimiento, desde eliminar las contaminaciones que el tejido pueda contener y la selección de su calidad: buscando el tipo del órgano, edad ontogénica y fisiológica del mismo, el tamaño y el estado sanitario general de la planta donante.

Tabla 2. El uso de la micropropagación en la conservación y/o restauración a nivel mundial.

Importancia	Especies	Tipo de cultivo	País	Referencia
Conservación y restauración cultural medicinal y ceremonial	<i>Turbinicarpus sp.</i>	Cultivo in vitro	México	Balick, M. K et al., 2020. Carlín et al., 2015.
Medicinal Aromáticas	<i>Achillea occulta L.</i> <i>Amsonia orientalis</i>	Organogenes directa e indirecta		Grigoriadou et al., 2019.; Cui et al., 2019.; Komakech et

	<i>Decne.</i> <i>Anthyllis</i> <i>spendens</i> L. <i>Calamintha</i> <i>cretina</i> Mill. <i>Prunus africana</i> Hook. <i>Magnolia</i> <i>sirindhorniae</i> Noot. <i>Cicer</i> <i>micropgyllum</i> Benth.			al., 2020.; Singh et al., 2019.
Comida Maderable	<i>Castanea</i> <i>americana</i>	Transgénico, modificado		Barnhill-Dilling et al., 2019.
Medicinal	<i>Gentiana kurro</i>	Cultivo brotación	India	Sharman, 2001.
Medicinal	<i>Eucalyptus spp.</i>	Cultivo in vitro	Australia, Tasmania	McComb et al., 1996.
Medicinal Pigmentos	<i>Rhinacanthus</i> <i>nasutus</i>	Cultivo in vitro	Suroeste de Bengala	Reshi et al., 2018.
Medicinal	<i>Gethyllis</i> <i>multifolia</i>	Hidrocultura	Worcester, Sudáfrica	Daniels et al., 2007.
Medicinal Alimento	<i>Agathosma</i> <i>betulina</i>	Micropropagación	Western cape, Sudáfrica	Witbooi et al., 2013.
Ornamental	<i>Epithelantha</i> <i>micromeris</i> (Engelm.)	Organogénesis directa	México	Villavicencio- Gutiérrez et al., 2012.
Medicinal	<i>Wrightia</i> <i>tinctoria</i>	Tejido de raíces y tallos	Nigeria	Supinrach et al., 2014.
Ornamental	<i>Sequoiadendron</i> <i>giganteum</i>	Cultivo meristemático	Sierra Nevada, USA	Barron et al., 2020.

Alimento Ceremonial	<i>Solanum tuberosum</i>	Explante de nódulos, microtuberización	Distribución global	Kim et al., 2019.; Vollmer et al., 2021.; Uchendu et al, 2016.; Parra- Rondinel et al., 2021.
Maderable Comida Ornamental	<i>Sorbus gemella</i> <i>S. omissa</i> <i>S. torminalis</i> <i>S. aucuparia</i>	Germinación de semillas y brotación	Europa	Dujícková, et al., 1991.; Malá et al., 2005.; Malá et al., 2009.; Chalupa, V., 1983.; Chalupa, V., 1987.; Lall, et al, 2006.; Sedivá et al., 2023.
Especies arbóreas importantes	<i>Ficus americana</i> Aubl. <i>F. obtusifolia</i> Kunt.	Germinación de semillas y propagación	Perú	Delgado- Paredes et al., 2023.
Especies arbóreas importantes	<i>Ramonda</i> <i>serbica</i> <i>R. nathaliae</i>	Organogenes directa e indirecta de semillas y explantos de hojas	Europa	Gashi et al., 2014.
Medicinal	<i>Allium sativum</i>	Micropropagación	México	Tirado et al., 2023.
Vegetación nativa	<i>Beaucarnea</i> <i>gracilis.</i> <i>B. recurvata</i>	Organogénesis directa	México	Osorio- Rosales y Mata-Rosas, 2005.

4.6. La fertilización nitrogenada causa un estrés químico y altera la diversidad microbiana en suelos y plantas (Fragmento del artículo publicado en *Symbiosis* 84, 379–390 (2021))

En los últimos tiempos se ha reconocido que las prácticas agrícolas como actividad antropogénica son un factor influyente del cambio climático. Por ejemplo, se han notificado emisiones de N_2O (un gas de efecto invernadero con un potencial de calentamiento 300 veces mayor que el del CO_2) procedentes de fertilizantes nitrogenados (Skiba y Rees 2014). Se ha determinado que solo entre el 10 y el 30% de los fertilizantes aplicados son absorbidos y utilizados directamente por las plantas (Beltran-Garcia et al. 2014). Por otra parte, Fukamachi et al. (2019) demostraron que el 0.1% de los pesticidas químicos alcanzan su objetivo en controlar las plagas. En consecuencia, grandes cantidades de las sustancias aplicadas se lixivian en el suelo y el agua circundantes, contaminando el medio ambiente (Fukamachi et al. 2019).

Además, las prácticas agrícolas basadas en la fertilización con nitrógeno a largo plazo han reducido la diversidad microbiana en el suelo e influyen en las comunidades microbianas que colonizan los tejidos externos e internos de las plantas, alterando así los procesos simbióticos mantenidos evolutivamente (Porter y Sachs 2020; Xiang et al. 2020). De hecho, se ha demostrado que los suelos forestales nativos tienen una mayor diversidad bacteriana que los suelos agrícolas (Roesch et al. 2007; Turner et al. 2013; Wu et al. 2020). Esta observación refuerza

la idea de que las prácticas agrícolas, en general, conducen a la pérdida progresiva de la funcionalidad del suelo para apoyar los cultivos modificando la composición microbiana de los suelos. Las enmiendas continuas del nitrógeno suprimen la respiración de los microbios del suelo, alteran los valores de pH (la acidificación del suelo es el resultado de la nitrificación, la oxidación del amonio a nitritos y luego a protones liberadores de nitratos) e incrementan los potenciales osmóticos del suelo. Además, la fertilización con nitrógeno puede inhibir directamente a los microorganismos, incluyendo bacterias y arqueas que oxidan amonio, debido a las altas concentraciones de amonio (Guo et al. 2010; Prosser and Nicol 2012; Yang et al. 2021). La fertilización también influye en la absorción de nutrientes minerales por las plantas. Curiosamente, se demostró que los fertilizantes nitrogenados inducen un cambio de α -proteobacteria a γ -proteobacteria, lo que promueve cambios en la desnitrificación, la nitrificación y la fijación de nitrógeno (Yang et al. 2015). También se ha informado que la N-fertilización reduce las poblaciones de bacterias y hongos que secretan ácidos orgánicos o fitasas, afectando indirectamente a la absorción de fosfato por las plantas (Yang et al. 2021).

Otro efecto perjudicial de la N-fertilización en los cultivos está relacionado con la defensa y la tolerancia al estrés, lo que hace a las plantas más susceptibles a plagas y patógenos y limita la productividad de los cultivos (Arif et al. 2020). Los efectos de los fertilizantes nitrogenados sobre la alteración de la diversidad microbiana y sus procesos simbióticos en ecosistemas y plantaciones agrícolas son complejos y están sujetos a muchas variables (por ejemplo, factores abióticos, patógenos, altitud, tipo de suelo, textura de suelo y más). Sin embargo, todavía tenemos un

conocimiento limitado de si existe un umbral para el nivel de entrada de nitrógeno más allá de las transiciones críticas de las comunidades microbianas (Li et al. 2021). La reconstitución de la diversidad microbiana y la restauración de los servicios simbióticos y la dinámica entre los componentes microbianos del suelo y los microbios endófitos son desafíos significativos. La figura 2 resume gráficamente los efectos del manejo agrícola sobre la alteración de la simbiosis y la pérdida de diversidad microbiana en los suelos y las plantas.

La figura 2 propone que, para una producción de alto rendimiento, los agricultores utilizan grandes cantidades de nitrógeno (tanto inorgánico como orgánico) y pesticidas. Las formas de nitrógeno aplicado afectan a los servicios microbianos simbióticos. El uso de nitratos como N-fertilizante en leguminosas altera la funcionalidad de los nódulos, causando senescencia e inhibiendo la actividad de nitrogenasa a través de la formación de óxido nítrico (NO). Las enmiendas N modelan el suelo y las comunidades bacterianas endófitas. Ambas situaciones aumentan la necesidad de más insumos de fertilizantes para apoyar la producción. Sin embargo, se observará un incremento de los costes económicos y nuevas plagas. Las interacciones perturbadas entre plantas y microbios hacen que los cultivos dependan más de los insumos agrícolas y sean menos sostenibles.

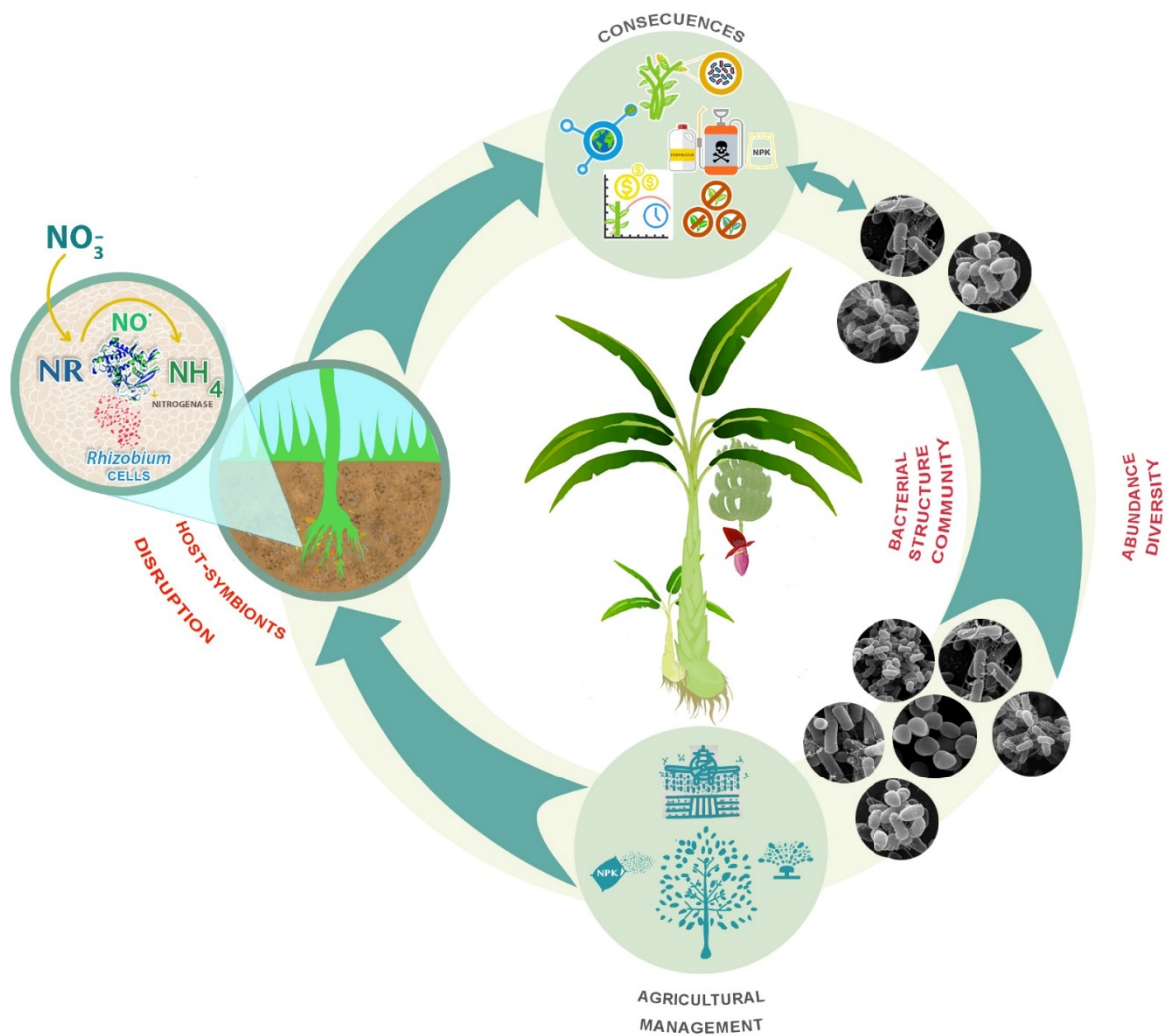


Figura 2. Efectos de la interrupción de la simbiosis en la producción agrícola y los cambios en la estructura microbiana de las comunidades causados por el manejo agrícola (N-inorgánico y N-orgánico a largo plazo, riego hídrico, etc.).

4.6.1. Las aplicaciones a largo plazo y excesivas de N-fertilizantes influyen en la diversidad microbiana

La adición de nitrógeno exógeno, fósforo y carbono a los suelos agrícolas determinan la composición microbiana de las plantas (Fierer and Lennon 2011; Howard et al. 2020). Las aplicaciones excesivas de amonio mineral causan la acidificación del suelo, el cambio en la estructura de la comunidad bacteriana y reducen la diversidad fúngica asociada con la actividad metabólica y las funciones biológicas en el suelo (Bai et al. 2020). La adición de urea como fertilizante del suelo primero aumenta el pH debido al proceso de hidrólisis de la urea y luego disminuye el pH debido a la oxidación de NH_3 . Se ha informado que el pH del suelo es el factor principal que conduce a diferencias de especialización entre los microbios del suelo, afectando la composición de la comunidad bacteriana del suelo en biomas y regiones donde los valores de pH del suelo oscilan entre 4,5 y 8,5 (Lauber et al. 2009; Bartram et al. 2014).

La fertilización prolongada de amonio puede aumentar la abundancia de bacterias oxidantes del amonio (AOB) y disminuir la abundancia total de bacterias en el suelo en comparación con las aplicaciones bajas o nulas de nitrógeno (Lingling et al. 2019). La abundancia de AOB a 0-20 cm de profundidad es mucho mayor que a 20-40 o 40-60 cm, lo que sugiere alteraciones en los componentes microbianos que están presentes y funcionan normalmente en estas profundidades del suelo (Dai et al. 2021). También se han medido los cambios en la diversidad de AOB para la fertilización orgánica. Tao et al. (2021) mostraron que los AOB son sensibles y no

resistentes al uso de estiércol bovino como enmienda orgánica, induciendo cambios distintos en el contenido de la comunidad de AOB y *Archaea* oxidantes de amoníaco (AOA) después de 85 días en comparación con la aplicación de urea. En cambio, la comunidad de AOA se mostró resistente. Cabe mencionar que las copias de los genes AOB eran de un orden de magnitud mayor que la de AOA, lo que sugiere que la nitrificación es impulsada por las AOB (Tao et al. 2021). Los genes funcionales de los microbios del suelo implicados en el ciclo del carbono, el nitrógeno y el fósforo se ven disminuidos por la fertilización a largo plazo.

Hu et al. (2019) mostraron que la fertilización con nitrógeno redujo la abundancia y la diversidad de Shannon de los genes *nifH* en un 47%. Bajo la N-fertilización a largo plazo, la comunidad diazotrófica estuvo dominada por α -Proteobacteria (*Bradyrhizobium* a nivel de género) pero disminuyó en β -Proteobacteria (*Azoarcus*, *Azohydromonas*) y Cianobacteria (*Anabaena*), sin afectar significativamente la abundancia relativa de δ -Proteobacteria, Verrucomicrobia y Firmicutes. La disminución del gen *nifH* está relacionada con el aumento de la disponibilidad de NH_4 y NO_3 , que satisfacen los requisitos de nitrógeno de los microorganismos (Tan et al. 2003). En cambio, el uso de fósforo como fertilizante aumenta significativamente la abundancia de *nifH*.

Si bien existen preocupaciones asociadas con la aplicación prolongada de nitrógeno, los informes indican un aumento significativo en la diversidad procariótica. Por ejemplo, Li et al. (2021) mostraron que la fertilización inorgánica a largo plazo (19 años) imparte impactos positivos en la biodiversidad bacteriana en suelos de arroz, donde los regímenes de gestión del agua estaban involucrados.

También, Kracmarova et al. (2020) reportaron cambios positivos en la diversidad microbiana del suelo y la actividad enzimática después de 20 años de aplicación periódica de fertilizantes orgánicos y químicos en comparación con los suelos sin aplicaciones, contribuye aproximadamente con un 15,7% a la varianza de la comunidad procariótica. Estos resultados contrastan con los obtenidos por muchos otros grupos en los que la reducción de la diversidad microbiana perturbó el equilibrio entre la adquisición y transformación del N, creando un círculo vicioso que hace que el sistema agrícola en su conjunto dependa aún más de las entradas externas de N (Huang et al. 2019; Liang et al. 2020; Liu et al. 2021a, b). Los resultados contrastantes en suelos con fertilización prolongada pueden ser el resultado de otros factores, como el tipo de suelo (Fierer y Jackson 2006).

También se ha propuesto que los tipos de uso del suelo están estrechamente asociados con comunidades microbianas distintas a nivel regional (Drenovsky et al. 2010; Fierer et al. 2012). Recientemente, Lee et al. (2020) informaron sobre variaciones en la estructura de las comunidades bacterianas en los suelos de invernaderos, huertos, arrozales y tierras altas recolectados en Corea.

Las propiedades químicas del suelo dependían de las prácticas de manejo agrícola y se relacionaban con variaciones en las comunidades bacterianas en diferentes tipos de uso agrícola de la tierra. Por ejemplo, los suelos de arrozales tenían valores de pH relativamente más bajos que otros tipos de uso del suelo y los invernaderos presentaban una conductividad eléctrica más elevada, P_2O_5 disponible y valores de cationes intercambiables. Además, los sistemas de huertos y tierras altas cultivados con plantas perennes y anuales en campo abierto presentaron propiedades

químicas del suelo similares. Las especies de cultivos afectaron el microambiente del suelo debido a diferencias en los exudados de la raíz. Las distribuciones de los taxones bacterianos Firmicutes, Chloroflexi y Acidobacteria se enriquecieron en los suelos de invernadero, arrozales y huertos. Por ejemplo, las bacterias acidófilas eran abundantes en los suelos de arrozales y huertos. De las 40 filas identificadas en este estudio, ocho tenían una abundancia relativa mayor que el 1%, siendo las filas Proteobacteria (32,7%), Acidobacteria (14,9%) y Actinobacteria (10,5%) las dominantes. Las bacteroidetes (10,3%) y las firmicutes (8,8%) fueron más altas en los suelos de invernadero (Lee et al. 2020).

Por otra parte, varios estudios sugieren que la adición de grandes cantidades de minerales N-fertilizantes (alrededor de 350-450Kg Ha⁻¹ año⁻¹) desplazan hacia arriba la abundancia relativa de Proteobacteria, Bacteroidetes y Gemmatimonadetes, y causa una reducción en Chloroflexi, Acidobacteria, Nitrospirae y Planctomycetes (Yao et al. 2020; Zhang et al. 2017; Nie et al. 2018). A nivel de clase, el porcentaje de α -Proteobacteria disminuyó, mientras que el de β -Proteobacteria y γ -Proteobacteria aumentó. La fertilización a largo plazo redujo las clases Acidobacteria, Holophagae y Solibacteria (Huang et al. 2019).

Otros estudios indicaron que la adición de nitrógeno disminuía la abundancia relativa de los taxones oligotróficos representados por grupos taxonómicos Planctomycetes y Chloroflexi phyla y aumentó la abundancia relativa de taxones copiotróficos representados por Proteobacteria, Actinobacteria y Firmicutes (Bai et al. 2020; Liu et al. 2020a, b; Schlatter et al. 2020). Esta observación no es del todo sorprendente, dado que los taxones bacterianos copiotróficos pueden proliferar

rápidamente en suelos ricos en nutrientes (es decir, con N suplementado). Por otro lado, los grupos oligotróficos crecen lentamente y se acumulan en suelos con nutrientes limitados (Koch 2001).

4.6.2. La agricultura organica también altera la diversidad microbiana

Los sistemas de bajo consumo, como la agricultura orgánica, reducen sustancialmente el uso de fertilizantes y plaguicidas sintéticos, así como la energía y las tensiones mecánicas. Estos enfoques tienen por objeto mitigar los efectos adversos y mejorar la producción sostenible. Sin embargo, todavía no se ha comprendido cómo la agricultura de bajo consumo modifica la diversidad del suelo y los microbios asociados a las plantas. Francioli et al. (2016) midieron cambios en la diversidad microbiana en suelos tratados con fertilizantes orgánicos (estiércol de corral: 20 toneladas ha⁻¹ de estiércol bovino) durante cuatro años con rotación de cultivos.

Los autores encontraron que los parámetros del suelo estaban fuertemente influenciados por la aplicación a largo plazo de fertilizantes minerales y orgánicos. La valoración de la diversidad y riqueza bacterianas fueron significativamente más altos en suelos fertilizados con estiércol de granja que en suelos con proteobacterias copiotróficas (α -proteobacteria y γ -proteobacteria) y Firmicutes mostrando una mayor abundancia. En contraste, Actinobacteria y Chloroflexi fueron más altos en los suelos fertilizados químicamente (es decir, NPK), y los suelos no fertilizados mostraron una mayor proporción de Acidobacteria y Nitrospirae. No hubo

diferencias significativas en la diversidad fúngica ($p = 0,22$, índice de Shannon). Este trabajo y otros informes recientes han demostrado que la fertilización orgánica a largo plazo puede aumentar o disminuir la diversidad bacteriana, lo que lleva a alteraciones significativas en la estructura de la comunidad microbiana del suelo agrícola (Hartmann et al. 2014; Kurzemann et al. 2020; Liu et al. 2021a, b; Su et al. 2021; Ye et al. 2021). De hecho, la fertilización orgánica a largo plazo puede estimular el crecimiento de taxones copiotróficos y suprimir el crecimiento de bacterias oligotróficas como las acidobacterias y el cloroflexio. Para los hongos, la fertilización orgánica a largo plazo redujo la abundancia relativa de hongos patógenos y aumentó la de hongos saprotrofos en suelos de arrozales (Wang et al. 2019).

Es bien conocido que la fertilización orgánica facilita la agregación del suelo al aumentar la materia orgánica, que actúa como agente de unión para las partículas del suelo y remodela las comunidades microbianas del suelo. Estudios anteriores han informado de que el aumento de macroagregados del suelo a través de la aplicación de enmiendas orgánicas, microbios copiotróficos y fertilizantes bioorgánicos (por ejemplo, *Bacillus amyloliquefaciens* más harina de colza y abono de pollo), desencadenan microagregados que favorecen a las bacterias oligotróficas (Zou et al. 2018; Dong et al. 2021; Merino-Martin et al. 2021).

4.6.3. La diversidad endófitas de los microbios también se ve afectada por la fertilización orgánica y convencional

En general, los endófitos son microbios del suelo o que son transportados por las semillas (hongos y bacterias) que las plantas mantienen en sus tejidos. Los microorganismos bien establecidos en las plantas se mantienen a lo largo de las generaciones y se convierten en componentes integrales de las plantas y se consideran probióticos vegetales, ya que promueven el crecimiento de las plantas, aumentan el rendimiento de los cultivos y ofrecen resistencia a las enfermedades en condiciones ambientales adversas (Beltran-Garcia et al. 2014; Macedo-Raygoza et al. 2019; Dini-Andreote 2020; Bradshaw y Pane 2020; Gupta et al. 2020). Los microbios endófitos son más abundantes en las raíces que en los tallos, hojas y semillas. La diversidad de endófitos bacterianos que habitan las plantas también se ha considerado un factor agrícola en la mejora de los rendimientos de los cultivos (White et al. 2019). Si bien son pocos los estudios que han evaluado la influencia de las prácticas agronómicas, especialmente de los regímenes prolongados de fertilización en nitrógeno o de fertilización orgánica sobre las comunidades endófitas, un estudio reciente demostró que los microbiomas endófitos y los hospederos de plantas utilizan estrategias para mantener la simbiosis y maximizar el crecimiento, la salud y el rendimiento de las plantas (Adeleke y Babalola 2021). Además, otros estudios han demostrado que la aplicación a largo plazo de N-fertilización afecta a las comunidades endófitas bacterianas en plantas de cultivo perturbando la colonización de las comunidades bacterianas fijadoras de nitrógeno

en las raíces y partes aéreas de las plantas (Fuentes-Ramírez et al. 1999; Seghers et al. 2004; Wemheuer et al. 2017).

Collavino et al. (2020) mostraron que la fertilización inorgánica (NPK) afecta negativamente a la diversidad de comunidades diazotróficas endófitas en plantas de tomate cultivadas en un invernadero. Los taxones más abundantes identificados incluyen endófitos naturales como *Rhizobium*, *Burkholderia* y bacterias anaerobias como *Clostridium*, *Geobacter* y *Desulfovibrio*. Los investigadores encontraron que la N-fertilización redujo las poblaciones de *Burkholderia*, *Geobacter* y *Cyanobacteria* y modificó la diversidad del contenido del gen *nifH* como lo demuestran los perfiles predominantes de filotipos bacterianos.

Mareque et al. (2018) mostraron que la fertilización del sorgo dulce en campo abierto con nitrógeno a 100 kg Ha^{-1} causó alteraciones en la estructura primaria y la abundancia de la comunidad bacteriana diazotrófica-endófitas pero no afectó la diversidad. Hubo una tendencia de la N-fertilización a aumentar la abundancia bacteriana en las raíces donde la diversidad era menor, pero este resultado no alcanzó un nivel significativo de estadística. Además, sólo las plantas cultivadas sin fertilización mostraron cambios en la abundancia del gen *nifH*. Por lo tanto, en ausencia de N-fertilización, las plantas reclutan bacterias diazotróficas que contribuyen al crecimiento de las plantas a través del proceso de fijación biológica de nitrógeno, como se observa en el arroz cultivado en ambientes pobres en N (Sessitsch et al. 2012).

En relación con la fertilización orgánica, Xia et al. (2015) detectaron diferencias notables en la abundancia y diversidad de bacterias endófitas cultivables de cuatro

cultivos principales. Este estudio mostró que la abundancia relativa de especies y la diversidad de endófitos bacterianos eran mayores en plantas cultivadas orgánicamente que en aquellas cultivadas con prácticas convencionales. El índice de diversidad de Shannon reveló que la diversidad endófito en tejidos como brotes y raíces era similar, y solo las semillas tenían la menor diversidad. Cabe mencionar que el cultivo orgánico enriquece la rizosfera y mantiene altos valores de pH. Un estudio metagenómico (Fadiji et al. 2020) también identificó cambios en la diversidad y estructura de los endófitos bacterianos asociados a las raíces de plantas de maíz dependiendo del esquema de manejo de fertilización empleado. Los autores encontraron que las Bacteroidetes dominaban en cultivos manejados con fertilizante orgánico (OF), las Firmicutes dominaban cuando no se aplicaba ningún fertilizante (NF) y las Proteobacteria (Gammaproteobacteria y Betaproteobacteria) dominaban cuando se utilizaba fertilizante inorgánico (IF). Un análisis de diversidad posterior mostró que la abundancia de bacterias endófitas fue mayor para el tratamiento de fertilización orgánica. Las actividades metabólicas de los endófitos vinculadas al metabolismo del nitrógeno y fósforo también fueron mayores en el grupo de fertilización orgánica. Se planteó la hipótesis de que la combinación de fertilizantes orgánicos e inorgánicos era más eficaz para aumentar y dirigir la diversidad bacteriana, aumentando así la producción de cultivos y teniendo menos impacto en los servicios simbióticos.

Como se ha mencionado anteriormente, las comunidades microbianas del suelo y de los endófitos se ven afectadas por la fertilización química con nitrógeno. Como resultado, las plantas muestran funciones metabólicas modificadas, dependencia

de fertilizantes químicos o una mayor sensibilidad a ambos tipos de estrés, lo que se refleja en última instancia en el rendimiento de los cultivos. El enriquecimiento orgánico de nutrientes (es decir, estiércol, compost o combinaciones de los mismos) influyen en la composición del microbioma del suelo al modular las interacciones bioquímicas entre las raíces de las plantas y reclutar otros microbios del suelo como endófitos potenciales. Aunque nos hemos centrado en las bacterias, es importante mencionar que las prácticas agrícolas alteran la complejidad de la red y la abundancia de taxones fúngicos en las raíces (Banerjee et al. 2019). En particular, la fertilización con nitrógeno también puede promover la desaparición de endófitos fúngicos, provocando que los microorganismos del suelo se conviertan en patógenos o generando una mayor necesidad de pesticidas para controlar nematodos y hongos patógenos (Garnica et al. 2020; Soonvald et al. 2020). Se deben realizar más estudios para comprender la importancia de los cambios en la estructura de las comunidades microbianas en suelos y plantas con fines agrícolas. Este conocimiento podría predecir las alteraciones que se producirán en los servicios ecológicos de las plantas en bosques, montañas y manglares.

4.7. Estrés multifactorial y su impacto en las plantas y sus microorganismos (fragmento del capítulo de libro Beltran-Garcia MJ., Martinez-Rodriguez, A. *et al.*, 2024 in Sustainable Agricultural Practices, Editor(s): Ajay Kumar, James F. White, Joginder Singh)

Los cultivos están sometidos constantemente a condiciones de tensión que reducen el rendimiento de las plantas. Las plantas poseen una serie de mecanismos protectores adquiridos durante la evolución para hacer frente a las situaciones ambientales adversas. La respuesta sistémica de la planta frente a un tipo (biótico o abiótico) o combinaciones de estrés reveló un complejo mecanismo de percepción y aclimatación que incluye la acumulación de diferentes transcritos y metabolitos, así como diversas respuestas celulares y moleculares para mantener la homeostasis permite la adaptación y/o supervivencia a las agresiones ambientales cambiantes (Zandalinas et al., 2021a, 2022; Zandalinas y Mittler, 2022).

Las plantas son "holobiontes", un concepto biológico propuesto por Lynn Margulis que explica la asociación simbiótica con una compleja red de microorganismos sometidos a procesos de adaptación y ajustes que les han permitido amortiguar los cambios ambientales con rapidez y precisión (Baedke et al., 2020). Las bacterias y hongos forman asociaciones simbióticas en las raíces, tallo o hojas. Los microbiomas de las plantas situados en la filosfera y rizosfera son heterogéneos y transitorios. Sin embargo, el microbioma endófito es altamente específico, y su diversidad está ligada a la inmunidad de las plantas que permite su establecimiento en la endosfera y, al mismo tiempo, contribuye a la resistencia del estrés vegetal. Las capacidades metabólicas y genéticas intrínsecas de los micromomas vegetales

mejoran la capacidad de las plantas para tolerar tensiones multifactoriales (Dixit et al., 2019; Phour y Sindhu, 2022; Salvi et al., 2022).

4.7.1. Respuestas de las plantas a la combinación de estrés multifactorial

En el medio ambiente, las plantas están expuestas a diferentes condiciones de estrés que afectan negativamente su productividad. El concepto de estrés a nivel fisiológico puede definirse como cualquier condición que sea letal para la reproducción y supervivencia de las plantas. El estrés que afecta a las plantas se ha clasificado típicamente como abiótico y asociado con el cambio climático (olas de calor, frío, inundaciones y sequía prolongada) y biótico (ataque de insectos y plagas microbianas patógenas). Recientemente se han añadido contaminantes a la lista de factores que provocan las plantas y están vinculados con actividades antropogénicas, como los metales pesados, los microplásticos, los plaguicidas y los antibióticos. Además, el aumento de la radiación UV, el ozono (O₃), el NO₂ y el CO₂ repercuten en la productividad de los cultivos (Zandalinas et al., 2021a; Zandalinas y Mittler, 2022; Sinha, 2021). Además, la combinación de diferentes factores estresantes, incluida la fertilización con nitrógeno, reduce la biodiversidad del microbioma vegetal (disbiosis), lo que ayuda a apoyar el crecimiento y la salud de las plantas (Beltran-Garcia et al., 2021a; Yang et al., 2021a).

Los grupos de investigación de Sara Zandalinas y Ron Mittler han integrado todos los factores de estrés que pueden afectar la productividad de los cultivos en un concepto llamado "combinación multifactorial de estrés", destacando que cada

condición de cada estrés tiene efectos sobre el crecimiento de las plantas. Sin embargo, la adición simultánea de diversos estreses abióticos provoca efectos devastadores (Zandalinas et al., 2021a). Una gran mayoría de los estudios mostraron que la combinación de estrés podría convertirse en sinérgico para la reducción del metabolismo del carbono fotosintético (por ejemplo, salinidad, sequía y altas temperaturas) en comparación con la aplicación de estrés individualmente en varias plantas (Anderson et al., 2021). Sin embargo, las combinaciones de estrés pueden ser beneficiosas para la planta (antagonistas) (Pascual et al., 2022; Zandalinas et al., 2021b; Rivero et al., 2022).

Además de activar respuestas moleculares y fisiológicas al estrés, las plantas deben reprogramar su metabolismo para mitigar el estrés y adaptarse a los cambios energéticos (Pascual et al., 2022; Balfagón et al., 2022; Anzano et al., 2022; Liu et al., 2022a; Nakashima et al., 2014). Por ejemplo, las plantas producen típicamente dos tipos de metabolitos: los metabolitos primarios que están involucrados en procesos celulares (por ejemplo, supervivencia, crecimiento y reproducción) derivados del metabolismo central (es decir, azúcares, aminoácidos, poliaminas, fosfolípidos) y metabolitos secundarios que se ven implicados en la regulación de las interacciones planta-medio ambiente, como los compuestos fenólicos, flavonoides, terpenos y moléculas de nitrógeno que se producen y también regula el desarrollo de las plantas y la respuesta al estrés.

Recientemente se ha propuesto que algunos metabolitos secundarios son multifuncionales y podrían funcionar como poderosos reguladores del crecimiento de las plantas y defenderse contra el estrés biótico y abiótico o combinaciones de estrés multifactorial (Jayaraman et al., 2021; Meraj et al., 2020; Yu et al., 2022a).

Dentro de la amplia gama de metabolitos secundarios sintetizados bajo estrés combinado, la biosíntesis de flavonoides ha atraído especialmente la atención en respuesta a la sequía, donde su síntesis implicó la expresión del factor de transcripción MYB, EGL3 (potenciador de GLABRA3), y el etileno-insensible 3 (EIN3), así como la actividad de la chalcona sintasa e isomerasa de chalcona (Dixit et al., 2019; Jayaraman et al., 2021; Hou et al., 2022; Liu et al., 2019a; Nakabayashi et al., 2013; Waititu et al., 2021). Además, se ha planteado la hipótesis de que la alta producción de flavonoides en respuesta al estrés por sequía sirve para remodelar el microbioma, Atraer bacterias beneficiosas que ayudan a aumentar la resistencia de las plantas a la deshidratación como se ha observado recientemente en *Arabidopsis* donde la atracción por los flavonoides de *Aeromonas* H1strain impulsa el cierre estomático (He et al., 2022).

4.7.2. Microbioma vegetal: la vida invisible que ayuda a las plantas contra el estrés

El microbioma vegetal es una asociación dinámica y extraordinariamente compleja de microbios que ayudan a las plantas de diversas maneras (De Faria et al., 2020; Semchenko et al., 2022). Las plantas han seleccionado estas comunidades microbianas durante millones de años de co-evolución, contribuyendo con múltiples funciones al holobionte. El microbioma vegetal se considera un segundo genoma porque es importante para regular el metabolismo de las plantas y crítico para el sistema inmunológico de la planta (Vannier et al., 2019). Estas comunidades microbianas, que incluyen bacterias, hongos, virus y parásitos,

amplían las capacidades genómicas y metabólicas de sus huéspedes contra el estrés. Sin embargo, algunos de estos microbios tienen funciones muy específicas y son considerados "piedras angulares" que trabajan en una red compleja con otros microorganismos de la misma especie, así como varias especies, géneros, clases y dominios (por ejemplo, Archaea y Eukarya) (Beltran-Garcia et al., 2021b; Tyagi et al., 2022).

Un número creciente de publicaciones muestran cómo estos componentes microbianos presentes en los microbiomas vegetales mitigan las tensiones individuales, incluyendo la sequía, el calor, el frío y la salinidad, pero falta información sobre sus papeles en la protección de las plantas bajo combinaciones estresantes (Choi et al., 2021). Estos microorganismos simbióticos de la filosfera, rizosfera y endosfera han sido considerados como la segunda línea de defensa contra el estrés abiótico y biótico (Fan et al., 2020; Hanaka et al., 2021; Verma et al., 2021; Zheng et al., 2021; Munir et al., 2022).

Las bacterias que colonizan las plantas apoyan el crecimiento y la respuesta al estrés abiótico a través de la síntesis directa de fitohormonas o regulando el antagonismo-sinergismo entre las vías de señalización de las fitohormonas y su sensibilidad. De hecho, las bacterias endófitas sintetizan directamente AUX, NO, CTKs, ABA, BRs, SA y GA tras la colonización del huésped (Park et al., 2017; Khan et al., 2011a; Mishra y Baek, 2021; Costa et al., 2022; Ma et al., 2022; Tsoetsi et al., 2022).

La cepa *Pseudomonas fluorescens* G20-18 aumenta el crecimiento del tomate y aumenta la tolerancia a la sequía. Las respuestas influyentes para la tolerancia al estrés incluyen síntesis de clorofila en las hojas y contenido de ABA. Además,

Pseudomonas activa sistemas de enzimas antioxidantes y la síntesis de compuestos fenólicos, antocianinas y flavonoides. Estos genes diferencialmente regulados eran siete veces más altos en condiciones de sequía como respuesta a la inoculación. *P. fluorescens* G20-18 produce CTKs (Mekureyaw et al., 2022). Por otro lado, *Bacillus amyloliquefaciens* de semillas de arroz produce GA que no solo aumenta la respuesta fisiológica del huésped, sino que también estimula los niveles de SA y reprimido ABA (Shahzad et al., 2016).

Además, los endófitos *Shewanella putrefaciens* y *Cronobacter dublinensis* mejoran la tolerancia a la sequía del mijo modulando los niveles de expresión de los genes en la biosíntesis de ácido absicico ABA y auxinas AUX, codificando la respuesta de transcripción a la sequía. Los factores de transcripción fueron significativamente más altos bajo estrés severo por sequía en plantas que no fueron inoculadas con endófitos (Manjunatha et al., 2022). Las bacterias productoras de AUX medían la sequía y la tolerancia a la sal aumentando la permeabilidad al agua, la absorción del agua y la detoxificación de los ROS, mejorando la arquitectura radicular e induciendo la expresión de genes resistentes al estrés (Khan et al., 2019; El Houda et al., 2022; Kour y Yadav, 2022).

También se ha informado que algunas especies de hongos endófitos exhiben funciones anti-estrés abiótico. Por ejemplo, el hongo endófito *Penicillium minioluteum* protege la soja dañada por la sal reduciendo los niveles de ABA, y *Penicillium glabrum* actúa como un protector en la soja y los girasoles disminuyendo significativamente la síntesis de ROS y la peroxidación lipídica y concentraciones

de ABA y prolina (Khan et al., 2011b; Ismail et al., 2021). Recientemente, Lubna et al. (2022) encontraron que inoculando la soja con el hongo endófito *Bypolaris sp.* bajo estrés salino, los niveles endógenos de ABA se redujeron, mientras que el SA aumentó en las plantas con hongos.

Los microbiomas de las plantas pueden proteger a los huéspedes contra los esfuerzos bióticos y abióticos y mejorar la adquisición y la absorción de nutrientes (fijación biológica del nitrógeno, solubilización del fosfato, transferencia orgánica del nitrógeno, y síntesis siderófora), puede inhibir la síntesis de etileno, y obtener amonio a través de la enzima ACC deaminasa. Los microbios vegetales sintetizan varias moléculas del tipo de los osmolitos, tales como betainas, poliaminas, compuestos de amonio cuaternario, trehalosa, glicerol, prolina, aminoácidos y melatonina para ajustar el estrés metabólico del agua en las plantas. Estos compuestos también protegen contra la oxidación de las proteínas de membrana y los fosfolípidos que funcionan como atrapadores de ROS (Bashir et al., 2022; Saleem et al., 2019; Zhang et al., 2022b; Noman et al., 2021a; Nanjani et al., 2022; Chen et al., 2022; Trivedi et al., 2020; Byregowda et al., 2022; Phour y Sindhu, 2022).

Curiosamente, los endofitos que residen dentro de los tejidos vegetales modularon la concentración de ROS y protegieron a la planta de los efectos perjudiciales de ROS durante el estrés. Los niveles de ROS se reducen sintetizando SOD, APX, CAT, ascorbato, glutatión y tocoferoles implicados en la homeostasis de ROS directamente o a través de la activación de mecanismos antioxidantes vegetales, en

la que las bacterias endófitas también inducen síntesis de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, carotenoides, entre otros (Verma et al., 2021).

Por otra parte, los endófitos inducen cambios en las plantas estresadas mediante la sobrepresión de genes tolerantes al estrés, incluidos los que participan en los genes de señalización ABA, AUX GA y JA, una mayor expresión de los canales iónicos KAT1 y KAT2, lo que da como resultado un aumento del Na⁺/K⁺ (Rani et al., 2022). Este fenómeno se conoce como tolerancia sistémica inducida (Chen et al., 2022; Mengistu et al., 2020; Bacon y White, 2016) y se refiere a una respuesta mediada por microorganismos a las respuestas de estrés abiótico de las plantas.

4.7.3. Retroalimentación reactiva de especies de oxígeno/antioxidantes para la modulación del microbioma, simbiosis, mitigación del estrés vegetal y más: muchas preguntas que requieren estudios adicionales

En todos los organismos aerobios, la síntesis de la generación de ROS es un hecho inherente a la vida celular. Las concentraciones aumentadas de ROS pueden tener efectos deletéreos en las células, pero a bajas concentraciones funcionan como moléculas de señalización para procesos celulares fundamentales (por ejemplo, crecimiento, diferenciación y muerte). Los ROS son importantes para el crecimiento de las plantas, la defensa contra patógenos y la respuesta al estrés y, junto con otras moléculas de señalización como calcio, NO y H₂S, sirven para la señalización intracelular como para las comunicaciones célula a célula durante las

tensiones bióticas/abióticas de forma independiente o en combinación con estrés multifactorial (Marcec et al., 2019; Wang et al., 2021; Singhal et al., 2021; Peláez-Vico, 2022). Por otra parte, para mantener la homeostasis de las ROS, las células vegetales activan sistemas específicos y rigurosos de eliminación de residuos, incluyendo sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, para promover el desarrollo de las plantas y estrategias de gestión del estrés que crean un asa de retroalimentación (Fig 3). Entre estas moléculas antioxidantes, los flavonoides han llamado la atención por su capacidad de acción como agentes oxidantes y quimioatrayentes bacterianos en condiciones de estrés (He et al., 2022).

Por lo tanto, las plantas deben reclutar a esos microbios con capacidades para superar el estrés oxidativo y reemplazar a los colonos naturales, recuperándose de la disbiosis y mejorando la tolerancia de la planta al estrés (Fig.3).

Las ROS son esenciales para modular el microbioma vegetal en condiciones estresantes y durante el desarrollo de la planta (Berrios y Rentsch, 2022). La producción de ROS puede ser por plantas o los microbios endófitos, activando la inmunidad de las plantas y coordinando la abundancia y diversidad de comunidades microbianas (Verma et al., 2021; Oukala et al., 2021). Para la producción de ROS, una oxidasa alternativa RBOHD (burst respiratory homolog D) facilita la producción de ROS junto con otras vías de señalización, incluyendo la activación de la inmunidad y las vías de tráfico vesicular, que podría explicar cómo la homeostasis microbiana revierte la disbiosis (Chen et al., 2020). Además, RBOHD es un punto de convergencia para el reconocimiento microbiano, la señalización por estrés y la respuesta de las plantas al estrés biótico y abiótico (Pfeilmeier et al., 2021; Liu et al., 2022c). La producción de ROS estimulada por la RBOH de la membrana y la

señalización que activa la respuesta antioxidante crea un asa de retroalimentación asociado con interacciones simbióticas entre plantas y microorganismos. Se ha demostrado que las ROS participan en muchas etapas de la interacción leguminosa-rizobio, desde la infección por rizobios hasta la senescencia del nódulo. Las ROS se producen desde la percepción de los factores de Nod (como los lipoquitooligosacáridos bacterianos); este hecho se ha medido a través de la inducción de genes antioxidantes en respuesta a la compatibilidad (Minguillón et al., 2022; Hawkins y Oresnik, 2022).

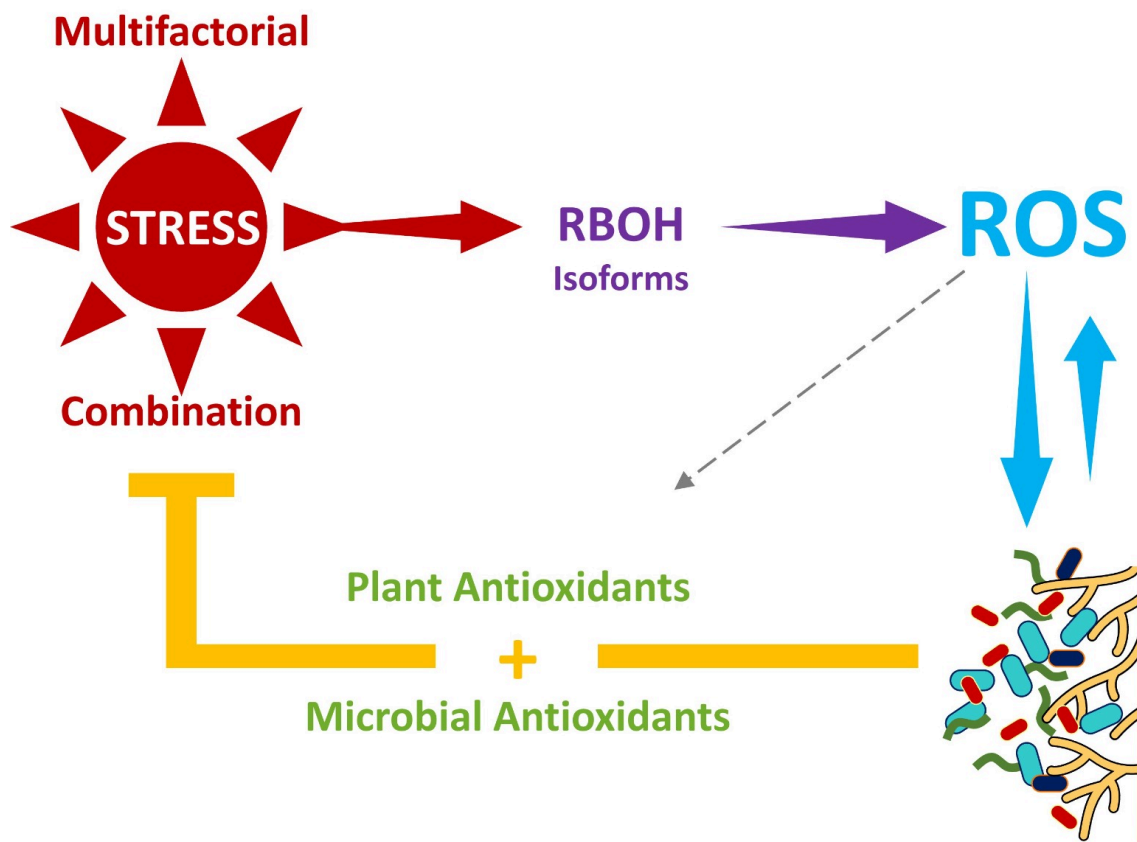


Figura 3. Relación planta-microbioma para la modulación microbiana para mejorar la resistencia de las plantas vinculada a ros-antioxidante retroalimentación. El estrés

de las plantas activa la producción de ROS y estimula directamente una respuesta antioxidante en las plantas o activa microbios que atenúan el ROS. Bajo un asa de retroalimentación, las plantas permiten la colonización, establecen simbiosis y soportan el estrés.

En los frijoles *Phaseolus*, después de 3 minutos de percibir el factor NOD, los pelos de la raíz liberan ROS (Arthikala et al., 2017). La producción de O_2^- y H_2O_2 es esencial para una infección eficaz y la liberación de rizobios en las células del nódulo. Es interesante que el H_2O_2 se haya detectado específicamente en los espacios intercelulares y/o las paredes de las células vegetales en nódulos indeterminados y determinados. Esta producción de ROS depende de la actividad de las isoformas RBOHA/RBOHB, la CuZnSOD y otras enzimas oxidasas, que influyen en la formación de nódulos y el metabolismo. En los frijoles comunes, RBOHB juega un papel central en la formación de respuesta de infección y organogénesis del nódulo a través de la interferencia con flavonoides, metabolismo del carbono, regulación del ciclo celular, y el AUX y CTKs al comienzo de la nodulación (Fonseca et al., 2021). El H_2O_2 también ha sido detectado alrededor de los bacteroides en nódulos. Por lo tanto, es probable que la senescencia de los nódulos esté relacionada con un evento de estrés oxidativo que implique una reacción del tipo Fenton con metales como el hierro y el cobre (Liu et al., 2019b). Por otra parte, el intercambio de ROS y la producción de especies reactivas de nitrógeno son claves para la comunicación entre nódulos y bacteroides, donde los antioxidantes son críticos para modular sus funciones, prevenir el daño oxidativo y mejorar la fijación del nitrógeno (Arthikala et al., 2014; Alquerres et al., 2010). La

síntesis de las isoformas SOD y CAT, es esencial para la actividad del bacteroide, y la deficiencia en estos antioxidantes impacta en la infección y nodulación (Kunert y Foyer, 2022).

En el mismo contexto de retroalimentación, se han observado ROS y antioxidantes en simbiosis tripartita en leguminosas. La interacción simbiótica simultánea de *Bradyrhizobium* y *Phomopsis liquidambaris*, un hongo endófito que depende de la producción de ROS y la biosíntesis de flavonoides que influyen en la nodulación, aumentando las respuestas de las bacterias rizobiales a los exudados de raíz y en la nodulación del cacahuate (Zhang et al., 2022c). Análisis transcriptómicos y metabólicos mostraron que la producción de flavonoides es una estrategia para aliviar el estrés oxidativo en las interacciones entre rizobios y hongos endófitos (Nath et al., 2016). Por lo tanto, las plantas y sus socios microbianos han co-optimizado las respuestas de tolerancia al estrés para el intercambio de señales con el fin de establecer una simbiosis funcional.

Además, se observó una interacción tripartita de plantas con asociados simbióticos entre micorrizas arbusculares y el hongo simbiótico radicular *Piriformospora indica*, mejorando el crecimiento de las plantas al aliviar los impactos del estrés y, consecuentemente, un mejor desarrollo de las plantas. La colonización fúngica mejora principalmente la cinética de producción de ROS (metabolismo de ROS y homeostasis de ROS) en los procesos celulares de las plantas y el crecimiento de las plantas bajo estrés biótico y abiótico (Hamilton, 2012). La propuesta del laboratorio es que la comunicación planta-microbio ocurre a través de la regulación ROS-antioxidantes, y por consiguiente la respuesta al estrés combinada.

Por otro lado, se ha observado que durante la interacción simbiótica de *Epichloë festucae* con gramíneas frescas de temporada (Rahnama et al., 2021). Bajo esta colonización, este hongo asintomático puede producir antioxidantes en respuesta a las tensiones bióticas y abióticas mejorando la respuesta de las plantas (Kayano et al., 2018). Sin embargo, interesantemente *Epichloë* reduce la producción de ROS para establecer la colonización al disminuir la actividad de RBOH a través de dos GTPases Rho no homólogos: Cdc42 y RacA que median la infección fúngica (Qi et al., 2017), por lo que es probable que este comportamiento sea más de un agente patógeno que de un benéfico.

Sin embargo, como se muestra en la Figura 4, se propone que la modulación de los microbiomas vegetales, su funcionalidad y la mitigación del estrés estén vinculados a la retroalimentación ROS/antioxidante (Zandi y Schung, 2022). Las condiciones de estrés influyen en la activación directa/indirecta de diferentes isoformas RBOH en el apoplasto, aumentando la producción de ROS, especialmente H_2O_2 (Qi et al., 2017). El H_2O_2 es una molécula estable que cruza las membranas utilizando canales de AQP. El aumento de la concentración de H_2O_2 en el citosol activa directamente las respuestas de estrés molecular vinculadas a la producción de antioxidantes que disminuirán la señal de ROS y por lo tanto mitigarán el estrés.

Sin embargo, ¿cómo funcionan las ROS para la modulación microbiana? Sabemos que algunas bacterias endófitas son reclutadas del suelo y luego filtradas según su tolerancia a los gradientes de ROS para llegar a la endosfera (Berrios y Rentsch, 2022). Sin embargo, no sabemos los mecanismos moleculares exactos que utilizan las bacterias endófitas para percibir y activar el sistema antioxidante para provocar una respuesta eficiente a la ROS en su camino hacia la endosfera. Recientemente,

Chang et al. (2021) y Micci et al. (2022), en estudios de bacterias involucradas en el ciclo de la rizofagia en los pelos radiculares y microbios en tricomas foliares, mostró evidencia histoquímica de que los microbios pueden secretar especies antioxidantes para protegerse del daño oxidativo debido al superóxido producido en tejidos y células vegetales. Sólo sabemos que la atracción y la entrada en la endosfera de estas bacterias influyen en la respuesta global de las plantas al estrés. Cabe mencionar que *Escherichia coli*, *Salmonella* y otros patógenos humanos aumentan su resistencia al estrés oxidativo y a los antibióticos si se les aplica una dosis baja de H₂O₂. En estas bacterias, una vez activados, los sensores REDOX como SoxR, OxyR y RsrA desintoxican niveles no deseables de ROS y protegen las células con estrategias antioxidantes (Chang et al., 2021).

Una vez que las bacterias han colonizado la endosfera, se producen ROS a niveles bajos alrededor de las bacterias para mantener relaciones simbióticas y la colonización. Sin embargo, aún no se ha descubierto completamente cómo las bacterias en las células de la raíz pueden adaptarse para apoyar la producción de ROS. Las bacterias endófitas producen sus antioxidantes en respuesta a la ROS, pero esto no es permanente. También es muy interesante que en el ciclo de la rizofagia algunos de estos "nuevos endófitos" absorbidos del suelo en la punta de las raíces son posteriormente expulsados de las puntas de los pelos de raíz en crecimiento para volver al suelo donde pueden adquirir nutrientes adicionales antes de ser atraídos de nuevo a las puntas de las raíces donde se acumulan los exudados para atraer a los microbios; mientras que otras bacterias pueden salir de las células radiculares hacia los espacios intercelulares para residir permanentemente en la

endoesfera (White et al., 2021, 2019b). Investigaciones futuras deben examinar cómo estas interacciones cambian a lo largo del tiempo y el espacio bajo múltiples estresores causados por el cambio climático y las actividades antropogénicas, como se ha propuesto de forma interesante por Trivedi et al. (2022). Lo que se necesita ahora es empezar a evaluar qué genes expresan los endófitos bacterianos mientras están dentro de los tejidos y las células vegetales, ya que interactúan con ROS producidos por el huésped y otras moléculas vegetales. La mayoría de los análisis genómicos se centran en la respuesta del huésped a las micobacterias endofíticas, más que en la respuesta endofítica a las células y tejidos del huésped.

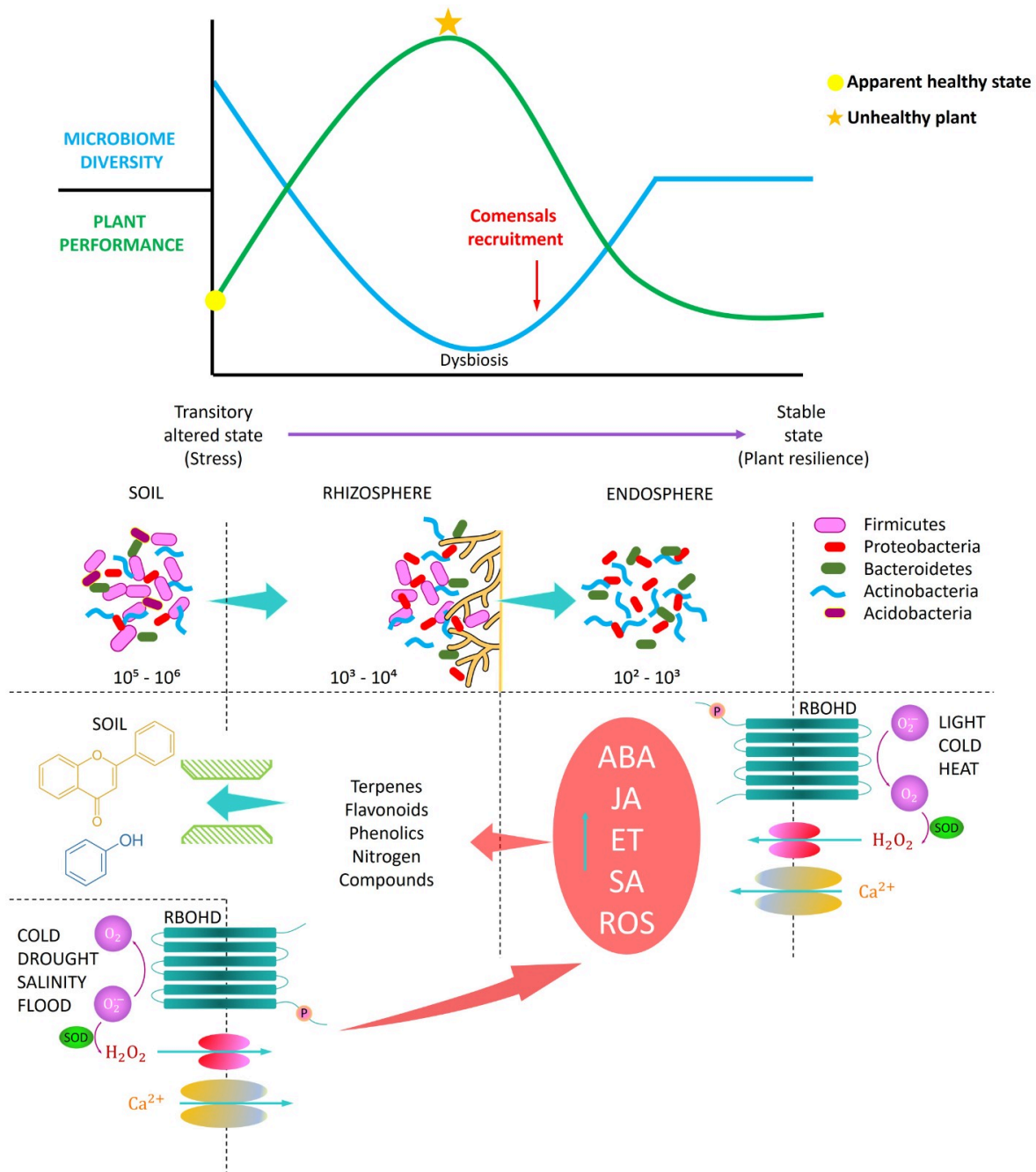


Figura 4. Reclutamiento microbiano inducido por las vías de respuesta al estrés como fitohormonas y derivados de ros de la actividad de nadph oxidasa (RBOHD). La diversidad del microbioma durante el estrés de las plantas puede alterarse debido a una “pérdida transitoria de microorganismos” que perjudica la salud de las plantas. En compensación, las raíces de la planta activan el reclutamiento comenal

desde el suelo hasta la endosfera, llamado estrategia “CRY FOR HELP” para liberar metabolitos secundarios. Los comensales que reemplazan a los endófitos “originales” fueron seleccionados en diferentes gradientes de ros y luego restauran gradualmente el estado de salud de las plantas.

Otro servicio simbiótico que implica la retroalimentación ROS-Aox ofrecida por las bacterias endófitas y cianobacterias está relacionado con la fijación de nitrógeno y la eficiencia del uso del agua. Por ejemplo, la actividad de la nitrogenasa es extremadamente sensible a la inhibición por el oxígeno y la ROS pero depende de una alta actividad metabólica para producir los ATPs necesarios mediante fosforilación oxidativa para sostener la fijación biológica del nitrógeno; así, en este evento paradójico requiere la regulación de los genes anti-ROS (Song et al., 2021; Alqueres et al., 2010; Raghavan et al., 2015; Kumar et al., 2018). En este sentido, se piensa que el aumento de los compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, y otras moléculas con características prooxidantes/antioxidantes sintetizadas después de la inoculación de la planta con sus endófitos permite a la planta fortalecer sus propias células contra ROS y reduce el oxígeno alrededor de las bacterias, controlar las concentraciones de oxígeno, permitir la fijación de nitrógeno por bacterias diazotróficas dentro de las células vegetales (Chang et al., 2021; Micci et al., 2022; White et al., 2021).

4.8. Situación del *Agave marmorata* o tepextate

El *A. marmorata* Roehl., es un agave silvestre que se utiliza para la producción de mezcal tradicional, tradicionalmente a este agave se le conoce como pitzomel o tepextate. La planta en una pequeña escala es parte de la economía de poblaciones rurales, porque cuando la planta madura después de 35 años, lo que la convierte en una de las plantas de agave más longeva (Jimenez-Valdés et al., 2010). Por lo que el uso para la producción de mezcal genera problemas de sustentabilidad y compromete la presencia de especímenes en el campo, afectando ampliamente la ecología del ambiente que rodea a la planta, entre estos se compromete la retención de agua, aumenta la erosión, los polinizadores se afectan por falta de miel y nutrientes originados en las flores.

Lamentablemente la especie de agave tiene una distribución restringida, solo crece en el área denominada valle de Tehuacán-Oaxaca situado en los estados de Puebla y Oaxaca, en bosques de la sierra madre del sur y el Istmo de Tehuantepec (García-Mendoza, 2011). En 2023, Valiente-Banuet reporto la existencia de 2.620 individuos por hectárea en el valle de Zapotitlán. La planta es semélpara, tiene propagación clonal ocasional y cuando la roseta o piña alcanza 60 cm de diámetro, puede florecer en mayo-junio (Ornelas et al., 2002, Jiménez-Valdés et al., 2010). Para la ecología como mencionamos es una especie clave por que 21 especies de aves (incluidos los colibríes) y al menos dos especies de murciélagos nectarívoros (es decir, *Choeronycteris mexicana* y *Leptonycteris nivalis*) se han reportado

alimentándose de sus flores en la Biosfera de la Reserva de Tehuacán-Cuicatlán (Ornelas et al., 2002).

La mayor parte de las investigaciones sobre *A. marmorata* se han centrado sobre su biología reproductiva (Ornelas et al., 2002), dinámica de población (Delgado-Lemus et al., 2014; Jimenez-Valdés et al., 2010), análisis de su cariotipo (diploide, $2n = 2x = 60$) (Flores-Maya et al., 2015), y diferentes estudios relacionados con la propagación in vitro y los microbios presentes en sus semillas (Aguilar Jiménez y Rodríguez de la O, 2018; Martínez-Rodríguez et al. 2019). Recientemente se estimó la diversidad genómica. Los datos obtenidos de 173 individuos genotipados indican la existencia de una diversidad genética relativamente alta a niveles de especies ($HT=0.229$) y ligeramente inferior a los valores en otras especies de agaves usados para la producción de bebidas destiladas, por ejemplo *A. angustifolia* ($HT=0.250$) para producción de bacanora en Sonora y *A. potatorum* ($HT=0.252$) utilizado para la producción del mezcal tóbala en Puebla y Oaxaca (Ruiz Mondragón et al., 2023), pero con una diversidad claramente mayor que en *A. tequilana* ($HT = 0,120$) utilizada para la producción de tequila en Jalisco (Ruiz Mondragon et al., 2022). Hasta el momento la reproducción clonal es poco común para este agave, sin embargo, la sustracción de especímenes tiene un efecto negativo sobre la diversidad genética de la planta. El mantenimiento de la variabilidad genética es importante para la conservación biológica por lo que la planta junto con sus polinizadores y otros socios biológicos, podrán adaptarse y enfrentar los cambios ecológicos en el panorama de extinción masiva relacionada con el cambio climático.

La reproducción y supervivencia de la planta está relacionada con el suelo, la germinación y crecimiento de plantas ocurre favorablemente cuando la corteza del suelo se compone de musgos, cianobacterias, algas verdes, hongos y líquenes, que son ricos en nutrientes que ayudan a la retención de agua creando microhábitats favorables para la germinación de semillas, en contraste con el suelo desnudo (Godínez-Alvarez et al., 2012).

Como hemos venido mencionado a lo largo del posgrado, no existen muchos estudios que apoyen la conservación y la restauración de un ecosistema mediante estrategias biotecnológicas que soporten la producción de plantas que se adapten y sobrevivan al estrés medioambiental. Por lo que en este proyecto buscamos la conservación del *A. marmorata* Roetzi como un modelo que nos ayude a establecer las estrategias y la metodología para la selección y reproducción *in vitro* y su posterior re-introducción al ecosistema. así como la búsqueda de la restauración genética y mejoramiento del cultivo de *A. tequilana* Weber mediante la inoculación con sus microorganismos endófitos (Martínez-Rodríguez, 2017 tesis de licenciatura). En esta ocasión hemos observado que la adición de bacterias endófitas y lantanidos conocidas como tierras raras promueven la activación de microbiomas endófitos, resultando un conocimiento importante que explique la adaptación de las plantas al estrés.

Capítulo 5

Inducción de la respuesta de propagación de líneas clonales de *A. marmorata* por diferentes concentraciones de 6-benzilaminopurina (BAP).

5. Inducción de la respuesta de propagación de líneas clonales de *A. marmorata* por diferentes concentraciones de 6-benzilaminopurina (BAP).

5.1 Resumen

La selección clonal y la micropropagación podrían contribuir a conservar la planta *A. marmorata*, especie de agave en peligro de extinción con la idea principal de reforestar sus hábitats naturales. Se desarrolló un protocolo de micropropagación utilizando la proliferación de brotes axilares para multiplicar líneas clonales derivadas de las semillas de *A. marmorata* (Martinez-Rodríguez et al., 2022). La aplicación de este proceso de propagación usando multiplicación eficiente de brotes inducida por la citocinina BAP podría contribuir a mejorar la reintroducción del agave en el bosque con fines de conservación y restauración de ecosistemas. Seleccionamos las líneas clonales respecto a la capacidad de multiplicación y la formación estable de tejidos observadas en diferentes líneas clonales. Las diferencias entre las líneas podrían explotarse para la producción de plantas de alta calidad con diferentes capacidades, tales como una rápida propagación, una mayor adaptación al estrés y un crecimiento bajo limitación de nutrientes, pero permite mantener diferentes genéticas en las plantaciones para satisfacer la demanda de plantas sin poner en riesgo un recurso natural.

De manera notable la línea AM32 presento la mayor formación de brotes inducidos por BAP y presentó bajo tejido senescente después de 60 días de cultivo. Nuestros resultados revelan diferencias en la inducción y multiplicación de brotes entre las

líneas clonales, incluso bajo condiciones idénticas de cultivo *in vitro*. También se seleccionaron las líneas clonales AM31 y AM33. Desde la perspectiva de la producción vegetal, las tres líneas clonales seleccionadas (AM31, AM32 y AM33) toleraron un entorno libre de nutrientes como vermiculita y arena de playa cuando fueron trasladadas *ex vitro*.

5.2 Métodos

5.2.1 Índice de Brotación inducido por 6-BAP

El índice de brotación se estimó en replicas de 5 frascos por cada línea, probadas con cada una de las concentraciones de 6-Benzilaminopurina, entre las cuales usamos 10 ppm, 5 ppm y 2.5 ppm. El medio MS (Murashige and Skoog, 1962) modificado sin la adición de vitaminas, se tuvo en ciclos de 12 horas luz y 12 horas oscuridad durante dos meses. Se usaron 5 propagulos para inicio de cada replica.

La estimulación de los brotes en las líneas de agave marmorata pueden llegar a ser muy efectivas con BAP debido a que la línea no está manoseada y el soporte de estrés de la genética de la línea ayuda a la tolerancia del estrés que está inducido por la adición de BAP de manera natural en la planta silvestre.

5.3 Resultados

5.3.1 Respuestas de brotación en líneas clonales de *A. marmorata* a concentraciones de 6 Benzilamino purina.

La figura 5 presenta la respuesta de brotación de las 11 líneas clonales de *A. marmorata* inducida por 2.5, 5 y 10 ppm de BAP. La adición al medio MS de 2.5, 5

y 10 ppm de BAP tuvo un efecto diferenciado en las plantas. Las líneas M06, M14D-E, AM32, AM33 y AM34 incrementaron la producción de los brotes utilizando una concentración de 10 ppm, cada una tuvo un promedio de brotación de 29.4 ± 2.40 , 37.6 ± 3.91 , 93.4 ± 3.43 , 65 ± 4.06 y 29.4 ± 5.63 respectivamente. La línea AM32 presento hasta 90 brotes en la concentración de 10 ppm. La fisiología de estos brotes fue vigorosa y no se observa la presencia con deterioro oxidativo.

El efecto del BAP sobre la brotación en las líneas AM20, AM21 y AM31 tuvo un efecto negativo al mostrar 13 ± 2.12 , 6 ± 2.91 y 15.2 ± 2.16 brotes en la concentración de 10 ppm. La línea AM21 tuvo la menor respuesta a la estimulación de brotes respecto a las otras líneas, además presento una mayor proporción de tejido oxidado y brotes sin vigor, ya que son flácidos en estructura. Sin embargo, la respuesta de estas a una concentración menor de 5 ppm, mejoraron en respuesta con un número de brotes de 28.8 ± 1.78 , 12 ± 5.09 y 36 ± 5.04 , la predominancia del tejido oxidado fue menor y los brotes tuvieron mejor apariencia.

El comportamiento de respuesta observado en las líneas M06, M14D-E y AM34, muestran que existe hay una disminución en la producción de brotes en todas las concentraciones, pero en la concentración de 5 ppm, se generaron 13 ± 2.12 , 24.6 ± 2.70 y 14.8 ± 2.77 respectivamente. Dentro de este segmento de líneas de baja respuesta al BAP la única línea que presenta una ganancia de generación de brotes con 5 ppm de BAP fue AM31 con 36 ± 5.04 pero no muestra diferencia significativa con 2.5 ppm que tuvo hasta 32.4 ± 4.5 brotes. La apariencia de los brotes es de color verde limón, no presenta abundante oxidación entre los brotes. Cuando se añadió la concentración de 2.5 ppm, unicamente dos líneas tuvieron mayor desarrollo de

brotes AM20 y AM2 de 41.4 ± 1.34 y 23 ± 3.74 (Figura 1). La línea M06 tuvo 3.6 ± 1.51 , M14D-E con 12.4 ± 1.67 , AM31 de 32.4 ± 4.50 , las líneas AM32 y AM33 con un promedio de 65 ± 3.67 y 35 ± 2.44 , finalmente la línea AM34 obtuvo 16 ± 1.22 brotes producidos en dos meses, teniendo una apariencia de coloraciones verde oscuro, para la línea AM34 presenta puntos violetas en la base de las hojas, así como AM32. La línea M06 persiste un color verde limón, indicador de hojas vigorosas.

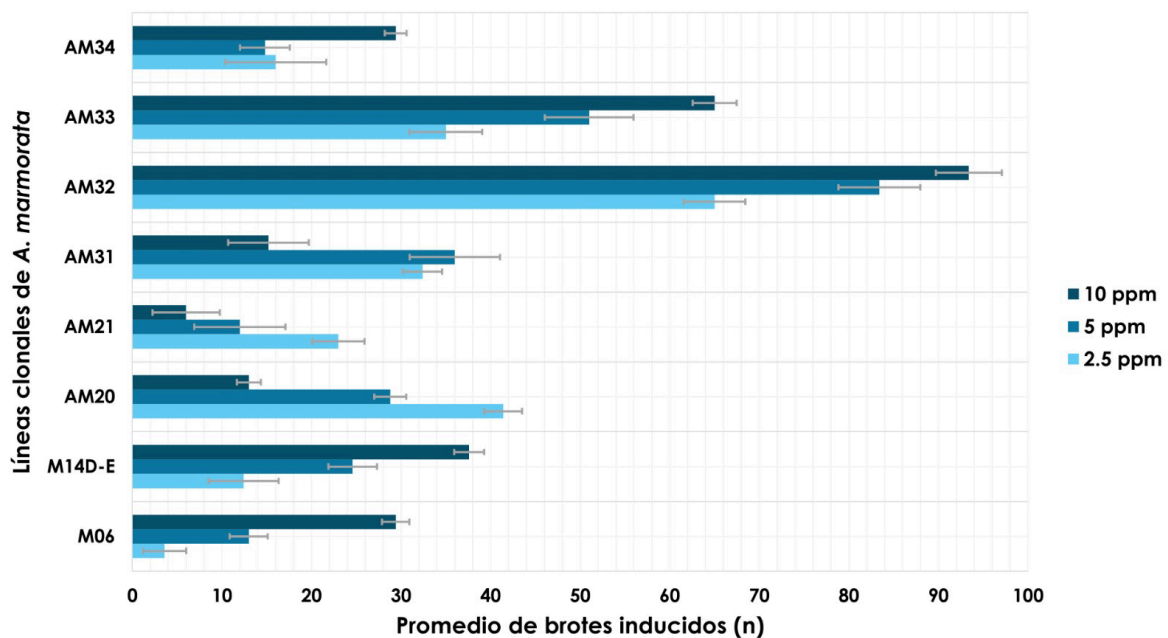


Figura 5. Inducción de la brotación de líneas clonales de *A. marmorata* por 6 BAP. Se utilizaron concentraciones de 2.5, 5 y 10 ppm en un seguimiento durante 2 meses. Las líneas clonales am32 y am33 tuvieron la mayor respuesta en todas las concentraciones con diferencias significativas entre ellas.

5.4 Discusión

Ocho líneas clonales de *Agave marmorata* fueron evaluadas por la brotación inducida por 6-BAP. El comportamiento de las líneas forma 2 grupos de respuesta. El grupo 1 fue de baja respuesta, donde se obtuvo un índice de brotación de hasta 40 brotes promedio en alguna de las concentraciones utilizadas que incluyen a las líneas M06, M14D-E, AM20, AM21, AM31 y AM34. Las líneas AM32 y AM33 respecto a las otras líneas clonales fueron consideradas como las de mayor respuesta a la brotación inducida por el BAP. En algunos casos se observan diferencias significativas entre concentración de BAP y una cepa en particular. La otra línea con diferencia significativas estadísticamente entre concentraciones fue M06, esta línea presenta un mayor número de brotes a mayor concentración de BAP, siendo cercana a 30 brotes a 10 ppm. La línea M14D-E, también presenta una respuesta de mayor brotación a mayor concentración de BAP. Con 38 brotes a 10 ppm de BAP. Completa este comportamiento de mayor brotación en respuesta a la concentración AM34, esta línea tiene 31 brotes a 10 ppm. Sin embargo, no se observa una diferencia significativa entre los valores de brotación alcanzados entre 2.5 ppm y 5 ppm de BAP.

Las plantas de la línea AM20, tuvieron una respuesta estadísticamente diferente entre concentraciones y tuvo un efecto de brotación contrario respecto a la concentración, ya que la menor concentración de BAP (2.5 ppm) fue la que mayor número de brotes tuvo con 42 comparadas con las líneas AM21 y AM31. El incremento de la concentración de BAP redujo la brotación hasta 14 brotes a 10

ppm. La línea AM21 solo fue significativamente diferente en la concentración de 2.5 ppm respecto a las otras dos concentraciones de BAP. Su respuesta de brotación fue mejor a menor concentración con 23 brotes en 2.5 ppm. Esta línea se caracterizó por tener la menor respuesta en la estimulación de brotes, además de presentar un tejido con mayor índice de oxidación y brotes sin vigor. La línea AM31 muestra un comportamiento de mayor número de brotes totales en 5 ppm, pero no es estadísticamente diferente con 2.5 ppm, el aumento de la concentración a 10 ppm reduce el número de brotes hasta un 55%.

El segundo grupo lo integran únicamente las líneas AM32 y AM33, las cuales tuvieron un seguimiento posterior al ser seleccionadas para este estudio respecto a la adición de bacterias y lantánidos. Estas líneas responden directamente a la concentración de BAP. AM32 tuvo hasta 90 brotes, siendo la línea más apta para producir plantas bajo este sistema de inducción. Las respuestas son significativamente diferentes entre concentraciones tanto en AM32 y AM33, pero no existe diferencia entre AM32 y AM33 en 2.5 ppm y 10 ppm respectivamente. El BAP o 6-bencilaminopurina (6-BA, una citocinina de primera generación) reguladora de plantas ampliamente usado en la micropropagación vegetal, debido a que promueve la división celular y la proliferación de brotes, sin embargo, su efectividad depende directamente de la planta y la concentración usada. Por ejemplo, en la micropropagación de pepino, BAP no tuvo efecto en la formación de brotes a concentraciones de 0.5, 1 y 2.5 ppm (Azizan y Zakaria, 2017).

En los agaves la falta de sistemas eficientes de propagación es un factor que limita el uso racional de varias especies, que en muchos casos han tenido una peligrosa

reducción de sus poblaciones debido a la sobreexplotación de los materiales silvestres. Trabajos relacionados a este proyecto. Por ejemplo, Rosales et al., (2008) en un estudio publicado en *Fitotecnia*, muestran que la utilización de BAP en los protocolos de propagación *in vitro* para *Agave cupreata*, *A. difformis*, *A. karwinskii*, *A. obscura* y *A. potatorum*, se logró la formación de brotes múltiples en medio MS suplementado con eficiencias de producción de brotes más altas para *A. cupreata* y *A. karwinskii* en concentraciones de 1,5 y 1 mg L⁻¹ BAP, con 10,5 y 6,1 brotes por explante, respectivamente. Ching et al., (2014) publicado en *Hortscience*, desarrollaron un sistema eficiente para la micropropagación de *Agave americana* L. utilizando tallos basales como explantes y cultivados en un medio modificado de Murashige y Skoog (MSI) suplementado con diversas concentraciones de 6-bencilaminopurina (BA) para la proliferación de brotes. El mayor número de brotes (18,5 brotes/explante) de tallos basales se obtuvo en MSI suplementado con 13,32 µM BA. En este trabajo, encontramos que las concentraciones micromolares de BAP fueron de 11.09 µM, 22.19 µM y 44 µM.

En 2015, Puente-Garza et al. en un trabajo publicado en *Frontiers in Plant Science*, utilizaron BAP para propagar *A. salmiana* usando una mezcla de auxinas y BAP a una concentración de 10 ppm (44.39 µM) provocó la brotación de 3.50 brotes en 60 días. Por último, Ríos Ramírez et al., en 2017 público en *Ciencia e Investigación agraria* el uso de BAP en la propagación de *A. angustifolia*, sobre la formación de nuevos brotes adventicios (organogénesis). Se establecieron grupos de tres a cuatro brotes en diferentes variantes de un medio de cultivo de Murashige y Skoog que tenían diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP; 0,5, 1, 2 y 4

ppm) y IAA (0,1, 0,3 y 1 ppm). Después de 16 semanas, se encontró que una mayor proliferación de brotes estaba positivamente relacionada con la concentración de reguladores de crecimiento. Por ejemplo, los tratamientos con 0,5 ppm BAP + 0,1 ppm de IAA tenía 7,8 brotes, mientras que los explantes establecidos en medio de cultivo con 4 ppm de BAP + 1 ppm de IAA tenían 32,8 brotes.

Nuestros resultados y los de otras publicaciones indican que las líneas clonales tienen una respuesta heterogénea a la citocinina BAP. Arzate-Fernandez et al., en 2020, muestra un protocolo que promovió la formación de brotes en *A. marmorata* y *A. salmiana*. Ellos lograron la regeneración de brotes en todos los experimentos probados; el mayor número de brotes fue en *A. salmiana* con 23.8 directamente con una concentración de 10 ppm de BAP, mientras que en *A. marmorata* se tuvieron 24.7 brotes con 5 ppm de BAP.

Estos resultados contrastan los obtenidos en este trabajo, donde las líneas clonales de *A. marmorata* al BAP responden de mejor manera en un medio que esta suplementado a la mitad de los nutrientes y sin uso de otras hormonas y con capacidades superiores de brotación, incluso en aquellas líneas de baja respuesta a las dosis de BAP usadas. Además, observamos enraizamiento en tres líneas (AM21, AM24 y AM34) con una tendencia a ser fácilmente individualizadas. Sin embargo, para la producción de plantas, el enraizamiento durante la multiplicación de las yemas atenúa la multiplicación de las yemas y/o eleva los procesos celulares para sostener el crecimiento de las plantas, aumentando en consecuencia los costos de producción.

En los tejidos vegetales, las citocininas actúan de forma antagónica a las auxinas y están en función de su concentración en el medio. Las citocininas determinan el destino celular al promover la diferenciación de los brotes. Se ha observado que las citocininas tienen un efecto retardante de la senescencia de las hojas. Pero también se ha observado que la adición o biosíntesis induce muerte celular apoptótica (Carimi et al., 2003), lo que no permite la rápida proliferación de los brotes reduciéndolos. La apoptosis en las plantas se induce por la infección por patógenos (respuesta hipersensible, HR) o la promoción de la senescencia. El primer tipo de muerte es rápida, mientras que el segundo es un proceso altamente regulado durante el cual se activan nuevas vías metabólicas y otras se desactivan.

En los tejidos vegetales, las citocininas pueden provocar alteraciones a nivel de membrana, modificando el potencial de membrana y se comprometen vías de señalización. El BAP, retarda la senescencia en plantas (Werner et al., 2003), sin embargo, depende de las concentraciones. Por ejemplo, BAP en concentraciones de 13 a 27 μM aceleraron la senescencia en Zanahoria y *Arabidopsis* como lo mostró Carimi et al., en 2003 en un trabajo publicado en *Plant Science*. Uno de los mecanismos sugeridos para el retraso de la senescencia por citocininas involucra la activación de un mecanismo antioxidante (Zavaleta-Mancera et al., 2007). Desde nuestro conocimiento la activación de un sistema antioxidante que protege contra el estrés está relacionado con la capacidad del BAP como un estimulante vía activación de estrés de tipo oxidativo. Algunos ensayos muestran que la citocinina puede inducir la expresión del gen regulador de respuesta (RR) OsRR6 en el arroz, y la sobreexpresión de OsRR6 en *A. thaliana* pueden aumentar la acumulación de

antocianinas en las semillas (Bhaskar et al., 2021), durante el desarrollo natural del grano de trigo púrpura, donde se involucra la vía de señalización ROS estuvo involucrada en la regulación de la acumulación de antocianinas (Li et al., 2021).

La 6-Benzimidolopurina (6-BAP) es una citocinina aromática con buena inducción de brotes porque se metaboliza rápidamente en los tejidos vegetales que puede tener efectos positivos y negativos sobre el estrés oxidativo, dependiendo del contexto, por ejemplo, en el pez cebra BAP puede promover el estrés oxidativo y la toxicidad para el desarrollo. Por otro lado, el BAP ayudar a reducir los efectos negativos del estrés oxidativo pueden estimular la biosíntesis de astaxantina en *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Torres-Haro et al., 2024). La astaxantina es un carotenoide con alta actividad antioxidante y en plantas de tomate, el 6-BAP combinado con el ABA pueden mejorar la tolerancia al estrés inhibiendo la absorción de Cadmio y Cobre (Emamverdiam et al., 2022).

El BAP, sin embargo, en la micropropagación tiene efectos secundarios a altas concentraciones, tales como la disminución del número de brotes o longitud y la inducción de apoptosis en tejidos vegetales y cultivos celulares, También se ha demostrado que el BAP reduce el crecimiento celular y bloquea la división celular de las plantas como posiblemente está ocurriendo en las líneas probadas. Recientemente, ha surgido un interés en estudiar las respuestas de las plantas a las citocininas. Estas hormonas se perciben a través de un fosforila y similar a los sistemas de dos componentes que las bacterias utilizan para detectar y responder a estímulos ambientales. En las plantas, las respuestas de citoquinina implican sistemas de percepción de dos componentes (por ejemplo, histidina cinasas y

histidina fosfotransferasas) que responden a los estrés bióticos y abióticos [57,58]. Por lo tanto, tanto los cultivos *in vitro* como las BAP y otras citocininas podrían utilizarse como modelo para estudiar la senescencia y las posibles respuestas de plantas micropropagadas en entornos hostiles.

Esto sugiere que el potencial de estrés causado por el BAP y estado fisiológico de las líneas se entrelazan para causar el efecto de poca y alta estimulación de la brotación, de tal forma que las plantas de las líneas M06 y AM21. Se debe profundizar en este tema. Por otro lado, como se demostró en este trabajo que ha sido publicado, las líneas de *A. marmorata* tienden a producir antocianinas y otra serie de metabolitos secundarios relacionados a la respuesta al estrés. En este trabajo, comparamos la multiplicación de brotes de 10 líneas seleccionadas utilizando el método de organogénesis directa, que implica la aplicación de citocinina BAP como inductor de brotes en un medio MS sin vitaminas durante ocho semanas. Se encontró que el BAP a 5 mg L⁻¹ o 22,2 μM produjo el mayor número de brotes en la línea clonal AM32 de *A. marmorata* y el menor en la línea AM24.

Nuestros resultados revelan diferencias en la inducción y multiplicación de brotes entre las líneas clonales, incluso bajo condiciones idénticas de cultivo *in vitro*. Desde la perspectiva de la producción vegetal, las tres líneas clonales seleccionadas (AM31, AM32 y AM33) toleraron un entorno libre de nutrientes como vermiculita y arena de playa. Por lo tanto, el comportamiento de estas líneas podría contribuir a la propagación y conservación de la masa de *A. marmorata*.

Capítulo 6

Acumulación de metabolitos secundarios:
flavonoides, compuestos fenolicos y
antocinaninas como un diferenciador entre
las líneas de mayor indice de brotación
Am32, Am31 y Am33.

6.1 Acumulación de metabolitos secundarios: flavonoides, compuestos fenolicos y antocinanas como un diferenciador entre las líneas de mayor indice de brotación Am32, Am31 y Am33; publicado en Martinez-Rodriguez A, et al., Micropropagation of Seed-Derived Clonal Lines of the Endangered *Agave marmorata* Roez and Their Compatibility with Endophytes. *Biology*. 2022; 11(10):1423.

6.1 Resumen

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las líneas en cuanto al contenido fitoquímico y solo pequeñas diferencias en el contenido de flavonoides en la línea AM31. El contenido de saponina esteroidea fue ligeramente elevado en AM32 (12,71 3,87 mg Diosgenin/g extracto seco). El análisis cromatográfico de los extractos crudos de las líneas clonales de *A. marmorata* fueron separadas en 23 fracciones totales. En la longitud de 275 nm se separaron diecisiete fracciones a (F2, F5, F7, F8, F12, F15, F22, F28, F29-F32, F37, F42, F44, F47, F48); tres fracciones a 205 nm (F1, F14, F62), dos a 390 nm (F25 y F66) y tres a 518 nm (F18, F23, F24). Se identificaron algunas moléculas bioactivas por espectrometría de masas MALDI-TOF, entre estas la catequina, ácido gálico, ácido cafeico, ácido sinápico como los compuestos fenólicos más abundantes. Respecto a los flavonoides se identificaron la isorhamnetina rutinósido, la isorhamnetina-glucurónido, la isorhamnetina 3-glucosido, la isorhamnetina-3-O-diglicósido, Miricetina Glucósido, Miricetina 3-O-Glucuronido, Miricetina 3-O-Rutinósido, Rutina, Quercetina-3-O-Glucósido, quercetina-3-glucósido o isoquercetina, kaempferol diglicósido, kaempferol rutinosido, Isorhamnetina Rutinosido. En el componente, el

acercamiento de espectrometría de masas indicó la probabilidad de moléculas similares a las saponinas tigenina y hecogenina. La línea AM31 tenía el mayor contenido de antocianinas como la cianidina 3,5 diglucósido en comparación con AM32 (NA% 23,08) y AM33 (NA% 21,66). Delfinidina 3,5-O-diglucosido fue ligeramente más alta en la línea AM31. La delfinidina-3-O-glucósido fue ligeramente elevada en AM32. Los resultados de la HPLC fueron consistentes con los análisis del contenido fitoquímico total, ya que las concentraciones ajustadas a la normalización de área fueron similares entre las líneas clonales. Los extractos tienen perfiles similares de fragmentos iónicos (m/z) con ligeras variaciones de intensidad y apariencias de señales en m/z 1361.978 en la línea AM33.

6.2 Métodos

6.2.1 Análisis de compuestos fitoquímicos de líneas clonales seleccionadas de *A. marmorata*

6.2.1.1 Material vegetal y su liofilización

Se utilizaron brotes *in vitro* de seis meses de edad de las líneas clonales AM31, AM32 y AM33 como material vegetal para la extracción fitoquímica. Se eliminaron cuidadosamente los residuos de agar, el tejido vegetal seco y las raíces. El material vegetal se pesó y ajustó a 10 g por muestra y se congeló inmediatamente con nitrógeno líquido durante 30 min. Los brotes se pulverizaron en un mortero frío, se pusieron sobre hielo y luego se liofilizaron. La liofilización se realizó en una LabCONCO Free Zone 2.5 plus (LabConco Corp, Kansas, MO, USA) con una condición de vacío de 0,10 mbar a 85 °C durante 11 h. Adicionalmente, 5 g de hojas de *A. marmorata* almacenadas en macetas y suelo bajo condiciones de invernadero

durante tres años fueron liofilizadas de la misma manera que los brotes para obtener un polvo seco fino para extracción fitoquímica.

6.2.2 Preparación de las muestras para obtener extractos derivados de las líneas clonales e hijuelo de *A. marmorata*

Para la evaluación fitoquímica, las hojas de agave y los brotes liofilizados (400 mg) se trituraron durante 3 min en un mortero y maza y se extrajeron secuencialmente con 15 ml de los siguientes disolventes: (a) 0,5% de ácido trifluoroacético en metanol, (b) etanol:agua (50 v/v) y (c) metanol:agua (80:20 v/v). Los extractos se agitaron en una incubadora rotativa (Infors HT, Ecotron, Rittergasse, Bottmingen, Suiza) a 150 rpm durante 48 h a 25 °C, y los residuos vegetales se eliminaron por centrifugación a 6300 g durante 10 minutos a 4 °C. Los residuos de cada disolvente se recogieron en el mismo vial y se almacenaron a 80 °C. El sobrenadante se recogió y evaporó al vacío. Para los análisis HPLC-PDA y UHPLC-UV, se reconstituyeron 50 mg de extractos de brotes en extracto hidroalcohólico compuesto por agua:etanol:metanol (10:30:60 v/v). Todos los reactivos se compraron a Sigma-Aldrich.

6.2.3 Cuantificación de la saponina total de flavonoides, fenólicos y esteroideos

El contenido total de flavonoides en los extractos de brotes de *A. marmorata* se determinó utilizando el método del tricloruro de aluminio ($AlCl_3$) descrito por Chang et al. [41]. Inicialmente se añadieron 200 μ L de cada muestra (10,0 0,1 mg

disueltos en 1,0 ml de metanol al 80%), 400 μ L de agua y 1000 μ L de solución AlCl_3 (preparado como sigue: 133 mg de cloruro cristalino de aluminio, 400 mg de acetato cristalino de sodio disuelto en 100 ml de metanol al 80%). La absorbencia se registró a 430 nm utilizando un espectrofotómetro ultravioleta-lambda 25 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). El contenido total de flavonoides se calculó sobre la base de una curva de calibración ($y = 4,9218x - 0,0024$, $r^2 = 0,9997$) utilizando soluciones de quercetina (5-50 $\mu\text{g/mL}$) en metanol al 80% (Sigma-Aldrich). El contenido total de flavonoides se expresa en mg de equivalente de quercetina por gramo de peso seco del extracto (mg QE/g DW).

Los fenólicos totales se determinaron utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu con ácido gálico como patrón (Sigma-Aldrich). Las muestras (500 μ L) se mezclaron con 250 μ L de reactivo al 50% de Folin-Ciocalteu y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, se añadieron 2000 μ L de una solución de bicarbonato sódico (7% p/v). Después de 90 min a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 760 nm utilizando un espectrofotómetro UV/Vis. Los fenólicos totales se cuantificaron utilizando una curva de calibración ($y = 54,554x - 0,0016$, $r^2 = 0,9959$) obtenida a partir de una concentración conocida del patrón de ácido gálico (2-200 $\mu\text{g/mL}$). La concentración se expresa en miligramos de ácido gálico equivalente por gramo de peso seco (mg GAE/g DW).

El contenido de saponinas esteroidales se calculó utilizando una curva estándar de diosgenina ($y = 3,503x + 0,0179$, $r^2 = 0,9965$) obtenida a partir de concentraciones conocidas (5-150 $\mu\text{g/mL}$) de diosgenina (Sigma-Aldrich). La solución de muestra se preparó en agua (a 10,0 0,1 mg/mL), disuelta en un volumen igual de acetato de etilo (Merck) y agitada dos veces durante 1 min en un vórtice. Después se mezcló

500 µL de extracto bruto y 500 µL de reactivo anisaldehído al 0,5% (Sigma-Aldrich) y se mantuvo durante 10 min. Luego, se agregaron 2 mL de ácido sulfúrico al 50% (Golden Bell, México) en reactivo de acetato de etilo. Las muestras se pusieron en un baño de agua a 60 °C durante 10 minutos, y luego se registró la absorbancia a 430 nm. La concentración de saponina esteroideal total se expresa en mg de diosgenina equivalente por gramo de extracto en peso seco (mg de diosgenina E/g de peso muerto).

El contenido total de saponina se calculó utilizando una curva estándar de diosgenina ($y = 0,6509x + 0,283$, $r^2 = 0,9953$). Diez mg de extracto bruto se disolvieron en 5 ml de metanol acuoso al 50%. Luego, 250 µL de la alícuota se transfirieron a tubos de ensayo en los que se añadió un volumen igual de reactivo de vainillina (8%), seguido de 2,5 mL de ácido sulfúrico al 72% (v/v). La mezcla se mezcló y se puso en un baño de agua a 60 °C durante 10 minutos. Los tubos se enfriaron en un baño de agua fría durante 3-4 minutos, y la absorbancia de la mezcla de reacción de color amarillo se midió a 544 nm contra una muestra en blanco que contenía 50 % de metanol acuoso en lugar de una muestra. La concentración total de saponina se expresa en mg de diosgenina equivalente por gramo de extracto seco (mg de diosgenina E/g DW).

6.2.4 Análisis/colecta de fracciones por técnicas de HPLC-PDA y UHPLC-UV

Los compuestos fitoquímicos extraídos del tejido de la planta y de las hojas se analizaron mediante un HPLC acoplado a un detector de fotodiodos (sistema

HPLC Waters e2695 con detector 2998 PDA, Milford, MA, EE.UU.) y una columna Luna C18 (2)-100A, 4,6 250 mm (5 μ m) (Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.). La elución gradiente consistía en fase móvil A (0,5% de ácido trifluoroacético en agua) y fase móvil B (0,5% de trifluoroacético en acetonitrilo) a un caudal de 1,0 ml/min. El gradiente se realizó como sigue: fase móvil B se mantuvo al 5% durante 2,5 min. fase móvil B aumentó del 5% al 23%; de 2,5 a 35 min, fase móvil B (isocrática) se fijó en el 23% de 35 a 40 min, fase móvil B aumentó del 23% al 85% de 40 a 78 min, fase móvil B (isocrática) se fijó en el 85% de 78 a 83 min, fase móvil B fijada al 90% de 83 a 90 min, y finalmente la fase móvil B volvió al 5% y se mantuvo de 90 a 95 min. El volumen de muestra fue de 50 μ L en una concentración igual de 30 mg/mL (0,01). Se midieron y registraron los picos de absorbencia a $\lambda = 518$ nm (para las antocianinas), $\lambda = 205$ nm (para las saponinas), $\lambda = 275$ nm y $\lambda = 390$ nm (flavonoides y ácidos fenólicos).

Se utilizó un HPLC con detector UV-Vis de longitud variable (Ultimate 3000, Thermo Scientific) acoplado a un colector de auto fracción para recoger fracciones separadas en las mismas condiciones cromatográficas descritas para el análisis HPLC-PDA. El volumen de muestra fue de 50 μ L a una concentración igual de 32 mg/mL (0,01). Las fracciones se recogieron simultáneamente en las cuatro longitudes de onda seleccionadas ($\lambda = 518$ nm, $\lambda = 205$ nm, $\lambda = 275$ nm y $\lambda = 390$ nm) y luego se liofilizaron para el análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF.

6.2.5 Análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF

Las fracciones secas se resuspendieron en 100 μ L de metanol de grado HPLC y se homogéneizaron en un aparato de vórtice antes del análisis. Los espectros de masa MALDI-TOF se obtuvieron utilizando ácido dihidroxibenzoico (DHB) 2,5 como matriz (2,5 DHB 30 mg, 990 μ L de acetonitrilo, 10 μ L de ácido trifluoroacético) en un MALDI-TOF-TOF de velocidad Autoflex (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemania), equipado con un láser de nitrógeno pulsado a 355 nm. La adquisición del pico se realizó en el modo de reflectrón positivo y negativo, utilizando una tensión de aceleración de 20 kV. El intervalo de masa para el análisis era de 350-1500 Da.

Se depositó un microlitro de cada muestra resuspendida en la placa de acero MALDI y se secó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, se añadió 1 μ L de la matriz DHB a cada pozo y se volvió a secar. La calibración de masa se logró con patrones de péptido (estándar de calibración de péptido II, Bruker Daltonics) manchados en una placa de acero inoxidable antes de la adquisición de datos. El programa Flex Analysis 3.3 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemania) procesó perfiles de masa para producir los picos de cada fracción (m/z). Se utilizaron los ajustes por defecto para la corrección y el suavizado de la línea de base.

6.3 Resultados

6.3.1 Análisis comparativo del contenido total de flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas en líneas clonales con mayor índice de brotación

La tabla 3 presenta los resultados del contenido de metabolitos secundarios del tipo de los flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas con el objetivo de diferenciar las líneas de mayor respuesta a la brotación inducida por el BAP. Se utilizó un hijuelo de tres años separado de la planta madre que se ha mantenido en una maceta con sustrato de composta de roble. Los resultados presentados en la tabla X.1 muestran que para el contenido total de compuestos fenólicos la línea AM31 es la que acumula mayor cantidad con 15.28 mg/g de tejido, este número es superior incluso que el contenido de compuestos fenólicos en el hijuelo de 3 años con 11.20 mg/g. Los valores en las líneas tienen diferencias estadísticas especialmente en AM31. Los flavonoides totales basados en el contenido de quercetina mg/g fue superior en las tres líneas con 13.94, 11.22 y 12.20 mg/g en las líneas AM31, AM32 y AM33 respectivamente, sin embargo, no se observan diferencias estadísticamente significativas. Por otra parte, se midió el contenido de saponinas esteroidales en las hojas de las líneas y los hijos basados en el contenido de diosgenina. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de saponinas entre todas las muestras. Los valores mayores se encontraron en la línea AM32 y el hijuelo de 3 años con 12.71 y 12.74 mg/g.

Tabla 3. Contenido total de compuestos fenólicos, flavonoides y saponinas en 3 líneas clonales de *A. marmorata*.

Sample	Total Phenolic Content (mgGAE/g Crude Dried Extract) Mean \pm SE	Total Flavonoid Content (mg Quercetin E/g Crude Dried Extract) Mean \pm SE	Total Steroidal Saponin Content (mg Diosgenin E/g Crude Dried Extract) Mean \pm SE	Total Saponin Content (mg Diosgenin E/g Crude Dried Extract) Mean \pm SE
AM31	15.28 \pm 0.78 ^b	13.94 \pm 0.19 ^b	10.79 \pm 2.84 ^a	42.46 \pm 0.05 ^a
AM32	12.90 \pm 1.38 ^{ab}	11.22 \pm 1.31 ^b	12.71 \pm 3.87 ^a	43.59 \pm 3.45 ^a
AM33	13.89 \pm 0.35 ^{ab}	12.20 \pm 2.02 ^b	10.49 \pm 3.81 ^a	47.66 \pm 2.57 ^a
HAM	11.20 \pm 2.36 ^a	1.67 \pm 0.10 ^a	12.74 \pm 0.10 ^a	48.42 \pm 3.78 ^a

Different letters mean significant differences between extracts, $p < 0.05$.

6.3.2 Perfil cromatográfico e identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF de fracciones separadas y colectados por HPLC-UV de extractos de las líneas clonales de *A. marmorata*

Para determinar el contenido de metabolitos en las líneas clonales se desarrollaron métodos HPLC-PDA y HPLC-UV con fines de detectar las diferencias en las concentraciones y los tipos de metabolitos secundarios acumulados en los brotes de tres líneas de *A. marmorata*. La separación por HPLC de los extractos de cada línea clonal se monitoreo usando cuatro longitudes de onda: 205 nm, 275 nm, 390 nm y 518 nm. Según las longitudes de onda monitoreadas y el análisis del contenido fitoquímico total, se determinó que aproximadamente 66 fracciones fueron separadas. Se esperaban diferencias en los perfiles cromatográficos de los extractos hidroalcohólicos; sin embargo, el número de fracciones separadas de cada línea fue similar, presentando solamente variaciones en las intensidades y áreas pico.

En general el número de fracciones separadas se hallaron en las siguientes longitudes de onda 275 nm se separaron diecisiete fracciones a (F2, F5, F7, F8, F12, F15, F22, F28, F29-F32, F37, F42, F44, F47, F48); tres fracciones a 205 nm (F1, F14, F62), dos a 390 nm (F25 y F66) y tres a 518 nm (F18, F23, F24). La tabla 4 presenta las fracciones/compuestos que diferían entre líneas según la normalización del porcentaje de área cromatográfica y resume las características cromatográficas y las asignaciones de iones m/z de antocianinas, flavonoides, taninos y ácidos fenólicos.

Tabla 4. Tiempos de retención (tR), longitud de onda (λ nm), porcentajes por zona de normalización (%) y $[M+X]^+$ y fragmentos iónicos (m/z) de las fracciones recogidas de extractos hidroalcohólicos brutos de brotes de *A. marmorata* utilizando HPLC-UV y MALDI-TOF MS.

Fracción	tR (min)	λ (nm)	Porcentaje por zona de normalización (%)			m/z (+) / ion asignación	Identificación tentativa	Clase de metabolito
			AM31	AM32	AM33			
F1	2.42	205	7.015	24.19	8.15	224, 329, 581 636, 782, 1070, 1200 290 [M], 581 [2M+H, dimero], 870 [3M+H, trimero],	Desconocido	Mezcla de compuestos
F2	2.95	275	5.18	3.68	3.57	1201 [4M+H, tetramero+K]	Catequina	Fenólico

F5	5.37	275	8.55	6.90	6.90	171 [M], 343 [2 M+H, dimer], 512 [3 M+H, trimer], 684 [4 M+H, tetramer]	Ácido gálico	Fenólico
F7	8.47	275	0.73	3.30	3.0	635[M+H+rutinosido]	Isorhamnetina rutinosido	Flavonoide
F8	9.89	275	10.645	1.48	1.97	482 [M+H-glucurónido]	Miricetina-3-glucosido	Flavonoide
F12	17.35	275	1.20	5.01	4.62	496 [M+H-glucurónido]	Miricetina-3-glucurónido	Flavonoide
F14	19.75	205	2.86	0.78	1.06	628 [M+H+ramnosilglucosido]	Miricetina-3-rutinosido	Flavonoide
F15	20.63	275	0.30	3.42	3.80	180 [M+H], 360 [M+H, dimer], 539 [M+H, trimer], 745 [M+H, tetramer]	Ácido cafeico	Fenólico
F18	25.08	518	12.99	15.10	14.45	303 [M], 484 [M+glucósido+Na]	Delfindina-3-O-glucosido	Antocianina
F22	27.72	275	1.79	1.05	1.68	607 [M+H]	Rutina	Flavonoide
F23	28.23	518	35.48	23.08	21.66	484 [M+glucósido+K] 613 [M+2glyc+Na-18]	Cianidina 3,5-diglucosido	Antocianina
F24	29.45	518	5.1	3.9	4.4	484 [M+glucósido+Na], 496 [M+glucósido+K], 656 [M+2glucosido+K]	Delfinidina-3,5-O-diglucosido	Antocianina
F25	29.87	390	2.085	3.95	4.73	296 [M], 484 [M+H+glucuronido+Na]	Quercetina-glucurónido	Flavonoide
F28	34.15	275	2.16	2.88	1.75	224 [M] 455 [2M+H, dimer]	Ácido sinápico	Fenólico

						736 [3M+H, trimero]		
F29	34.60	275	23.66	12.72	12.26	621[M+H+2 glucósido]	Quercetina-3-O-diglucosido	Flavonoide
F30	35.87	275	5.17	3.78	3.71	465 [M+H+ glucósido]	Quercetina-3-glucosido	Flavonoide
F31	38.17	275	6.48	5.63	5.64	605 [M+H+2 glucósido] 628 [M+H+2 glucósido+N a]	Kaempferol-diglucosido	Flavonoide
F32	38.97	275	2.52	0.71	1.15	635 [M+H+2 glucósido]	Isorhamnetina-3-O-diglucosido	Flavonoide
F37	49.89	275	3.51	5.05	4.60	1332 [M+H-4hexosa-2pentosa]	Tigogenin	Saponina
F42	56.38	275	0.55	1.18	1.49	496 [M+H+ glucurónido]	Isorhamnetina - glucurónido	Flavonoide
F44	59.42	275	0.84	3.63	4.88	473 [M+H+glucósido]	Isorhamnetina-3-glucosido	Flavonoide
F 47	63.43	275	0.32	1.01	1.015	1185 [M+H-3hexose-2Pentoso]	Hecogenina	Saponina
F 48	64.53	275	0.3	0.85	1.146	1056 [M+H-3hex-Pen]	Hecogenina	Saponina
F62	84.92	205/ 390	4.10	3.55	2.74	496 [M+H+ glucurónido]	Miricetina-3-glucosido	Flavonoide
F66	90.02	390	6.28	9.78	8.02	287 [M] 595 [M+rutinosa]	Kaempferol rutinosido	Flavonoide

Las fracciones se analizaron para su identificación provisional por espectrometría de masas MALDI-TOF. Compuestos fenólicos presentes en las fracciones que absorbieron a 275 nm, incluyeron a : catequina (F2, [M+] a m/z 290 y [4M+H+K] a m/z 1201), ácido gálico (F5, [M+] a m/z 171), ácido cafeico (F15, [M H] a m/z 180) y ácido sinápico (F28, [M+] a m/z 224), mientras que los flavonoides estaban representados por la isorhamnetina rutinósido (F7, [M+H+Rutinoside] con

m/z 635), la isorhamnetina-glucurónido (F42, [M+H+Glucuronido] en *m/z* 496), la isorhamnetina 3-glucoside (F44, [M+H+Glucosido] en *m/z* 473), la isorhamnetina-3-O-diglucosido (F32, [M+H+2 Glucósido] a *m/z* 635), Micetina Glucósido (F8, [M+H] a *m/z* 482), Micetina 3-O-Glucuronido (F12, [M+H] a *m/z* 496), Micetina 3-O-Rutinósido (F14, [M+H+Rhamnosy-Glucoside] a *m/z* 628), Rutina (F22, [M+H] a *m/z* 607), Quercetina-3-O-Glucósido (F29, [M+H+2 Glucósido] en *m/z* 621), quercetina-3-glucósido o isoquercetina (F30, [M+H+glucósido] en *m/z* 465) y kaempferol diglucósido (F31, [M+H+2 Glucósido+Na] en *m/z* 628).

Basado en el porcentaje de área normalizada (AN) (Tabla 4), AM31 ($\lambda = 275$ nm) tenía los niveles más bajos de Isorhamnetina Rutinosido (F7), Myricetin 3-O-Glucuronido (F12), ácido Caffeic (F15), Isorhamnetina-Glucuronido (F42), Isorhamnetina 3-Glucosido (F44) y la probabilidad de moléculas similares a las saponinas (F47-F48). En contraste, AM31 tenía más Myricetina-3-glucósido y Quercetina-3-O-diglucósido que AM32 y AM33. Estos resultados representan las diferencias más notables entre las tres líneas. No se pudo identificar la F1 recolectada a 205 nm, pero su contenido fue mayor en AM32 (NA 24,19%). El análisis de cromatografía en capa fina (TLC) indica que esta fracción es una mezcla de compuestos. Además, F14 y F62 (Myricetina 3-O-rutinosido y Myricetina 3-O-glucuronido, respectivamente) se incrementaron en AM31.

Las fracciones F25 y F66 ($\lambda = 390$ nm) correspondieron provisionalmente a los flavonoides quercetina-glucurónido (F25, [M+H+Glucurónido+Na] en *m/z* 484) y kaempferol rutinosido (F66, [M+H] en *m/z* 595). A 518 nm, las fracciones contenían antocianinas y hexosas designadas como glucosa por su patrón de fragmentación.

La línea AM31 tenía el mayor contenido de cianidina 3,5 diglucósido (F23, NA 35,48%, [M+H] m/z a 613) en comparación con AM32 (NA% 23,08) y AM33 (NA% 21,66). Delfinidina 3,5-O-diglucosido (F24, [M+H] m/z 656) fue ligeramente más alta en la línea AM31. El F18 correspondió a delfinidina-3-O-glucósido ([M+glucósido+Na] en m/z 484) y fue ligeramente elevado en AM32. Los resultados de la HPLC fueron consistentes con los análisis del contenido fitoquímico total, ya que las concentraciones ajustadas a la normalización de área fueron similares entre las líneas clonales. Al menos 30 fracciones estaban ausentes del extracto de hoja del hijuelo de *A. marmorata* en comparación con los brotes micropropagados, muchos de ellos son antocianinas y compuestos tipo flavonoides.

En nuestro estudio, la ionización de las moléculas fue mejor en el modo reflectrón positivo; sin embargo, muchos compuestos analizados aquí también se ionizaron eficientemente en el modo negativo. Las muestras analizadas fueron co-cristalizadas con DHB para aumentar la eficiencia y reproducibilidad de la ionización. La certeza de identificar las moléculas obtenidas a partir de los extractos de brotes se incrementó utilizando estándares comerciales. Las moléculas identificadas en este trabajo han sido reportadas en otras especies de agave, algunas de ellas asociadas con propiedades biológicas como el control de enfermedades y el desarrollo de nuevos fármacos para enfermedades crónicas y agudas.

Los espectros de masas MALDI-TOF de los extractos de las tres líneas clonales estandarizadas a la misma concentración (10 mg/mL) se presentan en la figura 4. Los extractos tienen perfiles similares de fragmentos iónicos (m/z) con ligeras

variaciones de intensidad y apariencias de señales en m/z 1361.978 en la línea AM33 (Figura 4C). Esta molécula no pudo ser identificada, pero su fragmento de ion m/z sugiere que es una molécula saponina.

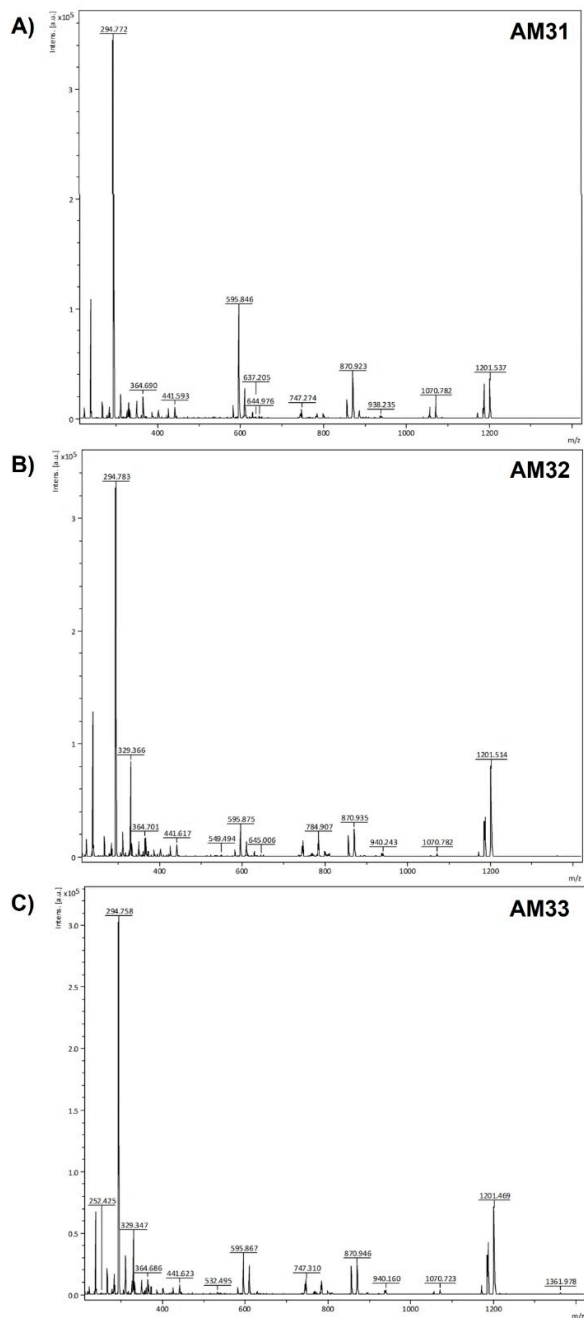


FIGURA 6. Espectros de masa positivos del ion maldi-tof de los extractos hidroalcohólicos de las tres líneas clonales en modo reflectrón. (A) AM31, (B) AM32 y (C) AM33. La concentración de cada extracto se ajustó a 10 mg/ml. Los fragmentos de iones a m/z 254.425 y 294.758 se correlacionan con la matriz DHB $[M+H]^+$ Y $[M+K]^+$.

6.4 Discusión

6.4.1 Análisis comparativo del contenido total de metabolitos en líneas clonales con mayor índice de brotación

Para encontrar algunas diferencias entre las líneas seleccionadas de *A. marmorata*, cuantificamos el contenido de flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas. Estos fitoquímicos son coproductos de alto valor en los agaves. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las líneas en cuanto al contenido fitoquímico y solo pequeñas diferencias en el contenido de flavonoides en la línea AM31. El contenido de saponina esteroidal fue ligeramente elevado en AM32 (12,71 3,87 mg Diosgenin/g extracto seco). Estos valores son consistentes con los datos de estudios previos con otras especies de Agave, desde plantas cultivadas en el campo o mediante micropropagación in vitro (Puente-Garza et al., 2015; Puente-Garza et. al., 2017; Morreeuw et al., 2021).

Sin embargo, el contenido total de saponina fue mayor en AM33. Por el contrario, se encontraron diferencias significativas en el contenido de flavonoides de *A. marmorata* "hijuelo" mantenido en macetas durante tres años en comparación con las líneas clonales (tabla 2). Esta observación es interesante porque,

fisiológicamente, la síntesis de fitoquímicos como fenólicos, flavonoides y saponinas se ha asociado con la respuesta de la planta a los estrés bióticos y abióticos, tales como la sequía o el ataque por microorganismos e insectos (Erken, 2022; Puente-Garza et al., 2021; Qian et al., 2021).

Actualmente, las plantas propagadas *in vitro* se consideran una herramienta para la producción de metabolitos secundarios porque proporcionan una producción rápida y continua de compuestos bioactivos, que pueden ser manipulados por reguladores del crecimiento como el BAP (Ayuso, 2020; Kaur et al., 2021). Riaji et al., (2022) observaron un mayor contenido total de fenoles y flavonoides en plantas micropropagadas en comparación con la planta madre. Los tres fitoquímicos medidos en este trabajo están asociados con actividad antioxidante, como se muestra en varios extractos de hojas de agave después de la cosecha del tallo o piña (Puente-Garza et al., 2015). Los protocolos *in vitro* a través de la proliferación de brotes axilares probablemente facilitarán el desarrollo del programa de conservación y contribuirán a una producción bioactiva sostenible de fitoquímicos. Se deben realizar más estudios para determinar las concentraciones y los tipos de compuestos fitoquímicos a fin de predecir si las plantas propagadas se adaptarán bien cuando se reintroduzcan en el bosque.

6.4.2 Identificación de compuestos fitoquímicos acumulados en las líneas clonales

Se emplearon métodos cromatográficos para detectar diferencias en las concentraciones y tipos de metabolitos secundarios acumulados en los brotes de las tres líneas de *A. marmorata*. Basándose en el porcentaje de área normalizada (AN) a diferentes longitudes de onda, se identificaron diferencias en los compuestos de los extractos (Tabla 3). Utilizando la espectrometría de masas MALDI-TOF, pudimos identificar con certeza al menos 18 moléculas de las fracciones separadas que presentaban diferencias en el contenido entre líneas clonales (Tabla 3). Las moléculas de flavonoides incluyen Isorhamnetina rutinosido, Myricetina 3-O-glucurósido, Myricetina glucosido, Myricetina 3-O-rutinosido, Isorhamnetina-glucurósido, Isorhamnetina 3-glucosido, Isorhamnetina-3-O-diglucosido, Rutina, Quercetina-3-O-diglucosido, Quercetina-3-glucosido Isoquercitrina, y Kaempferol diglucosido. También identificamos compuestos fenólicos como ácido cafeico, catequina, ácido gálico y ácido sinápico. Además, se identificaron provisionalmente tres saponinas, posiblemente tigogenina y hecogenina (figura 4), porque sus patrones no estaban disponibles. Sin embargo, los fragmentos de ionización (m/z) apoyan la presencia de estas moléculas. Estos compuestos fueron reportados anteriormente por Puente-Garza et al. 2017 y 2020.

Por último, las antocianinas, incluyendo la cianidina 3,5 diglucosido, la delphinidina 3,5-O-diglucosido y la delphinidina 3-O-glucosido, se destacaron como compuestos con las diferencias más significativas entre líneas clonales evaluadas. Estas

moléculas han sido previamente reportadas en varias especies de agaves silvestres y atribuidas a funciones protectoras de las plantas. La presencia de antocianinas en *A. marmorata* es una característica fenotípica que lo distingue de otras especies de *Agave* y está presente en una etapa temprana de la edad de la planta. Típicamente, la espectrometría de masas MALDI-TOF se utiliza para estudiar biomoléculas grandes (por ejemplo, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos), y ESI-MS se utiliza para analizar el perfil químico de moléculas de bajo peso molecular (<1000 Da).

En este trabajo se demuestra que operar el MALDI-TOF-MS en el modo reflectrón facilita la evaluación de flavonoides, compuestos fenólicos y antocianinas en brotes de *A. marmorata*. De hecho, estudios anteriores informaron la utilidad de MALDI-TOF-MS en el perfil de compuestos fenólicos en plantas (Frison-Norrie & Sporns, 2002; Ucar et al., 2013). La detección de antocianinas (m/z 250-800 Da) (Alecu et al., 2016, Wang et al., 2021). Los fragmentos de ionización con m/z entre 484-656 Da se asociaron con antocianinas glicosiladas, y los con m/z 295, 303, 325, 482, 484, 496 y 595 correspondieron a flavonoides glucósidos con hexosas y pentosas como quercetina, micaristina y kaempferol (Fougère et al., 2018). Además, los fragmentos de ionización con $m/z > 1000$ Da correspondieron a saponinas (Puente Garza et al., 2017).

Los flavonoides son metabolitos secundarios en las plantas que las protegen de una variedad de tensiones, incluyendo estrés abiótico como la sequía, la sal y la radiación UV, y tensiones bióticas como hongos, bacterias y nematodos parasitarios vegetales (Shah & Smith, 2020). Por otra parte, los flavonoides actúan como

antioxidantes directos para desintoxicar las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por plantas bajo estrés (Shomali et al, 2022; Daryanavard et al., 2023). James White, colega del laboratorio piensa que los flavonoides son sintetizados por las plantas para crear condiciones anoxigénicas que permitan que funcionen las nitrogenasas bacterianas de los endófitos presentes en los tejidos y provean de nitrógeno a las células vegetales. Además, los flavonoides desempeñan un papel en las asociaciones planta-microbio, como la planta-rizobia y las simbiosis micorrízicas arbusculares (Wang et al. 2022).

Por otra parte, los flavonoides protegen a las plantas de la radiación solar de onda corta, regulan el crecimiento celular en las plantas y al producir tonos de color específicos en las hojas y pétalos de flores pueden atraer a los polinizadores (Ma et al., 2024). Algunos flavonoides combaten ciertas plagas y patógenos. Los flavonoides se encuentran en muchas plantas, frutas y semillas, y también están presentes en el té y el vino (Waheed-Janabi et al., 2020). Las plantas transgénicas que regulan el contenido de flavonoides han mostrado una mayor tolerancia al estrés (Zhuang et al., 2023).

Las antocianinas son metabolitos secundarios de plantas pertenecientes a la familia de los flavonoides. Se trata de una clase de pigmentos naturales hidrosolubles de las plantas. La estructura básica de las antocianinas junto con azúcares simples como glucosa, galactosa y ramnosa puede producir diferentes tipos de antocianinas, dependiendo de los sustituyentes del anillo B en la estructura básica, incluyendo pelargonidina, delfinidina, petunidina, cianidina y malvidina. En este

trabajo se identificaron formas glucosiladas de delphinidina y cianidina en las líneas clonales. Este tipo de moléculas antocianinas tienen una estructura común derivada del esqueleto de flavilio (2-fenilbenzopyrylium) que es hidroxilado y metoxilado según los tipos de que también ayudan a las plantas a tolerar el estrés ambiental al protegerlas del daño oxidativo y actuar como antioxidantes (Li & Ahammed, 2023) y con especial protección contra altos niveles de irradiación ya que absorben el exceso de luz visible, que puede proteger a las plantas del alto estrés lumínico, pero no pueden proteger a las plantas de la alta luz UV (Zhao et al., 2022). Al igual que los flavonoides las antocianinas pueden disminuir el impacto de las especies de oxígeno reactivas previniendo daños al ADN, proteínas y los lípidos.

Las antocianinas en las plantas también se producen en respuesta a los diferentes tipos de estrés abiótico, como la sequía, la salinidad elevada, y el frío. El equilibrio entre las antocianinas y los ROS es importante para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Aumentar la cantidad de antocianinas en las plantas manipulando los genes reguladores podría ayudar a mejorar su resistencia al estrés. La presencia de estas moléculas sugiere que *A. marmorata* tiene la capacidad de acumular flavonoides y antocianinas favoreciendo la sobrevivencia de las plantas en los ambientes que se desarrolla y que la exposición a BAP puede ser un inductor tipo hormético que favorezca la acumulación de estos metabolitos secundarios.

Por último, las saponinas son una clase de glucósidos vegetales que están involucrados en la defensa vegetal y pueden ser afectados por el estrés, por ejemplo, las plantas de *Agave salmiana* cultivadas *in vitro* aumentan su contenido en saponina y actividad antioxidante en respuesta al estrés por sequía. Las plantas

cultivadas en 30% de polietilenglicol (PEG) tenían el mayor contenido total de saponina, y también tuvieron cambios en el ancho de la hoja y color (Puentes-Garza et al., 2017). El mismo grupo de investigación en 2021, demostró en plantas de *Agave salmiana* cultivadas *in vitro* fueron expuestas a los elicitores de sal, incluyendo AlCl_3 , NaCl y CoCl_2 . La presencia de las sales en diversas concentraciones no afectó las características fisiológicas de la planta. Sin embargo, 0,5 mM de NaCl indujo una mayor producción de saponina total. Las saponinas son glucósidos vegetales que reciben su nombre por sus propiedades similares a las del jabón. Se encuentran en muchas especies de plantas y se cree que son una defensa preformada contra el ataque fúngico.

Capítulo 7

Capacidades de promoción de crecimiento de plantas y características antifúngicas de la cepa endófito *A. xylosoxidans* contra cepas fitopatógenas de *Fusarium*.

7. Capacidades de promoción de crecimiento de plantas y características antifúngicas de la cepa endófito *A. xylosoxidans* contra cepas fitopatógenas de *Fusarium*.

7.1 Resumen

Estudios previos abordaron el conocimiento del microbioma de las semillas y de plántulas desarrolladas en el laboratorio de *A. marmorata*, se halló la cepa *Achromobacter xylosoxidans* que proviene de plántulas con desarrollo de 10 días. La cepa N (AX) fue secuenciada (ADNr 16S) y registrada en el genbank bajo la clave MF540449.1. La bacteria tiene propiedades agronómicas especializadas en la fijación de nitrógeno, produce Ácido Indol Butírico y es positivo a la actividad de ACC deaminasa, enzima involucrada en la degradación del precursor de etileno, el ácido amino-ciclopropanocarboxílico. Se evaluó, la capacidad antifúngica de esta bacteria. Reportes de otras cepas de *A. xylosoxidans* aisladas de semillas muestran tener capacidad especial de inhibir hongos *in vitro* e *in vivo* y actividad proteolítica. La cepa N (AX) fue caracterizada como proteasa negativa en el medio de skim milk y no tiene la capacidad de inhibir cepas de *Fusarium*.

7.2 Métodos

7.2.1 Identificación del producto de PCR del 16s ADNr de la cepa N (AX) de *A. xylosoxidans*

Achromobacter xylosoxidans se identificó primeramente por espectrometría de masas MALDI-TOF con un score de 2.121. La cepa para la identificación se

cultivó por 16 horas y hizo la extracción de ADN por el método de DNAzol. Se añadió 250 µL de DNAzol (Molecular Research Center Inc) y 250 µL de Tris-EDTA (Sigma-Aldrich), se agito vigorosamente en un vortex durante 5 minutos y se centrifugo a 11,000 rpm durante 12 minutos. El sobrenadante se colectó en un tubo nuevo y se agregó 500 µL etanol absoluto, este se mezcló con el sobrenadante por inversión, se dejó toda la noche a -20°C para la precipitación del ADN, al día siguiente se centrifugo a 11,000 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante por decantado, para después agregar 500 µL de etanol al 70% que ayudó con el lavado del pellet de ADN, se centrifugo nuevamente, se desechó el sobrenadante por decantado para dejar secando el pellet de aproximadamente 5 a 10 minutos, una vez seco se resuspendio el pellet en función del tamaño con un rango de 20 – 100 µL.

Se midió la absorbancia del ADN en un bioespectro (BioSpectrometer, eppendorf), posteriormente se siguió con la replicación de secuenciación mediante 16s con el uso de los oligos al 10 µM de los oligos Forward 341 – ‘CCTACGGGNGGCWGCAG’ y Reverse 805 – ‘GACTACHVGGGTATCTAATCC’, se hizo la replicación por PCR punto final con la DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermoscientific, Molecular biology), las condiciones de PCR se hizo en un termociclador NYX TECHNIK iniciando con una desnaturalización de 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización de 95°C por 30 segundos, alineación a 51°C por 30 segundos y una extensión de 72°C por 30 segundos, con una extensión final de 72°C por 5 minutos.

La purificación del producto se hizo con el kit ThermoScientific GeneJET Gel Extraction Kit, bajo el siguiente protocolo: mezclar 2 μ L de gel red con toda la muestra, se vació en un gel de purificación con agarosa al 1% disuelta en TBE al 0.5%, corriendo el gel a 80 volts durante 40 minutos. Se cortaron las bandas del gel con ayuda de un transiluminador y su luz UV, antes de cada corte se pesó el tubo cónico Eppendorf de 2.0 mL, para colocar ahí cada una de las bandas cortadas. Se añadió 100 μ L de Binding buffer por cada 100 mg (1:1) del peso de agar en el tubo con la banda de ADN, se colocó en un baño recirculador de 60°C durante 10 minutos, este se agitó cada 3 minutos para derretir la agarosa completamente. Al tubo se añadió 100 μ L (1:1) de isopropanol grado biología molecular y se agitó durante 15 segundos.

La mezcla se colocó en una columna de purificación para ser centrifugada durante 1 minuto a 12,000 rpm, en la columna se pipeteó nuevamente 100 μ L de binding buffer para ser centrifugado bajo las mismas condiciones. A la columna se le agregó 700 μ L de la solución Wash buffer (debe tener adición de etanol) y se centrifugó 1 minuto a 12,000 rpm, se desechó el residual filtrado para ser centrifugado nuevamente, la columna se pasó a un nuevo tubo cónico, directo al centro de la membrana se le agregó 25 μ L de la solución de buffer de elución caliente, dejándolo en incubación durante 2 minutos, se centrifugó durante 1 minuto a 12,000 rpm, se repitió este paso una vez, colectando un total de 50 μ L de ADN.

Para cada proceso de electroforesis desde la extracción de ADN, PCR y Purificación se utilizaron geles de agarosa al 1% disueltos en Buffer de corrida al 0.5%, el cual se preparó de la siguiente manera: TBE stock al 5x, se pesó en un volumen de 900

mL de agua destilada 54 g de Trizma Base (Sigma-Aldrich) y 27.5 g de ácido bórico (Merck), en constante agitación, después se agregó 20 mL de EDTA 0.5 M con un pH de 8, para finalmente aforar a 1,000 mL. Para la preparación del buffer 0.5%: se tomó 50 mL del concentrado 5x y se añadió a 450 mL de agua destilada, para completar una solución final de 500 mL.

El producto de PCRse mandó a secuenciar en el Instituto Potosino de Investigación científica y Tecnológica A.C. La secuencia se procesó quitando terminales inespecíficos y se analizó por BLAST de NCBI. Esta cepa se sometió a registro de GenBank con la obtención del número **MF540449.1**

7.2.2 Prueba de Skim Milk – para la determinación de Proteasas

La preparación del medio Skim milk (100 g de leche descremada, pH final de 6.8 ± 0.4). El medio de cultivo se dividió en dos matraces, primero se suspendiendo 8 g de polvo de leche descremada (BD Difco) en 100 mL de agua destilada, en un matraz de 250 mL. En un segundo matraz se agregó 4 g de agar bacteriológico (BD Bioxon) en 100 mL de agua destilada se hizo en un matraz de 500 mL. Agitando vigorosamente, los dos matraces con cada uno de los medios se esterilizaron en autoclave (Felisa FE-397) a 121°C durante 15 minutos, una vez transcurrido el tiempo, en una campana de flujo laminar se vertió el medio de leche descremada (Skim milk al matraz con el medio de agar bacteriológico, agitando para homogenizar delicadamente, evitando grumos, se vaciaron en cajas de Petri estériles. Para la evaluación de una respuesta positiva a la secreción de proteasas se debe tener la formación de halos de clarificación en el medio de cultivo.

Para la prueba, únicamente se tomó una colonia bacteriana de *Achromobacter xylosoxidans* con un crecimiento de 16 horas a 32°C en medio Agar Soya Trypticaseína (TSA, BD Bioxon), y se realizó un piquete en el medio de Skim milk, este proceso se repitió 5 veces, entre cada toma se esterilizaba el asa microbiológica y se volvía a hacer el nuevo piquete de la bacteria en el medio de cultivo.

7.2.3 Prueba de producción de auxinas

En un tubo Falcón con capacidad de 50 mL, se esterilizó 5 mL de Caldo de Soya Trypticaseína al 50% (CST, SOLBIOISA) por autoclave a 121°C durante 15 minutos (Felisa FE-397), se le inocularon 5 colonias bacterianas, que previamente tuvieron un crecimiento de 16 horas, el crecimiento de las bacteria se hizo en cajas petri con medio Agar Soya Trypticaseína (AST, BD Bioxon), una vez colocadas en el medio líquido se incubaron en un shacker a una temperatura de 32°C y agitación de 200 rpm (INFORS HT – Ecotron) durante 16 horas, una vez transcurrido el tiempo se tomó 1 mL del cultivo líquido y se inoculó en 3mL de caldo de Soya al 50% adicionado con 5 mL de L-Triptófano 5 mM = 0.05106 g de L-Triptofano (Sigma-aldrich), este se filtró por membrana de nitrocelulosa con un poro de 0.22 µm y se almacenó hasta su uso.

Para preparar el medio de prueba, se añadieron los 5 mL de solución estéril de L-Triptofano a 45 mL de CST al 50% previamente esterilizado, se mezcló cuidadosamente hasta tener una solución homogénea. Se incubo durante tres días a un temperatura de 32°C y 200 rpm, cuando se cumplió el tiempo se hizo el

revelado de la presencia de auxinas con el reactivo de Salkowski, la bacteria se centrifugó (ESCO, TCR-1500-9) a 4°C con 7,500 rpm durante 5 minutos, se colectó 450 µL del sobrenadante a tubos cónicos de 1.6 mL por triplicado, a estos mismos se les añadió 450 µL del reactivo de Salkowsky, el cual se preparó en base a dos soluciones: la primera se hizo, pesando 1.35 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y se disolvieron en 10 mL de agua destilada; para la solución dos: en 50 mL de HClO_4 al 35% se le agrega 1 mL de la solución uno (cloruro férrico). Ambas soluciones se dejaron a temperatura ambiente. Una vez que se tiene la mezcla de la bacteria con el reactivo de Salkowsky se mezclan por inmersión y la reacción se dejó incubando en oscuridad durante 40 minutos.

El resultado positivo en esta prueba se considera cuando hay un cambio de color en el tubo, pasando de un amarillo a rosa mexicano considerando a la bacteria como productora de auxinas, específicamente ácido indol acético (AIA); si se torna naranja es ácido indol butírico (AIB). El aumento de estas coloraciones nos habla de la concentración de la hormona producida. Así mismo, si la muestra se queda de color amarillo, es negativa para la prueba.

7.2.4 Metodología de la prueba de antifúngicas

Las pruebas de capacidades antifúngicas se hicieron con: *Achromobacter xylosoxidans* (N) bacteria endófito de plántula de 10 días de crecimiento de *Agave marmota*; *Bacillus velezensis* (P1VB) endófito de la planta de banano y *Bacillus amyloliquefaciens* (MaM) endófito de las flores masculinas de coco. Se utilizaron cinco cepas de hongos patógenos dentro del género de *Fusarium*: *F. oxysporum* de

Agave tequilana; *F. solani*, 9DA3 y *Fusarium sp.* vienen de fruta de coco y M2A de fruta de mango. Además, se usaron dos cepas de hongos que son utilizados como benéficos como *Trichoderma asperellum* (TRIASPER) y *Trichoderma sp.*

El crecimiento de las cepas de hongo se midió en medio Agar Dextosa y Papa (PDA, BD Bioxon) esterilizado por autoclave a 121°C durante 17 minutos (Felisa FE-397), fue vaciado en cajas de Petri de plástico de 15mm x 90mm (PETRILLUX), los hongos se incubaron a una temperatura de 27°C, con el objetivo de tener las cepas activas. En cada prueba de inhibición fúngica, se cortó micelio de cada cepa de hongo, cuadros de aproximadamente 4mm x 4mm, estos fueron colocados al centro de una caja de petri con medio PDA nuevo, la prueba se únicamente se hizo por duplicado con las cepas de *B. velezensis* (P1VB) y *A. xylosoxidans* (N). Las cepas fúngicas se incubaron durante tres días o hasta que el hongo tuvo un crecimiento radial de 3.0 centímetros. Posteriormente se colocó la bacteria, considerando la sección periférica del hongo, se midió 1.0 cm lejano a esta (en sentido opuesto) y se trazó una línea de 5.0 cm de forma horizontal, así mismo se hizo de forma paralela el trazo de otra línea (en sentido sur). En sentido este y oeste se dejaron libres como controles del crecimiento de cada cepa.

Las bacterias se activaron directamente de los viales en criopreservación, posteriormente cultivadas en medio de Agar Soya Trypticaseína (TSA, BD Bioxon) esterilizado bajo las mismas condiciones, se hicieron tres resiembras para tener las bacterias activas, estas se dejaron en crecimiento durante 16 horas a 32°C, transcurriendo el tiempo, se tomó una colonia bacteriana con un asa microbiológica previamente esterilizada y se hace una fina línea, en un solo sentido (de izquierda

a derecha) hasta completar los cinco centímetros previamente marcados. Se dejaron incubando durante tres días a una temperatura de 27°C.

En una segunda prueba, se midió el efecto de concentración bacteriana en la línea inoculada, se utilizó el mismo método de activación en los hongos y las bacterias, así como los medios de cultivo. Para la inoculación del hongo, se midió 2.0 cm a partir de la periferia de la caja Petri hacia el centro y se colocó una rodaja de micelio en agar de 4mm x 4mm para cada una de las cepas. Las cepas de *Fusarium*, se dejaron en incubación a 27°C durante dos días, alcanzando un crecimiento del hongo aproximado de 1.5 cm. Desde la periferia del crecimiento del hongo se midió 1.0 cm y se dibujó de forma horizontal una línea de 5.0 cm, las bacterias utilizadas se dejaron crecer durante 16 horas a 32°C, con la toma de una colonia bacteriana se hizo el rayado de la línea, se incubó a 27°C durante 24 horas, al transcurrir el tiempo se hizo una nueva inoculación de la bacteria.

La bacteria tuvo las mismas condiciones de crecimiento, la inoculación se hizo de la siguiente manera: después de nuestra primera línea de crecimiento bacteriano se midió entre 0.5 cm a 1.0 cm de distancia para marcar la segunda línea, esto podría depender del crecimiento diario del hongo y de la movilidad bacteriana previamente colocada, con la cepa de MaM se hizo una medición de 1.0 cm para los hongos *Fusarium oxysporum*, para *Trichoderma sp.* y TRIASPER fue de 1.2 cm, utilizando también la cepa N (AX). Las otras cepas se hicieron a una distancia de 0.5 cm. Se trazó una nueva línea de 5.0 cm, colocando la bacteria con 16 horas de crecimiento. Al cumplir nuevamente 24 horas de incubación se trazó nuestra tercera línea

considerando los mismos parámetros de medición y crecimiento microbiano. La prueba se dejó en incubación un total de 4 días hasta la lectura de los datos, tomando en cuenta desde que se puso la primera línea bacteriana.

7.2.5 Material Biológico: Cepas fúngicas y bacterianas utilizadas en los ensayos

Cepas de *Fusarium*: *F. oxysporum*, 9DA3, *F. solani*, *Fusarium* sp. M2A y dos cepas de *Trichoderma*: AMX y *Trichoderma* sp. P1VB muestra inhibición dentro de las primeras 48 horas, la cual es superada por el hongo al transcurso del tiempo.

7.3 Resultados

La figura 7 presenta las capacidades proteolíticas y antifúngicas de la cepa N (AX) de *A. marmorata* que se comparó con una cepa endófito de la hoja de banana P1VB (Beltrán-García et al., Patente, 2021) que tiene la capacidad de inhibir diferentes tipos de hongos, incluidos el hongo causal de la Sigatoka negra. La cepa de *A. xylooxidans* N (AX) dio negativo a la prueba de proteasa, que se caracteriza por desarrollar un halo de clarificación del medio de cultivo conocido como Skim milk, el cual se usa para determinar proteasas o caseínasas específicas. La cepa P1Vb de banana identificada como *B. velezensis* logró clarificar evidentemente el medio de cultivo.

La capacidad antifúngica se determinó mediante el ensayo de antagonismo dual comparativo. Las cepas de hongos fitopatógenos del género *Fusarium* aisladas de plantas y suelo. *B. velezensis* solo inhibió una cepa de *F. oxysporum* aislada de

A. tequilana. Las otras cepas son retenidas durante las primeras 48 horas post-inoculación, pero este efecto desaparece ya que el hongo crece sobre el inoculo. Por otra parte, la cepa de *A. xylosoxidans* en algunas cepas muestra rasgos de retención en las primeras horas post-inoculación, especialmente en la cepa de *F. solani*, pero se puede considerar de manera general que esta cepa no tiene capacidad antifúngica al menos con estos hongos relacionados con la pudrición seca de los agaves.

En la prueba se utilizó una cepa comercial de *Trichoderma aesperellum* (TRIASPER) donada por el Biol. Juan Pablo Hernández. La cepa de *B. velezensis* no causo la inhibición de *Trichoderma*, al contrario, podemos observar que *B. velezensis* es inhibido ya que la bacteria no crece en el inoculo colocado a 2 cm del hongo en crecimiento. El comportamiento de la cepa N(AX) ante las cepas de *Trichoderma* muestra la existencia de compatibilidad entre ambas, solo se observa una disminución de la esporulación en el sitio de la inoculación de la bacteria.

La figura 8 presenta un ensayo de antagonismo dual simple ya que solo se inoculó una de las bacterias en un lado frontal al crecimiento del hongo y se hizo otra modificación al ensayo, al inocular la bacteria consecutivamente durante 3 días seguidos y cada 24 horas respecto al seguimiento del crecimiento del hongo, con la finalidad de distinguir que el nulo efecto antagónico se debe o a que la bacteria envejece rápidamente y se pierde la inhibición o no tiene capacidad antagónica. En esta prueba se añadió una cepa endófito aislada de flores de coco, la cepa MAM que corresponde a una cepa de *B. amyloliquefaciens*. Respecto a la cepa N (AX) de *A. marmorata*, los resultados son similares al primer ensayo. Bajo este nuevo acercamiento la cepa retiene nuevamente el crecimiento de *F. solani* y la cepa de

Fusarium M2A. Se repite el efecto sobre *Trichoderma* de retrasar las bandas de conidiación. El efecto de retención de la cepa P1VB aumenta por la inoculación continua durante el crecimiento de los fitopatógenos, sin embargo, el hongo sigue creciendo, se repite el resultado de inhibición sobre la cepa de *F. oxysporum*. La cepa MaM tiene efecto de inhibición sobre las cepas de *F. oxysporum* y *Fusarium* spp. y efecto de retención parcial en las otras cepas probadas.

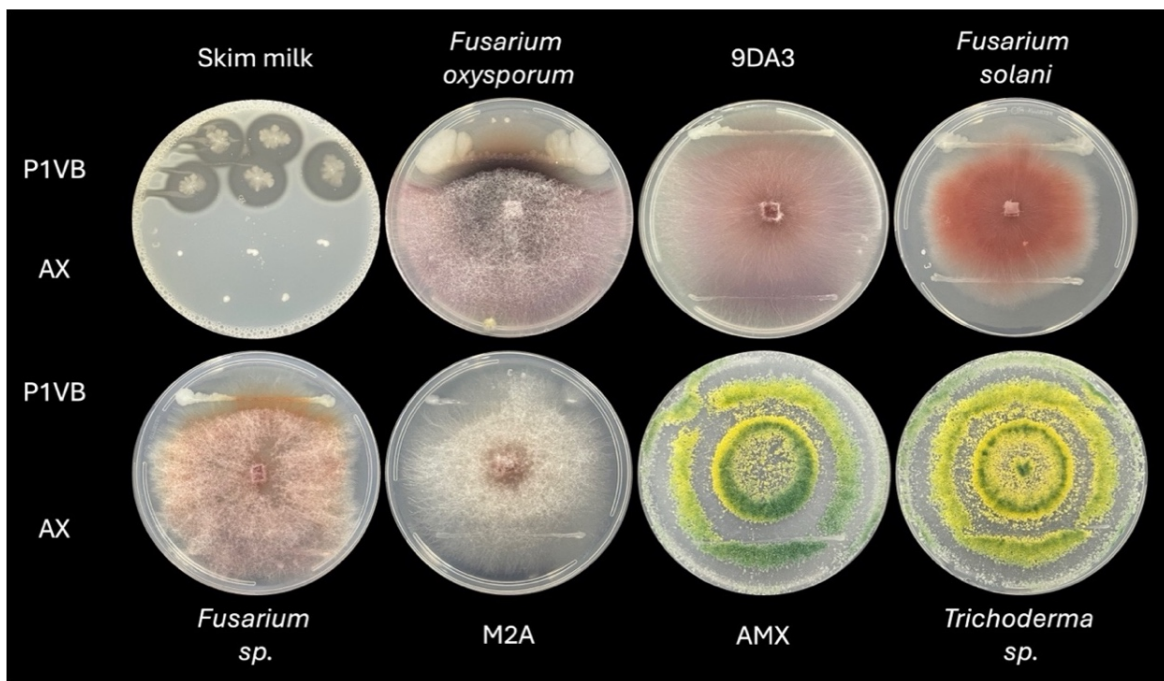


Figura 7. Valoración de la capacidad antifúngica de *Achromobacter xylosoxidans* (AX) contra cepas fitopatógenas de *Fusarium*. Se usó como control una cepa de *Bacillus velezensis* (P1Vb) aislada de hojas de banana. La cepa AX no presenta actividad proteolítica, así mismo no causa alguna inhibición en las cepas de hongos analizadas.

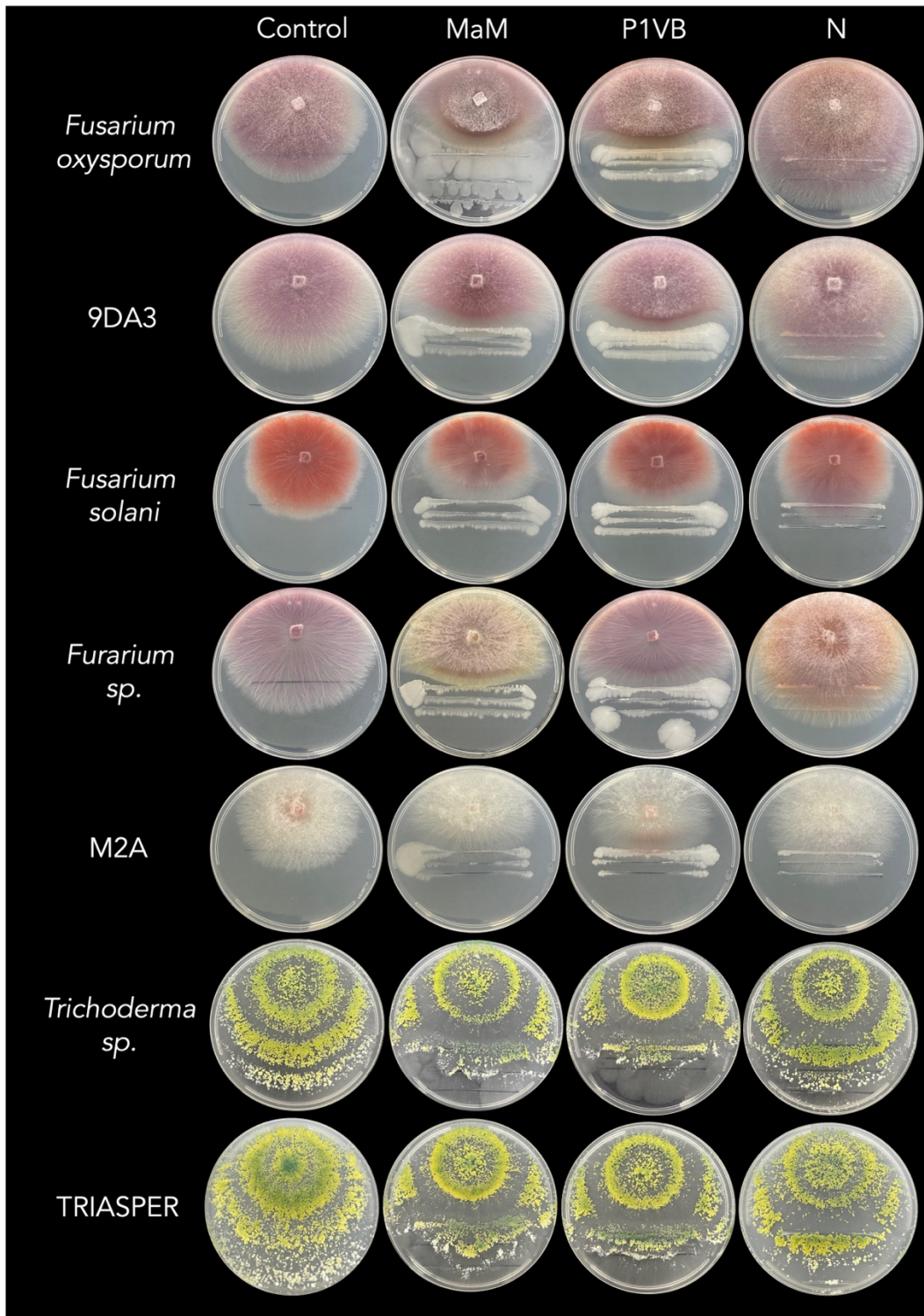


FIGURA 8. PRUEBA DE ANTAGONISMO DUAL PARA VALORACIÓN DE CAPACIDAD ANTIFÚNGICA DE LA CEPA N (AX) DE A. MARMORATA. LA

INOCULACIÓN DE LA CEPA CADA 24 HORAS, CONCLUYE QUE *A. XYLOSOXIDANS* CARECE DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

7.4 Discusión

Ha sido ampliamente reportado algunas de las propiedades que proveen las bacterias endófitas a sus hospedantes incluyen capacidades antagónicas, ya sea por ocupación del nicho o por la secreción de metabolitos secundarios con actividades antifúngicas y antibacterianas (Capítulo 3). Estas sustancias pueden contribuir a la salud general de las plantas hospedantes y a la protección contra enfermedades.

La cepa N (AX) *A. xylosoxidans* aisladas de plántulas de *A. marmorata* de 10 días de desarrollo (Martínez-Rodríguez et al, 2019) fue caracterizada en trabajos anteriores por sus propiedades de promoción y protección del crecimiento de las plantas (Martínez-Rodríguez, Tesis de maestría 2021) en las que se destaca la fijación de nitrógeno atmosférico, la producción de ácido indol butírico (en este trabajo) y a la actividad de ACC deaminasa, enzima involucrada en la degradación del precursor de etileno, el ácido amino-ciclopropanocarboxílico (en este trabajo). Para completar su caracterización se evaluó la capacidad antifúngica. La tabla 5 presenta los porcentajes de crecimiento de las cepas fúngicas probadas en este estudio en presencia de las bacterias endófitas. Las cepas MaM y P1VB tienen efecto de retención/inhibición del crecimiento desde un 90% hasta 29%. Siendo ambas cepas más eficientes contra *F. oxysporum* aislado de cultivos enfermos de *A. tequilana*. La cepa N-Ax de *Achromobacter* no ejerce un efecto de inhibición o retención tal y como se observa en las cepas de *Bacillus* utilizadas como controles. Por el contrario, se observa que las cepas de *Fusarium* son estimuladas en el

crecimiento desde un 15% hasta un 75%. Se observa una inhibición de 29% en una cepa de *Trichoderma*.

Tabla 5. Porcentajes de crecimiento de cepas fúngicas contra *Bacillus amyloliquefaciens* (MAM), *Bacillus velezensis* (P1VB) y *Achromobacter xylosoxidans* (N-Ax).

Cepas fúngicas	Porcentaje de crecimiento (%)		
	MaM	P1VB	N-AX
<i>Fusarium oxysporum</i> 9DA3	10	15	175
<i>Fusarium solani</i>	15.38	15.38	115.38
<i>Fusarium sp.</i> M2A	31.25	31.25	125
<i>Trichoderma asperellum</i>	38.46	57.69	115.38
<i>Trichoderma sp.</i>	71.43	71.43	119.05
	100	92.11	100
	100	100	71.43

Achromobacter xylosoxidans es una bacteria endófitas que también se ha logrado aislar de los tejidos radiculares de banana, tomates, calabazas y judías. La cepa MRH 11de *A. xylosoxidans* aislada de banana tiene la capacidad de producir AIA, la solubilización de fosfatos y la producción de cianuro de hidrógeno y tiene la capacidad de inhibir *in vitro* a *Curvularia lunata*, un hongo que causa la enfermedad de las manchas de las hojas del plátano Cavendish (Chowhan et al., 2023). Por otra parte, La cepa CTA8689 fue aislada de la raíz de frijol común e identificada como *Achromobacter xylosoxidans* utilizando la secuencia de 16S rDNA, las características morfológicas y fisiológicas. La cepa CTA8689 suprimió el crecimiento micelial de *F. solani* en métodos de doble cultivo (58,67%) y filtrados de cultivo (41,87%). Los compuestos orgánicos volátiles (COV) producidos por

CTA8689 inhibieron el crecimiento micelial y la germinación de conidios de *F. solani* en un 42,26% y 59,12%, respectivamente. Además, esta cepa produjo biofilm, enzimas líticas como quitinasa, proteasa y pectinasa, sideróforo, AIA e giberelina, y fue capaz de solubilizar fosfato. Además, la severidad de la enfermedad de la podredumbre de raíz de frijol común se redujo mediante el tratamiento del suelo y las semillas en un 83,89% y 87,60%, respectivamente, 60 días después de la inoculación. Además, la inoculación de *A. xylosoxidans* cepa mejoró los parámetros de crecimiento de las plantas en frijol común bajo condiciones de invernadero (Mohamadpoor et al., 2022).

Otro estudio demostró el efecto de control biológico contra el hongo *Magnaporthe grisea* ejercido por la misma cepa de *A. xylosoxidans* cuando se inoculó en semillas de arroz. Además de disminuir la colonización del hongo fitopatogénico, hubo un aumento en la tasa de germinación, el índice de vigor de las plántulas y el rendimiento de las plantas de arroz inoculadas sin condiciones de enfermedad (Joe et al., 2012).

El análisis de antagonismo dual realizado muestra que *A. xylosoxidans* N (AX) no tiene la capacidad de inhibir las cepas de *Fusarium* probadas, salvo una cepa de *F. oxysporum* y no tiene actividad proteolítica. Tanto la hidrólisis proteica y la capacidad antifúngica se comparó contra otras bacterias endófitas del género *Bacillus*. La formación de halos de clarificación alrededor de la colonia bacteriana en el medio Skim Milk es una prueba que nos ayuda a conocer la secreción de enzimas que degradan la lactosa y la caseína para la obtención de nutrientes durante las primeras 24 horas de incubación con una temperatura de 32°C, una vez

que la bacteria se encuentra en contacto con el medio de cultivo. Las cepas de *Bacillus* utilizadas tienen actividad proteolítica y han mostrado ser inhibidoras de hongos fitopatógenos que afectan cocos y bananas, sin embargo, al igual que la cepa N (AX) su tasa de inhibición es baja, lo que sugiere también que las cepas de *Fusarium* fitopatógenas probadas en este trabajo tienen una resistencia superior a otros hongos fitopatógenos aislados de plantas de banana y coco enano brasileño. Ante las capacidades de promoción de crecimiento de plantas mostradas por la cepa N (AX), sugieren que esta cepa endófito podrá ser utilizadas como una cepa bio-estimulante y no como un agente de control biológico.

Capítulo 8

Compatibilidad de *Achromobacter xylosoxidans* en líneas clónales AM31, AM32 y AM33 de *A. marmorata*.

8. Compatibilidad de *Achromobacter xylooxidans* en líneas clonales AM31, AM32 y AM33 de *A. marmorata*. Publicado en Martínez-Rodríguez A, et al., Micropropagation of Seed-Derived Clonal Lines of the Endangered *Agave marmorata* Roezli and Their Compatibility with Endophytes. *Biology*. 2022; 11(10):1423.

8.1 Resumen

Los microorganismos endófitos (bacterias y hongos) han sido reconocidos por su papel en el crecimiento de las plantas y la protección contra el estrés abiótico y biótico. Plantas derivadas de las líneas clonales de *A. marmorata* fueron inoculadas con cuatro bacterias endófitas. Entre estos, la cepa de *Achromobacter* apoyaron el crecimiento vegetal de la línea AM32. Se observó un efecto notable de muerte vegetal después de la inoculación con *Enterobacter cloacae*, un endófito de *A. tequilana*. Fue difícil determinar si *E. cloacae* se comporta como un patógeno o no soporta el crecimiento de las plantas ya que no se observaron signos de podredumbre bacteriana o de enfermedad y no hubo diferencias significativas en la muerte inducida entre las tres líneas clonales. Además, *Pseudomonas aeruginosa*, un endófito de *A. marmorata*, redujo la biomasa. Aunque la línea AM32 tuvo la respuesta más destacada a la inoculación bacteriana, esto no se refleja en la adquisición total de biomasa. El peso húmedo más alto se observó para el tratamiento con Ax fue 3,82 g. Los datos negativos solo se observaron cuando las plantas fueron tratadas con Ec, Pa y Bt, obteniendo cantidades de biomasa de 3,08 g, 2,98 g y 1,95 g, respectivamente. Para AM31, no se observaron diferencias

significativas entre la inoculación de Ax y Bt (1,32 g y 1,20 g) en este parámetro; sin embargo, se observó un incremento negativo de biomasa para los tratamientos bacterianos con Pa y Ec con 1,40 g y 0,78 g.

Nuestros resultados demuestran la incompatibilidad de *A. marmorata* con *E. cloacae* y la especialización entre la planta huésped y sus endófitos. La compatibilidad de la planta-endófito podría ser explotada para impulsar el establecimiento y la estabilidad de mutualismos que beneficien al desarrollo vegetal, la tolerancia al estrés y la resistencia a los patógenos.

8.2 Métodos

8.2.1 Adaptación de la planta al sustrato de Arena-Vermiculita en microcosmos libre de nitrógeno

Los brotes de las líneas AM31, AM32 y AM33 fueron separados y colocados en cajas de color magenta para enraizamiento en 120 mL de medio MS conteniendo 0.025 mg/L de cinetina, 30 g/L de sacarosa, 2 g/L de carbón activado y 15 g/L de agar bacteriológico como agente gelificante. Los brotes se cultivaron en medios de enraizamiento durante 100 días bajo un fotoperiodo de 12 horas con iluminación led (22 $\mu\text{mol m}^2/\text{S}$). Las plántulas de 3-4 cm de altura y aproximadamente 2 g de peso se aclimatan en un contenedor de vidrio con una mezcla de vermiculita y arena de playa (5:50) esterilizada por autoclave y se regó con medio MS salino sin fuentes de nitrógeno y carbohidratos. La arena de playa fue colectada en "Punta Perula" playa en la Huerta Jalisco, México (Latitud: 19.587855, Longitud: 105.128493) fue lavada varias veces con agua corriente para eliminar material orgánico, secadas al

aire y esterilizadas en autoclave durante 3 h. Estas plantas se cultivaron en cuarto de cultivo a 30°C. La tasa de adaptación de las plantas se determinó después de ocho semanas.

8.2.2 Estimulación del crecimiento de las plantas con bacterias endófitas

Para evaluar el efecto sobre la estimulación del crecimiento vegetal y la compatibilidad de endofitos se utilizaron diez plantas para cada tratamiento de las tres líneas clonales (AM31, AM32 y AM33) transmitidos por semillas de *A. marmorata* y *A. tequilana* entre estos *Achromobacter xylosoxidans* N(Ax) (acceso GenBank MF540449.1), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) EP60A3 (acceso GenBank MF540452.1); *Bacillus tequilensis* (Bt) AT-10 (acceso GenBank KY681426.1) y *Enterobacter cloacae* SEA01 (acceso GenBank KY625189.1).

La siguiente tabla resume las características de promoción del crecimiento de las plantas de las bacterias endófitas utilizadas para evaluar su estimulación del crecimiento en líneas clonales.

Tabla 6. Resumen de las capacidades de promoción de crecimiento de plantas de las bacterias endófitas utilizadas en el ensayo, AX, BV y ML.

Género y especie	Propiedades agronómicas						
	Cepa	GenBank	NFB	NBRIP	ACC	AUX	CAT
<i>A. xylosoxidans</i>	N (AX)	MF540449	+	-	+	AIB	-
<i>B. velezensis</i>	P1VB (BV)	MT919309	-	+	-	AIB	+

<i>M. luteus</i>	PP10B6A (ML)	KY744353	+	-	+	AIA	-
------------------	-----------------	----------	---	---	---	-----	---

NFB: fijación de nitrógeno, **NBRIP:** solubilización de fósforo, **ACC:** producción de ACC deaminasa, **AUX:** producción de hormonas, **AIB:** Ácido Indol Butírico y **AIA:** Ácido Indol Acético, **CAT:** producción de catalasas.

Para la producción de inóculo, las cepas bacterianas se cultivaron en caldo CTS (Trypticaseína de Soya) y se incubaron a 32°C con agitación de 100 rpm durante 20 h. Las suspensiones bacterianas se centrifugaron durante 5 min a 12.850g. Los sobrenadantes se descartaron, y los sedimentos celulares se lavaron tres veces con solución salina al 0.9% más glucosa al 0.1%. El paquete celular bacteriano se suspendió en la solución salina-glucosa a una OD 600nm de 1,0 equivalentes correspondientes a las siguientes UFC's/ml: *B. tequilensis* 70 X10⁶, *E. cloacae* 17.6X 10⁶, *A. xylosoxidans* 1.5X 10⁶ y *P. aeruginosa* 3.4 X10⁶ UFC/mL.

Cada planta aclimatada se trató con 2.5 mL del inóculo bacteriano colocado directamente en el sustrato cerca de las raíces. Se realizaron cinco inoculaciones a cada grupo de plantas por línea clonal durante un período de 14 días. Las plantas se agruparon bajo las siguientes etiquetas: (G1) control de agua, (G2) *B. tequilensis* (Bt), (G3) *E. cloacae* (Ec) aislado de *A. tequilana*, (G4) *A. xylosoxidans* (Ax) y (G5) *P. aeruginosa* (Pa) aislado de *A. marmorata*. Las plantas se mantuvieron en las mismas condiciones descritas anteriormente para la aclimatación. Después de la inoculación bacteriana final, las plantas fueron irrigadas con 2.5 ml de agua destilada estéril cada 3 días. Treinta días después de la inoculación (desde la

primera inoculación), se registró el número de nuevas hojas, raíces, longitud de la raíz y peso fresco y seco de las plantas.

8.2.3 Parámetros de crecimiento de las plantas y compatibilidad de tres líneas clonales con bacterias endófitas

Nuestra intención al aplicar bacterias endófitas es evaluar la compatibilidad y los efectos sobre los parámetros de crecimiento de las plantas entre las líneas clonales. Evaluamos el efecto de una inoculación intensiva con 4 bacterias endófitas en las plantas de las tres líneas clonales seleccionadas de *A. marmorata*.

Seis plantas fueron seleccionadas para cada uno de los 7 grupos para la inoculación con las siguientes bacterias endófitas: *Alcaligenes faecalis* (G2) y *Curtobacterium flaccumfaciens* (G3) como endófitas de *A. angustifolia*; *Bacillus tequilensis* (G4), *Enterobacter cloacae* (G5) cepas endófitas de *A. tequilana* y *Achromobacter xylosoxidans* (G6) y *Pseudomonas aeruginosa* (G7) endófitas de *A. marmorata*. El G1 fue irrigado con agua como el control negativo.

Cultivo de las bacterias. - Las bacterias se incubaron en 50 ml de Caldo Casoy (Trypticaseína de soya) a 32°C durante 20 horas. En 10 tubos Eppendorf se agregó a cada uno 2 ml del caldo con crecimiento bacteriano, estos se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 minutos, se colocaron en hielo mientras se decantó el sobrenadante, se colocaron nuevamente 2 ml a cada tubo para centrifugación, esto con el fin de concentrar la bacteria obtenida en el caldo se decantó el sobrenadante, a los tubos con el pellet de bacteria se les agrego 1 ml de solución glucosa al 0.1%, se agitaron vigorosamente en un vortex hasta que se re-suspendiera la pastilla, se

centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos, este paso se llevó a cabo tres veces. Una vez lavada la bacteria se prosiguió a re-suspender en 5 ml de solución de glucosa al 0.1% en un matraz de 250 ml para ser ajustada a 1 abs (Espectro UV-VIS, Lambda 25). Durante el ajuste la bacteria en todo momento se encontró en hielo. Se hicieron 5 inoculaciones a los grupos en un periodo de 14 días, cada planta se rego con 2.5 ml de bacteria los días 23, 25 y 27 de mayo del 2018, en las dos inoculaciones finales del día 01 y 05 de junio del 2018. La cantidad inoculada de bacteria aumento a 5 ml por planta. Para el grupo de plantas correspondientes a *A. tequilana* se les dio una sexta inoculación el día 15 de junio 2018 con 5 ml por planta. El número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) a una absorbencia de 1 a 600 nm fue de: *A. faecalis* 52×10^4 , *C. flaccumfaciens* 5×10^4 , *B. tequilensis* 70×10^6 , *E. cloacae* 176.5×10^5 , *A. xylooxidans* 15×10^5 y *P. aeruginosa* 34×10^4 .

8.2.4 Evaluación del crecimiento, biomasa producida en las plantas por inoculación de bacterias en *A. marmorata*.

A cada planta se les midió como parámetros de crecimiento, la altura de la planta y las raíces usando una regla en los ejes "X" y "Y" sobre hojas blancas estériles, se contó el número de hojas presentes y se tomó el peso húmedo con una balanza granataria digital (OHAUS).

8.2.5 Análisis de la estructura (arquitectura) de la raíz en plantas de *A. marmorata* y *A. tequilana* inoculadas con bacterias.

Previo a la inoculación de las bacterias, las raíces fueron marcadas con un esmalte de uñas de color blanco. Después de 30 días post-inoculación con las bacterias, las raíces que fueron marcadas antes de colocarlas en aclimatación, fueron cortadas alrededor de 2 cm cada una, se disolvió una pastilla de DAB (3,3-diminobencidina) (Sigma-Aldrich) en 15 ml de agua destilada estéril, se agregó 5 ml de la solución en viales de vidrio junto con las raíces de G3, G4, G6 y G7, se dejaron en contacto con la solución durante 24 horas. Cumpliendo el tiempo fueron lavadas con agua corriente para quitar el exceso de tinción, las raíces se colocaron 2 ml de una solución azul de anilina durante 15 minutos.

Posteriormente fueron lavadas con agua corriente y se analizaron al microscopio. Se evaluó el promedio de número de pelos radiculares en 1 cm de raíz, contando en sentido arriba y debajo del fragmento, para su longitud se colocó una hoja milimétrica bajo el portaobjetos y a nivel de microscopio se registró la altura de 50 pelos radiculares en cada sentido para obtener un promedio. Además, se determinó el número de raíces secundarias presentes en 1 cm el esquema a seguir se muestra en la figura 9.

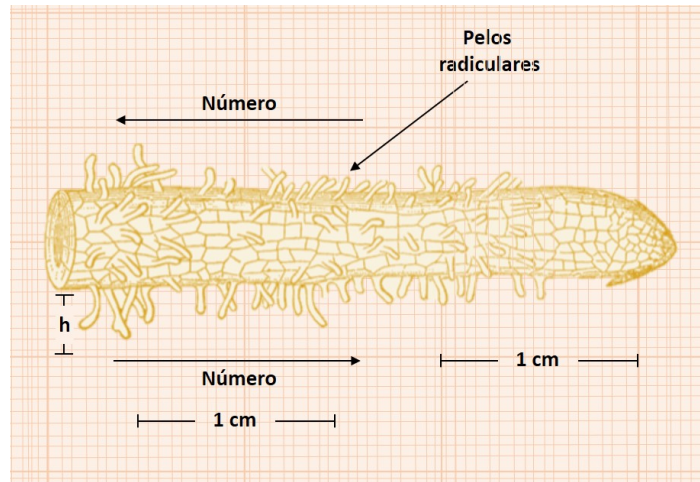


Figura 9. Representación estructural de la raíz, esquema a seguir para el conteo de pelos radiculares, altura y presencia de raíces secundarias en 1 cm bajo hoja milimétrica.

8.3 Resultados

La figura 9 muestra los resultados del crecimiento, incluyendo la aparición de nuevas hojas y el número de raíces formadas, longitud de raíz (cm) y peso fresco y seco (g) de plantas inoculadas con bacterias endófitas. Durante este ensayo, las plantas no fueron alimentadas con ninguna solución mineral o fuente de carbono o nitrógeno. Como se esperaba, no se observó ningún efecto significativo sobre el crecimiento de las plantas en ninguna línea clonal bajo tratamiento de control irrigado solución salina-glucosa. Por lo tanto, los efectos positivos y negativos sobre el crecimiento de las plantas deben atribuirse directamente a la inoculación bacteriana.

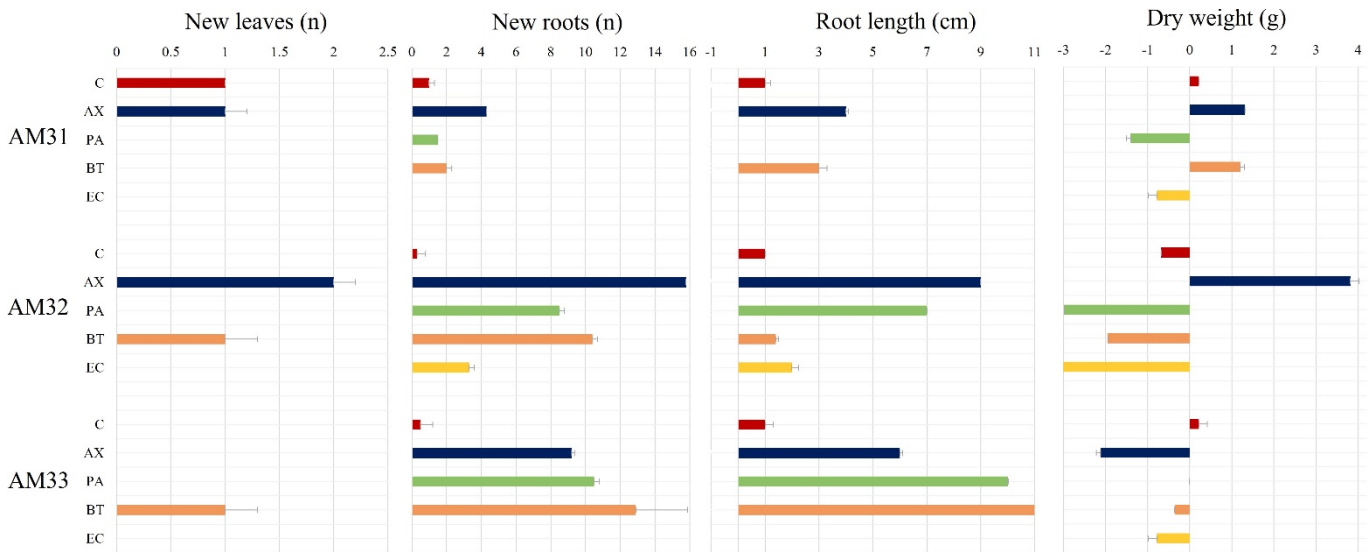


Figura 10. Las bacterias endófitas afectan el crecimiento de las líneas clonales am31, am32 y am33 bajo limitación de nutrientes. El grupo control de la planta fue tratado con una solución salina-glucosa. Los efectos positivos y negativos sobre el crecimiento de las plantas deben atribuirse directamente a la inoculación bacteriana. Los datos se presentan como la media y el error estándar de la media de las plantas inoculadas en la formación de nuevas hojas, raíces, longitud de raíz y peso seco 30 d post-inoculación. Los valores y las medias representan tres experimentos replicados. C = control, ax = *a. Xylooxidans*, pa = *p. Aeruginosa*, bt = *b. Tequilensis* y ec = *e. Cloacae*.

La figura 10 muestra que la línea AM31 no responde significativamente a la inoculación con las bacterias. Por ejemplo, no emergieron nuevas hojas en lotes de plantas tratadas con *B. tequilensis* y *P. aeruginosa*. No se detectó también una respuesta en la estimulación de formación de raíces nuevas tras los tratamientos microbianos, excepto para las plantas inoculadas con *A. xylooxidans* (Ax), que

formaron + 3 raíces comparadas con el control. La inoculación de *E. cloacae* en la línea AM31 causó la muerte de las plantas. En la línea AM32, la inoculación con *B. tequilensis* (Bt) o *A. xylosoxidans* (Ax) indujo la aparición de una o dos hojas nuevas durante el período post-inoculación. Las plantas de control no forman hojas nuevas. Las hojas de las plantas formadas e inoculadas con Ax presentaban un aumento en el tono de verde, indicativo de la síntesis de clorofila. El efecto destacado de la inoculación bacteriana en AM32 está relacionado con el número de raíces y su longitud. Por ejemplo, AX aumentó hasta 14 nuevas raíces en comparación con las plantas de control. Para la cepa BT se observaron un total de 11 nuevas raíces, seguidas por PA con 8 y EC con 3. Un efecto sobre la longitud de la raíz se asoció con las cepas AX y PA, produciendo un aumento de nueve y siete centímetros.

Aunque la línea AM32 tuvo la respuesta más destacada a la inoculación bacteriana, esto no se refleja en la adquisición total de biomasa. El peso seco más alto se observó para el tratamiento con AX con 3,82 g. Los datos negativos solo se observaron cuando las plantas fueron tratadas con EC, PA y BT obteniendo cantidades de biomasa de 3,08 g, 2,98 g y 1,95 g, respectivamente. Para AM31, no se observaron diferencias significativas entre la inoculación de AX y BT (1,32 g y 1,20 g) en este parámetro; sin embargo, se observó un incremento negativo de biomasa para los tratamientos bacterianos con PA y EC con 1,40 g y 0,78 g.

Al igual que en las otras dos líneas clonales, la inoculación con bacterias endófitas aumentó el número de raíces y la longitud de la raíz en la línea AM33 comparada con el control. La cepa Bt indujo la formación de 10 nuevas raíces, con un promedio cercano a los 11 cm. En los tratamientos con AX y PA, se observó la formación de 5 y 8 raíces más que el control, respectivamente. No se detectaron cambios

significativos en el aumento de peso. La cepa de *A. xylosoxidans* contribuyó con mayor formación de raíces en todas las líneas clonales propagadas, produciendo 16 nuevas raíces. Aquí, encontramos un notable efecto sobre la muerte de las plantas causada por la inoculación de *E. cloacae* y una reducción en la adquisición de biomasa de las líneas AM31 y AM32 causada por *P. aeruginosa*. Estas observaciones indican incompatibilidad entre *E. cloacae* y las líneas clonales y la especificidad de *A. xylosoxidans* y *P. aeruginosa* para *A. marmorata* (Fig. 9)

Bacillus tequilensis es una bacteria endófito que fue aislada de las semillas de *A. tequilana*. Tiene un buen efecto en la línea AM33, especialmente en lo que se refiere a la formación de raíces (número y longitud). En las otras líneas clonales, sus efectos fueron bastante limitados. En este caso, la línea AM32 tuvo una respuesta moderada a la inoculación de esta bacteria, y algunas plantas murieron.

8.4 Discusión

Los microorganismos endófitos (bacterias y hongos) han sido reconocidos por su papel en el crecimiento de las plantas y la protección contra el estrés abiótico y biótico (White et al., 2021). La definición general de microorganismos endófitos se refiere a las bacterias y hongos que pueden vivir en los tejidos vegetales sin síntomas de infección por enfermedades. Sin embargo, la plasticidad fenotípica de los endófitos explica su conversión del mutualismo al antagonismo en diferentes plantas según la hipótesis propuesta por Schulz y Boyle en 2005.

Las asociaciones entre plantas y microorganismos se remontan a más de 400 millones de años. Ecológicamente, las plantas son consideradas holobiontes, es

decir se asocian con microorganismos, que son un grupo diverso que puede incluir bacterias, arqueas, hongos, protistas, algas y animales. La teoría del holobionte describe la relación interdependiente entre las plantas y sus microbios, que puede ser beneficiosa o perjudicial (Berg et al., 2024).

Los microorganismos endófitos son esenciales para la microbiota de la planta. Varias publicaciones mencionan la importancia de los endófitos en las plantas micropropagadas a través de la "biotización", en la que su inoculación mejora el crecimiento, desarrollo y resistencia de las plántulas, incluso facilitan la adaptación a una transferencia segura en condiciones *ex vitro* en diferentes etapas antes de la introducción en el ambiente de cultivo. La biotización de las plantas es un proceso biotecnológico que implica la inoculación de plantas con microorganismos, como bacterias o hongos, para mejorar su crecimiento y tolerancia al estrés. Los microorganismos proporcionan nutrientes y hormonas vegetales a las plantas, mientras que las plantas aportan compuestos orgánicos, conocidos como fotosintatos a los microorganismos mediante la fotosíntesis (Tamošiūnė et al., 2018; Kanani et al., 2020; Soumare et al., 2021, Salotti et al., 2023).

Antes de este estudio, nuestro grupo de investigación demostró cómo las bacterias endófitas apoyan el crecimiento de *A. tequilana* en condiciones de nitrógeno limitado (Beltran-Garcia et al., 2014). En este trabajo de investigación se mostró la existencia de incompatibilidad entre *E. cloacae* y las líneas clonales y la especificidad de *A. xylooxidans* y *P. aeruginosa* con *A. marmorata*. Según Sneek et al. en 2019, una de las consecuencias potenciales de la transmisión vertical es la especialización

entre el huésped y su simbiote (bacteria endófito). Estos simbioses pueden haberse hecho compatibles con especies o genotipos de los huéspedes y son incompatibles con plantas anfitrionas genéticamente nuevos. En consecuencia, se observaron limitaciones de colonización del huésped y un crecimiento deficiente del simbiote en plantas genéticamente diferentes de la planta madre (por ejemplo, plantas derivadas de semillas).

Enterobacter cloacae es una bacteria endófito ampliamente distribuida entre las plantas y sus semillas (Aguilar-Jimenez, et al., 2018; Lima et al., 2018; White, et al., 2018; Mukherjee et al., 2021). Los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación mostraron que la cepa de *E. cloacae* SEA02 indujo una notable acumulación de biomasa en plantas micropropagadas de *A. tequilana*, proporcionando nitrógeno orgánico una vez que la bacteria colonizó la raíz (manuscrito de García-Ochoa en preparación). Además, en plantas de banano micropropagadas, la inoculación de *E. cloacae* endófito es altamente colonizadora (cepa C2) mejoró el crecimiento de las plantas, transfiriendo nutrientes del suelo a las raíces, convirtiéndolas así en una bacteria esencial para los plátanos (Macedo-Raygoza et al., 2019; Martínez-Rodríguez et al., 2019).

Anteriormente se demostró que la inoculación de *E. cloacae* SEA02 en las raíces de *A. tequilana* induce rápidamente la acumulación de H₂O₂ en toda la planta en pocos minutos (Lima et al., 2018). Este hecho está relacionado con una respuesta natural de las plantas a la percepción endófito, donde las plantas consumen bacterias para obtener nutrientes en condiciones limitadas, especialmente nitrógeno.

Por otra parte, *B. tequilensis* es una bacteria endófito que pudo ser aislada de las semillas de *A. tequilana*. La inoculación de esta cepa afecto a la línea AM33, especialmente en la formación de raíces (número y longitud). En las otras líneas clonales sus efectos fueron de limitados a nulos. Se ha demostrado que, cuando se cultivan las plantas con N y P limitados, la cepa de *B. tequilensis* proporciona N orgánico a las plantas de *A. tequilana* (Beltran-Garcia et al., 2014). *B. tequilensis* también ha demostrado transferir N orgánico por proteínas marcadas isotópicamente y ácidos nucleicos de bacterias utilizando $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ como fuente de nitrógeno. Tras varias inoculaciones, el material nitrogenado de las células de *A. tequilana* comenzó a incorporar ^{15}N , incluso en la clorofila, donde los cuatro átomos de nitrógeno de la molécula están marcados isotópicamente (Beltran-Garcia et al., 2014). En este trabajo, la línea AM32 tuvo una respuesta moderada a la inoculación de esta bacteria, y algunas plantas murieron.

La figura 10 representa un resumen del comportamiento de las líneas clonales inoculadas con bacterias endófitas, mostrando que N-AX tiene n mejor efecto sobre el crecimiento de las líneas AM31 y AM32, mostrando cambios drásticos especialmente en la línea AM32 tanto en el número de hojas y tamaño de las raíces. Los efectos de las inoculaciones bacterianas sobre el crecimiento de cada línea clonal se resumen en la figura 11, que también indica cual fue el mejor parámetro de crecimiento causado por una bacteria específica. Como se ha mencionado anteriormente, las plantas inoculadas con *E. cloacae* causaron que más plantas murieran; Por lo tanto, es difícil determinar si *E. cloacae* se comporta en las líneas celulares de *A. marmorata* como un patógeno o no soporta el crecimiento de las plantas ya que no se observaron signos de podredumbre bacteriana o de

enfermedad y no hubo diferencias significativas en la muerte inducida entre las tres líneas clonales. Según García-Ochoa de nuestro grupo de investigación, la cepa *E. cloacae* SEA02 tiene propiedades promotoras de plantas como la fijación del nitrógeno y la actividad de la deaminasa ACC. Sin embargo, este endófito no produce auxinas, lo que probablemente explica la falta de estimulación de las raíces en *A. marmorata*, lo que obstaculizó varios parámetros de crecimiento. En cambio, las cepas Bt, Ax y Ps producen auxinas del tipo IAA.

En este trabajo no se evaluó la existencia de diferencias genéticas entre las líneas clonales seleccionadas, pero sí observamos las respuestas de crecimiento de las plantas debido a la inoculación endófito. La respuesta más alta fue en la línea AM32, respecto a la formación de raíces y el crecimiento. La inducción del crecimiento de las raíces es esencial para los agaves porque proporciona anclaje en el suelo y agua y absorción de nutrientes, ambos son procesos fundamentales en suelos erosionados y secos.

La cepa de *A. xylooxidans* que fue aislada de plántulas de 10 días de *A. marmorata* contribuyó con mayor formación de raíces en todas las líneas clonalmente propagadas, produciendo hasta 16 nuevas raíces. Un estudio de Aguilar-Jimenez y Rodríguez en 2018, informó alargamiento de la raíz cerca de 9,3 cm en plántulas de *A. marmorata* cultivadas en un medio MS suplementado con 10 mg/L del ácido acético indol (AIA) auxina. La cepa N (AX) utilizada en este trabajo es un endófito diazotrófico, y un solubilizador de fosfatos previamente aislado de plántulas de *A.*

marmorata desarrollado 10 días después de la germinación de las semillas (Martínez-Rodríguez et al., 2019).

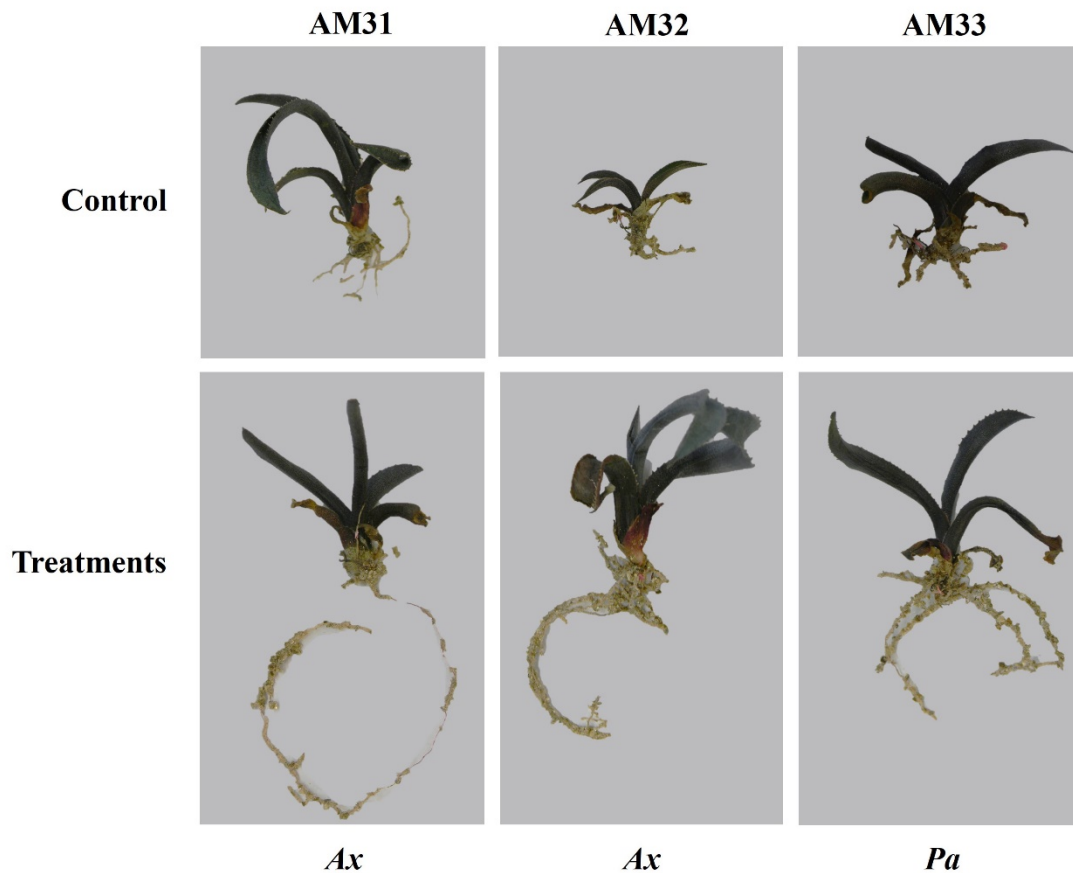


Figura 11. Respuesta de las líneas clonales de *A. marmorata* a la inoculación con bacterias endófitas. La figura resume el mejor tratamiento entre inoculación bacteriana y control, donde *A. xylooxidans* fue el mejor tratamiento para AM31 y AM32, y *P. aeruginosa* fue el mejor tratamiento para AM33.

Pocos estudios publicados han demostrado el potencial de *A. xylooxidans* como endófito y su capacidad de mejorar el crecimiento de las plantas (PGPB). Benson et al. (2013) informaron de que la cepa AUM54 de *A. xylooxidans*, combinada con ácido indolo3-butírico (IBA), promovía el crecimiento de brotes, longitud de la raíz,

el número de raíces y la tolerancia al estrés en comparación con las plantas de control en condiciones de micropropagación de la planta medicinal *Naravelia zeylanica*, que se encontraba en peligro de extinción. Los autores también demostraron que *A. xylosoxidans* desempeña un papel en el aumento de la supervivencia de las plantas durante la aclimatación en invernadero.

Además, Jana y Yaish (2021) han demostrado recientemente que la cepa de *A. xylosoxidans* SQU-1, cepa de rizobacterias aislada de palmeras datileras (*Phoenix dactylifera* L.) cultivadas bajo salinidad, mejora la germinación de semillas de palmera datilera y el crecimiento de *Arabidopsis* en condiciones normales y salinas. El aumento de peso seco en las plantas de la línea AM32 está posiblemente relacionado con la contribución del AX al suministro de nutrientes. Sin embargo, los mecanismos y las respuestas de la línea clonal a la biotización con *A. xylosoxidans* todavía necesitan ser explorados.

Las plantas micropropagadas a menudo presentan diferencias en el tipo de microbioma endófito en comparación con las plantas cultivadas convencionalmente. De hecho, durante el proceso de sanitización de los tejidos muchos microorganismos beneficiosos son eliminados a través de los protocolos de micropropagación utilizados. La biotización con endófitos se considera una nueva estrategia atractiva para proteger las plantas que se micropropagan, evitando la mortalidad cuando se transfieren de condiciones *in vitro* a *ex vitro*. Las plantas micropropagadas inoculadas con bacterias endófitas muestran cambios fisiológicos y de desarrollo y resistencia a los patógenos (Leite et al., 2021; Pushpakanth, et al., 2021; Castro-Restrepo et al., 2022; Ważny et al., 2022).

Capítulo 9

Estimulación de la acumulación de total de biomasa vegetal, raíces, emergencia y tamaño de hojas) de plantas micropropagadas de *A. marmorata* por aplicaciones de bacterias endófitas, nitrato de lantano y nitrato de amonio

9. Estimulación de parámetros biométricos (acumulación de total de biomasa vegetal, raíces, emergencia y tamaño de hojas) de plantas micropropagadas de *A. marmorata* en respuesta a aplicaciones de bacterias endófitas, nitrato de lantano y nitrato de amonio

9.1 Metodología

Las características biométricas después de las aplicaciones en las plantas de *Agave marmorata*, se midieron bajo los parámetros de hojas nuevas producidas, raíces nuevas, peso seco total en gramos.

Cada planta se adaptó durante dos semanas en un microcosmos en frascos de cristal y tapón de algodón con 250 g de arena de desierto, esterilizada por autoclave durante 3 horas a 121°C. Se colocaron 10 plantas por cada tratamiento, en un total 6 grupos: control de agua (C-), *Achromobacter xylosoxidans* (AX), *Bacillus velezensis* (BV), *Micrococcus luteus* (ML), Nitrato de amonio (NH_4NO_3) y Nitrato de Lantano a 10 ppm ($\text{La}(\text{NO}_3)_3$). Las plantas se trataron durante 15 semanas en total, en las cuales se regaron con los tratamientos cada 2 semanas: generando un registro de 8 aplicaciones totales distribuidos en las semanas 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15. El riego normal de las plantas se hizo con agua destilada estéril. La recolección de los datos por tratamiento se hizo durante la semana 5 con un total de 2 inoculaciones-estimulaciones, para la semana 10 se tenían 5 inoculaciones y a la semana 15 se completaron 8 inoculaciones.

Los grupos de plantas se iniciaron de forma homogénea con 5 hojas cada una de las plantas y 6 raíces en total. La recolección de datos se hizo cada 5 semanas,

sacando las plantas de los microcosmos que se encuentran estériles, la planta se seccionó en una caja de Petri con bisturí estériles, en 5 partes: **raíces**, **pseudotallo** y las hojas en tres partes: la **base** de la hoja que conecta con el pseudotallo, el **centro** de la hoja y la **punta**, como se muestra en la figura 12. Se tomaron dos plantas tratadas por cada tratamiento, tomando fotografías sobre hojas estériles, se midió el tamaño de las plantas con dos reglas bajo ejes “X” y “Y”, se contó el número de hojas, dando un valor unitario, al igual que las raíces.

Los valores registrados para las pruebas biométricas, se hicieron en función del tejido que se perdió o la generación de nuevas hojas y raíces, bajo el parámetro de valores unitarios por cada tratamiento a las 5, 10 y 15 semanas.

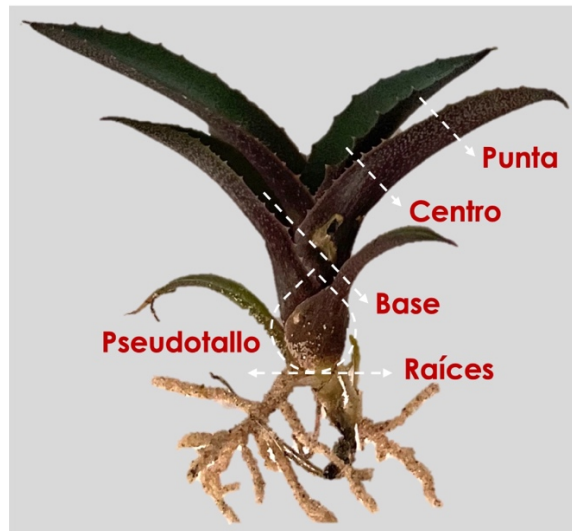


Figura 12. Representación de los cortes hechos en las plantas de *Agave marmorata*. Sección de raíces, pseudotallo y hojas: base, centro y punta. Obtención del material vegetal para análisis de biomasa seca y recuperación de microorganismos.

En frascos de vidrio estériles de 20 ml se colocó el tejido fresco de cada sección y se pesó en una balanza analítica (OHAUS), el peso del tejido se dividió en pesos similares para ser destinados a dos procesos: extracción de bacterias y determinar peso seco. El tejido se dejó secando en una estufa a una temperatura de 85°C, hasta tener un peso seco constante, este se pesó nuevamente por cada sección de tejido y se hizo el peso de la planta completa.

Para determinar el porcentaje de biomasa seca, se registró el peso seco completo de la planta (raíces, pseudotallo y las tres secciones de las hojas), en cada sección de la planta se sacó su porcentaje con la representación de su valor en peso seco, representado por la siguiente fórmula.

$$\text{Porcentaje de biomasa seca (\%)} = \frac{\text{Peso seco por sección de planta (g)}}{\text{Peso seco total de la planta (g)}} * 100$$

Dando un valor representado por la mayor acumulación de biomasa seca para cada sección de la planta por tratamiento. Esto se hizo únicamente en la semana 10 y 15 para los tratamientos C-, AX, BV, ML y La(NO₃)₃.

9.2 Resultados

La figura 13 representa el comportamiento de las plantas de los distintos lotes que fueron divididos respecto al tipo de aplicación ya sea química o biológica. El panel A, muestra que Las plantas en cada uno de los tratamientos, empezaron con 5 hojas totales después de la adaptación. Las plantas del cultivo testigo o control tuvo una pérdida de 2 hojas en las primeras 5 semanas al igual que en los tratamientos con

nitrate de lantano ($\text{La}[\text{NO}_3]_3$) nitrate de amonio (NH_4NO_3) y las bacterias *B. velezensis* (BV) y *Micrococcus luteus* (ML). El grupo de *A. xylosoxidans* tuvo la perdida de una hoja, por lo que este comportamiento de perdida de hojas es parte de la fisiología de adaptación de la planta. En este tiempo las plantas tratadas con NH_4NO_3 se consideran muertas.

En la semana 10, las plantas tenían 5 aplicaciones. En este punto del seguimiento se halló que los grupos de plantas tratadas con BV, $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ y el control tuvieron la recuperación de casi 1 hoja. Las plantas tratadas con ML emitieron 3 hojas nuevas y las plantas con tratamiento con NH_4NO_3 murieron todas. Las plantas tratadas con AX perdieron una hoja. A las 15 semanas de tratamiento y con un acumulado de 8 aplicaciones las plantas tuvieron una recuperación de una hoja promedio respecto a las 10 semanas, salvo las plantas tratadas con ML y el control que tuvieron perdida de 3 hojas, finalizando con 3 hojas activas. El lote AX incremento 0.50 hojas en promedio respecto a la semana 10 y terminó con un total de 4 hojas. El tratamiento con BV emitió 1.1 hojas y termino con 4.60 hojas activas. Por último, el lote tratado con el lantánido aumento una hoja y termino con 5 hojas activas. El comportamiento en la emisión de hojas es oscilante, lo que sugiere que las aplicaciones de lantánidos y bacterias producen un estrés que mantiene en un numero de hojas similares al final de los ensayos. La tendencia a incrementar hojas de manera constante entre las 10 y 15 semanas solo se observa en los tratamientos con $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ y las bacterias *Achromobacter* y *Bacillus*.

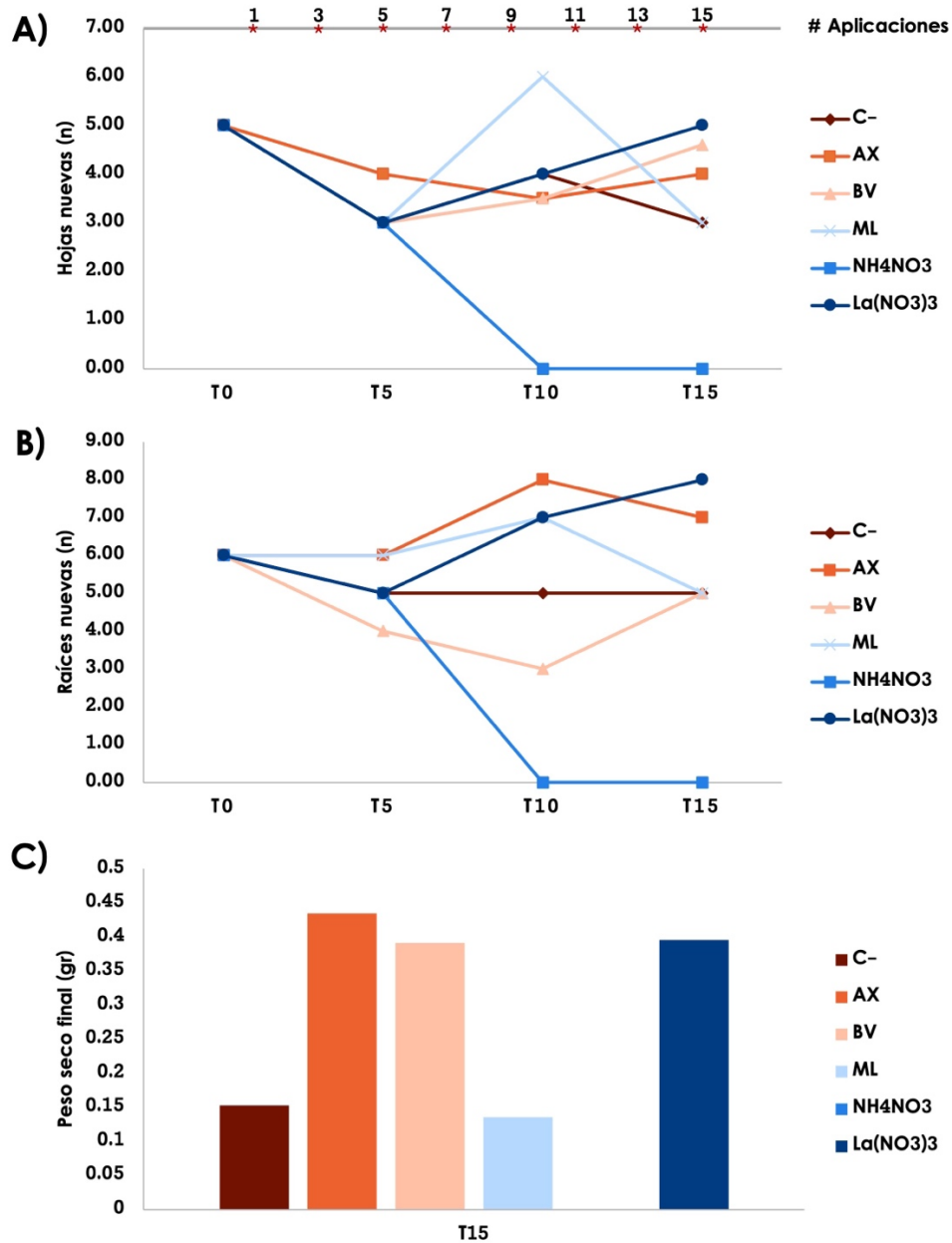


Figura 13. Acumulación de biomasa vegetal inducida por aplicaciones de bacterias endófitas y nitrato de lantano. A) Emisión de hojas nuevas; b) Emisión de raíces nuevas; c) Biomasa seca final. Se presenta el seguimiento durante 15 semanas con 8 aplicaciones totales. Los tratamientos con el lantánido y las bacterias *A. xylooxidans* y *B. velezensis* influyen en el contenido de biomasa final con diferencias significativas en la emisión de hojas y raíces.

Otro parámetro medido fue la emisión de raíces. Todas las plantas empezaron con un promedio de 6 raíces cada una como se muestra en el panel B. El lote control durante el seguimiento y en respuesta a las aplicaciones se mantiene sin cambios en la emisión de raíces desde la semana 5 hasta la semana 15, experimentando una pérdida de 1 raíz en las primeras 5 semanas del ensayo. El lote de plantas Ax no tiene cambios negativos en las primeras 5 semanas manteniendo sus 6 raíces, aumentando en la emisión de raíces en las siguientes 5 semanas (T10) y sufre un decaimiento entre las semanas 10 y 15, terminando con 7 raíces al final del experimento.

La bacteria BV o *Bacillus velezensis*, tiene un efecto negativo sobre la emisión de raíces perdiendo hasta casi 3 raíces en las primeras 10 semanas, tendencia que cambia a partir de la semana 10 con la emisión de 2 raíces nuevas, finalizando el seguimiento con 5 raíces activas. Las plantas tratadas con la bacteria *Micrococcus luteus* (ML) incrementan en promedio 1 raíz en las primeras 10 semanas de aplicaciones y pierde una raíz entre la semana 10 y la 15. Por último, el tratamiento con nitrato de lantano se comporta con un efecto de estimulación de hasta 2 raíces nuevas de la semana 5 hasta la 15, experimentó un decaimiento en las primeras 5 semanas, en este tratamiento las plantas terminaron el seguimiento con 8 raíces activas.

El panel C, presenta el comportamiento final de las plantas respecto al peso seco total. Los valores en mg de biomasa seca indican que el lote con menor acumulación de biomasa corresponde al lote tratado con *M. luteus* con 0.1355 g seguido del control tiene 0.1525 g. Dentro de los lotes con mayor peso seco al final se muestra

que el tratamiento con Ax tuvo 0.4338 gramos, *B. velezensis* con 0.3912 g y el $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ con 0.3958 gr.

La tabla 7, presenta de manera diferencial las secciones de las plantas con el mayor porcentaje de biomasa seca en las semanas 10 y 15 de seguimiento en el crecimiento. El lote control en la semana 10, distribuye la acumulación de biomasa un 47% en las hojas, un 14% en el pseudotallo y un 39% en la raíz. En la semana 15 y final del seguimiento se muestra que la mayor acumulación de biomasa seca es en la raíz con un 62% del total, seguido del 23% en el pseudotallo. Los tratamientos biológicos con BV, Ax y MI muestran que la biomasa de las plantas se acumula principalmente en las hojas con valores del 63% y 62% en la semana 10 y 15 del lote tratado con *M. luteus* respectivamente, 53 y 74% en el lote tratado con *B. velezensis* en las semanas 10 y 15 y el tratamiento con *Achromobacter* con 61% y 54% en las mismas semanas de seguimiento. El porcentaje de biomasa más alto acumulado en el pseudotallo se observó en el tratamiento con ML con 31% en la semana 15 y el tratamiento que indujo el mayor porcentaje de biomasa seca en la raíz se presentó en el lote tratado con BV con un 33% en la semana 10, posteriormente este valor decae al 13% en la semana 15.

Tabla 7. Porcentaje de biomasa seca por sección de *Agave marmorata* en la semana 10 y 15 bajo tratamientos biológicos y químicos.

Tratamientos	C-		AX		BV		ML		La(NO ₃) ₃	
	Semanas cumplidas a la toma de muestra									
	10	15	10	15	10	15	10	15	10	15
Porcentual de biomasa seca total por sección de la planta (%)										
Hojas	47	15	61	54	53	74	63	62	41	35
Pseudotallo	14	23	20	18	14	13	15	31	12	11
Raíz	39	62	19	28	33	13	22	7	47	54

El tratamiento con lantano presentó la mayor acumulación en la raíz, con un 47% y 54% en la semana 10 y 15 respectivamente y con 41% y 35% en las hojas en los mismos tiempos de colecta de datos.

9.3 Discusión

En esta sección del trabajo se valoró la utilización de bacterias y nitrato de lantano como agentes de bioestimulación de las plantas. El uso de microorganismos o moléculas químicas orgánicas e inorgánicas promueven el uso eficiente de nutrientes, aumentan el estrés y mejoran la calidad de las plantas, independientemente de su contenido nutricional. El objetivo fundamental de este proyecto es la conservación y restauración de los ambientes agaveros con plantas de *Agave marmorata*. La sobrevivencia de las plantas derivadas de la micropropagación es baja debido a que como parte del protocolo de la técnica se debe reducir el contenido de microorganismos entre ellos los endófitos. Por lo que la adaptación a respuestas de estrés y la protección inducida por bioestimulantes biológicos o químicos son una opción para evaluar la tolerancia de plantas de agave micropropagadas al cambio de *in vitro* a *ex-vitro*.

Los valores biométricos en el crecimiento de las plantas evaluado fueron la emisión de hojas nuevas y raíces bajo aplicaciones intensivas cada 2 semanas de bacterias endófitas y un lantánido en una condición de limitación de nutrientes, promoviendo que las bacterias sean utilizadas como fuente de nutrición orgánica y además provocar la estimulación. Los datos obtenidos del comportamiento de las plantas inoculadas son muy similares, solo varía respecto a la progresión del tiempo.

La adaptación de la planta al nuevo sustrato comienza con la pérdida de material vegetal en las primeras 5 semanas, especialmente la pérdida de dos hojas, esta senescencia es inducida por la limitación de nutrientes del sustrato que permite la movilización del nitrógeno a partir de la degradación de proteínas fotosintéticas proporcionando una enorme fuente de nutrición de los órganos de crecimiento como nuevas hojas (Masclaux-Daubresse et al. 2010). En este tiempo se encontró que la doble aplicación de la cepa de *Achromobacter xylosoxidans* disminuyó el efecto de pérdida de 1 hoja en las plantas, sin embargo, no se observa una estimulación, al contrario, la pérdida de hojas continúa hasta la semana 10. Se observa una pequeña recuperación de 0.5 hojas promedio hasta la semana 15 en la cual finalizó el seguimiento (Fig. 13A).

Por el contrario, la cepa de *Achromobacter* tiene mayor efecto sobre la estimulación de raíces, reflejando un incremento a partir de la semana 10 de tratamiento (Fig. 13B). Sin embargo, al final del seguimiento este tratamiento biológico acumula 3.3 veces más biomasa que el control y el tratamiento con *Micrococcus luteus* (ML). El comportamiento de distribución de biomasa tal y como se muestra la tabla 7 indica que la mayor acumulación de biomasa se distribuye en las hojas de las plantas

acumulando el 61% y 54% en las últimas dos colectas del seguimiento, pero este es un evento que también se observa en los otros tratamientos biológicos.

Las plantas en la naturaleza son colonizadas por un grupo enorme de bacterias, protozoarios y hongos. Estos microbios contribuyen con la resistencia de las plantas en condiciones agresiva, desde el estatus nutricional del suelo, pH, fitopatógenos y factores relacionados con el cambio climático (sequía, salinidad, ondas de calor, etc.) (Martinez-Rodriguez et al., 2014). La selección de bacterias como *Achromobacter* y debido a su compatibilidad la vuelven prometedora. Los hallazgos muestran que la bacteria incrementa el material radicular, pero la mayor cantidad de biomasa se reserva en las hojas, aunque no se refleja en el número de hojas emitidas, este hecho sugiere que la bacteria rescata a las plantas del estrés nutricional y estimula una estructura vegetal que mantiene activa a la planta y de acuerdo al análisis de promoción de crecimiento, esta bacteria tiene la capacidad de producir ACC deaminasa, una enzima que retrasa la senescencia inducida por el etileno y reanuda el crecimiento de las plantas.

Este fenómeno de rescate ante una condición de estrés también fue observado en plántulas de *Arabidopsis* bajo estrés alcalino en un sistema de agar, donde la cepa *Achromobacter* sp. 5B1 (Vázquez et al., 2024) en las que su aplicación mejora la biomasa total de la planta, la biomasa de brotes y la biomasa de raíces no solo a pH neutro (7.0), sino también a pH alto (9.0). La cepa de *Achromobacter* sp. 5B1 fue aislado de la rizosfera de un árbol de mezquite que crece en el desierto de Chihuahua. Otro ejemplo de rescate de plantas bajo condiciones de estrés fue observado en plántulas de tomate, donde la cepa *Achromobacter xylosoxidans* BOA4 combinada con un extracto de alga aumentaron un 33% el peso seco de la

parte superior de la planta, pero disminuyó el 44% la relación entre la biomasa de la raíz y la parte inferior aún bajo estrés salino (Santana et al., 2022), tal y como se observa en este trabajo.

La cepa de *Bacillus velezensis* utilizada en este trabajo fue aislada de las hojas de banana enano gigante Cavendish, la cual muestra un efecto potencial de protección contra el agente causal de la Sigatoka negra, *Pseudocercospora fijiensis*. Esta cepa indujo que las plantas de *Agave* acumularan 2.33 veces más biomasa que el control. El comportamiento de esta cepa es totalmente diferente a *A. xylooxidans*. *B. velezensis* no disminuye el impacto de senescencia inducido por la adaptación al sustrato en las primeras 5 semanas, pero el comportamiento de hojas en las siguientes 10 semanas totales muestra un efecto ascendente en el número de hojas (Fig. 11A). De manera inversa esta cepa no influye en el número de raíces, se observa un decaimiento en el número de raíces totales, hasta después de las 10 semanas. Respecto a la diferenciación en la acumulación de biomasa, se observa nuevamente que el efecto se mantiene sobre el aporte porcentual de las hojas a la estructura de la planta acumulando un 53% y un 74% de total en las semanas 10 y 15 respectivamente. El aporte de la raíz a la biomasa cambia de 33% a 13% en las semanas 10 y 15. Respecto al pseudotallo el porcentaje de biomasa es menor que el observado en los tratamientos con *Achromobacter* y *Micrococcus*.

Bacillus velezensis es una bacteria que puede ayudar a las plantas a crecer y tolerar el estrés (Zhong et al., 2024; Bai et al., 2024; Peñas-Corte et al., 2024). Así también se ha observado que esta bacteria promueve el crecimiento de plantas produciendo citocininas y auxinas tipo AIA (Cheng et al., 2024; Aunkam et al., 2024; Joly et al., 2021). La cepa P1VB usada en este trabajo no presenta la síntesis de auxinas tipo

AIA pero si de AIB o ácido indol butírico. Algunas cepas de *B. velezensis* estimulan la protección contra condiciones de estrés como la sal, la temperatura y condiciones alcalinas (Cheng et al., 2024) y apoyan la absorción de nutrientes (Kenfaoui et al., 2024). *B. velezensis* es una cepa endófito prometedor para ser utilizada en la adaptación de *A. marmorata* a condiciones de estrés nutricional a pesar de no ser parte del microbioma del agave tepextate.

Otro resultado sobresaliente observado fue la acumulación de biomasa inducida por la aplicación de nitrato de lantano $\text{La}(\text{NO}_3)_3$. El lantánido induce una acumulación de 2.66 veces más biomasa seca final que el cultivo control y ligeramente mayor a lo observado en el tratamiento con *B. velezensis* (Fig. 11C). Después de la semana 5, las plantas tratadas aumentan progresivamente el número de hojas y de raíces, este es el único de los tratamientos que muestran crecimiento en paralelo la parte aérea y la masa radicular y al terminar el seguimiento presentan las plantas más grandes como se observa en la figura 14, aunque la biomasa seca no refleja que este tratamiento sea el de mayor tamaño. Esto sugiere que uno de los efectos de la aplicación del lantánido es la acumulación de agua en los tejidos celulares dando una mayor turgencia en hojas y raíces. Lo cual también es observado en los tratamientos con *Micrococcus luteus*, que resulto ser el tratamiento biológico con menos biomasa seca al final del ensayo. Las plantas con el tratamiento con *M. luteus* recuperan rápidamente la pérdida de hojas que ocurre en las primeras 5 semanas y alcanza el mayor número de hojas de todos los tratamientos entre la semana 5-10, pero después decae, hasta presentar el menor contenido de biomasa seca.



Figura 14. Aspectos macroscópicos de plántulas de *A. marmorata* tratadas con bacterias endófitas y un lantánido. Se observa una correlación negativa entre el paso seco y la apariencia de la plántula fresca. Lo observado sugiere acumulación inducida de agua por el tratamiento.

La retención de agua (y soluto) determina el turgor de las células, impulsando la expansión celular de las plantas y contribuyendo a la forma y función de las plantas, incluyendo los movimientos estomatales (Brendel, 2021). La turgencia es una variable fisiológica que indica el estado hídrico de la planta. La turgencia es fundamental para el crecimiento y la estabilidad de las plantas, ya que ayuda a mantener su forma y tamaño. Cuando las células vegetales pierden agua, se produce un proceso llamado ósmosis, que hace que el agua se mueva hacia afuera de las células. Esto provoca que las células pierdan la presión de turgencia y las hojas y flores se marchiten. El contenido absoluto de agua sobre una base de biomasa seca tiene un sentido funcional fácilmente perceptible, pero el significado fisiológico y el significado ecológico de las diferencias drásticas en el contenido de agua de las plantas necesitan ser más estudiados.

El $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ puede afectar al crecimiento de las plantas de varias maneras. Por ejemplo, acelera la germinación, aumenta el vigor de las semillas y mejora el

contenido de clorofila (Fashui et al., 2000). En los tomates, la suplementación con iones de lantano puede ayudar a aliviar la supresión del alargamiento de las raíces que se produce bajo estrés lumínico (Iguchi et al., 2023). El lantano puede afectar muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, incluyendo la eficiencia de la fotosíntesis, la capacidad de absorción de nutrientes minerales, el crecimiento de las raíces y el equilibrio fitohormonal (Liu et al., 2017; Liu & Zhang, 2022; De Oliveira et al., 2024). Por otra parte, bajo estrés salino, las semillas de quinua en presencia de nitrato de lantano estimulan la germinación y aumentan la germinación de las semillas y estimulan el crecimiento aéreo de las plántulas. Las plantas tratadas con nitrato de lantano responden de mejor manera al estrés salino (Pang et al., 2019; Jia et al., 2024). Sin embargo, las concentraciones excesivas de lantano también pueden ser tóxicas para las plantas, afectando a la división celular, la estructura del ADN, la absorción de nutrientes y la fotosíntesis (Sharma et al., 2024).

Recientemente en el grupo de investigación tenemos especial interés en el estudio del efecto hormético de los lantánidos sobre las plantas. La hormesis es una estimulación a dosis bajas y una inhibición a dosis altas en los organismos. Varios factores estresantes (abióticos y bióticos) pueden causar respuestas horméticas en las plantas. Las tierras raras o lantánidos se han utilizado durante mucho tiempo en la agricultura (es decir, principalmente a través de fertilizantes LREE aplicados por aire) debido al hecho de que las dosis bajas promueven el crecimiento de las plantas (Agathokleous et al., 2018). Es reconocido que las bajas dosis en fenómenos horméticos causan daños moderados. Defenderse contra dosis bajas de estresores no requiere costos de energía significativos (Erofeeva, 2024). Por lo

tanto, la activación de defensa moderada elimina el daño y puede aumentar la fotosíntesis y la eficiencia de respiración oscura (Fonseca et al., 2021).

La respiración oscura es un proceso que ocurre en las plantas y otros organismos cuando no hay luz, y las plantas convierten el dióxido de carbono en carbohidratos o azúcares usando energía química del ATP y NAD(P)H. Es una fase independiente de la luz de la fotosíntesis que ocurre en las mitocondrias. La respiración oscura produce energía que las plantas usan para mantener y crecer sus órganos. Es un factor importante en los presupuestos energéticos de las plantas, consumiendo entre el 30 y el 70 % del carbono total fijado. Este efecto debe ser medido en nuestros ensayos futuros para explicar cambios drásticos en el contenido de biomasa vegetal, la obtención de energía, más allá de la movilización de nitrógeno hacia los órganos en crecimiento como ha sido discutido previamente. Cabe destacar que sólo algunas dosis de agentes horméticos pueden optimizar el metabolismo energético y aumentar la productividad de las plantas, entre ellos los lantánidos. Este efecto depende también de la fase de desarrollo de las plantas sometidas a estrés. Las mismas vías de señalización del estrés (ABA, señalización ROS, etc.) pueden ser la base de cambios en el metabolismo energético. Debemos profundizar en esta área de la biología de las plantas.

9.5 Preguntas que deben ser respondidas

1. ¿La estimulación radicular sugiere la adaptación de las plantas a eventos de estrés para después reutilizar la energía bajo respiraciones oscuras incidentes en la producción de hojas?
2. ¿En cuanto tiempo tarda en colonizar *Achromobacter* la planta, así como *Micrococcus luteus*, *Bacillus velezensis* podría colonizar la planta de Agave aun cuando no es endófito?
3. ¿El aumento de la turgencia inducida por el lantano y *M. luteus* influyen en la acumulación de ácido abscísico y un mayor tiempo de cerrado de los estomas?
4. ¿Si la aplicación de bioestimulantes biológicos son considerados agentes de estrés o fitopatógenos en las primeras interacciones con la planta?
5. ¿Podemos considerar la adaptación al estrés un evento que influye en la modificación del microbioma para soportar el crecimiento o respuestas de sobrevivencia de las plantas?

Capítulo 10

Determinar el efecto de la adición de nitrato de lantano y *A. xylosoxidans* sobre la activación del microbioma: UFC's y diversidad.

10. Determinación del efecto de la adición de AX, BV, ML y Nitrato de Lantano sobre la activación del microbioma: UFC's y diversidad.

10.1 Resultados

10.1.1 Unidades formadoras de colonias inducibles por tratamientos químico y biológicos

En este objetivo del proyecto doctoral se analizaron los cambios en la composición del microbioma cultivable en plantas de *Agave marmorata* después de 8 inoculaciones durante 15 semanas. Los tratamientos fueron exactamente los mismos que se analizaron para valorar el efecto sobre el cambio biométrico de las plantas. Los cambios fueron valorados en las hojas, pseudotallo y raíces de las plantas cada 5 semanas.

Hojas. - La figura 15 muestra que al inicio de los ensayos (T0) no se observó la presencia de un microbioma cultivable en ninguna de las secciones de las plantas (UFC's=0). En el panel A se muestra el cambio en el número de Unidades Formadoras de Colonia (UFCs) en las hojas. Las plantas irrigadas con agua mostraron un incremento gradual de UFCs desde un orden de 10^5 hasta 10^6 a las 15 semanas con valores netos de UFCs de 1.09×10^5 , 2.59×10^6 y 9.46×10^6 en la semana 5, 10 y 15 de tratamientos respectivamente. Las plantas tratadas con el nitrato de lantano no mostraron cambios significativos en el número de UFCs en las hojas ya que se mantienen en el mismo orden en las primeras 10 semanas, incrementándose ligeramente en la semana 15. Los números para este tratamiento fueron de 6.61×10^5 , 4.9×10^5 y 4.66×10^6 UFCs. Los comportamientos de la activación de un microbioma cultivable cuando se aplican biológicos tienen un

incremento significativo entre el tiempo 0 y las primeras 5 semanas de 0 UFCs hasta un orden de 7log en el tratamiento con *M. luteus*. *B. velezensis* se mantuvo en el mismo orden durante las 15 semanas de tratamiento (10^6). En *M. luteus* hubo cambios en el microbioma cultivable que van de 0 hasta 1.24×10^7 en las 5 semanas primeras, disminuyendo a 5.9×10^5 en la semana 10 de cuantificación y sube hasta 1.57×10^8 en la semana 15.

Pseudotallo. - en el panel B se muestra un comportamiento de variaciones en el contenido microbiano. La irrigación con agua pasa de 0 a 6.10×10^6 UFCs en las primeras 5 semanas, siguiendo en orden ascendente hasta la semana 10 alcanzando hasta 1.53×10^8 UFCs/g de tejido, después el número decae a 3.6×10^5 en la semana 15. El tratamiento químico nuevamente es el que menor UFCs cultivables activa. Durante las primeras 5 semanas sube a 3.20×10^5 UFCs, incrementa ligeramente a 1.75×10^6 en la semana 10 y decae a 3.90×10^5 UFCs en la semana 15, por lo que al igual que en las hojas es la condición más estable respecto a la activación del microbioma.

Los tratamientos biológicos muestran que *B. velezensis* y *M. luteus* incrementan hasta 7 ordenes el número de bacterias cultivables con valores oscilantes de 1×10^7 a 2.75×10^6 y 3.7×10^7 en el tratamiento con *Bacillus*, mientras que para *Micrococcus* los valores de UFCs fueron de 1.17×10^7 , 4.80×10^5 y 3.65×10^7 UFCs en el seguimiento de las 15 semanas. Los valores de UFCs inducibles por *A. xylosoxidans* fueron ligeramente menores respecto a las otras bacterias, con una variación de 1 orden tal y como se observa en el tratamiento químico. Los valores totales de UFC/g de tejido fueron 1×10^6 , 1.15×10^5 y 1.11×10^6 desde la semana 5 hasta la 15.

Raíces. - En este tejido se observó la mayor activación del microbioma cultivable tal y como era esperado. El lantánido tiene un incremento de hasta 10^6 UFCs en las primeras semanas de seguimiento y tratamiento y sube hasta 1.80×10^7 UFCs en la semana 15, al igual que en los otros tejidos analizados sube solo un orden por las 8 aplicaciones. Las UFCs por la aplicación de agua es superior al lantano, el primer incremento de acuerdo con nuestro estudio es hasta 9.9×10^6 UFCs en las 5 semanas, sube a 3×10^7 en la semana 10 y llega hasta 3.6×10^8 en la semana 15. *Micrococcus* nuevamente fue el de mayor inducción del microbioma cultivable. Los valores en la semana 5 después de 2 aplicaciones fue de 1×10^7 UFCs/g; en las siguientes 2 tomas de muestra hallamos que sube a 1.21×10^9 (10 semanas) y finaliza en 5.20×10^8 UFCs. *Bacillus*, fue el tratamiento que mantiene un orden ascendente sin oscilaciones en las 15 semanas. Los valores fueron de 1.81×10^6 , hasta 1.01×10^9 en la semana 15. El número de UFCs inducidas por *A. xylosoxidans* fue mayor en este tejido, pero el comportamiento fue el mismo de inducir un solo orden de 10^7 a 2.25×10^8 en la semana 10 y reduciendo ligeramente a 4.80×10^7 en la semana 15. Estos resultados confirman la compatibilidad de *Achromobacter* y con el lantano por el NO_3 que funciona como un nutriente respecto al crecimiento de las plantas y su estabilidad en el microbioma, como se discutirá más adelante.

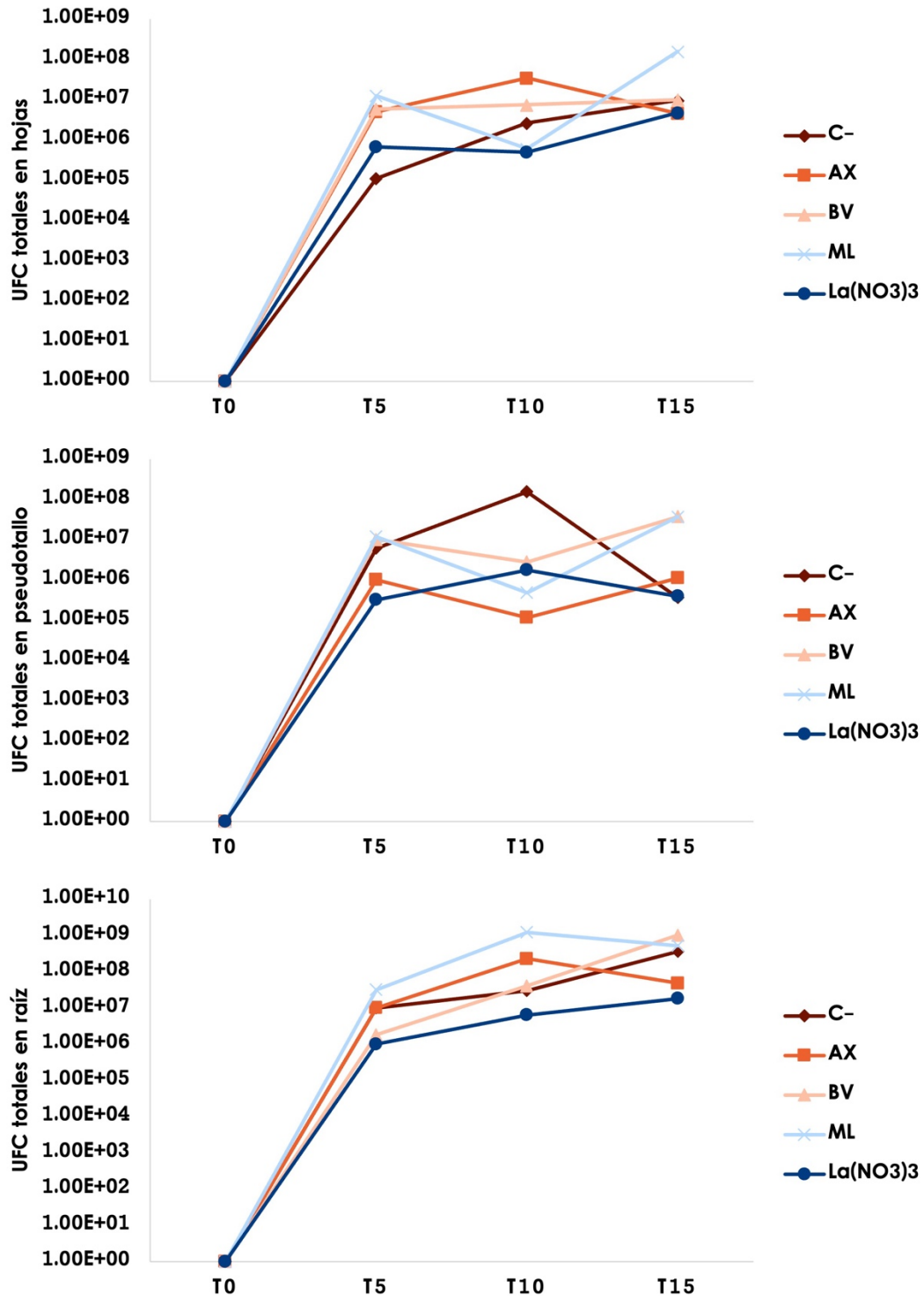


Figura 15. Dinámica de UFC's en plantas tratadas con lantano y bacterias endófitas.

La adaptación de las plantas a un sustrato con limitación de nutrientes incrementa

el microbioma cultivable en diferentes tejidos. No se observa un efecto significativo en las UFC's en las plantas tratadas versus el control.

10.1.2 Activación del microbioma

Respecto a la diversidad microbiana una vez que las plantas son tratadas, las diferentes secciones de la planta muestran la presencia de hasta 4 filos bacterianos (Fig. 16). En el control irrigado con agua se encontró que en las raíces existe una distribución del 50% de Proteobacterias, 25% Firmicutes y 25% de Actinobacterias. En el pseudotallo la distribución del componente microbiano cambia al 50%-50% Proteobacteria-Firmicutes. La hoja fue dividida en tres segmentos, en la base de la hoja que es un sitio con mayor acumulación de humedad registro la presencia de Firmicutes en un 50%, Proteobacterias 25% y Actinobacterias 25%. El centro de las hojas cuenta con los tres filos, con mayor abundancia de los Firmicutes 63.64%, Proteobacterias 27.27% y Actinobacterias con el 9.09%. La punta de la hoja presenta una distribución de 60% de Firmicutes y el 40% de Proteobacterias.

La inoculación de *A. xylosoxidans* en las raíces las raíces muestran que la mayor abundancia pertenece a las Proteobacterias con el 52.17%, seguido de los Firmicutes con el 39.13% y 8.70% de Actinobacterias. En el pseudotallo se aumentan los Firmicutes con un 64.71%, para el filo de Proteobacterias y Actinobacterias se distribuye de manera similar con el 17.65% de ambos filos. En la base de la hoja se mantiene la misma relación con Firmicutes como el filo mayoritario con el 60% y el el 20% de Proteobacterias y Actinobacterias por igual. En el centro de la hoja, los Firmicutes y Proteobacterias tiene una misma cantidad,

con el 44.44% y las Actinobacterias baja al 11.11%. La punta de la hoja mantiene la misma distribución que el centro de la hoja.

La aplicación de *B. velezensis*, provocó que en las raíces una distribución Firmicutes con el 38.89%, Proteobacterias el 44.44% y de Actinobacterias hasta el 16.67%. En el pseudotallo es el único tejido que muestra hasta 4 filos, donde los Firmicutes y Proteobacterias comparten el 40%, así también las Actinobacterias y los Bacteroidetes aportan el 10% cada uno a la diversidad microbiana. En la base de las hojas la mayor abundancia fue de las Proteobacterias, seguido de los Firmicutes y Actinobacterias con el 37.5% y 12.5%. En el centro de la hoja desaparecen totalmente las Proteobacterias y la distribución fue del 85.71% de Firmicutes y el 14.29% para las Actinobacterias. En la punta de la hoja el 100% pertenece a los Firmicutes.

Las plantas tratadas con *M. luteus*, se presentan 3 filos. La raíz contiene Firmicutes y Actinobacterias con un 36.36% en ambas y el 27.27% de las bacterias pertenecen al filo de las Proteobacterias. En el pseudotallo la mayor abundancia fue de las Actinobacterias con el 50%, seguido de Proteobacterias el 40% y Firmicutes el 10%. Aunque en la base de las hojas solo se tienen el cultivo de Firmicutes y Proteobacterias con el 60% y 40%. En el centro de la hoja la mayor abundancia pertenece a los Firmicutes con el 70% y el 30% de Actinobacterias. En la punta de las hojas las Proteobacterias son el filo abundante con el 75% y Firmicutes el 25%, reduciendo a cero las Actinobacterias.

Por último, el tratamiento con Nitrato de Lantano, tuvo como característica principal la predominancia del filo Actinobacterias en los tejidos. La raíz presento un 53.57%

de Actinobacterias y 46.43% de Firmicutes, pero para el pseudotallo se invierten los números y la predominancia fue del 53.33% para los Firmicutes y el 46.67% para las Actinobacterias. La base de la hoja presenta que el 64.29% de las bacterias aisladas pertenece a las Actinobacterias, sumado al 35.71% de los Firmicutes. El centro y la punta de la hoja tienen la presencia de los tres filos característicos de Firmicutes, Proteobacterias y Actinobacterias, con valores de 37.5%, 12.5% y el 50%, para la punta el 50%, 8.33% y 41.67%, respectivamente.

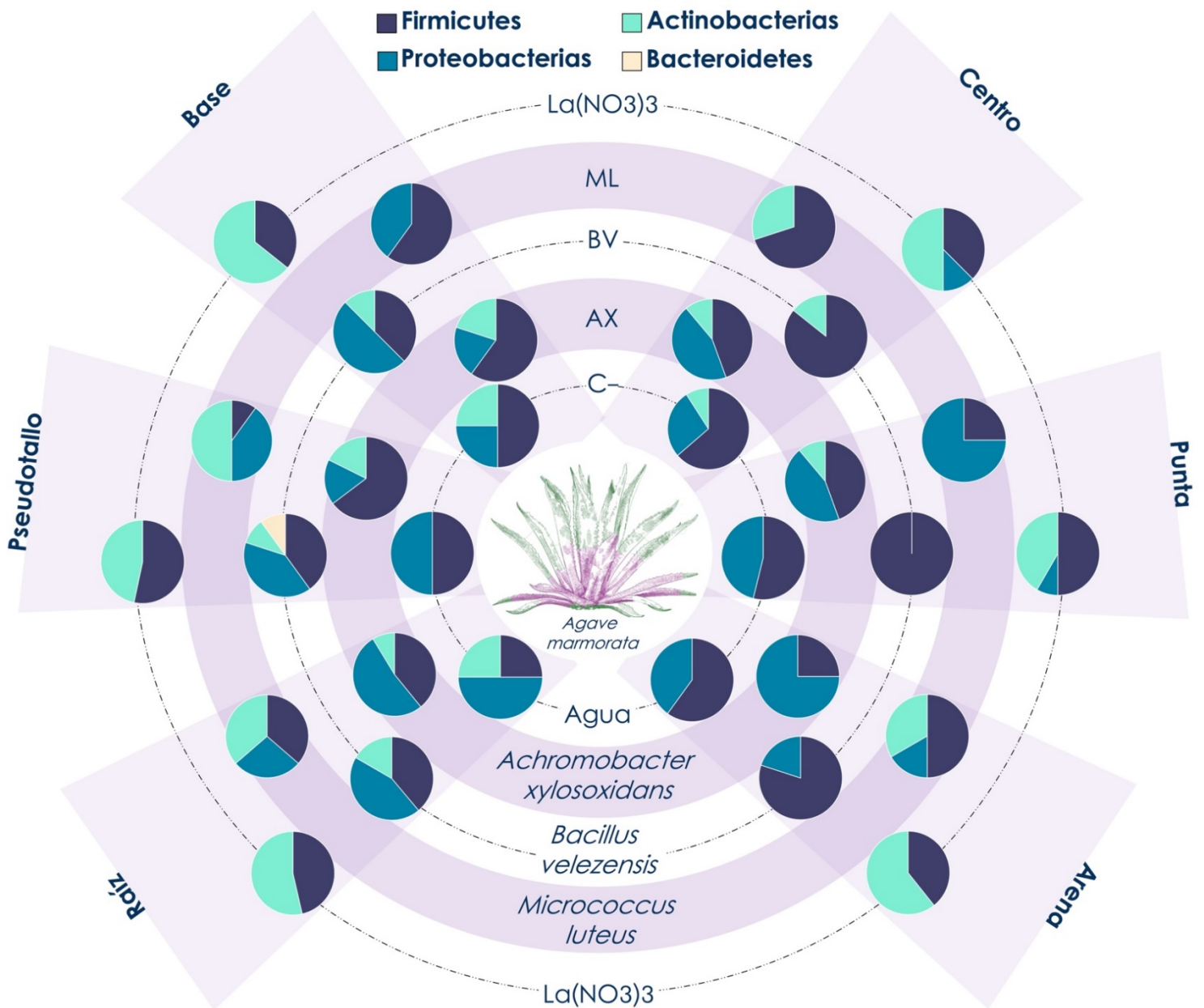


Figura 16. Filogenia del microbioma activado en cada una de las secciones de la planta de *agave marmorata*: raíz, pseudotallo y las hojas se seccionaron en 3: base, centro y punta, además se analizó la arena donde estaba establecida la planta en el microcosmos. Este estudio representa el total de las 15 semanas por tratamiento:

Agua (C-), Achromobacter xylosoxidans (AX), Bacillus velezensis (BV), Micrococcus luteus (ML) y 10 ppm de La(NO₃)₃, finalizando con 8 inoculaciones de cada uno.

10.2 Discusión

10.2.1 Activación de un microbioma cultivable en plantas por aplicaciones de químicos y biológicos.

La asociación entre plantas y microorganismos tiene más de 400 millones de años. Los microorganismos aparecieron antes que las plantas y colonizaron una gran parte de los ecosistemas del planeta, por lo que las plantas formaron asociaciones simbióticas y comensales. Los microbiomas adquiridos por las plantas protegen a las plantas y pueden ser cambiados transitoriamente por situaciones de estrés abióticos y bióticas. Después de algunas semanas post-aplicación del estrés los cambios en el microbioma no son evidentes y conllevan a una estabilización del microbioma o un aumento de la diversidad microbiana y su uniformidad.

Las plantas bajo condiciones de estrés pueden adquirir un microbioma y modificar su composición, sin embargo, bajo estas condiciones se experimenta primero un efecto de disbiosis, es decir la pérdida en número y diversidad de microorganismos. Tal y como se explicó en Beltran-Garcia et al., 2024, las plantas para defenderse después de la pérdida de sus microbios activan un mecanismo de atracción del suelo o la rizosfera hacia sus compartimentos, seleccionando aquellos microorganismos útiles. Este comportamiento se acuñado como “Cry for help” (Rolfe et al., 2019). Sin embargo, en este trabajo las plantas de *A. marmorata* no experimentan un fenómeno de atracción, si no más bien ocurre una activación del

microbioma, ya que las plantas transferidas de medio Murashige & Skoog inicialmente carecen de un microbioma cultivable. La transferencia a un medio de arena de desierto estéril sin nutrición (estrés por nutrientes) después de 5 semanas experimenta un incremento de hasta 7 unidades logarítmicas en sus tejidos, corroborando un fenómeno de estrés por deficiencia nutricional base. De acuerdo con los resultados presentados en la figura X, tanto la aplicación de biológicos como de lantano también alteran el microbioma cultivable, sin embargo, el número de UFC's entre los tratamientos no muestran diferencias significativas, por lo que la principal condición de estrés que activa al microbioma es la deficiencia de nutrición. El efecto más claro sobre el comportamiento del microbioma de la planta por la limitación nutricional se observa en todas las secciones de la planta en la semana 10, especialmente en el pseudotallo donde el control está aparentemente 1.5 ordenes de magnitud logarítmica por encima del tratamiento con *Bacillus* y el Lantano. El tratamiento con *M. luteus* se encuentra 2 ordenes abajo y *Achromobacter* 2 ordenes logarítmicos.

El tratamiento lantano esta por abajo del control en las hojas y las raíces 1 orden en el contenido de UFCs. En todas las secciones de las plantas el microbioma es oscilante. Se ha establecido que, bajo condiciones de limitación de nutrientes, cambios en el metabolismo de las plantas conllevan a cambios en el tipo y composición de exudados de las raíces afectando las comunidades microbianas asociadas a las raíces (Singh et al., 2022; Enagbonma et al., 2023). Como se observa en la figura XC en las raíces todos los tratamientos tienden a aumentar el contenido microbianos, pero la aplicación de nitrato de lantano es la que menos UFCs presentan y los cambios entre tiempos de muestreo no son significativos, ya

que como mencionamos anteriormente el cambio es de 1 orden logarítmico aproximadamente. Esto se debe quizás a que la planta este utilizando el NO_3 como fuente de nutriente y el estrés nutricional sea reducido, influyendo que la planta no active un suficiente número de bacterias disuadiendo a las plantas a la necesidad de activar microbios útiles, por ejemplo, fijadores de nitrógeno (Beltran-Garcia et al., 2021; Singh et al., 2022; Dixon et al., 2022).

Por otra parte, en condiciones inoculantes microbianos son capaces de restaurar la disbiosis por compensación o reducción de los cambios microbiomas inducidos por patógenos (Berg et al., 2021). En este trabajo discretamente se observa este fenómeno. La aplicación de *B. velezensis* y *A. xylosoxidans*, *M. luteus* en hojas y raíces son ligeramente mayores que el control, sin embargo, no es significativo ya que el número de UFCs están en el mismo rango que el control. Es intrigante el significado de las oscilaciones en el número de bacterias en los tejidos. En un estudio previo Beltran-Garcia et al., 2014 usando al agave azul como modelo mostró que las condiciones de limitación de nutrientes obligan a las plantas a consumir bacterias y que el nitrógeno microbiano es incorporado a la estructura vegetal, soportando un crecimiento sostenido de la planta. Por otro lado, la hipótesis de la rizofagia, formulada por primera vez por Paungfoo-Lohienne et al. (2013), postula que los nutrientes importantes de las plantas pueden adquirirse en las raíces mediante un proceso por el cual las bacterias endófitas cierran su ciclo entre el suelo y las raíces. La atracción de los nutrientes del suelo ocurre a través de la degradación de los microbios dentro de las células de la raíz mediada por un incremento de las especies de oxígeno reactivas (White et al., 2018; White et al., 2019). En 2022, Zhang et al., hallaron que la adición de una cepa endófitas de

Pseudomonas estimulaba el crecimiento de las raíces de *Agave palmeri* y que su contribución se debía a que era consumida en las raíces, además de actuar como un bioestimulante. Como hemos mencionado los bioestimulantes se refieren a un grupo de diversas sustancias y microorganismos que estimulan la vida o que promueven respuestas favorables de las plantas. Estimulan los procesos naturales para mejorar/beneficiar la absorción de nutrientes, la eficiencia de los nutrientes, la tolerancia al estrés abiótico y la calidad del cultivo y muchos de ellos. Hay una ligera correlación entre los cambios de UFCs y la acumulación de biomasa vegetal final, especialmente en los tratamientos con *B. velezensis* y *A. xylooxidans*, sin embargo, se requieren más estudios para precisar los cambios inducidos y el comportamiento de crecimiento de la planta.

Respecto a la distribución filogenética, el tratamiento con agua o control presenta la activación de Actinobacterias únicamente en la raíz, la base y centro de la hoja y en el pseudotallo, solo son firmicutes y proteobacterias, con mucha similitud entre ellas, en la forma proporcional. La mayor presencia de bacterias se encuentra en el filo de los Firmicutes, con mayor predominancia de *B. subtilis ssp spizizeni*. Sin embargo, todos los tratamientos, activan el filo de las Actinobacterias en las raíces y el centro de las hojas. Pero existe una notoria ausencia de este filo en la punta de la hoja.

La aplicación de *B. velezensis* en la punta de la hoja es la única bacteria que presenta el 100% de cultivo de Firmicutes, donde solo se aislaron *B. amyloliquefaciens ssp. plantarum* y *B. subtilis ssp spizizeni*. En el pseudotallo es el único tratamiento que presenta un cuarto filo, los Bacteroidetes, que tiene aislados pertenecientes a *Elizabethingia miriola*. Por otra parte, *M. luteus* en los tejidos de la base de la hoja y el centro se observa un cambio brusco de distribución filogenética,

modificando el contenido de Proteobacterias por la activación de Actinobacterias y los Firmicutes. Cada uno de los filos se encuentra representado de forma equitativa entre los tejidos de la planta con este tratamiento.

La aplicación de nitrato de lantano, es el único tratamiento que logro activar el filo de Actinobacterias en todos los tejidos de la planta. Así mismo, en las partes del centro y punta de la hoja se presentan proteobacterias en un bajo número comparado con los otros tratamientos en este tejido. La activación del microbioma dominante indica mayoría de Actinobacterias. Diversos estudios sugieren que las actinobacterias son altamente resistentes a la sequía y a condiciones de nutrientes pobres. Además, tienen la función de promover el crecimiento de las plantas gracias a su buena adaptabilidad a las superficies de las raíces de las plantas y su capacidad para contrarrestar muchos patógenos vegetales (Prathyusha te al, 2018). Se ha reportado que las tierras raras afectan a la estructura comunitaria de bacterias en la rizosfera y la filosfera del arroz, promoviendo cambios de la distribución de las bacterias en la rizosfera, raíz, filosfera y hoja del arroz (Zhang et al, 2022).

Las tablas X y Y, muestran los generos y especies cultivados en este estudio después de la activación por la aplicación de lanatano y bacterias endófitas.

Tabla 8. Bacterias cultivadas activadas por tratamiento C-, AX, BV, ML y La(NO₃)₃ a partir de los tejidos de raíz, pseudotallo, base, centro y punta de las hojas de *A. marmorata*, a 15 semanas de inoculaciones.

Género y especie	Tratamientos y secciones de la plantas de <i>A. marmorata</i>																								
	C-					AX					BV					ML					La(NO ₃) ₃				
	R	P	B	C	P	R	P	B	C	P	R	P	B	C	P	R	P	B	C	P	R	P	B	C	P
<i>A. xylooxidans</i>			X	X	X	X								X			X	X	X		X				
<i>A. ursingii</i>														X											
<i>A. jandaei</i>												X													
<i>A. radiobacter</i>											X														
<i>B. amyloliquefaciens</i>											X											X			
<i>B. amyloliquefaciens ssp. amyloliquefaciens</i>				X																					
<i>B. amyloliquefaciens ssp. plantarum</i>		X		X	X			X	X				X	X	X				X		X	X	X	X	
<i>B. cereus</i>						X	X																		
<i>B. mojavensis</i>					X											X						X			
<i>B. pumilus</i>						X	X																		
<i>B. subtilis</i>														X					X						
<i>B. subtilis ssp. subtilis</i>													X	X											
<i>B. subtilis ssp. spizizenii</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X	
<i>C. cellulans</i>				X							X										X	X	X	X	
<i>C. pakistanensis</i>			X			X	X	X	X																
<i>C. aquatica</i>												X	X												
<i>C. terrigena</i>												X													
<i>E. miricola</i>												X													
<i>E. asburiae</i>						X	X		X																
<i>E. bugadensis</i>							X																		
<i>K. oxytoca</i>												X													
<i>L. fuchuensis</i>			X																						

Tabla 9. Bacterias cultivadas en el sustrato de arena de desierto de los microcosmos de *A. marmorata* por cada uno de los tratamientos: C-, AX, BV, ML y $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ durante 15 semanas.

Género y especie	Tratamientos				
	C-	AX	BV	ML	$\text{La}(\text{NO}_3)_3$
<i>A.xylosoxidans</i>	X	X	X	X	
<i>B. amyloliquefaciens</i>			X	X	X
<i>ssp. plantarum</i>					
<i>B. subtilis</i>		X			
<i>B. subtilis ssp. spizizenii</i>	X	X	X	X	X
<i>C.cellulans</i>					X
<i>E. asburiae</i>		X			
<i>M. oxydans</i>					X
<i>M. paraoxydans</i>				X	X
<i>P. barcinonensis</i>					X
<i>P. silvae</i>					X
<i>R. radiobacter</i>	X				

C-: Control de agua, **AX:** *Achromobacter xylosoxidans*, **BV:** *Bacillus velezensis*, **ML:**

Micrococcus luteus y $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ a 10 ppm.

Capítulo 11

Conclusiones

11. Conclusiones

Las líneas clonales seleccionadas presentaron una respuesta de brotación diferenciada respecto a las concentraciones de la citocinina 6-bencilaminopurina (BAP). La línea AM32 fue la que presentó la mayor inducción de brotes.

La proliferación vegetal de las líneas clonales inducida por el BAP da la posibilidad de producir grandes cantidades de plantas para fines de experimentación y producción semi-comercial o ecológica.

El análisis fitoquímico no muestra diferencias significativas entre las líneas, pero algunos flavonoides y saponinas podrían ser utilizados como marcadores de crecimiento y estrés. Se observó la acumulación de antocianinas, moléculas relacionadas con la protección contra el estrés abiótico. La manipulación con BAP induce la acumulación de estos metabolitos secundarios en el tejido vegetal, que podrían ser utilizados en un futuro como bioestimulantes propios de las plantas.

Achromobacter xylosoxidans una bacteria endófito y compatible con el *A. marmorata* no tiene efecto antifúngico, pero funciona como un bioestimulante, por lo que podría estar sujeta a desarrollar un bioinsumo para este tipo de plantas, al demostrar su efecto de protección contra estrés nutricional y por la estimulación de un microbioma endófito cultivable.

Las plantas muestran una mayor estimulación con los tratamientos en el siguiente orden *A. xylosoxidans* > *B. velezensis* > Nitrato. La acumulación de biomasa inducida es diferenciada, las bacterias estimulan hojas y el lantánido las raíces. Por lo que es posible desarrollar una fórmula que combine ambos tratamientos.

En este ensayo se demostró la activación del microbioma endófito y no la atracción de bacterias benéficas como es el caso del cry for help. Se debe profundizar en el

papel de las bacterias activadas. En la biología de la planta este hallazgo es importante ya que los suelos donde se desarrolla naturalmente *A. marmorata* son pobres de materia orgánica y con alta salinidad.

No podemos distinguir si las oscilaciones del microbioma inducido responden a un estado de enfermedad o para la obtención de nutrientes. Hay correlaciones entre el incremento en los órdenes de las UFC's y la pérdida de hojas. Contrario a esto, también observamos que la pérdida del microbioma influye en la aparición de tejidos por lo que podemos también proponer que el incremento de bacterias se puede deber a la necesidad de un consumo de las plantas para obtener nutrientes. Especialmente bajo condiciones de limitación de nitrógeno, como se ha mostrado en otros ensayos del grupo de investigación. Se requiere de más estudios para elucidar este proceso simbiótico de obtención de nitrógeno.

Se observa la activación de componentes microbianos relacionados con los filos microbianos de Actinobacterias, Firmicutes y Proteobacterias.

El Nitrato de lantano activa el microbioma de las plantas con gran abundancia las Actinobacterias, que pueden aportar tolerancia a la sequía y escasas nutrición.

Bacillus subtilis ssp. spizizenii es la bacteria que mayor predominancia tuvo en todos los tratamientos: C-, AX, BV, ML y $\text{La}(\text{NO}_3)_3$. Encontrándose en los tejidos del pseudotallo y raíces.

Capítulo 12

Bibliografía citada

12. Bibliografía citada

1. Abraham-Juárez, M., Hernández-Cárdenas, R., Santyo-Villa, J., O'Connor, D., Sluis, A., Hake, S., Ordaz-Ortiz, J., Terry, L., and Simpson, J. (2015). Functionally different PIN proteins control auxin flux during bulbin development in *Agave tequilana*. *J Exp Bot*, 66 (13): 3893-3905. doi: 10.1093/jxb/erv191.
2. Adeleke, B. S., Babalola, O. O., (2021). The endosphere microbial communities, a great promise in agriculture. *Int Microbiol*, 24, 1-17. doi: 10.1007/s10123-020-00140-2.
3. Agathokleous, E., Kitao, M., Calabrese, E. J., (2018). The rare earth element (REE) lanthanum (La) induces hormesis in plants. *Environ Pollut*, 238:1044-1047. doi: 10.1016/j.envpol.2018.02.068.
4. Aguilar Jimenez, D., & Rodriguez de la O, J. L. (2018). Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roezl) en la Mixteca Poblana Mixteca. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20, 124–131.
5. Alducin-Martínez, C., Ruiz Mondragón, K. Y., Jiménez-Barrón, O., AguirrePlanter, E., Gasca-Pineda, J., Eguiarte, L. E., & Medellín, R. A. (2023). Uses, knowledge and extinction risk faced by agave species in Mexico. *Plants*, 12, 124.
6. Alecu, A., Albu, C., Litescu, S. C., Eremia, S. A. V., Radu, G. L. (2016). Phenolic and anthocyanin profile of *Valea calugareasca* red wines by HPLC-PDA-MS and MALDI-TOF analysis. *Food Anal Methods*, 9, 300–310.

7. Alquéres, S. M. C., Oliveira, J. H. M., Nogueira, E. M., Guedes, H. v., Oliveira, P. L., Câmara, F., Baldani, J. I., Martins, O. B., (2010). Antioxidant pathways are up-regulated during biological nitrogen fixation to prevent ROS-induced nitrogenase inhibition in *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Arch Microbiol*, 192(10), 835-841. doi: 10.1008/s00203-010-00609-1.
8. Anderson, C. M., Mattoon, E. M., Zhang, N., Becker, E., McHargue, W., et al., (2021). High light and temperature reduce photosynthetic efficiency through different mechanisms in the C4 model *Setaria viridis*. *Commun Biol*, 4, 1092.
9. Angeles-Espino, A., Valencia-Botín, A. J., Virgen-Calleros, G., Ramírez-Serrano, C., Paredes-Gutiérrez, L., Hurtado-De la Peña, S., (2012). Micropropagation of Agave (*Agave tequilana* Weber. var. Azul) through axillary buds. *Trop Subt Agro*, 15, 693-698.
10. Anzano, A., Bonanomi, G., Mazzoleni, S., Lanzotti, V., (2022). Plant metabolomics in biotic and abiotic stress: a critical overview. *Phytochem Rev*, 21(2), 1-22.
11. Arif, I., Batool, M., Schenk, P. M., (2020). Plant microbiome engineering: expected benefits for improved crop growth and resilience. *Trends Biotechnol*, 38, 1385-1396. doi: 10.1016/j.tibetch.2020.04.015.
12. Arthikala, M. K., Montiel, J., Sánchez-López, R., Nava, N., Cárdenas, L., Quinto, C., (2017). Respiratory burst oxidase homolog gene A is crucial for *Rhizobium* infection and nodule maturation and function in common bean. *Front Plant Sci*, 8. doi: 10.3389/fpls.2017.02003.
13. Arthikala, M. K., Sánchez-López, R., Nava, N., Santana, O., Cárdenas, L., Quinto, C., (2014). RbohB, a *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene,

- enhances symbiosome number, bacteroid size, and nitrogen fixation in nodules and impairs mycorrhizal colonization. *New Phytologist*, 202(3), 886-900. doi: 10.1111/nph.12714.
14. Aunkam, P., Sibponkrung, S., Limkul, S., Seabkongseng, T., Mahanil, K., Umnajkitikorn, K., Boonkerd, N., Teaumroong, N., Sato, S., Tittabutr, P., Boonchuen, P., (2024). Mechanisms of *Cannabis* growth promotion by *Bacillus velezensis* S141. *Plants*, 13(21):2971. doi: 10.3390/plants13212971.
15. Aureoles-Rodríguez, F., Rodríguez de la O, J. L., Legaria-Solano, J. P., Sahágún-Castellanos, J., Peña-Ortega, M. G., (2008). Propagación in vitro del maguey bruto (*Agave inaequidens* Koch.), una especie amenazada de interés económico. *Revista chapingo, Serie Horticultura*, 14(3), 263-269.
16. Ayuso, M., Pinela, J., Días, M. I., Barros, L., Ivanov, M., Calhelha, R. C., Soković, M., Ramil-Rego, P., Barreal, M. E., Gallego, P. P., Ferreira, I. C. F. R., (2020). Phenolic composition and biological activities of the in vitro cultured endangered *Eryngium viviparum* J. Gray. *Ind Crops Prod*, 148, 112325.
17. Azizan, M. N. A. B., Zakaria, N. L., (2017). The effect of BAP and NAA treatment on micropropagation of *Cucumis sativus* L. *IJSR*, 6(11). doi: 10.21275/ART20177887.
18. Bacon, C. W., White Jr, K. F., (2016). Functions, mechanisms and regulation of endophytic and epiphytic microbial communities of plant. *Symbiosis*, 68, 87-98. doi: 10.1007/s13199-015-0350-2.

19. Bai, Y., Chang, Y., Hussain, M., Lu, B., Zhang, J., Song, X., Lei, X., Pei, D., (2020). Soil chemical and microbiological properties are changed by long-term chemical fertilizers that limit ecosystem functioning. *Microorganisms*, 8,694. doi: 10.3390/microorganisms8050694.
20. Bai, Y., Song, K., Gao, M., Ma, J., Zhou, Y., Liu, H., Zeng, H., Wang, J., Zheng, X., (2024). Using multi-omics to explore the effect of *Bacillus velezensis* SAAS-63 on resisting nutrient stress in lettuce. *Appl Microbiol Biotechnol*, 108(1):313. doi: 10.1007/s00253-024-13153-y.
21. Balfagón, D., Sengupta, S., Gómez-Cadenas, A., Fritschi, F. B., Azad, R. K.m, Mittler, R., Zandalinas, S. I., (2019). Jasmonic acid is required for plant acclimation to a combination of high light and heat stress. *Plant Physiol*, 181(4), 1668-1682. doi: 10.1104/pp.19.000956.
22. Balick, M. J., Cox, P. A., (2020). *Plants, people, and culture: the science of ethnobotany*. 2nd ed. Garland Science CRC press; Boca raton, FL. USA.
23. Banerjee, S., Walder, F., Büchi, L., Meyer, M., Held, A., Gattinger, A., Keller, T., Charles, R., van der Heijden, M. G. A., (2019). Agricultural intensification reduces microbial network complexity and the abundance of keystone taxa in roots. *ISME J*, 13, 1722-1736. doi: 10.1038/s41396-019-0383-2.
24. Barnhill-Dilling, S. K., Delborne, J. A., (2019). The genetically engineered American chestnut tree as opportunity for reciprocal restoration in Haudenosaunee communities. *Biol Conserv*, 232, 1-7.
25. Barron, R., Master's thesis. Boise State University; Boise, ID, USA: Jul 2020. *In vitro* regeneration, rooting, and cloning of *Artemisa tridentata*.

26. Bartram, A. K., Jiang, X., Lynch, M. D., Masella, A. P., Nicol, C. W., Dushoff, J., Neufeld, J. D., (2014). Exploring links between pH and bacterial community composition in soil from the Craibstone experimental farm. *FEMS Microbiol Ecol*, 87, 403-415. doi: 10.1111/15746941.12231.
27. Bashir, I., War, A. F., Rafiq, I., Reshi, Z. A., Rashid, I., Shouche, Y. S., Phyllosphere microbiome: diversity and functions. *Microbiol res*, 254, 126888. doi: 10.1016/j.micres.2021.126888.
28. Bautista-Montes, E., Hernández-Soriano, L., Simpson, J., (2022). Advances in the micropropagation and genetic transformation of *Agave* species. *Plants*, 11(13), 1757.
29. Beltran-Garcia, M. J., White, J. F., Prado, F. M., Prieto, K. R., Yamaguchi, L. F., Torres, M. S., Kato, M. J., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P., (2014). Nitrogen acquisition in *Agave tequilana* from degradation of endophytic bacteria. *Sci Rep*, 4, 6938.
30. Beltran-Garcia, M. J., Martinez-Rodriguez, A., Olmos-Arriaga, I., Valdes-Salas, B., Di Mascio, P., White, J. F., (2021). Nitrogen fertilization and stress factors drive shifts in microbial diversity and plants. *Symbiosis*, 84, 379-390.
31. Beltran-Garcia, M. J., Martinez-Rodriguez, A., Olmos-Arriaga, O., Valdes-Salas, B., Chavez-Castrillon, Y. Y., Di Mascio, P., White, P. F., (2021). Probiotic endophytes for more sustainable banana production. *Microorganisms*, 9(9), 1805. doi: 10.3390/microorganisms9091805.
32. Benson, A., Melvin, J., Balathandayutham, K., Sa, T., Chandrasekaran, R., (2013). Role of *Achromobacter xylosoxidans* AUM54 in micropropagation of

- endangered medicinal plant *Naravelia zeylanica* (L.) DC. *J. Plant Growth Regul*, 33, 202–213.
33. Berg, G., Dorador, C., Egamberdieva, D., Kostka, J. E, Ryu, C., Wassermann, B., (2024). Shared governance in the plant holobiont and implications for one health, *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 100, Issue 3, fae004. doi: 10.1093/femsec/fae004.
34. Berg, G., Kusstatscher, P., Abdelfattah, A., Cernava, T., Smalla, K., (2021). Microbiome modulation—toward a better understanding of plant microbiome response to microbial inoculants. *Front Microbiol*, 12:650610. doi: 10.3389/fmicb.2021.650610.
35. Berrios, L., Rentsch, J. D., (2022). Linking reactive oxygen species (ROS) to abiotic and biotic feedbacks in plant microbiome: the dose makes the poison. *Int J Mol Sci*, 23(8), 4402. doi: 10.3390/ijms23084402.
36. Binh, L. T., Muoi, L. T., Oanh, H. T. K., Thang, T. T., Phong, D. T., (1990). Rapid propagation of agave by in vitro tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 23, 67-70.
37. Bonbón-Palomares, D., Laborin-Siriviriam, F., Tinoco-Ojanguren, C., Peñalba, M., Reyes-Ortega, I., and Molina-Freaner, F. (2018). Reproductive ecology of *Agave colorata*: the importance of nectar-feeding bats and the germination consequences of self-pollination. *Plant Ecol*, 219: 927-939. doi: 10.1007/s11258-018-0847-x.
38. Bradshaw, M. J., Pane, A. M., (2020). Field inoculations of nitrogen fixing endophytes on turfgrass. *Physiol Mol Plant Pathol*, 112, 101557. doi: 10.1016/j.pmpp.2020.101557.

39. Brendel, O., (2021). The relationship between plant growth and water consumption: a history from the classical four elements to modern stable isotopes. *Annals of Forest Science* 78, 47. doi: 10.1007/s13595-021-01063-2.
40. Byregowda, R., Prasad, S. R., Oelmüller, Nataraja, K. N., Kumar, M. K. P., (2022). Is endophytic colonization of host plants a method of alleviating drought stress? Conceptualizing the hidden world of endophytes. *Int J Mol Sci*, 23(16), 9194. doi: 10.3390/ijms23169194.
41. Carimi, F., Zottini, M., Formentin, E., Terzi, M., Schiavo, F. L., (2003). Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta*, 216, 413-421. doi: 10.1007/s00425-002-0862-x.
42. Carlín, A. P., Tafoya, F., solís, A. G. A., Pérez-Molphe-Balch, E., (2015). Effects of different culture media and conditions on biomass production of hairy root cultures in six Mexican cactus species. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 51, 332-339.
43. Castro-Restrepo, D., Dominguez, M. I., Gaviria-Gutiérrez, B., Osorio, E., Sierra, K., (2022). Biotization of Endophytes *Trichoderma asperellum* and *Bacillus subtilis* in *Mentha spicata* microplants to promote growth, pathogen tolerance and specialized plant metabolites. *Plants (Basel)*, 11(11):1474. doi: 10.3390/plants11111474.
44. Chalupa, V., (1983). In vitro propagation of willows (*Sallix* spp.) European mountain-ash (*Sorbus aucuparia* L.) and black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) *biol Plant*, 25, 305-307.

45. Chalupa, V., (1987). Vegetativní rozmnozování listnatých dřevin rizky a metodou in vitro. *Lesnictví*, 33, 501-510.
46. Chang, X., Kingsley, K. L., White, J. F., (2021). Chemical interactions at the interface of plant root hair cells and intracellular bacteria. *Microorganisms*, 9(5), 1041. doi: 10.3390/microorganisms9051041.
47. Chávez-Ortiz, L. I., Morales-Domínguez, J. F., Rodríguez-Sahagún, A., Pérez-Molphe-balch, E., (2021). In vitro propagation of *Agave guiengola* Gentry using semisolid medium and temporary immersion bioreactors. *Phyton*, 90, 1003-1013.
48. Cheng, C., Su, S., Bo, S., Zheng, C., Liu, C., Zhang, L., Xu, S., Wang, X., Gao, P., Fan, K., He, Y., Zhou, D., Gong, Y., Zhong, G., Liu, Z., (2024). A *Bacillus velezensis* strain isolated from oats with disease-preventing and growth-promoting properties. *Sci Rep*, 14, 12950. doi: 10.1038/s41598-024-63756-8.
49. Chen, J., Sharifi, R., Khan, M. S. S., Islam, F., Bhat, J. A., Kui, L., Majeed, A., (2022). Wheat microbiome: structure, dynamics, and role in improving performance under stress environments. *Front Microbiol*, 12, 821546. doi: 10.3389/fmicb.2021.821546.
50. Chen, T., Nomura, K., Wang, X., Sohrabi, R., Xu, J., Yao, L., Paasch, B. c., Ma, L., 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(7805), 653-657. doi: 10.1038/s41586-020-2185-0.

51. Chen, Y., Chen, X., Hua, Y., Yue, L., Trigiano, R., Chen, Z. M., (2014). Micropropagation of *Agave americana*. Hort Sci, 49(3), 320-327. doi: 10.21273/HORTSCI.49.3.320.
52. Choi, J., Choudhury, A. R., Park, S. Y., Oh, M. M., Sa, T., (2021). Inoculation of ACC deaminase-producing *Brevibacterium linens* RS16 enhances tolerance against combined UV-B radiation and heat stresses in rice (*Oryza sativa* L). Sustainability, 13(18), 10013. doi: 10.3390/su131810013.
53. Chowhan, P., Swarnakar, S., Chakraborty, A. P. (2023). New report of endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from root tissue of *Musa* spp. Mol Biol Rep 50, 9179–9190. doi: 10.1007/s11033-023-08789-4.
54. Collavino, M. M., Cabrera, E. V., Bruno, C., Aguilar, O. M., (2020). Effect of soil chemical fertilization on the diversity and composition of the tomato endophytic diazotrophic community at different stages of growth. Braz J Microbiol, 51, 1965-1975. doi: 10.1007/s42770-020-00373-3.
55. Costa-Gutierrez, S. B., Adler, C., Espinosa-Urgel, M., De Cristóbal, R. E., (2022). *Pseudomonas putida* and its close relatives: mixing and mastering the perfect tune for plants. Appl Micro Biotech, 106(9-10), 3351-3367. doi: 10.1007/s00253-022-11881-7.
56. Cui, T., Deng, Y., Zheng, K., Hu, X., Zhu, M., Deng, X., Xi, R., (2019). An efficient micropropagation protocol for an endangered ornamental tree species (*Magnolia sirindhorniae* Noot. & Chalermglin) and assessment of genetic uniformity through DNA markers. Sci Rep, 9, 9634.

57. Dai, X., Guo, Q., Song, D., Zhou, W., Lui, G., Liang, G., He, P., Sun, G., Yuan, F., Liu, Z., (2021). Long-term mineral fertilizer substitution by organic fertilizer and the effect on the abundance and community structure of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in paddy soil of South China. *Euro J Soil Biol*, 103, 103288. doi: 10.1016/j.ejsobi.2021.103288.
58. Daniels, C. W., Master's thesis. Cape peninsula University of Technology; cape town, western cape, South Africa, Jun 2007. A study of the propagation and cultivation of *Gethyllis multifolia* and *G. villosa*.
59. Daryanavard, H., Postiglione, A. E., Mühlemann, J. K., Muday, G. K., (2023). Flavonols modulate plant development, signaling, and stress responses. *Curr Opin Plant Biol*, 72:102350. doi: 10.1016/j.pbi.2023.102350.
60. Davis, S. C., & Ortiz-Cano, H. G. (2023). Lessons from the history of agave: Ecological and cultural context for valuation of CAM. *Annals of Botany*, 132, mcad072. doi: 10.1093/aob/mcad072.
61. De Faria, M. R., Costa, L. A. S., Chiaramonte, J., Bettiol, W., Mendes, R., (2020). The rhizosphere microbiome: functions, dynamics, and role in plant protection. *Trop Plant Path*, 221146850. doi: 10.1007/s40858-020-00390-5.
62. Delgado-Aceves, L., Portillo, L., Folgado, R., Romo-Paz, F. J., Gonzalez Arnao, M. T., (2022). New approaches for micropropagation and cryopreservation of *Agave peacockii*, an endangered species. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 150, 85-89.
63. Delgado-Lemus, A., Torres, I., Blancas, J., & Casas, A. (2014). Vulnerability and risk management of agave species in the Tehuacán Valley, México.

Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, 10, 53. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-10-53>.

64. Delgado-Paredes, G. E., Rojas-Idrogo, C., Esquerre-Ibañez, B., Vásquez-Díaz, C., Zuñe-Da Silva, F., Kuethe, J. R., (2023). Micropropagation and germplasm conservation of *Ficus americana* Aubl. and *F. obtusifolia* Kunth from Lampayequé (Peru). *Columbia Forestal*, 26(1), 92-108.
65. De Oliveira, C., Ramos, S. J., Dinali, G. S., De Carvalho, T. S., Martins, F. A. D., Faquin, V., Castro, E. M., Sarkis, J. E. S., Siqueira, J. O., Guilherme, L. R. G., (2024). Biostimulant response of foliar application of rare earth elements on physiology, growth, and yield of rice. *Plants (Basel)*, 13(11):1435. doi: 10.3390/plants13111435.
66. Dini-Andreote, F., (2020). Endophytes: the second layer of plant defense. *Trends plant Sci*, 25(4), 319-322. doi: 10.1016/j.tplants.2020.01.007.
67. Dixit, S. K., Gupta, A., Fatima, U., Senthil-Kumar, M., (2019). AtGBF3 confers tolerance to *Arabidopsis thaliana* against combined drought and *Pseudomonas syringae* stress. *Env Exp Bot*, 168, 103881. doi: 10.1016/j.envexpbot.2019.103881.
68. Dixon, M., Rohrbaugh, C., Afkairin, A., Vivanco, J., (2022). Impacts of the green revolution on rhizosphere microbiology related to nutrient acquisition. *Applied Microbiology*, 2(4):992-1003. doi: 10.3390/applmicrobiol2040076.
69. Dong, Z., Guo, Y., Yu, C., Zhixian, Z., Rongli, M., Deng, W., Li, Y., Hu, X., (2021). The dynamics in rhizosphere microbial communities under bacterial wilt resistance by mulberry genotypes. *Arch Microbiol* 203,1107-1121. doi: 10.1007/s00203-020-02098-1.

70. Drennan, P.M. and Nobel, P.S. (2000) Responses of CAM species to increasing CO₂ concentrations. *Plant Cell Environm.* 23:767-781.
71. Drenovsky, R. E., Steenwerth, K. L., Jackson, L. E., Scow, K. M., (2010). Land use and climatic factors structure regional patterns in soil microbial communities. *Glob Ecol Biogeogr*, 19, 27-39. doi: 10.1111/j.1466-8238.2009.00486.x.
72. Dujicková, M., Mala, J., Chalupa, V., (1991). Vegetativné monození *Subus torminalis* (L.) Crantz a *Sorbus domestica* L. in vitro. *Práce Vúlh m*, 77, 27-48.
73. El Houda, R. N., Silini, H. C., Silini, A., Alenezi, F. N., Bouket, A. C., Oszako, T., Lassaad, B., (2022). Alleviation of salt stress via habitat-adapted symbiosis. *Forests*, 13(586). doi: 10.3390/f13040586.
74. Emamverdian, A., Ding, Y., Alyemeni, M. N., Barker, J., Liu, G., Li, Y., Mokhberdoran, F., Ahmad, P., (2022). Benzylaminopurine and abscisic acid mitigates cadmium and copper toxicity by boosting plant growth, antioxidant capacity, reducing metal accumulation and translocation in bamboo (*Pleioblastus pygmaeus* (Miq.)) plants. *Antioxidants*, 11(12), 2328. doi: 10.3390/antiox11122328.
75. Enagbonma, B. J., Fadiji, A. E., Ayangbenro, A. S., Babalola, O. O., (2023). Communication between plants and rhizosphere microbiome: Exploring the root microbiome for sustainable agriculture. *Microorganisms*, 11(8):2003. doi: 10.3390/microorganisms11082003.
76. Erken, O., (2022). Some bioactive metabolites' response to long-term water stress in red cabbage. *Sci. Hortic*, 293, 110731.

77. Erofeeva, E. A., (2024) Plant hormesis: The energy aspect of low and high-dose stresses. *Plant Stress*, 14, 100628. doi: 10.1016/j.stress.2024.100628.
78. Fadiji, A. E., Ayangbenro, A. S., Babalola, O. O., (2020). Metagenomic profiling of the community structure, diversity, and nutrient pathways of bacterial endophytes in maize plant. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 113, 1559-1571. doi: 10.1007/s10482-020-01463-w.
79. Fan, D., Subramanian, S., Smith, D. L., (2020). Plant endophytes promote growth and alleviate salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep*, 10(1), 12740. doi: 10.1038/s41598-020-69713-5.
80. Fashui, H., Zhenggui, W., Guiwen, Z., (2000). Effect of lanthanum on aged seed germination of rice. *Biol Trace Elem Res*, 75(1-3):205-13. doi: 10.1385/bter:75:1-3:205.
81. Fierer, N., Jackson, R. B., (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci*, 103, 626-631.
82. Fierer, N, Lennon, J. T., (2011). The generation and maintenance of diversity in microbial communities. *Am J botan*, 98(3), 439-448. doi: 10.3732/ajb.1000498.
83. Fierer, N., Lauber, C. L., Ramirez, K. S., Zaneveld, J., Brandford, M. A., Rob, K., (2012). Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *ISME J*, 6, 1007-1017. doi: 10.1038/ismej.2011.159.
84. Flores-Maya, S., Vargas-Jurado, M. A., Suárez-Mota, M. E., & Barrera-Escorcia, H. (2015). Análisis cariotípico de *Agave marmorata* y *Agave peacockii* (Agavaceae) ubicados en las terrazas aluviales del río Zapotitlán,

- Puebla, México. Polibotánica, 40, 109–125. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.40.7>.
85. Fonseca-García, C., Nava, N., Lara, M., Quinto, C., (2021). An NADPH oxidase regulates carbon metabolism and the cell cycle during root nodule symbiosis in common bean (*Phaseolus vulgaris*). BMC Plant Biol, 21(1), 274. doi: 10.1186/s12870-021-03060-z.
86. Fougère, L., Da Silva, D., Destandau, E., Elfakir, C., (2018). TLC-MALDI-TOF-MS-based identification of flavonoid compounds using an inorganic matrix. Phytochem. Anal, 30, 218–225.
87. Francioli, D., Schulz, E., Lentendu, G., Wubet, T., Buscot, F., Reitz, T., (2016). Mineral vs. organic amendments: microbial community structure, activity and abundance of agriculturally relevant microbes are driven by long-term fertilization strategies. Front Microbiol, 7, 1446. doi: 10.3389/fmicb.2016.01446.
88. Frison-Norrie, S., Sporns, P., (2002). Identification and quantification of flavonol glycosides in almond seedcoats using MALDI-TOF MS. J Agric Food Chem, 50, 2782–2787.
89. Fuentes-Ramírez, L. E., Caballero-Mellado, J., Sepúlveda, J., Martínez-Romero, E., (1999). Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. FEMS Microbiol Ecol, 29, 117-128. doi: 10.1111/j.1574-6941.1999.tb00603.x.
90. Fukamachi, K., Konoshi, Y., Nomura, T., (2019). Disease control of *Phytophthora infestans* using cyazofamid encapsulated in poly lactic-co-

- glycolic acid (PLGA) nanoparticles. *Colloid Surf A Physicochem Eng Asp*, 577, 315-322. doi: 10.1016/j.colsurfa.2019.05.077.
91. García-González, R., Quiroz, K., Carrasco, B., Caligari, P., (2010). Plant tissue culture: current status, opportunities and challenges. *Cien Inv Agr*, 37(3), 5-10. doi: 10.4067/S0718-16202010000300001.
92. García-Mendoza, A. (2011). Agavaceae. Flora del Valle de TehuacánCuicatlán. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 88:1-95. URL: http://www.ibiologia.unam.mx/barra/publicaciones/floras_Tehuacán/2012/F88_Agav.pdf.
93. García-Mendoza, A. (2007). Los Agaves de México. *Ciencias*, 87: 71-23.
94. García-Moya, E., Romero-Manzanares, A., and Nobel, P. S. (2011). Highlights for *Agave* productivity. *GCB Bioenergy*, 3, 4-14. doi: 10.1111/j.1757-1707.2010.01078.x.
95. Garnica, S., Rosenstein, R., Schön, M., (2020). Belowground fungal community diversity, composition and ecological functionality associated with winter wheat in conventional and organic agricultural systems. *Peer J* 8:e9732. doi: 10.7771/peerj.9732.
96. Gashi, B., Abdullai, K., Sota, V., Kongjika, E., (2014). Micropropagation and in vitro conservation of the rare and threatened plants *Ramonda serbica* and *Ramonda nathaliae*. *Physiol Mol Biol Plants*, 21(1), 123-136.
97. Godínez-Alvarez, H., Morín, C., & Rivera-Aguilar, V. (2012). Germination, survival and growth of three vascular plants on biological soil crusts from a Mexican tropical desert. *Plant Biology*, 14, 157–162.

98. Grigoriadou, K., Krigas, N., Sarropoulou, V., Papanastasi, K., Tsoktouridis, G., Maloupa, E., (2019). In vitro propagation of medicinal and aromatic plants: the case of selected Greek species with conservation priority. *In Vitro Cell Dev Biol*, 55, 635-646.
99. Guo, J. H., Liu, X.J., Zhang, Y., Shen, J. L., Han, W. X., Zhang, W. F., Christie, P., Goulding, K. W., Vitousek, P M., Zhang, F. S., (2010). Significant acidification in major Chinese croplands. *Science* 327(5968), 1008-1010.
100. Gupta, sS., White, J., Kulkarni, M., (2020). An outlook on current and future directions in endophyte research. Editorial Note-Endophyte Special Issue (South African Journal of Botany). *S Afr J Bot.* doi: 10.1016/j.sajb.2020.04.024.
101. Haberlandt, G., (1902). Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen. Book: *Plant Tissue Culture*, 69-93. doi: 10.1007/978-3-7091-6040-4_1.
102. Hamilton, C. E., Gundel, P. E., Helander, M., Saikkonen, K., (2012). Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plant: a review. *Fun divers*, 54, 1-10. doi: 10.1007/s13225-012-0158-9.
103. Hanaka, a., Ozimek, E., Reszczyńska, E., Jaroszuk-Sciset, J., Stolarz, M., (2021). Plant tolerance to drought stress in the presence of supporting bacteria and fungi: an efficient strategy in horticulture. *Horticulturae*, 7(10), 390. doi: 10.3390/horticulturae7100390.
104. Hartmann, M., Frey, B., Mayer, J., Mader, P., Widmer, F., (2014). Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *ISME J*, 9, 1177-1194. doi: 10.1038/ismej.2014.210.

105. Hawkins, J. P., Oresnik, I. J., (2022). The rhizobium-legume symbiosis: co-opting successful stress management. *Front Plant Sci*, 12. doi: 10.3389/fpls.2021.796045.
106. Hazra, S. K., Das, S., Das, A. K., (2002). Sisal plant regeneration via organogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 70, 235-240.
107. He, D., Singh, S. K., Peng, L., Kaushal, R., Vílchez, J. I., Shao, C., Wu, X., Zheng, S., Morcillo, R. J. L., Paré, P. W., Zhang, H., (2022). Flavonoid-attracted *Aeromonas sp.* from the *Arabidopsis* root microbiome enhances plant dehydration resistance. *ISME J*, 16(11), 2622-2632. doi: 10.1038/s41396-022-01288-7.
108. Hou, Q., Li, S., Shang, C., Wen, Z., Cai, X., Hong, Y., Qiao, G., (2022). Genome-wide characterization of chalcone synthase genes in sweet cherry and functional characterization of *CpCHS1* under drought stress. *Front Plant Sci*, 13. doi: 10.3389/fpls.2022.989959.
109. Howard, M. M., Kao, Kniffin, J., Kessler, A., (2020). Shift in plant-microbe interactions over community succession and their effects on plant resistance to herbivores. *New Phytol*, 226, 1144-1157. doi: 10.1111/nph.16430.
110. Hu, x., Liu, J., Wei, D., Zhou, B., Chen, X., Jin, J., Liu, X., Wang, G., (2019). Long-term application of nitrogen, not phosphate or potassium, significantly alters the diazotrophic community compositions and structures in a Mollisol in Northeast China. *Res Microbiol*, 170, 147-155. doi: 10.1016/j.resmic.2019.02.002.

111. Huang, Q., Jianlei, W., (2019). The 19-years inorganic fertilization increased bacterial diversity and altered bacterial community composition and potential functions in a paddy soil. *Appl Soil Ecol*, 144, 60-67. doi: 10.1016/j.apsoil.2019.07.009.
112. Huang, R., McGrath, S.P., Hirshch, P. R., Clark, I. M., Storkey, J., Wu, L., Zhou, J., Liang, Y., (2019). Plant-microbe networks in soil are weakened by century-long use of inorganic fertilizers. *Microb Biotechnol* 12, 1464-1475. doi: 10.1111/1751-7915.13487.
113. Huerta-Lovera, M., Peña-Valdivia, C. B., García-Esteva, A., Kohashi-Shibata, J., Campos-García, H., and Aguirre-Rivera, J. (2018). Maguey (*Agave salmiana*) infructescence morphology and its relationship to yield components. *Genet Resour Crop Evol*, 65: 1649-1661. doi: 10.1007/s10722-018-0641-6.
114. Hussain, A., Ahmed-Qarshi, I., Nazir, H., Ullah, I., (2012). Chapter 1: Plant tissue culture: current status and opportunities, 1-27. doi: 10.5772/50568.
115. Iguchi, S., Tokunaga, T., Kamon, E., Takenaka, Y., Koshimizu, S., Watanabe, M., Ishimizu, T., (2023). Lanthanum supplementation alleviates tomato root growth suppression under low light stress. *Plants*, 12(14):2663. doi:10.3390/plants12142663.
116. Ismail, I., Hamayun, M., Hussain, A., Iqbal, A., Khan, S. A., Gul, S., Khan, H., Rehman, K. u., Bibi, H., Lee, I. J., (2021). *Penicillium glabrum* acted as a heat stress relieving endophyte in soybean and sunflower. *Pol J Environ Stud*, 30(4), 3099-3110. doi: 10.15244/pjoes/128579.

117. Jana, G., Yaish, M., (2021). Genome analysis of a salinity adapted *Achromobacter xylosoxidans* rhizobacteria from the date palm. *Rhizophere*, 19, 100401.
118. Jayaraman, K., Raman, V. K., Sevanthu, A. M., Sivakumar, S. R., Gayatri, Viswanathan, C., Mohapatra, T., Mandal, P. K., (2021). Stress-inducible expression of chalcone isomerase2 gene improves accumulation of flavonoids and imparts enhanced abiotic stress tolerance to rice. *Env Exp Bot*, 190, 104582. doi: 10.1016/j.envexpbot.2021.104582.
119. Jia, T., Gu, J., Ma, M., (2024). $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ substantially fortified *Glycyrrhiza uralensis*'s resilience against salt stress by interconnected pathways. *BMC Plant Biol*, 24(1):926. doi: 10.1186/s12870-024-05644-x.
120. Jimenez-Valdés, M., Godínez-Alvarez, H., Caballero, J., & Lira, R. (2010). Population dynamics of *Agave marmorata* Roezl. Under two contrasting management systems in Central Mexico. *Economic Botany*, 64(2), 149–160.
121. Joe, M. M., Islam-Rashedul, M. D., Karthikeyan, B., Bradeepa, K., Sivakumaar, P. K., Sa, T., (2012). Resistance responses of rice to rice blast fungus after seed treatment with the endophytic *Achromobacter xylosoxidans* AUM54 strains. *Crop Prot*, 42, 141–148.
122. Joly, P., Calteau, A., Wauquier, A., Dumas, R., Beuvin, M., Vallenet, D., Crovadore, J., Cochard, B., Lefort, F., Berthon, J. Y., (2021). From strain characterization to field authorization: highlights on *Bacillus velezensis* strain B25 beneficial properties for plants and its activities on phytopathogenic fungi. *Microorganisms*, 9(9):1924. doi: 10.3390/microorganisms9091924.

123. Kanani, P., Modi, A., Kumar, A., (2020). Biotization of endophytes in micropropagation: A helpful enemy. In *Microbial Endophytes: Prospects for Sustainable Agriculture*; Kumar, A., Singh, V.P., Eds.; Woodhead Publishing: Sawston, UK, 357–379.
124. Kaur, K., Singh, P., Kaur, K., Bhandawat, A., Nogia, P., Pati, P.K., (2021). Development of robust In vitro culture protocol for the propagation of generically and phytochemically stable plants of *Withania somnifera* (L.) Dunal (Ashwagandha). *Ind Crops Prod*, 166, 113428.
125. Kayano, Y., Tanaka, A., Takemoto, D., (2018). Two closely related Rho GTPases, Cdc42 and RacA, of the endophytic fungus *Epichloë festucae* have contrasting roles for ROS production and symbiotic infection synchronized with the host plant. *PLoS Pathog*, 14(1), e1006840. doi: 10.1371/journal.ppat.1006840.
126. Khan, A. L., Hamayun, M., Ahmad, N., Hussain, J., Kang, S. M., Kim, Y. H., Adnan, M., Tang, D. S., Waqas, M., Radhakrishnan, R., Hwang, Y. H., Lee, I. J., (2011a). Salinity stress resistance offered by endophytic fungal interaction between *Penicillium minioluteum* LHL09 and glycine max. L. *J Micro Biotech*, 21(9), 893-902. doi: 10.4014/jmb.1103.03012.
127. Khan, M. A., Asaf, s., Khan, A. L., Ullah, I., Ali, S., Kang, S. M., Lee, I. J., (2019). Alleviation of salt stress response in soybean plants with the endophytic bacterial isolate *Curtobacterium sp.* SAK1. *BMC*, 69, 797-808. doi: 10.1007/s13213-019-01470-x.

128. Kim, J., Soh, S. Y., Bae, H., Nam, S. Y., (2019). Antioxidant and phenolic contents in potatoes (*Solanum tuberosum* L.) and micropropagated potatoes. *Appl Biol Chem*, 62, 1-9.
129. Klimova, A., Ruiz Mondragón, K. Y., Aguirre-Planter, E., Valiente, A., Lira, R., & Eguiarte, L. (2023). Genomic analysis unveils reduced genetic variability but increased proportion of heterozygotic genotypes of the intensively managed mezcal agave, *Agave angustifolia*. *American Journal of Botany*, 110, e16216. <https://doi.org/10.1002/ajb2.16216>.
130. Koch, A. L. (2001). Oligotrophs versus copiotrophs. *BioEssays*, 23, 657-661. doi: 10.1002/bies.1091.
131. Komakeck, R., Kim, J., Kim, W. J., Omujal, F., Yang, S., Moon, B. C., Okello, D., Rahmat, E., Nambatya-Kyetune, G., Matsabisa, M. G., (2020). Micropropagation protocol for the endangered medicinal tree *Prunus africana* (Hook f.) kalkman: genetic fidelity and physiological parameter assessment. *Front Plant Sci*, 11, 1871.
132. Kour, D., Yadav, A. N., (2022). Bacterial mitigation of drought stress in plants: current perspectives and future challenges. *Curr Microbiol*, 79(9), 248. doi: 10.1007/s00284-022-02939-w.
133. Kracmorova, M., Karpiskova, J., Uhlik, O., Strejcek, M., Szakova, J., Balik, J., Demnerova, K., Stiborova, H., (2020). Microbial communities in soils and endosphere of *Solanum tuberosum* L. and their response to long-term fertilization. *Microorganisms*, 8, 1377.
134. Kumar, a., Kirti, a., Rajaram, H., (2018). Regulation of multiple abiotic stress tolerance by LexA in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain

- PCC7120. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 26, S1874-9399(19)30185-8. doi: 10.1016/j.bbagr.2018.07.007.
135. Kunert, K. J., Foyer, C. H., (2022). Redox metabolism in soybean and its significance in nitrogen-fixing nodules. Chapter seven, *Adv Bot Res*, 102, 177-209. doi: 10.1016/bs.abr.2022.02.020.
136. Kurzemann, F., Plieger, U., Probst, M., Spiegel, H., Sandén, T., Ros, M., Insam, H., (2020). Long-term fertilization affects soil microbiota, improves yield and benefits soil. *Agronomy*, 10(1664), 1-17. doi: 10.3390/agronomy10111664.
137. Lauber, C., Hamady, M., Knight, R., Fierer, N., (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environ Microbiol*, 75, 5111-5120. doi: 10.1128/AEM.00335-09.
138. Lee, S. A., Kim, J. M., Kim, Y., Joa, J. H., Kang, S. S., Ahn, J. H., Kim, M., Song, J., Weon, H. Y., (2020). Different types of agricultural land use drive distinct soil bacterial communities. *Sci Rep*, 10, 17418. doi: 10.1038/s41598-020-74193-8.
139. Lecona-Guzman, C. A., Reyes-Zambrano, S., Barredo-Pool, F. A., abud-Archila, M., Montes-Molina, J. A., Rincón-Rosales, R., Gutierrez-Miceli, F. A., (2017). In vitro propagation of *Agave americana* by indirect organogenesis. *HortScience*, 52, 996-999.
140. Leite, M. S., Furtado-Pinto, T. E., Rabelo-Centofante, A., Rubio-Neto, A., Guimaraes-Silva, F., Gonçalves-Selari, P. J. R., Martins, P. F., (2021). Acclimatization of *Pouteria gardneriana* Radlk micropropagated plantlets:

- Role of In vitro rooting and plant growth-promoting bacteria. *Curr. Plant Biol*, 27, 100209.
141. Lema-Ruminska, K., Kulus, D., (2012). Induction of somatic embryogenesis in *Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem. in the aspect of light conditions and auxin 2,4-D concentrations. *Acta Scien Polo Horto Cult*, 11(4), 77-87.
142. Li, D., Zhao, B., Zhang, J., Liu, K., Huang, Q., (2021). Different traits from the paddy soil and upland soil regulate bacterial community and molecular composition under long-term fertilization regimes. *Appl Soil Ecol*, 165, 103982. doi: 10.1016/j.apsoil.2021.103982.
143. Li, L., Yang, G., Ren, M., Wang, Z., Peng, Y., Xu, R., (2021). Co-regulation of auxin and cytokinin in anthocyanin accumulation during natural development of purple wheat grains. *J Plant Grow Reg*, 40, 1881-1893. doi: 10.1007/s00344-020-10237-7.
144. Li, Z., and Ahammed, G. J., (2023). Plant stress response and adaptation via anthocyanins: A review. *plant stress*, 10: 100230. doi: 10.1016/j.stress.2023.100230.
145. Liang, Y., Ning, D., Lu, Z., Zhang, N., Hale, L., Wu, L., Clark, I., Mcgranth, S., Storkey, J., Hirsch, P., Sun, B., Zhou, J., (2020). Century long fertilization reduces stochasticity controlling grassland microbial community succession. *Soil Biol Biochem*, 151, 108023.
146. Lima, A. S., Prieto, K. R., Santos, C. S., Paula-Valerio, H., Garcia-Ochoa, E. Y., Huerta-Robles, A., Beltran-Garcia, M. J., Di Mascio, P., Bertotti, M., (2018). *In-vivo* electrochemical monitoring of H₂O₂ production induced by

- root-inoculated endophytic bacteria in *Agave tequilana* leaves. *Biosens Bioelectron*, 99, 108–114.
147. Lingling, R., Xiuling, L., Lingzhi, L., (2019). Community characteristics of soil ammonia oxidizing bacteria after different fertilizer applications. *Chinese J Eco-agri*, 27. doi: 10.13930/j.cnki.cjea.180645.
148. Liu, H., Li, J., Carvalhais, L. C., Percy, C. D., Verma, J. P., Schenk, P. M., Singh, B. K., (2020a). Evidence for the plant recruitment of beneficial microbes to suppress soil-borne pathogens. *New Phytol*, 229, 2873-2885. doi: 10.1111/nph.17057.
149. Liu, J., Qiu, G., Liu, C., Chen, X., Fu, Q., Lin, Y., Guo, B., (2022c). Salicylic acid, a multifaceted hormone, combats abiotic stresses in plants. *Life (basel)*, 12(6), 886. doi: 10.3390/life12060886.
150. Liu, L., Chao, N., Yidklisi, K., Kang, X., Cao, X., (2022a). Comprehensive analysis of the MTB transcription factor gene family in *Morus alba*. *BMC Plant Biology*, 22, 281.
151. Liu, L., Li, S, Yue, S., Tian, J., Chen, H., Jiang, H., Siddiqued, K. H. M., Zhan, A., Gang, Q., Yu, Q., (2021a). Soil microbial community and network changes after long-term use of plastic mulch and nitrogen fertilization on semiarid farmland. *Geoderma*, 396, 115086. doi: 10.1016/j.geoderma.2021.115086.
152. Liu, W., Ling, N., Luo, G., Guo, J., Zhu, C., Xu, Q., Liu, M., Shen, Q., Guo, s., (2021b). Active phoD-harboring bacteria are enriched by long-term organic fertilization. *Soil Biol Biochem*, 152, 108071. doi: 10.1016/j.soilbio.2020.108071.

153. Liu, X., Qiu, W., Rao, B., Cao, Y., Fang, X., Yang, J., Jiang, G., Zhong, Z., Zhu, J., (2019b). Bacterioferritin comigratory protein is important in hydrogen peroxide resistance, nodulation, and nitrogen fixation in *Azorhizobium caulinodans*, 201, 823-831.
154. Liu, Y., Ji, D., Turgeon, R., Chen, J., Lin, T., Huang, J., Luo, J., Zhu, Y., Zhang, C., Lv, Z., (2019a). Physiological and proteomic responses of Mulberry Trees (*Morus alba*. L.) to combined salt and drought stress. *Int J Mol Sci*, 20(10), 2486. doi: 10.3390/ijms20102486.
155. Liu, Y., Sun, L., Zhang, P., Wan, J., Wang, R., Xu, J., (2017). Lanthanum inhibits primary root growth by repressing auxin carrier abundances in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 8:1661. doi: 10.3389/fpls.2017.01661.
156. Liu Y, Zhang J. Lanthanum promotes bahiagrass (*Paspalum notatum*) roots growth by improving root activity, photosynthesis and respiration. *Plants*, 2022; 11(3):382. doi: 10.3390/plants11030382.
157. Lubna, M. A. K., Asaf, S., Jan, R., Waqas, M., Kim, L. M., Lee, I. J., (2022). Endophytic fungus *Bipolaris sp.* CSL-1 induces salt tolerance in *Glycine max.* L via modulating its endogenous hormones, antioxidative system and gene expression. *Plant Microo Interac*, 17(1), 319-332. doi: 10.1080/17429145.2022.2036836.
158. Luna-Luna, S., Enríquez-Del Valle, J. R., Rodríguez-Ortiz, G., (2017). Anatomía y morfología de plantas micropropagadas-aclimatadas de *Agave potatorum* Zucc. Fertirrigdas en vivero. *Rev Fitotec Mex*, 40(4), 491-494.

159. Ma, C., Hua, J., Li, H., Zhang, J., Luo, S., (2022). Inoculation with cabofuran-degrading rhizobacteria promotes maize growth through production of IAA and regulation of the release of plant-specialized metabolites. *Chemosphere*, 307(3), 126027. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.136027.
160. Ma, D., Guo, Y., Ali, I., Lin, J., Xu, Y., Yang, M., (2024). Accumulation characteristics of plant flavonoids and effects of cultivation measures on their biosynthesis: A review. *Plant Physiol Biochem*, 215:108960. doi: 10.1016/j.plaphy.2024.108960.
161. Macedo-Raygoza, G. M., Valdez, B. S., Prado, F. M., Prieto, K. R., Yamaguchi, L. F., Kato, M. J., Canto-Canche, B. B., Carillo-Beltran, M., Di Mascio, P., White, J. F., Beltran-Garcia, M. J., (2019). *Enterobacter cloacae*, an endophyte that establishes a nutrient-transfer symbiosis with banana plants and protects against the black Sigatoka pathogen. *Front Microbiol*, 10, 804. doi: 10.3389/fmicb.2019.00804.
162. Malá, J., Máchová, P., Cvrcková, H., Cizková, L., (2005). Využití mikropropagace pro reprodukci genových zdrojů vybraných ušlechtilých dřevin (*Malus sylvestris*, *Pyrus pyraeaster*, *Sorbus torminalis*, *S. aucuparia* a *Prunus avium*). *Zprávy Lesn. Vyzkumu*, 2, 219-224.
163. Malá, J., Máchová, P., Cvrcková, H., Karady, M., Novák, O., Mikulík, J., Hauserová, E., Greplová, K., Strnad, M., Doležal, K., (2009). Micropropagation of wild service tree (*Sorbus torminalis* (L.) Crantz): the regulative role of different aromatic cytokinins during organogenesis. *J Plant Growth Regul*, 28, 341-348.

164. Manjunatha, B. S., Nivetha, N., Krishna, G. K., Elangovan, A., Pushkar, S., Chandrashekar, N., Aggarwal, C., Asha, A. D., Chinnusamy, V., Raipuria, R. K., Watts, A., Bandeppa, S., Dukare, A. S., Paul S., (2022). Plant growth-promoting rhizobacteria *Shewanella putrefaciens* and *Cronobacter dublinensis* enhance drought tolerance of pearl millet by modulating hormones and stress-responsive genes. *Physiol Plant*, 174(2), e13676. doi: 10.1111/ppl.13676.
165. Marcec, M. J., Gilroy, S., Poovaiah, B. W., Tanak, K., (2019). Mutual interplay of Ca²⁺ and ROS signaling in plant immune response, *Plant Sci*, 283, 343.
166. Mareque, C., Da Silva, T., Vollú, R., Beracochea, M., Seldin, L., Battistoni, F., (2018). The endophytic bacterial microbiota associated with sweet sorghum (*sorghum bicolor*) is modulated by the application of chemical N fertilizer to the field. *Int J Genomics*, 30, 7403670-7403610. doi: 10.1155/2018/7403670.
167. Martinez-Rodriguez, A., Macedo-Raygoza, G., Huerta-Robles, A.X., Reyes-Sepulveda, I., Lozano-Lopez, J., Garcia-Ochoa, E. Y., Fierro-Kong, L., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P., White, J. F., Beltran-Garcia, M. J., (2019). Agave Seed Endophytes: Ecology and Impacts on Root Architecture, Nutrient Acquisition, and Cold Stress Tolerance. In: Verma, S., White, Jr, J. (eds) *Seed Endophytes*. Springer, Cham.
168. Martinez-Rodríguez, J. del C., De la Mora-Amutio, M., Plascencia-Correa, L. A., Audelo-Regalado, E., Guardado, F. R., Hernández-Sánchez, E., Peña-Ramírez, Y. J., Escalante, A., Beltrán-García, M. J., Ogura, T.,

- (2014). Cultivable endophytic bacteria from leaf bases of *Agave tequilana* and their role as plant growth promoters. *Braz J Microbiol*, 45(4):1333-9. doi: 10.1590/s1517-83822014000400025.
169. Martínez-Palacios, A., Ortefa, L. M. P., Chávez, V. M., Bye, R., (2003). Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoria-reginae*: considerations for its conservation. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 74, 135-142.
170. Martínez-Rodríguez, A. (2017). Selección y dinámica de sucesión de bacterias endófitas transmitidas por la semilla y la micropropagación de plántulas de *Agave marmorata* Roezl para fines de restauración de un ecosistema. Tesis profesional para obtener el título de Licenciado Biólogo, Universidad Autónoma de Guadalajara.
171. Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., Suzuki, A., (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann Bot*, 105(7):1141-57. doi: 10.1093/aob/mcq028.
172. McComb, J., Bennett, I., Tonkin, C., (1996). In vitro propagation of Eucalyptus species. In: Taki., Williams, R., editors. *Tissue culture of Australian plants*. University of New England; Armidale, NSW, Australia, 112-156.
173. Mekureyaw, M., Pandey, C., Hennessy, R. C., Nicolaisen, M. H., Liu, F., Nybroe, O., Roitsch, T., (2022). The cytokinin-producing plant beneficial bacterium, *Pseudomonas fluorescens* G20-18 primes tomato (*Solanum lycopersicum*) for enhanced drought stress response. *J Plant Physiol*, 270, 153629. doi: 10.1016/j.jplph.2022.153629.

174. Mengistu, A. A., (2020). Endophytes: colonization, behaviour, and their role in defense mechanism. *Int J Microbiol*, 6927219. doi: 10.1155/2020/6927219.
175. Meraj, T. A., Fu, J., Raza, a. M., Zhu, c., Shen, Q., Xu, D., Wang, Q., (2020). Transcriptional factors regulate plant stress responses through mediating secondary metabolism. *Genes*, 11(4), 346. doi: 10.3390/genes1140346.
176. Merino-Martin, L., Stokes, A., Gweon, H., Moragues, L., Staunton, S., Plassard, C., Oliver, A., Le Bissonnais, Y., Griffiths, R., (2021). Interacting effects of land use type, microbes and plant traits on soil aggregate stability. *Soil Biol Biochem*, 154, 108072. doi: 10.1016/j.soilbio.2020.108072.
177. Micci, A., Zhang, Q., Chang, X., Kingsley, K., Park, L., Chiaranunt, P., Strickland, R., Velazquez, F., Lindert, S., Elmore, M., Vines, P. L., Crane, S., Irizarry, I., Kowalki, K. P., Johnston-Monje, D., White, J. F., (2022). Histochemical evidence for nitrogen-transfer endosymbiosis in non-photosynthetic cells of leaves and inflorescence bracts of angiosperms. *Biology*, 11(6), 876. doi: 10.3390/biology11060876.
178. Miguel-Luna, M. E., Enriquez del Valle, J. R., Vlasco-Velasco, V. A., Villegas-Aparicio, Y., Carillo-Rodríguez, J. C., (2014). Concentración de benciladenina, tipo y dosis de carbohidratos en el medio de cultivo para proliferación de brotes de *Agave americana*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 46(1), 97-107.

179. Minguillón, S., Matamoros, M. a., Duanmu, D., Becana, M., (2022). Signaling by reactive molecules and antioxidants in legume nodules. *New Phytol* 236(3), 815-832. doi: 10.1111/nph.18434.
180. Mishra, A. K., Baek, K. H., (2021). Salicylic acid biosynthesis and metabolism: a divergent pathway for plants and bacteria. *Biomolecules*, 11(5), 705. doi: 10.3390/biom11050705.
181. Mohamadpoor, M., Amini, J., Ashengroph, M., Azizi, A., (2022). Evaluation of biocontrol potential of *Achromobacter xylosoxidans* strain CTA8689 against common bean root rot. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 117: 101769, doi: 10.1016/j.pmpp.2021.101769.
182. Monja-Mio, K. M., Barredo, F., Herrera, G., Esqueda, M., Robert, M. L., (2015). Development of the stomal complex and leaf surface of *Agave angustifolia* Haw. "Bacanora" plantlets during the in vitro to ex vitro transition process. *Sci Hortic*, 189, 32-40. doi: 10.1016/j.scienta.2015.03.032.
183. Monja-Mio, K. M., Olvera-Casanova, D., Herrera-Alamillo, M. A., Sánchez-Teyer, F. L., Robert, M. L., (2021). Comparison of conventional and temporary immersion systems on micropropagation (multiplication phase) of *Agave angustifolia* Haw. *Bacanora. 3 Biotech*, 11, 77.
184. Morreeuw, Z. P., Castillo-Quiroz, D., Ríos-González, L. J., Martínez-Rincón, R., Estrada, N., Melchor-Martínez, E. M., Iqbal, H. M. N., Parra-Saldívar, R., Reyes, A. G., (2021). High throughput profiling of flavonoid abundance in *Agave lechuguilla* residue-valorizing under explored mexican plant. *Plants*, 10, 695.

185. Mukherjee, A., Gaurav-Kumar, A., Kumar-Patel, P., Singh, S., Kumar-Chouhan, K., Lepcha, A., Pereira, A. P. A., Verma, J. K., (2021). Unlocking the potential plant growth-promoting properties of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed endophytes bio-inoculants for improving soil health and crop production. *Land Degrad Dev*, 32, 4362–4374.
186. Munir, N., Hanif, M., Abidee, Z., Sohail, M., (2022). Mechanisms and strategies of plant microbiome interactions to mitigate abiotic stresses. *Agronomy*, 12(9), 12092069. doi: 10.3390/agronomy12092069.
187. Nakabayashi, R., Yonekura-Sakakibara, K., Urano, K., Suzuki, M., Yamada, Y., Nishizawa, T., Matsuda, F., Kojima, M., Sakakibara, H., Shinozaki, K., Michael, A. J., Tonhge, T., Yamazaki, M., Saito, K., (2013). Enhancement of oxidative and drought tolerance in *Arabidopsis* by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *The Plant J*, 77, 367. doi: 10.1111/tpj.12388.
188. Nakashima, K., Yamaguchi, K., Shinozaki, K., (2014). The transcriptional regulatory network in the drought, cold, and heat. *Front Plant Sci*, 5, 170.
189. Nanjani, S., Soni, R., Paul, D., Keharia, H., (2022). Genome analysis uncovers the prolific antagonistic and plant growth-promoting potential of endophyte *Bacillus velezensis* K1. *Gene*, 836, 146671. doi: 10.1016/j.gene.2022.146617.
190. Narváez-Zapata, J. A., and Sánchez-Teyer, L. F. (2009). Agaves as a raw material: recent technologies and applications. *Rec Pat Biotech*, 3: 185-191. doi: 10.2174/187220809789389144.

191. Nath, M., Bhatt, D., Prasad, R., Gill, S. S., Anjum, N. A., Tuteja, N., (2016). Reactive oxygen species generation-scavenging and signaling during plant-arbuscular mycorrhizal and *Piriformospora*. *Front Plant Sci*, 7. doi: 10.3389/fpls.2016.01574.
192. Naziri, M., Sadat, S., Soltani-Howyzeh, M., (2019). The effect of different hormone combinations on direct and indirect somatic embryogenesis in *Agave americana*. *Iran J Plant Physiol*, 9, 2739-2747.
193. Nie, Y., Wang, M., Zhang, W., Ni, Z., Hashidoko, Y., Shen, W., (2018). Ammonium nitrogen content is a dominant predictor of bacterial community composition in an acidic forest soil with exogenous nitrogen enrichment. *Sci Total Environ*, 624, 407-415. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.12.142.
194. Nobel, P.S. (1996) Responses of some North American CAM plants to freezing temperatures and doubled CO₂ concentrations: implications of global climate change for extending cultivation. *Journal of Arid Environments*, 34:187-196.
195. Noman, M., Ahmen, T., Ijaz, U., Shahid, M., Azizullah, Li, D., Manzoor, I., Song, F., (2021). Plant-microbiome crosstalk: dawning from composition and assembly of microbial community to improvement of disease resilience in plants. *Int J Mol Sci*, 22(13), 6852. doi: 10.3390/ijms22136852.
196. Ornelas, J. F., Ordano, M., Hernández, A., López, J. C., Mendoza, L., & Perroni, Y. (2002). Nectar oasis produced by *Agave marmorata* Roehl. (Agavaceae) lead to spatial and temporal segregation among nectarivores in the Tehuacán Valley, México. *Journal of Arid Environments*, 52, 37–51. [https://doi.org/10.1016/S0140-1963\(02\)90971-7](https://doi.org/10.1016/S0140-1963(02)90971-7).

197. Osorio-Rosales, M. L., Mata-Rosas, M., (2005). Micropropagation of endemic and endangered Mexican species of ponytail palms. *HortScience*, 40(5), 1481-1484.
198. Oukala, N., Aissat, K., Pastor, V., (2021). Bacterial endophytes: the hidden actor in plant immune responses against biotic stress. *Plants*, 19, 1012. doi: 10.3390/plants10051012.
199. Pang, C., Zhang, Y., Li, Y., (2019). Effects of soaking seeds with lanthanum nitrate on seed germination and seedling growth of quinoa under salt stress. *Scientia Agricultura Sinica*, 52(24): 4484-4492.
200. Park, Y. G., Mun, B. G., Kang, S. M., Hussain, A., Shahzad, R., Seo, C. W., Kim, A. Y., Lee, S. U., Oh, K. Y., Lee, D. Y., Lee, I. J., Yun, B. W., (2017). *Bacillus aryabhatai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *Plos One*, 12, e0173203. doi: 10.1371/journal.pone.0173203.
201. Parra-Rondinel, F., Casa, A., Begazo, D., Paco, A., Márquez, E., Cruz, A., Segovia, J., Torres-García, I., Zarazúa, M., Lizárraga, L., (2021). Natural and cultural processes influencing gene flow among wild (Atoq Papa), weedy (Araq Papa and k'ipa papa), and crop potatoes in the Andean region of southern Peru. *Front Ecol Evol*, 9, 327.
202. Pascual, L. S., Segarra-Medina, C., Gómez-Cadenas, A., López-Climent, M. F., Vives-Peris, V., Zandalinas, S. I., (2022). Climate change-associated multifactorial stress combination: a present challenge for our ecosystems. *J Plant Physiol*, 276, 153764. doi: 10.1016/j.jplph.2022.153764.

203. Paungfoo-Lonhienne, C., Schmidt, S., Webb, R. I., Lonhienne, T. G., (2013). Rhizophagy—A new dimension of plant–microbe interactions. *Mol Microb Ecol Rhizosphere*, 1, 1199–1207.
204. Pedrosa-Manrique, A., Tupaz-Villacorte, J., Wiliam, A., (2008). Micropropagation de *Ilexkunthiana triana y planchon* (Aquifoliacea), una especie de gran importancia en programas de revegetación. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(2), 72-84.
205. Peláez-Vico, M. A., Fichman, Y., Zandalinas, S. I., Breusegem, F. V., Karpinski, S. M., Mittler, R., (2022). ROS and redox regulation of cell-to-cell and systemic signaling in plants during stress. *Free Radic Biol Med*, 193(Part 1), 354-362. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.10.305.
206. Peñas-Corte, M., Bouzas, P. R., Nieto Del Río, J., Manzanera, M., Barros-Rodríguez, A., Fernández-Navarro, J. R., (2024). Enhancing maize stress tolerance and productivity through synergistic application of *Bacillus velezensis* A6 and lamiales plant extract, biostimulants suitable for organic farming. *Biology (Basel)*, 13(9):718. doi: 10.3390/biology13090718.
207. Pfeilmeier, S., Petti, G. C., Miller, M. B., Daniel, B., Field, C. M., Sunagawa, s., Vorholt, J. A., (2021). The plant NADPH oxidase RBOHD is required for microbiota homeostasis in leaves. *Nature Microbiol*, 6, 852-864. doi: 10.1038/s41564-021-00929-5.
208. Phour, M., Sindhu, S. S., (2022a). Mitigating abiotic stress: microbiome engineering for improving agricultural production and environmental sustainability. *Planta*, 256(5), 85. doi: 10.1007/s00425-022-03997-x.

209. Porter, S., Sachs, J., (2020). Agriculture and the disruption of plant-microbial symbiosis. *Trends Ecol Evol*, 35, 426-439.
210. Portillo, L., Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Mora, A., Rodríguez-Garay, B., (2007). Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *Vitro Cell Dev Biol Plant* 43, 569-575. doi: 10.1007/s11627-007-9046-5.
211. Prathyusha, A. M. V. N., Bramhachari, P. V., (2018). Chapter 16—Novel perspectives of biotic and abiotic stress tolerance mechanism in Actinobacteria. In *new and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*; Singh, B.P., Gupta, V.K., Passari, A.K., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 235–244.
212. Powers, D. E., and Backhaus, R. A., (1989). In vitro propagation of *Agave arizonica* Gentry and Weber. *Plant Cell Organic Culture*, 16, 57-60.
213. Prosser, G., Nicol, W., (2012). Archeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialization and differentiation. *Trends Microbiol*, 20, 523-531. doi: 10.1016/j.tim.2012.08.001.
214. Puente-Garza, C. A., Espinosa-Leal, C. A., García-Lara, S., (2021). Effect of saline elicitors on saponin production in *Agave salmiana* plants grown In vitro. *Plant Physiol Biochem*, 162, 476–482.
215. Puente-Garza, C. A., Gutiérrez-Mora, A., García-Lara, S., (2015). Micropropagation of *Agave salmiana*: means to production of antioxidant and bioactive principles. *Front Plant Sci*, 6, 1026.
216. Puente-Garza, C. A., Meza-Miranda, C., Ochoa-Martínez, D., García-Lara, S., (2017). Effect of In vitro drought stress on phenolic acids, flavonols,

- saponins, and antioxidant activity in *Agave salmiana*. *Plant Physiol Biochem*, 115, 400–407.
217. Pushpakanth, P., Krishnamoorthy, R., Anandham, R., Senthilkumar, M., (2021). Biotization of tissue culture banana plantlets with *Methylobacterium salsuginis* to enhance the survival and growth under greenhouse and open environment condition. *J. Environ. Biol*, 42, 1452–1460.
218. Qi, J., Wang, J., Gong, Z., Zhou, J. M., (2017). Apoplastic ROS signaling in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol*, 38, 92-100. doi: 10.1016/j.pbi.2017.04.022.
219. Qian, H., Xu, Z., Cong, K., Zhu, X., Zhang, L., Wang, J., Wei, J., Ji, P., (2021). Transcriptomic responses to drought stress in *Polygonatum kingianum* tuber. *BMC Plant Biol*, 21, 537.
220. Raghavan, P. S., Rajaram, H., Apte, S. K., (2015). Membrane targeting of MnSOD is essential for oxidative stress tolerance of nitrogen-fixing cultures of *Anabaena sp.* strain PCC7120. *Plant Mol Biol*, 88(4-5), 503-514. doi: 10.1007/s11103-015-0339-5.
221. Rahname, M., Fleetwood, D. J., Johnson, R. D., (2021). Histological methods to detect early-stage plant defense responses during artificial inoculation of *Lolium perenne* with *Epichloë festucae*. *Bio Protoc*, 11(9), e4013. doi: 10.21769/BioProtoc.4013.
222. Rani, S., Kumar, P., Dahiya, P., Maheshwari, R., Dang, A. S., Suneja, P., (2022). Endophytism: a multidimensional approach to plant-prokaryotic microbe interaction. *Front Microbiol*, 13. doi: 10.3389/fmicb.2022.861235.

223. Reshi, N. A., Sudarshana, M., Girish, H., (2018). In vitro micropropagation of *Rhinacanthus nasutus* (L). Kurz. Int J Biodivers Conserv, 10, 357-364.
224. Riaji, L., Chograni, H., Rejeb, F. B., Romdhane, M. B., Masmoudi, A. S., Cherif, A., (2022). Efficient in vitro regeneration of the endangered species *Artemisia arborescens* L. through direct organogenesis and impact on secondary metabolites production. Horticult Environ Biotechnol, 63, 439–450.
225. Ripley, B. S., Abraham, T., Klak, C., Cramer, M. D., (2013). How succulent leaves of Aizoaceae avoid mesophyll conductance limitations of photosynthesis and survive drought. Journal of Experimental Botany 64: 5485–5496.
226. Rivero, R. M., Mittler, R., Blumwald, E., Zandalinas, S. I., (2022). Developing climate-resilient crops: improving plant tolerance to stress combination.
227. Robert, M., Herrera, J. L., Contreas, F., Scores, K. N., (1987). In vitro propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). Plant Cell Organic Culture, 8, 37-48.
228. Roesch, L., Fulthorpe, R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A., Kent, A., Daroub, S., Camargo, F., Farmerie, W., Triplett e., (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. ISME J, 1, 283-290. doi: 10.1038/ismej.2007.53

229. Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora, A., Acosta-Dueñas, B., (1996). Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 46, 85-87.
230. Rodríguez-Garay, B., Rodríguez-Domínguez, J. M., (2018). Micropropagation of *Agave* species. In *Plant Cell Culture Protocols*; Loyola-Vargas, V., Ochoa-Alejo, N., Eds.; *Methods in molecular biology*; Humana Press: New York, USA, 1815.
231. Rolfe, S. A., Griffiths, J., Ton, J., (2019). Crying out for help with root exudates: adaptive mechanisms by which stressed plants assemble health-promoting soil microbiomes. *Curr Opin Microbiol*, 49:73-82. doi: 10.1016/j.mib.2019.10.003.
232. Ruiz Mondragon, K. Y., Aguirre-Planter, E., Gasca-Pineda, J., Klimova, A., Trejo-Salazar, R. E., Reyes Guerra, M. A., Medellin, R. A., Piñero, D., Lira, R., & Eguiarte, L. E. (2022). Conservation genomics of *Agave tequilana* Weber var. Azul: Low genetic differentiation and heterozygote excess in the tequila agave from Jalisco, Mexico. *PeerJ*, 10, e14398.
233. Ruiz Mondragón, K. Y., Klimova, A., Aguirre-Planter, E., ValienteBanuet, A., Lira, R., Sanchez-de la Vega, G., & Eguiarte, L. E. (2023). Differences in the genomic diversity, structure, and inbreeding patterns in wild and managed populations of *Agave potatorum* Zucc. Used in the production of Tobaalá mezcal in southern Mexico. *PLoS ONE*, 18(11), e0294534.
234. Ruiz-Mondragón, Klimova, A., Valiente-Banuet, A., Lira, R., Luis E. Eguiarte López Acevedo, L., Merino Pérez, Y. E., Enríquez del Valle, J. R., Rodríguez-Ortiz, G., & Lagunas Sánchez, Z. C. (2018). In vitro organogenesis

- on stem tissues of *Agave marmorata* and *Agave angustifolia*. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 5(2), 98–105.
235. Saleem, M., Hu, J., Jousset, A., (2019). More than the sum of its parts: microbiome biodiversity as a driver of plant growth and soil health. *Ann Rev Ecol Evol*, 50, 145-168. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-110617-062605.
236. Salotti, A. H., Yarte, M. E., Larraburu, E. E. (2023). Biotization with plant growth promoting bacteria in micropropagation of *Jacaranda mimosifolia*. *Trees* 37, 1757–1765. doi: 10.1007/s00468-023-02457-7
237. Salvi, P., Mahawar, H., Agarrwal, R., Kajal., Gautam, V., Deshmukh, R., (2022). Advancement in the molecular perspective pf plant-endophytic interaction to mitigate drought stress in plants. *Front Microbiol*, 13. doi: 10.3389/fmicb.2022.981355.
238. Sánchez-Urbina, A., Ventura-Canseco, L. M. C., Ayora-Talavera, T., Abud-Archilla, M., Peez-Farrera, M. A., Dendooven, L., Miceli, F. G., (2008). Seed germination and in vitro propagation of *Agave grijalvensis* an endemic endangered Mexican species. *Asian J Plant Sci*, 7, 752-756.
239. Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Pulido, H., Rodríguez-Garay, B., (1999). Efficient in vitro propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 56, 163-167.
240. Santacruz-Ruvalcaba, F., Portillo, L., (2009). Thin cell suspension layer as a new methodology for somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *Ind Crops Prod*, 29, 609-614.
241. Santana, M. M., Rosa, A. P., Zamarreño, A. M., García-Mina, J. M., Rai, A., Cruz, C., (2022). *Achromobacter xylosoxidans* and *Enteromorpha*

- intestinalis* extract improve tomato growth under salt stress. *Agronomy*, 12(4):934. doi: 10.3390/agronomy12040934
242. Schlatter, D., Kahl, K., Carlson, B., Huggins, D., Paulitz, T., (2020). Soil acidification modifies soil depth-microbiome relationships in a no-till wheat cropping system. *Soil Biol Biochem*, 149, 107939. doi: 10.1016/j.soilbio.2020.107939.
243. Schulz, B., Boyle, C., (2005). The endophytic continuum. *Mycol. Res*, 109, 661–686.
244. Sedivá, J., Velebil, J., Zahradník, D., (2023). Micropropagation as a tool for the conservation of autochthonous *Sorbus* species of *Czechia*. *Plants*, 12(3), 488.
245. Seghers, D., Wittebolle, K. L., Top, E., Verstraete, W., Siciliano, S., (2004). Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. *Appl Environ Microbiol*, 70, 1475-1482. doi: 10.1128/AEM.70.3.1475-1482.2004.
246. Semarnat, Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental. Especies nativas de México de flora y fauna silvestre. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación (DOF).
247. Semchenko, M., Barry, K. E., De Vries, F. T., Mommer, L., Moora, M., Maciá-Vicente, J. G., (2022). Deciphering the role of specialist and generalist plant-microbial interactions as drivers of plant-soil feedback. *New Phytol*, 234(6), 1929-1944. doi: 10.1111/nph.10110.

248. Sessitsch, A., Hardoim, P. R., Doring, J., Weilharter, A., Krause, A., Woyke, T., Mitter, B., Hauberg-Lotte, L., Friedrich, F., Rahalkar, M., Hurek, T., Sarkar, A., Bodrossy, L., Van Overbeek, L. S., Brar, D., Elsas, J. D., Reinhold-Hurek, B., (2012). Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomics analysis. *MPMI*, 25,28-36. doi: 10.1094/MPMI-08-11-0204.
249. Shah, A., Smith, D. L., (2020). Flavonoids in agriculture: chemistry and roles in, biotic and abiotic stress responses, and microbial associations. *Agronomy*, 10, 1209. doi: 10.3390/agronomy10081209.
250. Shahzad, R., Waqas, M., Khan, A. L., Asaf, S., Khan, M. A., Kang, S. M., Yun, B. W., Lee, I. J., (2016). Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. *Plant Physio Bioch*, 106, 236-243. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.05.006.
251. Sharma, P., Bhushan, A., Dubey, R. S. (2024). Addressing lanthanum toxicity in plants: Sources, uptake, accumulation, and mitigation strategies, *Science of The Total Environment*, 929, 172560. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.172560.
252. Sharman, N., (2001). In vitro conservation of *Gentiana kurroo* Royle: an indigenous threatened medicinal plant. *Indian J Plant Gener Resour*, 14, 99-100.
253. Shomali, A., Das, S., Arif, N., Sarraf, M., Zahra, N., Yadav, V., Aliniaiefard, S., Chauhan, D. K., Hasanuzzaman, M., (2022). Diverse

- physiological roles of flavonoids in plant environmental stress responses and tolerance. *Plants (Basel)*, 11(22):3158. doi: 10.3390/plants11223158.
254. Sinha, R., Fritschi, F. B., Zandalinas, S. I., Mittler, R., (2021). The impact of stress combination on reproductive processes in crops. *Plant Science*, 311, 111007. doi: 10.1016/j.plantsci.2021.111007.
255. Singh, R. K., Anandhan, S., García-Pérez, I. M., Ruiz-May, E., Nava-Pérez, E., Quiroz-Figueroa, F. R., (2019). An efficient protocol for in vitro propagation of the wild legume *Cicer microphyllum* Benth., a crop wild relative of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 55, 9-14.
256. Singh, S. K., Wu, X., Shao, C. Zhang, H., (2022). Microbial enhancement of plant nutrient acquisition. *Stress Biology* 2, 3. doi: 10.1007/s44154-021-00027-w.
257. Singhal, R. K., Sha, D., Skalicky, M., Mishra, U. N., Chauhan, J., Behera, L. P., Lenka, d., Chand, S., Kumar, V., Dey, P., Indu, Pandey, s., Vachova, P., Gupta, A., Brestic, M., El Sabagh, A., (2021). Crucial cell signaling compounds crosstalk and integrative multi-omics techniques for salinity stress tolerance in plants. *Front Plant Sci*, 12. doi: 10.3389/fpls.2021.670369.
258. Skiba, U. M., Rees, R. M., (2014). Nitrous oxide, climate change and agriculture. *CAB Reviews*, 9, 010. doi: 10.1079/PAVSNNR20149010.
259. Slauson, L. A. (2000). Pollination biology of two chiropterophilous agaves in Arizona. *Am J Bot*, 87 (6): 825-836. doi: 10.2307/2656890.

260. Sneck, M. E., Rudgers, J. A., Young, C. A., Miller, T. E., (2019). Does host outcrossing disrupt compatibility with heritable symbionts? *Oikos*, 128, 892–903.
261. Song, Y., Wilsom, A. J., Zhang, X. C., Thoms, D., Sohrabi, R., Song, S., Geissmann, Q., Liu, Y., Walgren, L., He, S. Y., Haney, C. H., (2021). FERONIA restricts *Pseudomonas* in the rhizosphere microbiome via regulation of reactive oxygen species. *Nat Plants*, 7(5), 644-654. doi: 10.1038/s41477-021-00914-0.
262. Soonvald, L., Loit, K., Runno-Paurson, E., Astover, A., Tedersoo, L., (2020). Characterising the effect of crop species and fertilization treatment on root fungal communities. *Sci Rep* 10:18741. doi: 10.1038/s41598-020-74952-7.
263. Soumare, A., Diédhiou, A.G., Arora, N. K., Al-Ani, L. K. T., Ngom, M., Fall, S., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Kouisni, L., Sy, M. O., (2021). Potential role and utilization of plant growth promoting microbes in plant tissue culture. *Front. Microbiol*, 12, 649878.
264. Su, X., Li, G., Cotner, J., Wei, L., Wang, Y., Pan, T., Ding, K., (2021). Long-term organic fertilization changes soil active bacterial composition and multifunctionality: RNA-based bacterial community and qPCR-based SmartChip analysis. *J Soil Sediments*, 21, 799-809. doi: 10.1007/s11368-020-02854-2.
265. Supinrach, S., Supinrach, I., (2014). Study of cuttings and cutting environment of dutchman's pipe (*Aristolochia ringens* Vahl.); proceedings of

- the 52nd Kasetsart University annual conference, Kasetsart University; Bangkok, Thailand, 255-362.
266. Tamošiūnė, I., Stanienė, G., Haimi, P., Stanys, V., Rugienius, R., Baniulis, D., (2018). Endophytic *Bacillus* and *Pseudomonas* spp. Modulate apple shoot growth, cellular redox balance, and protein expression under In vitro conditions. *Front Plant Sci*, 9, 889.
267. Tan, Z., Hurek, T., Reinhold, B., (2003). Effect of N-fertilization, plant-genotype and environmental conditions on nifH gene pools in roots of rice. *Environ Microbiol*, 5, 1009-1015. doi: 10.1046/j.1462-2920.2003.00491.x.
268. Tao, R., Li, J., Hu, B., Chu, G., (2021). Ammonia-oxidizing bacteria are sensitive and not resilient to organic amendments and nitrapyrin disturbance, but ammonium-oxidizing archaea are resistant. *Geoderma*, 384, 114814. doi: 10.1016/j.geoderma.2020.114814.
269. Tejavathi, D. H., Rajanna, M. D., Sowmya, R., Gayathamma, K., (2007). Induction of somatic embryos from cultures of *Agave vera-cruz* Mill. *Vitr Cell Dev Biol Plant*, 43, 423-428.
270. Thorpe, T. A., (2007). History of plant tissue culture. *Mol Biotechnol*, 37(2), 169-180. doi: 10.1007/s12033-007-0031-3.
271. Tirado, B., Gómez-Rodríguez, V. M., Cruz-Cárdenas, C. I., Zelaya-Molina, L. X., Ramírez-Vega, H., Sandoval-Cancino, G., (2023). In vitro conservation of Mexican garlic varieties by minimal growth. *Plants*, 12(3), 3929.

272. Trivedi, P., Batista, B. d., Bazany, K. E., Singh, B. K., (2022). Plant-microbiome interactions under a changing world: responses, consequences and perspectives. *New Phytol*, 234(6), 1951-1959. doi: 10.1111/nph.18016.
273. Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., Singh, B. K., (2020). Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nat Rev Microbiol*, 18(11), 607-621. doi: 10.1038/s41579-020-0412-1.
274. Trejo-Salazar, R., Scheinvar, E., y Eguiarte, L. (2015). ¿Quién poliniza realmente los agaves? Diversidad de visitantes florares en 3 especies de *Agave* (Agavoideae: Asparagaceae). *Rev Mex Bio*, 86: 358-369. doi: 10.1016/j.rmb.2015.04.007.
275. Tsoetsi, T., Nephali, L., Malebe, M., Tugizimana, F., (2022). *Bacillus* for plant growth promotion and stress resilience: what have we learned? *Plants (Basel)*, 11(19), 2482. doi: 10.3390/plants11192482.
276. Turner, T., Karunakaran, R., Walshaw, J., Heavens, D., Alston, M., Swarbreck, D., Osbourn, a., Grant, A., Poole, P., (2013). Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *ISME J*, 7, 2248-2258. doi: 10.1038/ismej.2013.119.
277. Tyagi, R., Pradhan, S., Bhattacharjee, A., Dubey, S., Sharma, S., (2022). Management of abiotic stresses by microbiome-based engineering of the rhizosphere. *J Appl Microbiol*, 133(2), 254-272. doi: 10.1111/jam.15552.
278. Ucar, M. B., Ucar, G., Pizzi, A., Gonultas, O., (2013). Characterization of *Pinus brutia* bark tannin by MALDI-TOF MS and ¹³C NMR. *Ind Crops Prod*, 49, 697–704.

279. Uchendu, E. E., Shukla, M., Saxena, P. K., Keller, J. E. R., (2016). Cryopreservation of potato microtubers: the critical roles of sucrose and desiccation. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 124, 649-656.
280. Valenzuela-Zapata, A y Nabhan, G. P. (2003). *Tequila. A natural and cultural history*. University of Arizona Press, Tucson.
281. Valiente-Banuet, A. (2023). Mezcal boom and extinction debts. In R. W. Jones, C. P. Ornelas-García, R. Pineda-López, & F. Alvarez (Eds.), *Mexican fauna in the Anthropocene*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-031-17277-9_14.
282. Vannier, N., Agler, M., Hacquard, S., (2019). Microbiota-mediated disease resistance in plants. *Plos pathogens*. doi: 10.1371/journal.ppat.1007740.
283. Vázquez, K. R. J., López-Hernández, J., García-Cárdenas, E., Pelagio-Flores, R., López-Bucio, J. S., Téxon, A. C., Ibarra-Laclette, E., López-Bucio, J., (2024). The plant growth promoting rhizobacterium *Achromobacter* sp. 5B1, rescues *Arabidopsis* seedlings from alkaline stress by enhancing root organogenesis and hormonal responses. *Microbiol Res*, 281:127594. doi: 10.1016/j.micres.2023.127594.
284. Villavicencio-Gutiérrez, E. E., González-Cortés, A., Carranza-Pérez, M. A., (2012). Micropropagation of *Epithelantha micromeris* (Engelm.). F. A.C. Weber ex Britt, & Rose, ornamental cactus and phylogenetic resource of the Chihuahua desert. *Rev Mex Cien For*, 3(14), 83-99.
285. Verma, H., Kumar, D., Kumar, V., Kumari, M., Singh, S. K., Sharma, V. K., Droby, S., Santoyo, G., White, J. F., Kumar, A., (2021). The potential

- application of endophytes in management of stress from drought and salinity in crop plants. *Microorganisms*, 9(8), 1729. doi: 10.3390/microorganisms9081729.
286. Vollmer, R., Espirilla, J., Villagaray, R., Cardenas, J., Castro, M., Sanchez, J. C., Anglin, N. L., (2021). Cryopreservation of potato shoot tips for long-term storage. In: Dobnik, D., Gruden, K., Ramsak, K., Coll, A., editors. *Solanum tuberosum, methods and protocols*. Humana Press; Totowa, N.J, USA, 21-54.
287. Waheed-Janabi, A. H., Kamboh, A. A., Saeed, M., Xiaoyu, L., BiBi, J., Majeed, F., Naveed, M., Mughal, M. J., Korejo, N. A., Kamboh, R., Alagawany, M., Lv, H., (2020). Flavonoid-rich foods (FRF): A promising nutraceutical approach against lifespan-shortening diseases. *Iran J Basic Med Sci*, 23(2):140-153. doi: 10.22038/IJBMS.2019.35125.8353.
288. Waititu, J. K., Zhang, X., Chen, T., Zhang, C., Zhao, Y., Wang, H., (2021). Int Transcriptome analysis of tolerant and susceptible maize genotypes reveals novel insights about the molecular mechanisms underlying drought responses in leaves. *J Mol, Sci*, 22(13), 6980. doi: 10.3390/ijms22136980.
289. Wang, J., Yang, E., Chaurand, P., Raghavan, V., (2021). Visualizing the distribution of strawberry plant metabolites at different maturity stages by MALDI-TOF imaging mass spectrometry. *Food chem*, 345:128838. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128838.
290. Wang, Q., Mingchao, M., Jiang, X., Zhou, B., Guan, D., Cao, F., Chen, S., Li., (2019). Long-term N fertilization altered ¹³C-labeled fungal community

- composition but not diversity in wheat rhizosphere of Chinese black soil. *Soil Biol Biochem*, 135. doi: 10.1016/j.soilbio.2019.04.009.
291. Wang, L., Chen, M., Lam, P.Y. *et al.* (2022). Multifaceted roles of flavonoids mediating plant-microbe interactions. *Microbiome* 10, 233. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01420-x>.
292. Ważny, R., Jędrzejczyk, R. J, Rozpądek, P., Domka, A., Turnau, K., (2022). Biotization of highbush blueberry with ericoid mycorrhizal and endophytic fungi improves plant growth and vitality. *Appl Microbiol Biotechnol*, 106(12):4775-4786. doi: 10.1007/s00253-022-12019-5.
293. Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Onckelen, H. V., Schmölling, T., (2003). Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of root and root meristem activity. *Plant Cell*, 15, 2532-2550. doi: 10.1105/tpc.014928.
294. Wemheuer, F., Kaiser, K., Karlovsky, P., Daniel, R., Vidal, S., Wemheuer, B., (2017). Bacterial endophyte communities of three agricultural important grass species differ in their response toward management regimes. *Sci Rep*, 7, 40914. doi: 10.1038/srep40914.
295. White, J. F., Chang, X., Kingsley, K. L., Zhang, Q., Chiaranunt, P., Micci, A., Velazquez, F., Elmore, M., Crane, s., Li, S., Lu, J., Molina, M. C., González-Benítez, N., Beltrán-García, M. J., Kowalski, K. P., (2021). Endophytic bacteria in grass crop growth promotion and biostimulation. *Grass Research* 1, 5 doi: [10.48130/GR-2021-0005](https://doi.org/10.48130/GR-2021-0005).

296. White, J. F., Kingsley, K. L., Butterworth, S., Brindisi, L., Gatei, J. W., Elmore, M. T., Verma, S. K., Yao, X., Kowalski, K. P., (2019). Seed-vectored microbes: their roles in improving seed endophytes: biology and biotechnology, 3-20, Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-030-10504-4_1.
297. White, J. F., Kingsley, K. L., Verma, S. K., Kowalski, K. P., (2018). Rhizophagy cycle: An oxidative process in plants for nutrient extraction from symbiotic microbes. *Microorganisms*, 6, 95.
298. White, J. F., Kingsley, K. L., Zhang, Q., Verma, R., Obi, N., Dvinskikh, S., Elmore, M. T., Verma, S. K., Gond, S. K., Kowalski, K. P., (2019b). Review: endophytic microbes and their potential applications in crop management. *Pest Manag Sci*, 75(10), 2558-2565. doi: 10.1002/ps.5527.
299. White, J. F., Torres, M. S., Verma, S. K., Elmore, M. T., Kowalski, K. P., Kingsley, K. L., (2019). Evidence for widespread microbivory of endophytic bacteria in roots of vascular plants through oxidative degradation in root cell periplasmic spaces. In *PGPR amelioration in sustainable agriculture*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 167–193.
300. Witbooi, H., Master's thesis. Cape peninsula University of Technology; cape town, western cape, South Africa, Jun 2013. In vitro propagation of *Agasthoma betulina* an indigenous plant of economic importance.
301. Wu, S., Deng, J., Yin, Y., Qin, S., Zhu, W., Zhou, Y., Wang, B., Ruan, H., Jin, L., (2020). Bacterial community changes associated with land use type in the forest montane region of Northeast China forests, 11. doi: 10.3390/f11010040.

302. Xia, Y., De Bolt, S., Dreyer, J., Scott, D., Willuams, M., (2015). Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices. *Front Plant Sci*, 6, 490. doi: 10.3389/fpls.2015.00490.
303. Xiang, Q., Chen, Q., Dong, Z., Qiao, M., Yang, X., Hu, H., Zhu, Y., (2020). Microbial functional traits in phyllosphere are more sensitive to anthropogenic disturbance than in soil. *Environ Pollut*, 265, 114954. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114954.
304. Yang, C., Hamel, C., Gan, Y., (2015). Incongruous variation of denitrifying bacterial communities as soil N level rises in Canadian canola fields. *Appl Soil Ecol*, 89, 93-101. doi: 10.1016/j.apsoil.2015.01.002.
305. Yang, T., Lupwayi, N., Marc, S. T-A., Siddique, K. H. M., Bainard, L. D., (2021). Anthropogenic drivers of soil microbial communities and impacts on soil biological function in agroecosystems. *Glob Ecol Conser*, 7, e01521. doi: 10.1016/j.gescco.2021.e01521.
306. Yao, R., Yang, J., Wang, X., Xie, W., Zheng, F., Li, H., Tang, C., Zhu, H., (2020). Response of soil characteristics and bacterial communities to nitrogen fertilization gradients in a coastal salt-affected agroecosystem. *Land degradation development*, 32, 353. doi: 10.1002/ldr.3705.
307. Ye, G., Banerjee, S., He, J. Z., Fan, J., Wang, Z., Wei, X., Hu, H. W., Zheng, Y., Duan, C., Wan, S., Chen, J., Lin, Y., (2021). Manure application increases microbiome complexity in soil aggregate fractions: results of an 18-year field experiment. *Agric Ecosyst environ*, 307, 107246. doi: 10.1016/j.agee.2020.107249.

308. Yu, K., D'Odorico, P.; Novoa, A., Collins, S.L.; Hartzell, S.; Huang, H.; Liu, H., Weigelt, P., Porporato, A.M. (2024) Potential expansion of plants with crassulacean acid metabolism in the *Anthropocene*. *BioScience*, Volume 74, 478–487.
309. Yu, W., Liu, H., Luo, J., Zhang, S., Xiang, P., Wang, W., Cai, J., Lu, Z., Zhou, Z., Hu, J., Lu, Y., (2020). Partial root-zone simulated drought induces greater flavonoid accumulation than full root-zone simulated water deficiency in the leaves of *Ginkgo biloba*. *Env Exp Bot*, 201, 104998. doi: 10.1016/j.envexpbot.2022.104998.
310. Zandalinas, S. I., Sengupta, S., Fritschi, F. B., Azad, R. K., Nechushtai, R., Mittler, R., (2021). The impact of multifactorial stress combination on plant growth and survival. *New Phytol*, 230, 1034-1048. doi: 10.1111/nph.17232.
311. Zandalinas, S. I., Fritschi, F. B., Mittler, R., (2021). Global warming, climate change, and environmental pollution: recipe for a multifactorial stress combination disaster. *Trends Plant Sci*, 26, 588.
312. Zandalinas, S., Balfagón, D., Gómez-Cadenas, A., Mittler, R., (2022). Plant responses to climate change: metabolic changes under combined abiotic stresses. *J Exp Bot*, 73(11), 3339-3354. doi: 10.1093/jxb/erac073.
313. Zandalinas, S. I., Mittler, R., (2022). Plant response to multifactorial stress combination. *New Phytol*, 234, 1161-1167. doi: 10.1111/nph.18087.
314. Zandi, P., Schnug, E., (2022). Reactive oxygen species, antioxidant responses and implications from a microbial modulation perspective. *Biology (basel)*, 11(2), 155. doi: 10.3390/biology11020155.

315. Zavaleta-Mancera, H. A., López-Delgado, H., Loza-Tavera, H., Mora-Herrera, M., Trevilla-García, C., Vargas-Suárez, M., Oughan, H., (2007). Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *J Plant Physiol*, 164(12), 1572-1582. doi: 10.1016/j.jplph.2007.02.003.
316. Zhang, Q., Kingsley, K. L., White, J. F., (2022). Endophytic *Pseudomonas sp.* from *Agave palmeri* participate in the rhizophagy cycle and act as biostimulants in crop plants. *Biology*, 11(12):1790. doi: 10.3390/biology11121790.
317. Zhang, X., Hu, Z., Pan, H., Bai, Y., Hu, Y., Jin, S., (2022). Effects of rare earth elements on bacteria in rhizosphere, root, phyllosphere and leaf of soil-rice ecosystem. *Sci Rep* 12, 2089. doi: 10.1038/s41598-022-06003-2.
318. Zhang, X., Song, J., Yan, W., Li, T., Li, R., Wang, J., Wang, X., Zhou, Q., (2022b). Regulation of rhizospheric microbial network to enhance plant growth and resist pollutants: unignorable weak electric field. *Sci Total Environ*, 855, 158888. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.158888.
319. Zhang, Y., Shen, H., He, X., Thjomas, B., Lupwayi, N., Hao, X., Thomas, M., Shi, X., (2017). Fertilization shapes bacterial community structure by alteration by soil pH. *Front Microbiol*, 8, 1325. doi: 10.3389/fmicb.2017.01325.
320. Zhang, W., Luo, X., Mei, Y. Z., Yang, Q., Zhang, A. Y., Chen, M., Mei, Y., MA, C. Y., Du, Y. C., Li, M., Zhu, Q., Sun, K., Xu, F. K., Dai, C. C., (2022c). Priming of rhizobial nodulation signaling in the mycosphere accelerates

- nodulation of legume hosts. *New Phytol*, 235(3), 1212-1230. doi: 10.1111/nph.18192.
321. Zhao, S., Blum, J. A., Ma, F., Wang, Y., Borejsza-Wysocka, E., Ma, F., Cheng, L., Li, P., (2022). Anthocyanin accumulation provides protection against high light stress while reducing photosynthesis in apple leaves. *Int J Mol Sci*, 23(20):12616. doi: 10.3390/ijms232012616.
322. Zheng, Y. Xu, Z., Liu, H., Liu, Y., Zhou, Y., Meng, c., Ma, S., Xie, Z., Li, Y., Zhang, C. S., (2021). Patterns in the microbial community of salt-tolerant plants and the functional genes associated with salt stress alleviation. *Microbiol Spectr*, 9(2), e0076721. doi: 10.1128/Spectrum.00767-21.
323. Zhuang, W. B., Li, Y. H., Shu, X. C., Pu, Y. T., Wang, X. J., Wang, T., Wang, Z.,. (2023). The classification, molecular structure and biological biosynthesis of flavonoids, and their roles in biotic and abiotic stresses. *Molecules*, 28(8):3599. doi: 10.3390/molecules28083599.
324. Zou, C., Li, Y., Huang, W., Zhao, G., Pu, G., Su, J, Coyne, M., Chen, Y., Wang, L., Hu, X., Jin, Y., (2018). Rotation and manure amendment increase soil macro-aggregates and associated carbon and nitrogen stocks in fluecured tobacco production. *Geoderma*, 325, 49-58. doi: 10.1016/j.geoderma.2018.03.017.