



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**Caracterización de la microbiota rizosférica de  
*Amaranthus cruentus* L. y sus cambios cuando la  
planta es sometida a estrés salino**

Tesis que presenta

**Fátima Alejandra Talamantes Herrera**

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

**Codirectores de la Tesis:**

**Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa**

**Dr. Jorge Luis González Escobar**

San Luis Potosí, S.L.P., junio de 2021



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Caracterización de la microbiota rizosférica de *Amaranthus cruentus* L. y sus cambios cuando la planta es sometida a estrés salino**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Fátima Alejandra Talamantes Herrera** y aprobada el **28 de junio de 2021** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

---

**Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa**  
Codirectora de la tesis

---

**Dr. Jorge Luis González Escobar**  
Codirector de la tesis

---

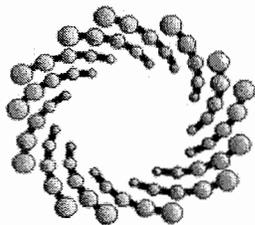
**Dra. Fabiola Jaimes Miranda**  
Miembro del Comité Tutorial



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de los doctores, Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa y el Dr. Jorge Luis González Escobar.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. CVU 1006835) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



**IPICYT**

# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 219 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 12 días del mes de julio del año 2021, se reunió a las 09:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

**Dra. Fabiola Jaimes Miranda**

**Presidenta**

**IPICYT**

**Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa**

**Secretaria**

**IPICYT**

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Fátima Alejandra Talamantes Herrera**

sobre la Tesis intitulada:

*Caracterización de la microbiota rizosférica de *Amaranthus cruentus* L. y sus cambios cuando la planta es sometida a estrés salino*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa**

**Dr. Jorge Luis González Escobar (CIATEJ)**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 09:44 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 12 días del mes de julio de 2021.

**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



**IPICYT**

SECRETARÍA ACADÉMICA  
INSTITUTO POTOSINO DE  
INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA  
Y TECNOLÓGICA, A.C.

## **Dedicatorias**

A mi madre y hermanos por el apoyo incondicional, gracias.

A mis compañeros de laboratorio y a mis compañeros de generación.

## **Agradecimientos**

Agradezco el apoyo de mis asesores, Dra. Ana Paulina Barba y el Dr. Jorge Luis González Escobar quienes me brindaron el apoyo para lograr los objetivos de mi proyecto.

A la Dra. Fabiola Jaimes Miranda, por su apoyo en la revisión del manuscrito y sus valiosos comentarios.

Al Mtro. Alberto Barrera Pacheco, por todo el apoyo dentro del laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio, Iván, Óscar, Guillermo, Selma, Adaía y Alberto, por el apoyo brindado.

A todo el personal del Instituto y en especial a la Coordinación de la DBM, y al Departamento de Posgrados que hacen posible el funcionamiento del Instituto.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. por el espacio y apoyo brindado. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

# Contenido

<b>Constancia de aprobación de la tesis</b>	ii
<b>Créditos institucionales</b>	iii
<b>Acta de examen</b>	iv
<b>Dedicatorias</b>	v
<b>Agradecimientos</b>	vi
<b>Lista de tablas</b>	ix
<b>Lista de figuras</b>	x
<b>Resumen</b>	xi
<b>Abstract</b>	xii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1. Antecedentes generales	1
1.1.1. <i>La salinidad como un problema mundial</i>	1
1.2. Organización y establecimiento de la microbiota vegetal	3
1.3. Estructura de la raíz, rizosfera y rizoplano	4
1.3.1. <i>Exudados de raíz y rizodepósitos</i>	6
1.4. Suelos y raíces como modeladores de la estructura de la microbiota vegetal	9
1.4.1. <i>Bacterias Promotoras de Crecimiento de Plantas (BPCP)</i>	10
1.4.2. <i>Bacterias endófitas</i>	12
1.5. Amaranto como cultivo de alto potencial biotecnológico	15
1.5.1. <i>Amaranto en estrés salino</i>	17
1.5.2. <i>Amaranto y microbiota</i>	18
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	20
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b>	21
3.1. Objetivos específicos	21
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	22
4.1. Material vegetal, condiciones de crecimiento y tratamiento de estrés salino	22
4.2. Cuantificación de almidón, azúcares solubles totales y prolina	22
4.3. Aislamiento de microorganismos de la endorizosfera y rizosfera	23
4.4. Aislamiento e identificación de bacterias cultivables endófitas de raíz	24
4.4.1. <i>Bacterias diazotróficas</i>	24
4.4.2. <i>Bacterias solubilizadoras de hierro</i>	24
4.4.3. <i>Bacterias solubilizadoras de fosfatos</i>	25
4.4.4. <i>Identificación de microorganismos aislados por marcado molecular del gen ADNr 16S</i>	25

4.5. Extracción de ADN metagenómico	25
4.6. Secuenciación del metagenoma y análisis bioinformático	26
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>27</b>
5.1. Cuantificación de almidón, azúcares solubles totales y prolina	27
5.2. Aislamiento e identificación de bacterias cultivables de endófitos de raíces de amaranto	28
5.2.1. <i>Bacterias aisladas en raíces de plantas de Amaranthus cruentus crecidas en condiciones control</i>	31
5.2.2. <i>Bacterias aisladas en raíces de plantas de Amaranthus cruentus en condiciones de estrés salino</i>	32
5.3. Análisis del metagenoma de rizosfera de Amaranthus cruentus mediante secuenciación del gen ADNr 16S	34
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>39</b>
PROSPECTIVAS	40
<b>Referencias</b>	<b>41</b>

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Identificación de aislados de bacterias endofíticas cultivables mediante secuenciación del gen <i>ADNr 16S</i>	29
<b>Tabla 2.</b> Distribución de lecturas de los datos obtenidas por secuenciación masiva del gen <i>ADNr 16S</i>	34

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Factores bióticos y abióticos que modelan la microbiota en plantas	5
<b>Figura 2.</b> Efecto de los rizodepósitos en la rizósfera	8
<b>Figura 3.</b> Mecanismos por los cuales las bacterias pueden promover el crecimiento de las plantas	11
<b>Figura 4.</b> (A) cuantificación de almidón, (B) azúcares solubles totales y (c) prolina; en tejidos de plantas de <i>Amaranthus cruentus</i> de plantas control y plantas sometidas a estrés salino	28
<b>Figura 5.</b> Bacterias diazotróficas aisladas en raíces de plantas de <i>Amaranthus cruentus</i>	30
<b>Figura 6.</b> Composición taxonómica de la rizosfera de <i>Amaranthus cruentus</i> , al nivel de filo	35
<b>Figura 7.</b> Abundancia relativa al nivel de orden en rizosfera de <i>Amaranthus cruentus</i> en plantas control y plantas sometidas a estrés salino	36

## Resumen

### Caracterización de la microbiota rizosférica de *Amaranthus cruentus* L. y sus cambios cuando la planta es sometida a estrés salino

La salinidad es uno de los problemas en constante crecimiento que afecta cientos de hectáreas agrícolas en todo el mundo; por lo tanto, es necesario buscar estrategias que nos permitan aminorar los efectos adversos del estrés salino sobre el crecimiento de plantas y por ende sobre la producción de alimentos. El uso de bacterias promotoras de crecimiento de plantas (BPCP), se ha propuesto como una alternativa para incrementar la productividad de los cultivos en una forma más amigable con el ambiente. Por este motivo es de gran interés el identificar cepas endófitas de plantas tolerantes a diversos tipos de estrés. *Amaranthus cruentus* L., es un cultivo resistente a diversas condiciones adversas como alta salinidad, sin embargo, se desconocen la existencia de bacterias asociadas a esta planta por lo que el objetivo de este trabajo fue aislar e identificar las BPCP asociadas a raíces y rizosfera de *A. cruentus* cuando la planta crece en condiciones normales y cuando es sometida a estrés por salinidad. Las bacterias cultivables endófitas de raíces fueron aisladas por métodos de microbiología tradicional. La microbiota de la rizosfera fue identificada mediante la secuenciación del gen *ARNr 16S*. Se aislaron 18 cepas de bacterias diazotróficas, las cuales 12 fueron capaces de solubilizar hierro, 6 aisladas de planta control y 6 de plantas crecidas en condiciones de estrés. De estas cepas 4 fueron capaces de solubilizar fosfatos. Los análisis bioinformáticos de la secuenciación del metagenoma revelaron la identidad de los microorganismos asociados a la rizósfera. Se encontraron diferenciados algunos taxones de las diferentes comunidades por lo que se confirma que la microbiota cambia con el estrés salino al que fueron sometidas las plantas. Esta microbiota podría estar relacionada con la tolerancia natural de amaranto a diferentes tipos de estreses abióticos.

**PALABRAS CLAVE:** Amaranto; BPCP; Enterobacter; Kosakonia; Metagenoma; Microbioma; Pseudomonas; Raíces.

# Abstract

## Characterization of *Amaranthus cruentus* L. rhizobiome and its changes when plants are subjected to salt stress

Salinity is one of the growing global problems affecting hundreds of agricultural hectares around the world; therefore, it is necessary to find strategies that allow us to reduce the adverse effects of saline stress on plant growth and consequently on food production. The use of plant growth-promoting bacteria (PGPB) has been proposed as an alternative to increasing crop productivity in a more environmentally friendly way. For this reason, it is of great interest to identify endophytic strains of stress-tolerant plants. *Amaranthus cruentus* L., is a crop resistant to various adverse conditions such as high salinity, however, there are no reports of endophytic bacterial communities with this plant. In that regard, the objective of this work was to isolate and identify the PGPBs associated with roots and rhizosphere of *A. cruentus* when the plant grows under normal conditions and when it was subjected to salinity stress. Cultivable root endophytic bacteria were isolated by traditional microbiology culture methods. The rhizosphere microbiota was identified by sequencing the *16S rRNA* gene. Diazotrophic strains were isolated, 12 of which were able to solubilize iron, from which 6 were isolated from control plant isolates and 6 from plants grown under salt stress. Of these strains, 4 were able to solubilize phosphates. Metagenome bioinformatics analyses revealed the identity of the microorganisms associated with the rhizosphere. Some taxa from different communities were found to be differentiated, which confirmed that the microbiota changes when plants were subjected to salinity stress. This microbiota could be related to the natural tolerance of amaranth to different types of abiotic stresses.

**KEY WORDS:** Amaranth; Enterobacter; Kosakonia; Metagenome; Microbiome; PGPR; Pseudomonas; Roots.

# INTRODUCCIÓN

## 1.1. Antecedentes generales

Al referirnos a la producción agrícola y alimentaria, la problemática global muestra que para poder mantener el ritmo de vida actual se necesitan formas más eficientes de cultivar nuestros alimentos. Uno de los principales desafíos en el siglo XXI es la optimización en la producción de manera sostenible y sustentable con la finalidad de producir alimentos suficientes y de calidad preservando la cultura y economía de la creciente población humana. Los métodos actuales de producción en la agricultura usan de manera inadecuada los pesticidas y fertilizantes químicos, creando una larga lista de problemas ambientales y de salud (Gunnell et al. 2007; Leach y Mumford 2008). Además, los patógenos de plantas emergentes, reemergentes y endémicos siguen siendo un desafío para nuestra capacidad de sostener el crecimiento y la salud de las plantas en todo el mundo (Miller et al. 2009). Aunque la contribución de la biotecnología vegetal ha sido importante en desarrollo de numerosas variedades nuevas de cultivos con mayor resistencia a las enfermedades, mayor tolerancia a la sequía, a la salinidad y con un incremento en el valor nutricional (Berg 2009); no obstante, existe una creciente demanda para desarrollar estrategias sólidas y ecológicamente compatibles de la agricultura con el medio ambiente.

### 1.1.1. *La salinidad como un problema mundial*

Globalmente en términos de estrés ambiental, la salinidad se considera como el tipo de estrés más severo que tiene efectos no sólo sobre la calidad del suelo y en el crecimiento de las plantas, sino también sobre los organismos vivos (Carillo et al. 2011a; Munns et al. 2014). Durante la última década se han reportado que aproximadamente 5.2 billones de hectáreas de tierras fértiles son erosionadas y alrededor del 50% de esta tierra está afectada solamente por estrés salino provocando efectos adversos en el crecimiento y rendimiento de las plantas

(Frenkel et al. 1978; Ghadiri et al. 2004). Esta degradación del suelo está creando un enorme problema para los agricultores.

El estrés salino se define como la fuerza osmótica ejercida sobre las plantas, cuando están creciendo en un área salina o bajo otras condiciones excesivamente salinas. La lixiviación y el drenaje insuficiente de las aguas de riego son la principal razón de la acumulación de sales en el suelo.

La salinidad es una condición del suelo caracterizada por una alta concentración de sales solubles. El Laboratorio de Salinidad USDA define un suelo salino cuando la  $CE_e$  (conductividad eléctrica del "extracto de pasta saturada") es de 4dS/m (decisiemens por metro) o más, lo que equivale a aproximadamente 40 mM de NaCl, salinidad que genera una presión osmótica de aproximadamente 0,2 Mpa. Esta definición de salinidad se deriva de la  $CE_e$  que reduce significativamente el rendimiento de la mayoría de los cultivos (Munns et al. 2008). Los suelos afectados por sales contienen grandes cantidades de sales solubles, que están presentes en la estructura espacial de macro y micro poros (Carmen y Roberto 2011). Sin embargo, el tipo de suelo define la concentración de sal y ésta puede ser diferente en diferentes suelos y en general se ha descrito que cuando el suelo presenta una conductividad de 20 mM o mayor se considera como un suelo salino o afectado por salinidad (de Souza Silva y Fay 2012).

Los principales tipos de salinidad incluyen salinidad por riego, agua de riego subterránea y salinidad transitoria (Rengasamy 2006). Los suelos afectados por sales contienen grandes cantidades de sales solubles, que están presentes en la estructura espacial de macro y micro poros (Carmen y Roberto 2011). Las aguas de riego contienen iones de sales como, sulfatos ( $SO_4^{2-}$ ), carbonato ( $CO_3^{2-}$ ), cloro ( $Cl^-$ ), magnesio ( $Mg^{2+}$ ), calcio ( $Ca^{2+}$ ), potasio ( $K^+$ ) y sodio ( $Na^+$ ). Dentro de los componentes salinos, el NaCl es de los más abundantes, los iones cloro son considerados tóxicos para las plantas y en altas concentraciones causan disminución o crecimiento lento (Hasegawa et al. 2000; Liu y Zhu 1998; Zhu et al. 2005). El NaCl es la sal más soluble y ampliamente distribuida, es común que las plantas desarrollen mecanismos para regular su acumulación y seleccionar otros nutrientes comúnmente presentes en bajas concentraciones, como el  $K^+$  y el  $NO_3^-$ ,

al excluir  $\text{Na}^+$ . En la mayoría de las plantas, las raíces excluyen efectivamente el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  mientras que el agua se absorbe del suelo (Munns 2005).

## 1.2. Organización y establecimiento de la microbiota vegetal

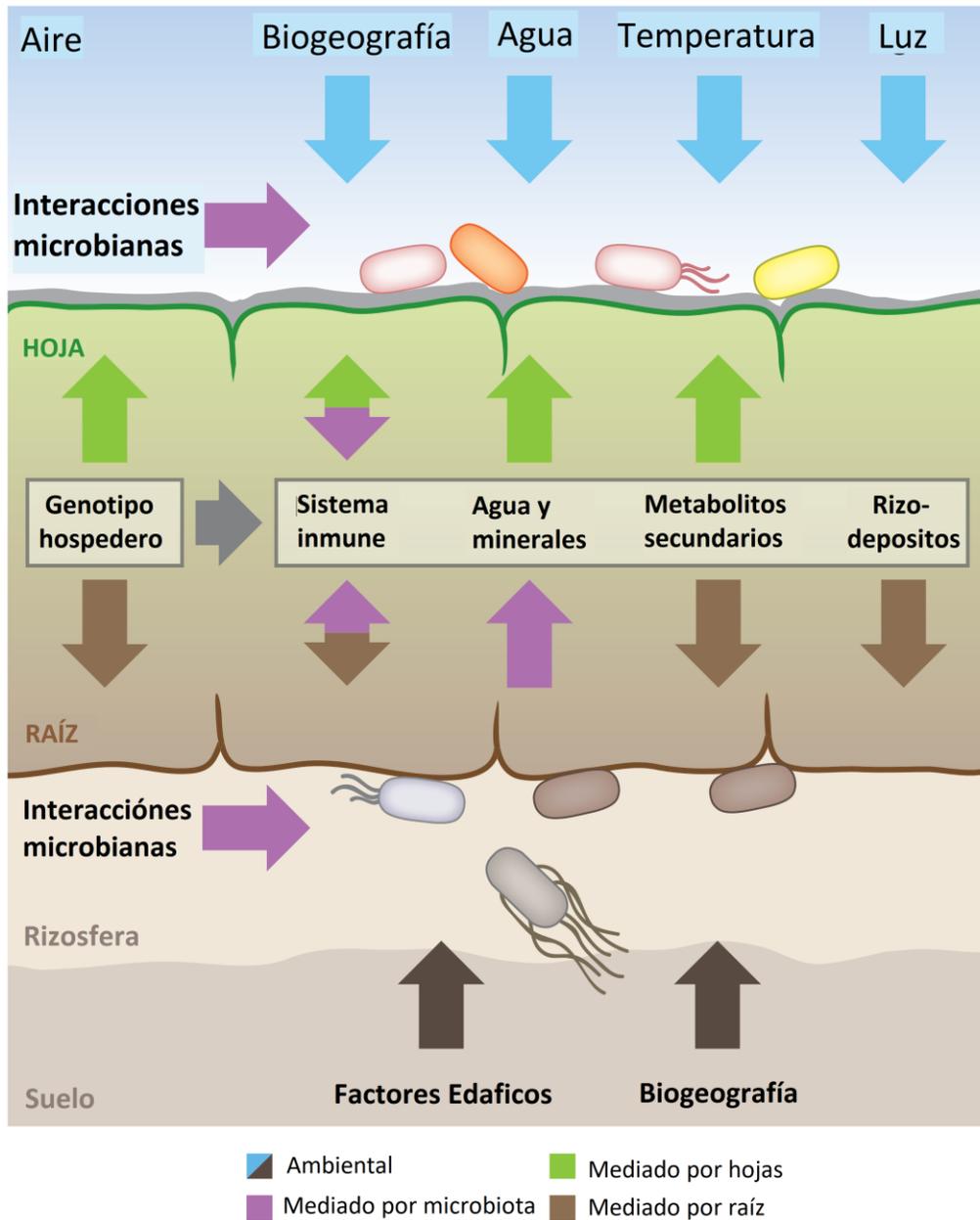
La evolución de las plantas en la tierra ha ido de la mano de una gran diversidad de microorganismos habitantes de una amplia diversidad de ambientes. A esta gran diversidad de microorganismos presentes en plantas los conocemos comúnmente como microbiota vegetal. La creciente conciencia sobre el impacto de las interacciones de la microbiota con la planta ha llevado a estudios masivos enfocados en la microbiota de plantas terrestres saludables y al reconocimiento de la salud vegetal como una característica de origen multifactorial. Cuando los microorganismos colonizan a las plantas terrestres y al estar en una relación estrecha pueden afectar la salud de la planta hospedera de forma benéfica, perjudicial o neutra ó con un sin número de intermediarios (Bai et al. 2015; Lundberg et al. 2013; Peiffer et al. 2013; Sessitsch et al. 2012).

El establecimiento de las comunidades microbianas en interacción con la planta en un principio no parece tener síntomas, y representan una continuidad de relaciones simbióticas que se pueden dividir en tres tipos: 1) parasitismo: asociación que se da cuando un organismo se beneficia a expensas del otro; 2) comensalismo: asociación entre dos organismos donde ningún organismo es perjudicado o beneficiado y 3) mutualismo: tipo de asociación donde se benefician ambos organismos. Una gran parte de los estudios en relación planta-microorganismos se han enfocado en las ventajas que estas asociaciones pueden brindar al hospedero, como la adquisición de nutrientes del suelo para el crecimiento de la planta, la protección indirecta contra patógenos, la tolerancia a diferentes condiciones de estrés como la salinidad de los suelos, condición cada vez más común debido a la sobre explotación de suelos, y a las inundaciones o sequías derivadas del cambio climático. Por lo tanto, la microbiota de la planta emerge como un rasgo novedoso que extiende la capacidad de las plantas para adaptarse al medio ambiente actual siempre en constante cambio (Bai et al. 2015; Bulgarelli et al. 2012; Lundberg et al. 2012).

### 1.3. Estructura de la raíz, rizosfera y rizoplaneo

La raíz de las plantas es uno de los compartimentos con mayor colonización de microorganismos, es la vía principal de entrada de endófitos (organismos que habitan al interior de los tejidos de la planta) y funciona como reservorio de los mismos, los cuales posteriormente se pueden diseminar hacia las partes aéreas de la planta (Chaparro et al. 2014). Estos endófitos provienen en su mayoría del suelo circundante el cual es la fuente primaria del suministro de microorganismos por su abundancia y diversidad de bacterias, archaeas y hongos, se ha reportado que el suelo sin sembrar o el suelo de rizosfera contiene un número de células microbianas de  $\sim 10^6$ – $10^9$  por gramo de suelo (Dardanelli et al. 2011). En general, la endosfera de las raíces muestra menor diversidad de microorganismos comparado con la superficie externa.

La rizosfera es la porción de suelo que está firmemente unida y siempre en contacto con la raíz, y el rizoplaneo corresponde a la superficie externa de la raíz donde se desarrolla la mayor parte de las interacciones microbianas con la planta (Chaparro et al. 2014; Mukerji et al. 2006). Durante este proceso de interacción, las plantas realizan una selección microbiana que permite el ensamble y el funcionamiento de las comunidades microbianas de la rizosfera (**Figura 1**). Sin embargo, este proceso puede ser afectado por diversos factores como la expansión del hábitat, los cambios en las prácticas agrícolas, calidad del sustrato, la arquitectura y los exudados de las raíces (Müller et al. 2016; Wieland et al. 2001).



**Figura 1. Factores bióticos y abióticos que modelan la microbiota en plantas.** Esquema de la relación de los factores intrínsecos y extrínsecos de la planta que modelan la estructura y ensamble de la microbiota. Factores ambientales y ecológicos; biogeografía, agua, temperatura, luz y factores edáficos. Factores intrínsecos de la planta: genotipo del hospedero, sistema inmune, agua y minerales, metabolitos secundarios y rizodepósitos y la competencia e interacciones al nivel del microbioma. Modificado de Müller et al. (2016).

### 1.3.1. Exudados de raíz y rizodepósitos

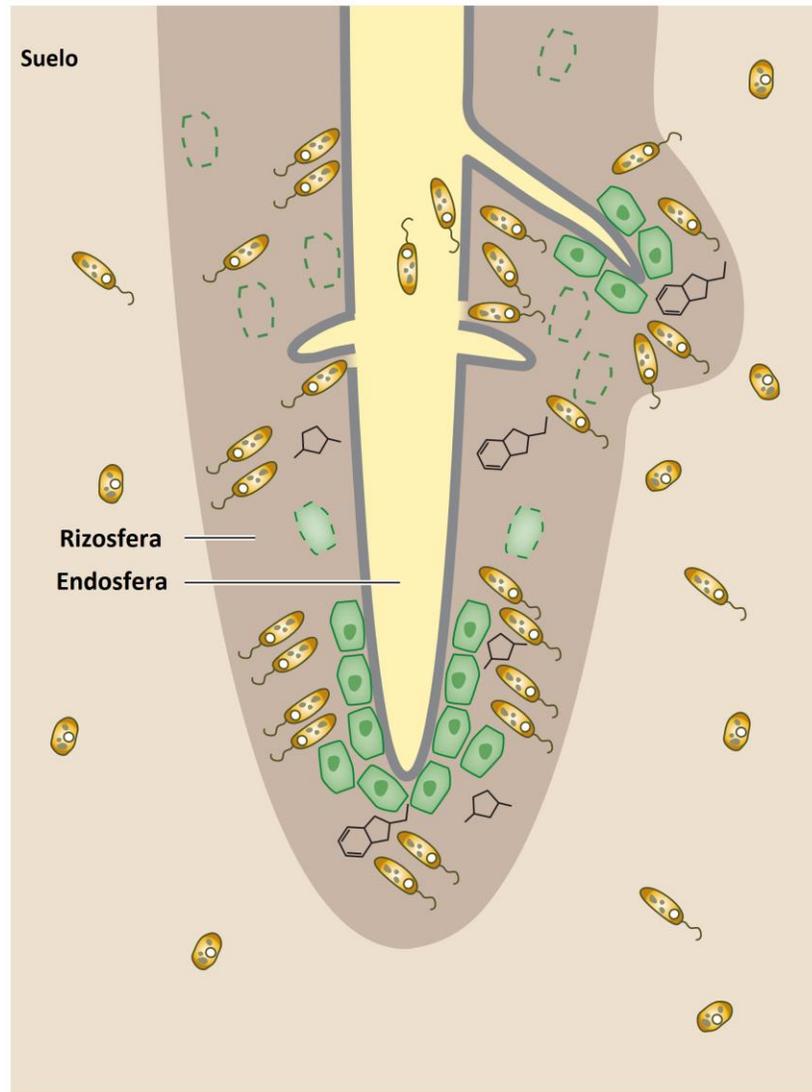
Para entender el papel de los exudados de raíz en la selección de las comunidades microbianas de la rizosfera, Chaparro et al. (2014) evaluaron mediante un análisis meta-transcriptómico la estructura de la comunidad bacteriana de la rizosfera asociada a cuatro etapas del desarrollo de *Arabidopsis thaliana*: plántulas, crecimiento vegetativo, floración prematura y floración. En general, observaron diferencias significativas en la estructura de la comunidad bacteriana en la etapa de plántulas con una significancia de ( $P < 0.05$ ). Los filos Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria y géneros específicos dentro de esos phyla siguieron patrones distintos asociados con el desarrollo de la planta y los exudados de la raíz. Estos resultados sugirieron que la planta puede seleccionar un subconjunto de microbios en diferentes etapas de desarrollo, para funciones específicas en cada etapa del desarrollo de la planta (Chaparro et al. 2014).

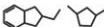
En este mismo contexto Bulgarelli et al. (2012) reportaron que las raíces de *A. thaliana*, cultivadas en suelos de diferentes orígenes, están colonizadas principalmente por tres filos: Proteobacterias, Bacteroidetes y Actinobacterias y cada grupo bacteriano está representado por una clase o familia dominante. Los autores discuten que el tipo de suelo y el genotipo del hospedero define la composición de las comunidades bacterianas que habitan las raíces. Consecuentemente, el tipo de suelo y el genotipo del hospedero define la composición de las comunidades bacterianas que habitan las raíces. La identificación de microorganismos específicos del tipo de suelo dentro de las comunidades microbianas de raíces respalda la conclusión de que estos representan endófitos de raíz derivados del suelo (Bulgarelli et al. 2012; Lundberg et al. 2012).

Li et al. (2018) al analizar seis especies de árboles de abetos (*Picea* spp.) encontraron que un carácter fenotípico de la planta está relacionado con algunos taxones microbianos específicos. Por otro lado, Peiffer et al. (2013) caracterizaron la diversidad bacteriana de la rizosfera de 27 variedades de maíz en cultivo en campo. Ellos encontraron que las plantas cultivan su microbioma ajustando el pH

del suelo, reduciendo la competencia hacia los microbios beneficiosos y proporcionando una fuente de energía, principalmente en forma de rizodepósitos ricos en carbono.

La rizosfera está bajo la influencia de los exudados de la raíz y alberga las comunidades bacterianas que pueden colonizar la endosfera. Por lo tanto, los exudados de la raíz tienen una función importante en la determinación del resultado de las interacciones en la rizosfera y en última instancia, en la dinámica de la comunidad de plantas y suelos (Bertin et al. 2003; Hawes et al. 2000; Mukerji et al. 2000) (**Figura 2**). Por esa razón las raíces segregan grandes cantidades de carbono fijado fotosintéticamente como exudados de la raíz o rizodepósitos que contienen una amplia gama de moléculas como, aminoácidos, iones de ácidos orgánicos, vitaminas, mucílago de polisacáridos. Estos compuestos son liberados en gran medida por una población de células especializadas llamadas células de borde de la raíz (Dennis et al. 2010), las cuales son el producto de la descamación de las células fronterizas del borde de la raíz, son parte del crecimiento y envejecimiento natural de la planta, y son particularmente importantes ya que pueden permanecer vivas y activas después de la descamación de la raíz (Hawes et al. 2000; Ho et al. 2017; Mukerji et al. 2006). Por ejemplo, en maíz las células del borde de raíz pueden permanecer en la rizosfera una semana o más con actividad biológica después de su descamación (Bulgarelli et al. 2016; Vermeer y McCully 1982).



-  Bacteria
-  Células vivas de borde de la raíz
-  Células decadentes del borde de la raíz
-  Compuesto orgánicos liberados por rizodeposición

**Figura 2. Efecto de los rizodepositos en la rizósfera.** Las células de raíz tienen efectos en el suelo circundante donde la raíz libera células de borde de la raíz y compuestos orgánicos volátiles que tienen un efecto quimio atrayente sobre las bacterias de la rizosfera que se concentran en los meristemos de las raíces primaria y secundaria. Modificado de Bulgarelli et al. (2016).

Haney et al. (2015), probaron la premisa de que las plantas tienen la capacidad de cultivar su propia microbiota benéfica específica. Los autores evaluaron diferentes especies silvestres de *A. thaliana* encontrando que las raíces de estas plantas difieren en la habilidad de asociarse con la bacteria *Pseudomonas fluorescens*. *P. fluorescens* se ha reportado como una cepa que confiere beneficios de protección contra estrés biótico y abiótico, además presenta actividad promotora de crecimiento a los miembros de las Brassicaceae. La inoculación con *P. fluorescens* en raíces de *A. thaliana* muestra resultados directos sobre la capacidad de la planta de identificar cepas/variedades y suprimir el crecimiento de otras especies de *Pseudomonas* bajo condiciones gnotobióticas. Estas diferencias bacteria-específica depende de la planta huésped y su capacidad para sustentar el crecimiento de bacterias específicas de *Pseudomonas* presentes en el suelo y la naturaleza del estrés bajo el que se encuentre el hospedero. De esta forma se entiende que las plantas son responsables en cierta medida de cultivar su propio microbioma. Mediante la asociación de miembros específicos de la microbiota a un genotipo específico de una planta.

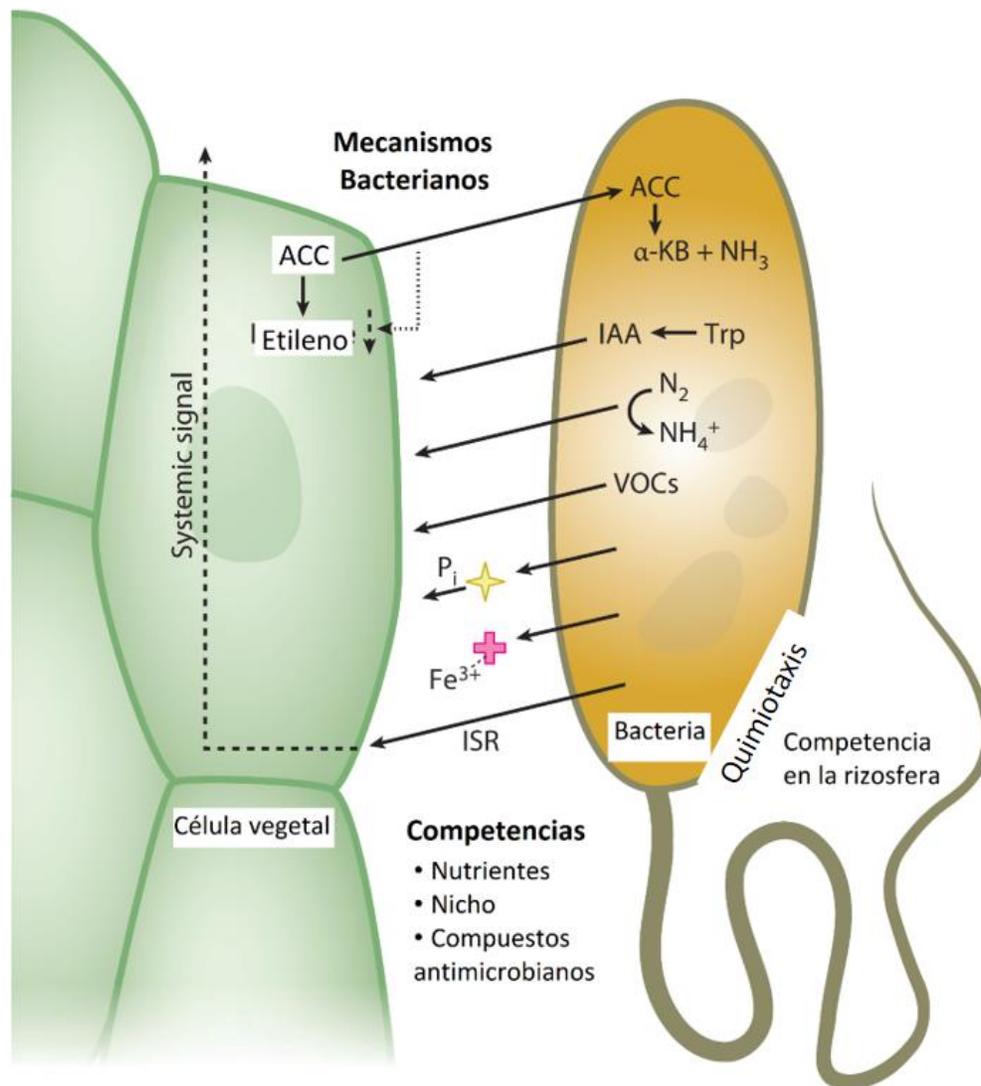
#### **1.4. Suelos y raíces como modeladores de la estructura de la microbiota vegetal**

El suelo es uno de los ecosistemas más ricos del planeta, puede variar en cuanto a composición y diversidad de microorganismos (Haney et al. 2015; Ho et al. 2017; Mukerji et al. 2006; Wieland et al. 2001), pero a pesar de las diferencias que se pueden encontrar en las muestras de suelos de diferentes continentes, se ha encontrado una concordancia entre los perfiles taxonómicos de las comunidades endófitas de raíz de *A. thaliana* de muestras provenientes de 4 tipos de suelo y 2 continentes diferentes (Bulgarelli et al. 2012; Lundberg et al. 2012). Se demostró que aún en distancias continentales de por medio, el ensamble de las comunidades bacterianas en una planta está conservado entre las mismas especies o que existe una gran relación microorganismos especie-específicos.

#### 1.4.1. *Bacterias Promotoras de Crecimiento de Plantas (BPCP)*

Las interacciones planta-microorganismo han sido estudiadas desde hace décadas; sin embargo, es difícil replicar los resultados de las bacterias promotoras de crecimiento de plantas, en parte porque los mecanismos utilizados por las bacterias para colonizar las plantas no han sido entendidos completamente. Además, el sistema donde se desarrollan debe considerar todos los componentes, tanto a la bacteria como a la planta y su entorno. Actualmente, la microbiota funge como una característica adquirida para mejorar la salud o rendimiento de la planta. Donde la planta es la fuerza de selección que actúa sobre el microbioma para reclutar las bacterias benéficas para ella tanto externa (rizosfera) como internamente (endosfera) (Rashid et al. 2012). Los BPCP ofrecen beneficios a la planta huésped particularmente en cuanto a la promoción del crecimiento y la protección contra patógenos (**Figura 3**) mediante mecanismos moleculares que favorecen la absorción de nutrientes, producción de hormonas, entre otros. La planta participa activamente en el reclutamiento de la microbiota benéfica, para contrarrestar ataques de patógenos (Cook et al. 1995).

La capacidad de diversas bacterias para promover el crecimiento de la planta está asociada a mecanismos directos o indirectos, el mecanismo directo esta relacionados con el metabolismo, mediante la adquisición de nutrientes esenciales como nitrógeno (N), fosforo (P) y hierro (Fe), o modulando los niveles de hormonas dentro de la planta huésped. Al modular los niveles hormonales puede implicar que las BPCP sinteticen una o más fitohormonas, auxina, citoquinina y giberelina. Además, algunos BPCP tienen capacidad de disminuir los niveles de la fitohormona etileno al sintetizar una enzima, 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, que escinde el compuesto ACC, el precursor inmediato del etileno en todas las plantas superiores. Por otro lado, los mecanismos indirectos del crecimiento de las plantas ocurren cuando una BPCP disminuye el daño a la planta después de la infección de un fitopatógeno, como pueden ser algunos hongos y bacterias del suelo. Esto generalmente ocurre por la inhibición del patógeno por el BPCP (Rashid et al. 2012; Bulgarelli et al. 2016).



**Figura 3. Mecanismos por los cuales las bacterias pueden promover el crecimiento de las plantas.** a) La actividad de la desaminasa ACC, enzima que disminuye los niveles de etileno en la planta, b) Biosíntesis de IAA, c) fijación de nitrógeno para uso biológico, d) producción de VOCs, e) solubilización de fósforo mediante la secreción de ácidos orgánicos o fosfatasas (representado por la estrella) y f) producción de sideróforos (representado por la cruz). ISR=Resistencia sistémica inducida; α-KB= α-ketobutirato; Pi=fosfato inorgánico; ACC=1-aminociclopropano-1-carboxilato; VOCs=compuestos orgánicos volátiles; IAA= auxina, ácido indol acético; Trp=triptófano. Modificado de Bulgarelli et al. (2016).

La resistencia sistémica inducida (ISR) depende principalmente de la señalización de jasmonato y etileno. De esta manera, las plantas están preparadas para reaccionar más rápida y fuertemente a un ataque de patógenos. Se ha observado ISR para muchos microorganismos y sus determinantes derivados celulares (los MAMP, como flagelos, componentes de la envoltura celular y sideróforos) (Bulgarelli et al. 2013; De Vleeschauwer y Hofte 2009; Zamioudis 2012). A veces, el mecanismo de ISR provocado por BPCP se superpone en parte con el de la resistencia sistémica adquirida (SAR) inducida por patógenos. Tanto el ISR como el SAR representan un estado de persistencia basal mejorada de la planta que depende de los compuestos de señalización ácido jasmónico y ácido salicílico (Van Loon 2007). Los patógenos son sensibles de manera diferente a la resistencia activada por estas vías de señalización. Estas interacciones son muy específicas para cada componente: la planta huésped, el patógeno y la cepa BPCP. Se reconocen mediante señales químicas entre sí: los exudados de las raíces y los metabolitos microbianos pueden tener esta función (Berg 2009). Los microbios inductores de ISR bien caracterizados incluyen varias especies de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, entre otros (Bulgarelli et al. 2013).

#### 1.4.2. *Bacterias endófitas*

Las bacterias pueden habitar tanto en los compartimentos externos como internos de la planta. Los endófitos bacterianos se refieren a aquellas cepas que tienen una parte o todo el ciclo de vida dentro de la planta y se localizan en espacios intra e intercelulares o en el tejido vascular, de forma independiente de si la asociación resulta benéfica o patogénica para el hospedero (Bacon y Hinton 2006). En general, las bacterias endófitas tienen la capacidad de colonizar las estructuras internas, la raíz, tallo, hoja, flor, fruto y semilla (Kumar et al. 2016). Sin embargo, su población puede diferir según la etapa de crecimiento de la planta, el tipo de tejido, la fisiología de la célula vegetal y los nichos que ocupan (Kuklinsky-Sobral et al. 2004).

Los endófitos destacan especialmente por la adición de capacidades que pueden dar a las plantas y sus potenciales usos agrícolas y biotecnológicos. El

uso de endófitos bacterianos en la estimulación de los mecanismos de defensa pueden ser una solución novedosa, rentable y óptima, con el fin de aumentar del rendimiento de los cultivos, y reducir los efectos nocivos del estrés, biótico y abiótico, en el crecimiento y desarrollo de la planta de forma respetuosa con el medio ambiente (Kaymak 2011).

Hay que notar que regularmente las BPCP tienen ventajas sobre las comensales y las parasitarias debido a su mejor adaptación contra el estrés biótico y abiótico sirviendo como una ventaja a la planta y siendo seleccionadas por esta característica (Ding et al. 2011). Por lo general, los mecanismos empleados por las bacterias endófitas para promover el crecimiento de las plantas son análogos a los de las bacterias rizosféricas. Sin embargo, trabajos recientes sobre la rizosfera y las comunidades microbianas endófitas revelaron que las bacterias de la rizosfera son significativamente diferentes de las bacterias endófitas en algunos rasgos. Pini et al. (2011) documentaron que las bacterias endófitas tienen un genoma más grande ( $6.73 \pm 1.26$  Mbp) comparado con las bacterias de la rizosfera ( $4.34 \pm 0.99$  Mbp), pueden colonizar el tejido interno, ej. cortex de raíz o xilema (Abbamondi et al. 2016). La densidad de población de células bacterianas por gramo de tejido de raíz varía de  $10^4$ – $10^8$  para endófitos, de  $10^6$ – $10^9$  para bacterias de suelo (Bulgarelli et al. 2013). La riqueza de la diversidad es menor para microorganismos endófitos comparado con los de rizosfera y los presentes en suelo (Huang 2018; Mendes et al. 2007; Szymańska et al. 2016).

Ali et al. (2014a) realizaron un análisis genómico comparativo para identificar los genes que diferencian a las bacterias endófitas de las bacterias rizosféricas responsables del comportamiento endofítico del género *Burkholderia*, se comparó con nueve endófitos de diferentes géneros (todas Proteobacterias). Encontraron un número significativo de genes que codifican para varias proteínas transportadoras involucradas en el transporte a través de membranas. Permiten a las endófitas bacterianas absorber de manera eficiente los nutrientes sintetizados por la planta que pueden estar presentes dentro de la planta o exudarse a la rizosfera, funcionan principalmente en el intercambio de carbohidratos y aminoácidos. Asimismo, se encontraron genes que codifican para la resistencia a

la nodulación dentro de la superfamilia resistencia-nodulación-división celular (RND) y sistema de eflujo de proteínas asociadas a la membrana las cuales se encontraron en todas de las bacterias endofíticas evaluadas.

Otros genes relacionados son los asociados a los sistemas de secreción. Los sistemas de secreción de tipo I y tipo II están presentes en algunos endófitos bacterianos, mientras que los sistemas de secreción de tipo III y tipo IV están presentes principalmente en bacterias patógenas y ausentes en endófitos. El sistema de secreción de tipo V se considera un autotransportador presente principalmente en endófitos, mientras que los sistemas de secreción de tipo VI usualmente tienen un papel positivo en las interacciones planta-microbio. La presencia de enzimas degradadoras de compuestos O- y S-glucosilados, como glucósido hidrolasas que degradan la pared celular de forma no invasiva, están presentes en endófitos. Además, varios reguladores transcripcionales están presentes incluidos AraC, FrmR, AsnC, LrgB, LysR, DeoR, WrbA. Estos reguladores transcripcionales funcionan de manera diferente en diferentes condiciones. La mayoría de ellos son reguladores globales, mientras que algunos funcionan de una manera más específica. Igualmente identificaron cuatro genes relacionados a sintetasas y reductasas de glucagón asociadas con una respuesta protectora necesaria para sobrevivir al estrés oxidativo del interior de la planta. Estas características bacterianas en conjunto permiten la colonización a los compartimentos internos a los endófitos: el flagelo, genes Nod, mecanismos de detoxificación, pili tipo IV, motilidad (Ali et al. 2014a; Compant et al. 2010).

Los mecanismos de translocación de las bacterias endofíticas dentro de las plantas hospederas involucran tanto mecanismos activos como pasivos, lo que les permite moverse del rizoplasma al córtex del sistema radicular. Knights et al. (2021) mencionaron que, en el mecanismo activo, la bacteria endofítica en el punto de la zona cortical de la raíz secreta varias enzimas degradantes de la pared celular para romper la endodermis, lo que a su vez les permite una mayor colonización dentro de la endosfera radicular. Sin embargo, en el mecanismo pasivo, las bacterias ingresan en el momento de la interrupción de la capa celular endodérmica, principalmente, durante el crecimiento de las raíces secundarias

(Gregory 2006) y durante el tiempo de la invasión de las bacterias fitopatógenas, lo que ayuda a las bacterias endófitas al mismo tiempo para penetrar en el cilindro central y moverse hacia el periciclo y finalmente llegar a los vasos del xilema radicular de sus anfitriones (Compant et al. 2010). Rosenblueth y Martínez-Romero (2006) mencionaron que incluso si algunos endófitos pueden colonizar los tejidos de la raíz interna y continuar su progresión hasta los vasos del xilema de la raíz, la penetración activa de los endófitos resulta en la inducción del sistema de defensa de la planta al secretar una baja cantidad de metabolitos en comparación con fitopatógenos. Por lo tanto, los endófitos pueden apoyar el crecimiento y desarrollo de los cultivos al: 1) mejorar la disponibilidad y accesibilidad de los nutrientes minerales [nitrógeno (N), fósforo (P), zinc (Zn) y hierro (Fe)], 2) sintetizando hormonas de crecimiento (por ejemplo, ácido indol acético, citoquininas y ácidos giberélicos), 3) produciendo 1-aminociclopropano-1-desaminasa de ácido carboxílico (ACC), que actúa como un precursor inmediato de la hormona etileno en todas las plantas superiores (Ali et al. 2014b; Kashyap et al. 2018; Kumar et al. 2016) e 4) induciendo la resistencia sistémica (ISR).

### **1.5. Amaranto como cultivo de alto potencial biotecnológico**

Los esfuerzos para promover el consumo de alimentos de origen vegetal que además ofrezcan beneficios a la salud han incrementado. El amaranto es un cultivo anual, altamente eficiente y de rápido crecimiento, puede crecer hasta 3300 m sobre el nivel del mar y prosperar en condiciones agronómicas adversas (suelos salinos, ácidos o alcalinos; sequía; altas temperaturas), adaptándose fácilmente a diferentes ambientes (Corke et al. 2016) Los amarantos pertenecen al género *Amaranthus* dentro de la familia Amaranaceae, el género *Amaranthus* incluye cerca de 70 especies de las cuales 40 son nativas de América y el resto se han encontrado en Australia, África, Asia y Europa. Dentro de este género se encuentran tres especies empleadas para la producción de semillas: *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* que son nativas de México y *A. caudatus* que es nativa de Centro y Sur América (NAS 1984; Espitia-Rangel et al. 2010). El

amaranto es considerado como un pseudocereal tradicionalmente cultivado en América, produce semillas de alto valor nutricional y nutracéutico. Con un contenido de proteína de alrededor del 16%, que es mayor que el trigo (12–14%), arroz (7–10%), maíz (9–10%) y otros cereales de consumo regular (Aguilar et al. 2015; Venskutonis y Kraujalis 2013).

Las proteínas de semilla de amaranto son excepcionales en cuanto a su calidad debido a su alto contenido de amino ácidos esenciales como lisina, metionina, triptofano, entre otros, por lo que se considera un excelente suplemento nutricional para los cereales convencionales que son pobres en este aminoácido (Bressani 1994; Correa et al. 1986). Los valores de aminoácidos de las diferentes variedades excedieron los requisitos establecidos por la World Health Organization (WHO) /Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/ United Nations University (UNU). Estos datos sugieren que las variedades de harinas de amaranto pueden ser adecuadas para el consumo humano y como fuentes de proteínas complementarias. Dado que las semillas de amaranto no contienen gluten, también se consideran una fuente importante de alimentos para la población afectada por la enfermedad celíaca (Ballabio et al. 2011). La semilla también contiene ácidos grasos insaturados y es una de las fuentes vegetales más ricas en escualeno, tocoferoles, compuestos fenólicos y vitaminas (Venskutonis y Kraujalis 2013). También es una fuente importante de fibra (Pavlík 2012).

Además, las proteínas de semillas de amaranto contienen diversos péptidos encriptados con diferentes actividades biológicas como actividad antihipertensiva (Barba de la Rosa et al. 2010), antidiabética (Velarde-Salcedo et al. 2013), antibogénica (Velarde-Salcedo et al. 2012) y péptidos con función cancer-preventivo (Maldonado-Cervantes et al. 2010).

Existen especies como *A. hybridus* y *A. tricolor* que tradicionalmente se emplean para consumo como vegetal (Corke et al. 2016) Las hojas de amaranto tienen un valor energético significativo que oscila entre 27 y 53 kcal / 100 g de hojas frescas y un alto valor nutricional, en particular 4-6 g de proteína, 0.2-0.6 g de grasa y 4-7 g de carbohidratos. Son una buena fuente de vitaminas y minerales, contienen tres veces más vitamina A, calcio y niacina (vitamina B) que

las espinacas y 18 veces más vitamina A, 13 veces más vitamina C, 20 veces más calcio y siete veces más hierro que la lechuga .

#### 1.5.1. *Amaranto en estrés salino*

El amaranto se ha considerado como un cultivo tolerante al estrés con alto potencial para la producción sostenible de alimentos. Por lo tanto, conocer los mecanismos de tolerancia al estrés del amaranto proporcionará un aporte valioso para mejorar la tolerancia al estrés de otras plantas de cultivo (Huerta-Ocampo et al. 2014).

Los niveles elevados de iones de sal en la solución del suelo que rodea las raíces de las plantas inducen un desequilibrio en el potencial hídrico entre las células de las raíces de las plantas y la solución del suelo ambiental, lo que da como resultado la deshidratación celular. Además, los niveles elevados de sales producen una penetración pasiva de iones de sal a través de la membrana plasmática y a una acumulación de iones de sal en el citoplasma celular que puede conducir a la inhibición de la actividad enzimática intracelular. Lo que lleva a una disminución del crecimiento de las plantas, disminución de la tasa fotosintética y homeostasis iónica. La acumulación excesiva de sal dificulta el crecimiento de los cultivos, la movilización de nutrientes y hace que las plantas sean más susceptibles a las enfermedades transmitidas por el suelo. Los compuestos tóxicos principales que obstruyen el metabolismo de las plantas bajo alta salinidad son las especies reactivas de oxígeno (ROS).

Para contrarrestar los efectos negativos del estrés salino, la planta estimula diferentes tipos de mecanismos de autoprotección para proteger las células del daño oxidativo. Varios mecanismos defensivos operados por las plantas para minimizar el nivel de estrés incluyen, 1) regulación positiva de la maquinaria antioxidante, 2) producción de osmolitos compatibles y 3) compartimentación de iones letales y tóxicos en tejidos que son menos sensibles (Ghorbanpour et al. 2013; Alqarawi et al. 2014). En el sistema antioxidante, los componentes enzimáticos (Ej., catalasa, glutatión reductasa peroxidasa y superóxido dismutasa) o no enzimáticos (Ej., tocoferol, glutatión, ácido ascórbico y metabolitos

secundarios) actúan en coordinación para proteger a las células contra el daño oxidativo causado por ROS (Vardharajula et al. 2011; Abd Allah et al. 2015). Existen varias opciones químicas y físicas para recuperar las tierras cultivables afectadas con sales, entre ellas destaca el uso de endófitos bacterianos para estimular los mecanismos de defensa los que pueden ser una solución más ecológica y rentable para reducir el efecto nocivo de la salinidad en el crecimiento y el rendimiento de los cultivos.

#### 1.5.2. *Amaranto y microbiota*

Existen algunos trabajos previos en los que se aborda la diversidad de bacterias en la rizosfera de raíces de amaranto, pero ninguno abordado desde la problemática de estrés salino. Moreno-Espíndola et al. (2013) se enfocaron en la comunidad bacteriana cultivable asociada a la rizocoraza de *Amaranthus hypochondriacus* L. en suelos arenosos del valle de México. Se enfocaron en los cambios fenotípicos de la comunidad bacteriana en función de los caracteres fisiológicos y bioquímicos, y su contribución al enriquecimiento nutricional. Obtuvieron aislados bacterianos (mediante técnicas convencionales de microbiología) procedentes de la rizocoraza del amaranto, se caracterizaron 38 aislados bacterianos mediante microscopia, pruebas morfológicas y fisiológicas, actividad enzimática, que clasificaron dentro de las familias Bacillaceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae y Streptomyetaceae. Sin embargo, no se usó un enfoque molecular para la identificación de los aislados bacterianos.

Moreno-Espíndola et al. (2018), evaluaron la actividad microbiana en la rizosfera de *A. hypochondriacus* L. en cuatro etapas del desarrollo y se identificaron 37 aislados bacterianos cultivables procedentes de suelo de rizocoraza identificados molecularmente. Moreno-Espíndola et al. (2013) reportaron una comunidad bacteriana cultivable asociada a la rizocoraza de *A. hypochondriacus*. Estos investigadores encontraron los cambios fenotípicos de la comunidad bacteriana en función de los caracteres fisiológicos y bioquímicos, y su contribución al enriquecimiento nutricional, en la rizocoraza de amaranto cultivado en un suelo arenoso del Valle de México.

Parra-Cota et al. (2014) evaluaron el uso de 5 rizobacterias diferentes, buscando promover el crecimiento y rendimiento de dos cultivares comercialmente importantes de semillas de amaranto *Amaranthus hypochondriacus* cv. Nutrisol y *A. cruentus* cv. Candil. Las plantas fueron crecidas en sustrato rico en condiciones de invernadero. Las cepas más eficientes fueron *Burkholderia ambifaria* Mex-5 y *B. caribensis* XV, que promovieron significativamente el crecimiento en ambas especies de amaranto, incrementaron el rendimiento de semillas y el índice de cosecha en combinación con fertilización química en *A. cruentus*. La promoción del crecimiento y mejoramiento del rendimiento correlacionó con el incremento de contenido de N en todos los tejidos examinados. También se vieron efectos positivos en el crecimiento en plantas de *A. cruentus* crecidas en suelos pobres, aun antes de la fertilización con fosfatos y nitrógeno. no hubo correlación entre los niveles no estructurales de carbohidratos en raíces de plantas inoculadas en las cuales se observó promoción del crecimiento. Se concluyó que las cepas de *Burkholderia* promueven efectivamente el crecimiento e incrementan el rendimiento de semillas en semillas de amaranto.

Oyeyiola et al. (2010) aislaron e identificaron las bacterias presentes en la zona de la raíz de *Amaranthus hybridus* en suelo franco arenoso experimental. Las bacterias fueron identificadas como *Bacillus subtilis*, *Aerococcus viridans*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Agrobacterium radiobacter*, *Flavobacterium ferrugineum*, *Flavobacterium lutescens*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus varians*, *Citrobacter freundii*, *Pediococcus pentosaceus* y *Staphylococcus saprophyticus*. Las bacterias más predominantes en el suelo de la rizosfera fue *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium*. Las bacterias más predominantes en el rizoplano fueron *Flavobacterium ferrugineum*, *Flavobacterium lutescens*, y *Bacillus subtilis*. Las bacterias más abundantes en el suelo no rizosférico fueron *Staphylococcus saprophyticus* y *Bacillus subtilis*. En este trabajo se observó un aumento progresivo en el efecto de rizosfera con el incremento de la edad de la planta hasta llegar a la décima semana, posterior a la siembra de las semillas y subsecuentemente ocurrió un decline hasta la catorceava semana.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La salinidad de los suelos es uno de los problemas ambientales más severos y que está en constante crecimiento afectando a cientos de hectáreas de tierras cultivables en todo el mundo; por lo tanto, se necesita encontrar soluciones para reducir los efectos negativos del estrés en plantas. Se ha indicado que el uso de bacterias promotores del crecimiento en plantas (BPCP) es una alternativa para incrementar la productividad de los cultivos en una forma más rentable y respetuosa con el medio ambiente, por lo que es importante identificar nuevas cepas endófitas bacterianas en especial de plantas que muestran resistencia a diferentes tipos de estreses ambientales, como es el caso del amaranto. Las plantas de amaranto son resistentes a diversas condiciones adversas, incluyendo altas concentración de sales; sin embargo, no existen estudios del metagenoma de estas plantas, en este sentido es de gran interés llevar a cabo los estudios de caracterización de la microbiota de la planta de amaranto.

### 3. OBJETIVO GENERAL

Aislar las bacterias endófitas cultivables de raíces y caracterizar la microbiota rizosférica de amaranto presente en plantas crecidas en condiciones normales de riego y en plantas sometidas a estrés salino.

#### 3.1. Objetivos específicos

- a) Obtener tejidos (rizosfera, raíces, tallos, hojas) de plantas de *Amaranthus cruentus* crecidas en condiciones control y plantas sometidas a estrés salino.
- b) Medir los cambios de acumulación de almidón, azúcares solubles totales y prolina en los tejidos colectados.
- c) Aislar e identificar por medios de cultivo microbiológicos las bacterias cultivables de raíces de plantas de *A. cruentus* crecidas en condiciones control y de plantas sometidas a estrés salino.
- d) Extraer el ADN bacteriano de la rizosfera e identificar su composición bacteriana mediante secuenciación del gen *ARNr 16S*.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Material vegetal, condiciones de crecimiento y tratamiento de estrés salino

Las semillas de amaranto (*Amaranthus cruentus* L.) fueron germinadas en una mezcla de suelo que contenía una proporción 1:1 de suelo de campo y sustrato comercial estándar (LM-1 Germination Mix; Lambert, Quebec, Canadá). El suelo de campo se obtuvo de suelos de cultivos de amaranto en Villa Juárez, San Luis Potosí, México (latitud 22° 21'26.33" N y longitud 100° 15'36.22" O). Después de la germinación durante 10 días a 28 °C con un fotoperiodo de luz de 12 h, las plántulas se trasplantaron a macetas de 2 L y se colocaron en invernadero con luz natural con una tasa de riego de 200 mL de agua cada 24 h. Los tratamientos de salinidad comenzaron a los 30 días después de la siembra y se mantuvieron durante 15 días. El tratamiento se inició con una concentración de 100 mM NaCl hasta alcanzar la concentración final de 500 mM NaCl, incrementando cada 48 h. El agua de grifo se utilizó para regar las plantas control y para las preparaciones de las diferentes concentraciones de NaCl.

### 4.2. Cuantificación de almidón, azúcares solubles totales y prolina

Se colectaron tejidos, raíces, tallos y hojas de plantas crecidas en condiciones control y sometidas a estrés salino. Los tejidos fueron secados por liofilización y pulverizados. Las muestras (30 mg) se les agregó 1 mL de etanol al 80% (v/v), mezclados e incubados por 15 min a 80 °C. Las muestras fueron centrifugadas a 5000 x g por 10 min. El precipitado fue lavado en forma secuencial con 0.5 ml de etanol al 50%, 20% y agua desionizada. Los sobrenadantes de cada lavado fueron mezclados, secados en un speed-vac y resuspendidos en agua (fracción soluble). Los precipitados fueron hidrolizados con 5 ml de una solución acuosa de HCl al

1% por 30 min a 100 °C y diluidos a 10 mL con agua desionizada (fracción insoluble).

Los azúcares totales solubles (fracción soluble) y almidón (fracción insoluble) fueron cuantificados por el método de antrona-ácido sulfúrico en formato de microplaca (Leyva et al., 2008). Los extractos (50 µL) se mezclaron con 250 µL de reactivo de antrona (0.15%) en 73% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Las muestras se incubaron por 10 min a 4 °C y calentadas a 100 °C por 15 min, luego las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente. El desarrollo de color fue medido en un espectrofotómetro a 620 nm. La curva de calibración fue preparada con concentraciones de glucosa de 10 a 100 µg/mL.

La cuantificación de prolina se realizó en la fracción soluble mediante el método de ninhidrina (Carrillo et al. 2011). Los extractos (50 µL) se mezclaron con 100 µL de solución de ninhidrina al 1% (ácido acético:agua, 60:40). La mezcla se incubó a 95 °C por 20 min, luego se enfrió a temperatura ambiente y el color desarrollado fue medido en espectrofotómetro a 520 nm. Se realizó una curva de calibración de 0 a 1 mM de prolina.

#### **4.3. Aislamiento de microorganismos de la endorizosfera y rizosfera**

Las raíces se sacaron cuidadosamente del suelo y se liberaron del exceso de tierra. Las muestras de raíces (3 g) de plantas individuales se transfirieron a un tubo estéril con 40 mL de tampón R (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, Triton X-100 al 0.1%) posteriormente se sometieron a ultrasonido durante 10 min en un baño ultrasónico para eliminar los microorganismos adheridos. Las muestras de rizosfera se obtuvieron de la centrifugación (1.935 × g durante 15 min a 4 ° C) del tampón R.

Para la obtención de las muestras de la endosfera radicular, las raíces se esterilizaron en superficie mediante lavados continuos (solución de etanol al 70%, hipoclorito de sodio al 1% y buffer de fosfato salino estéril PBS, pH 7.4), se cortaron en trozos y se trituraron en un mortero con PBS. El PBS de lavado final se inoculó en medio nutritivo como control negativo de la presencia de bacterias rizosféricas.

#### 4.4. Aislamiento e identificación de bacterias cultivables endófitas de raíz

##### 4.4.1. *Bacterias diazotróficas*

Para el aislamiento de bacterias las muestras fueron diluidas serialmente ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ) antes de plaquear en agar Jensen's libre de nitrógeno (20 g/L sacarosa, 1.0 g/L  $K_2HPO_4$ ; 0.5 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0.5 g/L NaCl; 0.1 g/L  $FeSO_4$ ; 50 mg/L  $Na_2MoO_4$ ; 2.0 g/L  $CaCO_3$ ; 15 g/L agar, a pH=7.0). posteriormente se incubó a 30 °C por 7 días, se purificaron las colonias visibles relacionadas con bacterias fijadoras de nitrógeno. Sucesivamente fueron codificadas como (RJC= Root-Jensen-Control y RJS= Root-Jensen-Stress) y transferidas a medio LB para su resguardo a -20 °C en glicerol 30%. Los cultivos bacterianos purificados (20  $\mu$ L) se cultivaron en medio LB y se sembraron en agar Chromo Azurol S (CAS) y Pikovskaya.

##### 4.4.2. *Bacterias solubilizadoras de hierro*

Para la caracterización de microorganismos solubilizadores de hierro, mediante producción de sideróforos se usó agar-CAS. El medio fue preparado usando una solución indicadora y agar-LB. La solución indicadora fue preparada mezclando 10mL solución de  $Fe^{+3}$  (1 mM  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  en 10 mM HCl) con 50 mL de solución CAS (1.21 mg/mL). La solución obtenida color morado se agregó lentamente a un vaso de precipitado con 40 mL de solución HDTMA (1.82 mg/mL) agitando constantemente. Por otra parte, se prepararon 900mL de agar LB (1/2) (7.5 g/L peptona; 2.5 g/L NaCl; 2.5 g/L extracto de levadura, 15 g/L agar; pH 6.7). Ambas soluciones fueron esterilizadas y mezcladas a 50 °C y plaqueadas en cajas Petri. Los microorganismos previamente inoculados en este medio que muestren un cambio de color de azul a amarillo fueron los considerados como solubilizadores de Fe.

##### 4.4.3. *Bacterias solubilizadoras de fosfatos*

Se usó agar Pikovskaya para la identificación de microorganismos solubilizadores de fosfatos, el medio fue preparado con 10 g/L glucosa; 0.5 g/L extracto de levadura; 5.0 g/L  $Ca_3(PO_4)_2$ ; 0.5 g/L  $(NH_4)_2SO_4$ ; 0.2 g/L NaCl, 0.1 g/L

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0.1 g/L KCl; 1 mg/L MnSO<sub>4</sub>; 1 mg/L FeSO<sub>4</sub>; agar 15 g/L, pH 7.0. Los microorganismos que mostraron un halo despejado alrededor de las colonias fueron considerados como solubilizadores de fosfatos.

#### 4.4.4. *Identificación de microorganismos aislados por marcado molecular del gen ARNr 16S*

Los microorganismos aislados fueron identificados usando el marcado molecular del gen ribosomal *ARNr 16S*. Los genes se amplificaron por PCR utilizando el par de cebadores universales 27 y 1492 (Eida et al. 2019). La mezcla de reacción (20 µL) contenía 100 ng de ADN genómico, 1x buffer de PCR, 0,2 µM de cebadores y 1 µM de ADN polimerasa Phusion High-Fidelity (Thermo Fisher Scientific). La PCR se realizó en un termociclador (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad) usando los siguientes parámetros de reacción: una desnaturalización inicial a 98 °C durante 3 min, y 34 ciclos de, desnaturalización a 98 °C durante 30 s, una hibridación a 57 °C durante 45 s, una extensión a 72 °C durante 1,5 min y una incubación final a 72 °C durante 10 min. El fragmento de *ARNr 16S* amplificado se separó mediante electroforesis en gel de agarosa (0,8% p/v), se cortó una sola banda del gel, se purificó y se disolvió en 30 µl de agua para la secuenciación.

#### 4.5. **Extracción de ADN metagenómico**

Las extracciones de ADN se hicieron conforme al protocolo de Coleman- Derr et al. (2016) para muestras de endosfera de raíz, se cortaron y se molieron 300 mg de cada muestra congelada en nitrógeno líquido en con un mortero estéril hasta obtener un polvo y luego se prepararon siguiendo un protocolo de extracción de ADN genómico (ADNg) de CTAB. En resumen, al tejido molido congelado se añadió 1 ml de tampón CTAB (Tris 100 mM pH 8, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, PVP 40 al 2%, bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 2%, beta-mercaptoetanol al 0,2%) y se incubó a 65 °C durante 1 h. Las muestras se centrifugaron a 10,000 g durante 10 min a 4 °C y al sobrenadante se añadió a 1 ml de cloroformo / alcohol isoamílico (24: 1), se centrifugó y el ADNg se precipitó con isopropanol y posteriormente se hizo un lavado con Etanol frio al 70%. Las extracciones de la

rizosfera se realizaron usando DNeasy PowerSoil DNA kit (Qiagen, Hilden, Germany). La cuantificación de ADNg se evaluó mediante espectrofotometría, usando Nanodrop 8000 Thermofisher Scientific y la integridad se verificó mediante un gel de electroforesis de agarosa 1%.

#### **4.6. Secuenciación del metagenoma y análisis bioinformático.**

La secuenciación del ADN se llevará a cabo mediante ensayos paired-end tags (2 × 250) utilizando la plataforma Illumina Miseq en el laboratorio de Integrated Microbiome Resource (IMR) en la universidad de Dalhousie, Canada. Las bibliotecas microbianas se construyeron amplificando la región variable V6-V8 del gen ribosomal ARNr 16S usando los primers B969F (ACGCGHNRAACCTTACC) y BA1406R (ACGGGCRGTGWGTRCAA) (Comeau et al. 2011). Las secuencias obtenidas se ensamblaron y se filtraron por calidad usando UPARSE (Edgar 2013). Una longitud de secuencia mínima de 245 pb y un Score Phred de 20 se tomaron en cuenta como criterio de calidad. La agrupación en unidades taxonómicas operativas (OTU) se realizaron con un umbral de divergencia del 3%. El control de quimeras se realizó utilizando UPARSE. Los OTU representativos se asignaron taxonómicamente usando la base de datos de Ribosomal Database Project (RDP) (Lan et al. 2012).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

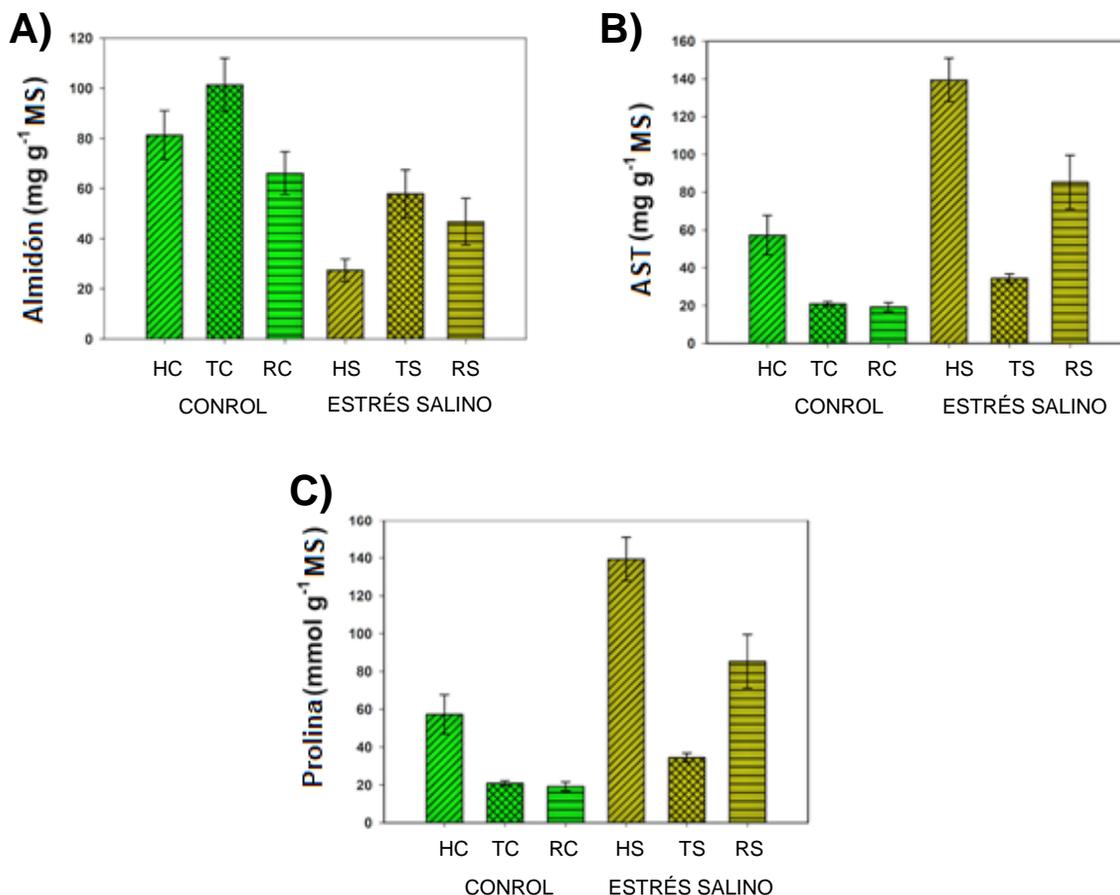
### 5.1. Cuantificación de almidón, azúcares solubles totales y prolina

La concentración de almidón acumulado en los tejidos control (**Figura 4A**), muestra que el tallo presentó la mayor concentración en peso seco (110 mg/g), seguido por las hojas y las raíces. En relación a las plantas sometidas a estrés salino se observó una disminución de casi el 50% de almidón con respecto al control. En forma contraria, la concentración de azúcares solubles totales (AST) fueron poco acumulados en los tejidos en condiciones control (**Figura 4B**), pero en condiciones de estrés incrementaron considerablemente. Las mayores concentraciones de AST se detectaron en las hojas con valores de 60 mg/g y 140 mg/g en condiciones control y condiciones de estrés, respectivamente. En los tallos los cambios en azúcares fueron de 20 a 30 mg/g, y en raíces se observó un incremento del triple respecto al control (20 a 90 mg/mg).

Similar a los resultados encontrados por Amirjani (2011), quien reportó que en plantas de arroz sometidas a estrés salino (200 mM NaCl) hay una correlación entre los niveles de azúcares en los brotes de plántulas y el tratamiento de estrés salino. Este grupo también reportó que las hojas nuevas muestran un incremento en el nivel de azúcares solubles, mientras que en raíces se observa una disminución en los niveles de almidón. Además, correlaciona los niveles de azúcares libres con el contenido total de clorofila a y el  $\phi$ FSII ( $\phi$ Fotosistema II). Así mismo reportó que el contenido total de azúcares reductores y no reductores disminuye en raíces.

Los niveles de prolina fueron cuantificados, para conocer el estado de estrés de las plantas. La concentración de prolina (**Figura 4C**), fue mayor en hojas que en tallos y raíces en condiciones control. Estos valores se ven incrementados en hojas (de 60 a 120 mmol/g) y raíces (de 20 a 60 mmol/g) y concuerdan con reportes que indican que el contenido libre de prolina en raíces de amaranto expuestas a estrés salino se triplica (Huerta-Ocampo et al. 2014). La acumulación de prolina libre es una respuesta común al estrés abiótico; varios estudios

sugieren que la prolina está involucrada en el ajuste osmótico entre el citoplasma y la vacuola. También se ha reportado que la prolina puede actuar como un agente protector para las enzimas, como un eliminador de radicales libres o como un compuesto de almacenamiento de carbono y nitrógeno para permitir la recuperación del estrés (Aghaei et al. 2008; Huerta-Ocampo et al. 2014).



**Figura 4. (A) cuantificación de almidón, (B) azúcares solubles totales y (C) prolina; en tejidos de plantas de *Amaranthus cruentus* de plantas control y plantas sometidas a estrés salino. Color verde control; amarillo estrés**

## 5.2. Aislamiento e identificación de bacterias cultivables de endófitos de raíces de amaranto

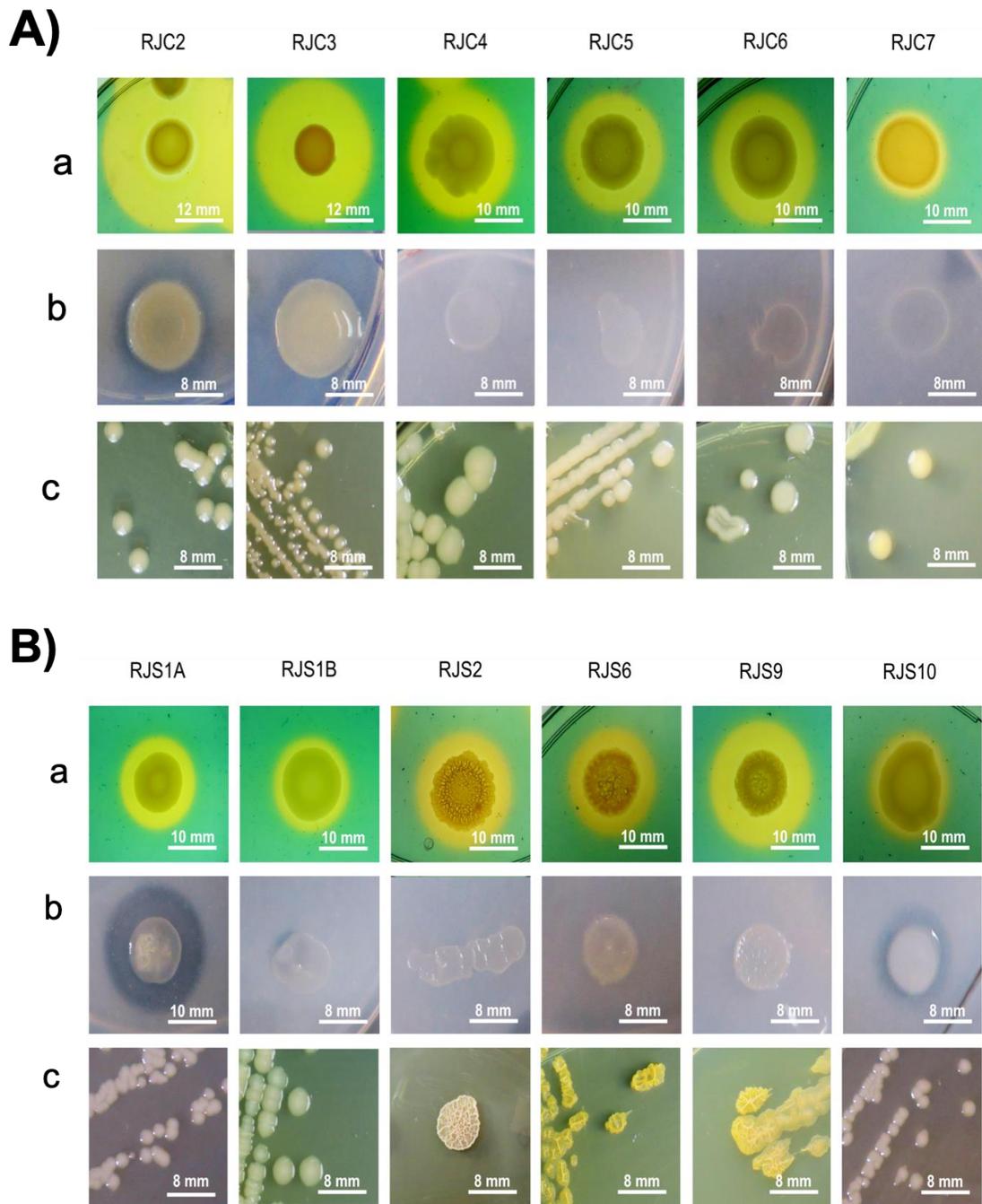
Se aislaron un total de 18 colonias bacterianas con capacidad para fijar N<sub>2</sub>; debido a su crecimiento en el medio agar Jensen's libre de nitrógeno; de las cuales 8 fueron aisladas de raíces de amaranto de plantas control y 10 de raíces en estrés

salino (**Tabla 1**). Doce de estos microorganismos se identificaron como solubilizadores de hierro debido a la presencia del halo amarillo en las placas de agar-CAS que indica la producción de sideróforos; 6 de estos microorganismos fueron aislados de plantas control (**Figura 5Aa**) y 6 de las plantas sometidas a estrés salino (**Figura 5Ba**). También se identificaron 4 cepas con capacidad de solubilizar fosfatos debido a la formación de un halo despejado en el agar Pikovskaya; dos de estas cepas se identificaron en las plantas control (**Figura 5Ab**) y 2 en las plantas en condiciones de estrés salino (**Figura 5Bb**).

**Tabla 1.** Identificación de aislados de bacterias endofíticas cultivables mediante secuenciación del gen *ADNr 16S*

Cepas bacterianas	Parientes cercanos basados en <i>ADNr 16S</i> (% ID)	Fijadoras de N <sub>2</sub>	Solubilizadoras de	
			hierro	fosfatos
<b>Plantas Control</b>				
RJC2	<i>Pseudomonas knackmussii</i> (99)	+	+	+
RJC3	<i>Pseudomonas knackmussii</i> (99)	+	+	+
RJC4	<i>Pseudomonas putida</i> (99)	+	+	-
RJC5	<i>Pseudomonas putida</i> (99)	+	+	-
RJC6	<i>Pseudomonas putida</i> (99)	+	+	-
RJC7	<i>Variovorax guangxiensis</i> (99)	+	+	-
<b>Plantas estrés</b>				
RJS1A	<i>Kosakonia sacchari</i> (97)	+	+	+
RJS1B	<i>Pseudomonas guariconensis</i> (95)	+	+	-
RJS2	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (98)	+	+	-
RJS6	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (95)	+	+	-
RJS9	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (100)	+	+	-
RJS10	<i>Enterobacter bugandensis</i> (99)	+	+	+

R=raíz, J=Medio Jensen's; C=plantas control; S=plantas estrés salino. Los números entre paréntesis indican el porcentaje de identidad de las secuencias.



**Figura 5. Bacterias diazotróficas aisladas en raíces de plantas de *Amaranthus cruentus*:** A) en condiciones control y B) en condiciones de estrés salino. a, bacterias productoras de sideróforos, todas positivas para producción de sideróforos; b, bacterias solubilizadoras de fosfatos, RJC2 y RJC3 (+) para solubilización de fosfatos. c, morfología de la colonia en medio LB.

Mediante secuenciación del gen *ARNr 16S* se identificó que la mayoría de los aislados bacterianos, que pertenecen a la clase Gammaproteobacteria (**Tabla 1**), que corresponden principalmente al género *Pseudomonas*. En las plantas control fueron caracterizadas por la presencia de *Pseudomonas putida* y las plantas sometidas a estrés salino por *Pseudomonas stutzeri*, ambas con la habilidad de quelar hierro. (**Tabla 1**). En plantas control, se identificó a *Pseudomonas knackmussii* como bacteria con actividad fijadora de N<sub>2</sub>, productora de sideróforos y solubilizadora de fosfatos, mientras que en plantas de estrés salino se identificaron las bacterias *Kosakonia sacchari* y *Enterobacter bugandensis* con estas tres propiedades. Solamente un aislado bacteriano perteneciente a la clase Betaproteobacterias se obtuvo de raíces de plantas control (**Tabla 1**).

Se ha reportado que bacterias pertenecientes a diversos géneros incluyendo *Enterobacter*, *Pseudomonas*, pueden mejorar las condiciones de las plantas hospederas bajo condiciones de estrés abiótico (Grover et al. 2011; Nadeem et al. 2016). Al inocular la rizosfera de plantas de *Zea mays* con *Pseudomonas stutzeri* se incrementaron los números de diazótrofos y oxidantes de amonio (Metha et al. 2021; Ke et al. (2019). Las cepas *Kosakonia sacchari*, *P. guariconensis*, *P. stutzeri*, y *Enterobacter bugandensis* solo se encontraron en raíces de plantas que crecen bajo tratamiento con sal. Estos resultados concuerdan con previos análisis metagenómicos de raíces de *Medicago truncatula* donde se encontraron *Enterobacter* y *Pseudomonas* (incluyendo *P. stutzeri*) en raíces cultivadas bajo condiciones de estrés salino (Yaish et al. 2016).

#### 5.2.1. Bacterias aisladas en raíces de plantas de *Amaranthus cruentus* crecidas en condiciones control

*Pseudomonas knackmussii*, pertenece al filo Proteobacteria; la clase Gammaproteobacteria; al orden Pseudomonadales; familia Pseudomonadaceae y género *Pseudomonas*. *P. knackmussii* es una bacteria gramnegativa, polarmente flagelada, móvil y de bacillo corta aislada de una planta de tratamiento de aguas

residuales en Gotinga, Alemania. Es la primera bacteria utilizada para estudiar la degradación de compuestos haloaromáticos (Stolz et al. 2007).

*P. putida* es una especie ampliamente estudiada por sus propiedades metabólicas, puede ser usada como sistema modelo para procesos biotecnológicos en la agricultura. Ha sido propuesta como herramienta para biorremediación en la remoción de contaminantes de suelos, vía rizoremediación, igualmente es una RPCP (Rizobacterias Promotora del Crecimiento de Plantas) que establece relaciones comensales con plantas pues favorece la movilización de nutrientes, previene la colonización y el desarrollo de patógenos y es un eficiente colonizador de nicho (Molina et al. 2020).

*Variovorax guangxiensis*, es una bacteria productora de ACC desaminasa, ha sido aislada de la rizosfera de cultivos de bananas en la provincia Guangxi de China (Gao et al. 2015). Se clasifica en el filo Proteobacteria; clase Betaproteobacteria; orden Burkholderiales; familia Comamonadaceae; y género *Variovorax*.

#### 5.2.2. Bacterias aisladas en raíces de plantas de *Amaranthus cruentus* en condiciones de estrés salino

La especie *Kosakonia sacchari* pertenece al filo Proteobacteria; clase Gammaproteobacteria; orden Enterobacterales; familia Enterobacteriaceae y género *Kosakonia*. La especie se clasificó originalmente dentro del género *Enterobacter*, posteriormente se reclasificó en el género actual, *Kosakonia*. *K. sacchari* es una bacteria fijadora de nitrógeno llamada así por su asociación con la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) promoviendo su crecimiento. Las bacterias *K. sacchari* son bacilos móviles gramnegativos, aeróbicos, que no forman esporas (Chen et al. 2014).

Se reportó una cepa de *P. guariconensis* mungfali encontrada En cultivos de *Arachis hypogaea* L, que sufre la enfermedad de la pudrición de collar causada por *A. niger*, fue aislada una cepa de *P. guariconensis* que es capaz de controlar la enfermedad mediante la producción de fitohormonas y solubilizando N, P, K y

Zn. En raíces de amaranto sometidas a estrés salino aislamos una cepa de *P. guariconensis*.

*Pseudomonas stutzeri*, perteneciente al grupo de las *Pseudomonas* no fluorescentes, bacterias gramnegativas, móviles por un solo flagelo. Son organismos no fermentadores, oxidasa positivos, aeróbicos. Por lo general, se encuentran en el suelo y rara vez causan enfermedades intrahospitalarias. Muestran una amplia gama de heterogeneidad fenotípica y genotípica y se observan un total de dieciocho genomovares dentro de la especie. *P. stutzeri* JM300 aislado del suelo mostró características desnitrificantes que también se utilizan como modelo para la transformación natural (Busquets et al. 2012). Muchos investigadores identificaron la producción de IAA, sideróforos y HCN y la solubilización de fosfato en *P. stutzeri*. Se encontró que *P. stutzeri* A1501, una bacteria fijadora de N<sub>2</sub>, mejora la producción de arroz (Pandey et al. 2013; VeenaKumari et al. 2020). Estas bacterias mejoran el crecimiento de las plantas debido a las fitohormonas producidas. El número de pelos radicales y raíces laterales tiende a aumentar cuando se inocula con RPCP y conduce a una mejor absorción de los minerales que están presentes en el suelo (VeenaKumari et al. 2020).

*Enterobacter bugandensis*, es un miembro de la familia Enterobacteriaceae dentro de la clase Gammaproteobacteria y el filo Proteobacteria. Se encuentra ampliamente disperso en diversos nichos ecológicos como el agua, el suelo y las plantas, así como en el tracto alimentario de los seres humanos. Varias especies de *Enterobacter* poseen múltiples actividades promotoras del crecimiento y, por lo tanto, son potenciadoras del crecimiento de las plantas. Sin embargo, otras especies son patógenos oportunistas. Los mecanismos a través de los cuales las especies de *Enterobacter* mantienen el crecimiento y la productividad de las plantas incluyen la fijación de nitrógeno, la mejora de la absorción de nutrientes, la solubilización del fosfato inorgánico, la producción de hormonas vegetales, la reducción de los niveles de etileno y la producción de compuestos antimicrobianos. Además, protegen a las plantas contra los fitopatógenos (Khalifa 2020).

### 5.3. Análisis del metagenoma de rizosfera de *Amaranthus cruentus* mediante la secuenciación del gen *ADNr 16S*

Después del procesamiento de las secuencias obtenidas por la secuenciación del metagenoma, se obtuvieron 187,999 lecturas de secuenciación masiva (**Tabla 2**), de las cuales se obtuvieron un total de 4835 OTUs que se clasificaron usando la base de datos de Ribosomal Database Project (RDP), y se obtuvo la siguiente diversidad taxonómica.

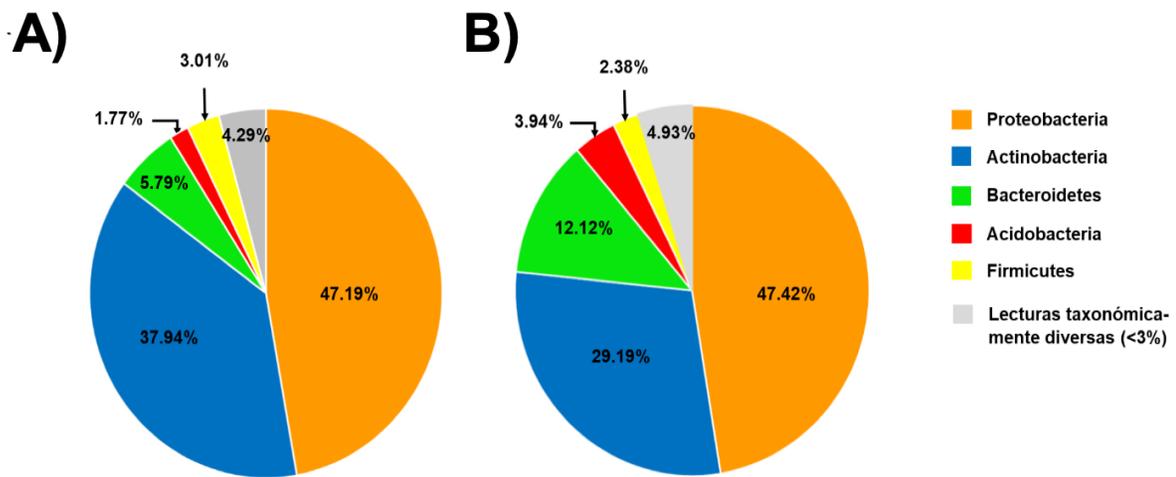
**Tabla 2.** Distribución de lecturas de los datos obtenidas por secuenciación masiva del gen *ADNr 16S*

MUESTRA	LECTURAS
<b>CONTROL</b>	
Z1	13230
Z2	16476
Z3	23326
Z4	19348
<b>ESTRÉS</b>	
Z5	35406
Z6	23401
Z7	25527
Z8	31285

Z=muestras de Rizosfera.

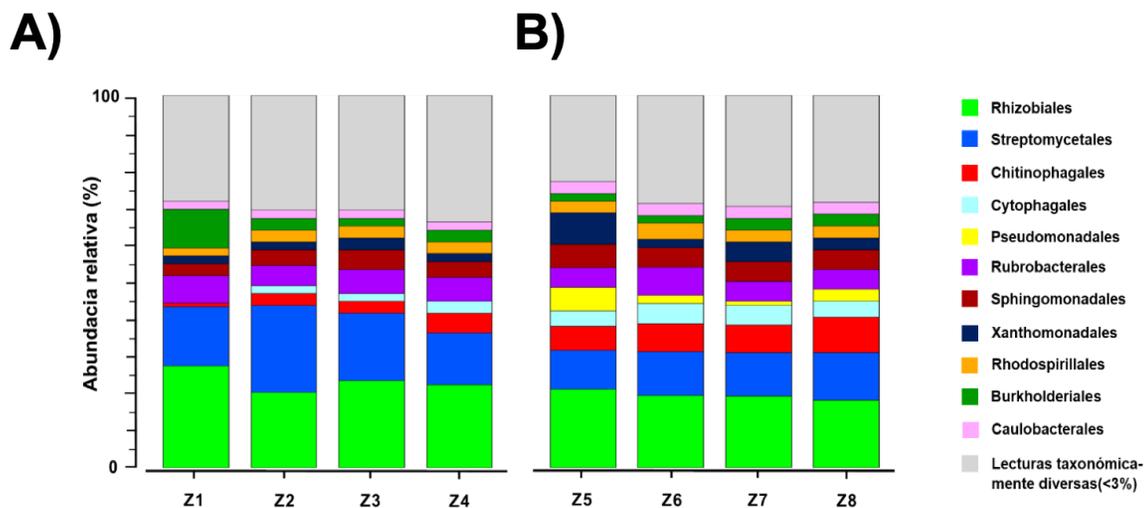
Como se muestra en la **Figura 6**, la rizosfera de plantas control a nivel de filo, se observó que está dominada por Proteobacterias (47.19%), seguida de Actinobacterias (37.94%), Bacteroidetes (5.79%), Firmicutes (3.01%) y Acidobacteria (1.77%) similar a lo reportado en la bibliografía (Bulgarelli et al. 2013; Lugtenberg y Kamilova 2009; Müller et al. 2016;.Rodriguez et al. 2019; Zarraonaindia et al 2015). En cambio para las plantas tratadas bajo estrés salino observamos los filos de Proteobacterias (47.42%), seguida de Actinobacterias (29.19%), Bacteroidetes (12.12%), Acidobacteria (3.94%) y Firmicutes (2.34%). En General se ve un importante cambio en la composición taxonómica al nivel de filo

cuando las plantas son sometidas a estrés salino, Disminuyen las Actinobacterias, de un 37.94 a 29.19% y los Firmicutes de 3.01 a 2.38%, y el aumento de Acidobacterias de 1.77 a 3.94%, y Bacteroidetes de 5.79 a 12.12%, aumentando en más del doble su diversidad bajo el tratamiento de estrés salino.



**Figura 6. Composición taxonómica de la rizosfera de *Amaranthus cruentus*, al nivel de filo** A) de plantas crecidas en condiciones control y B) plantas sometidas a estrés salino. Se observa la abundancia relativa de cada filo representado por un color.

Haciendo un análisis más detallado al nivel de orden (**Figura 7**), podemos observar que mientras al nivel de filo no encontramos un cambio en la abundancia relativa en el filo más abundante Proteobacteria, 47.19% para muestras control y 47.42% para muestras de estrés salino observamos al nivel de orden los siguientes componentes del filo Proteobacteria: Rhizobiales, Burkholderiales, Sphingomonadales, Rhodospirillales, Caulobacterales, Pseudomonadales y Xanthomonadales. Del filo Actinobacteria: Rubrobacterales y Streptomycetales. Y del filo Bacteroidetes los órdenes: Chitinophagales y Cytophagales.



**Figura 7. Abundancia relativa al nivel de orden en rizosfera de *Amaranthus cruentus* en plantas control y plantas sometidas a estrés salino. A) Muestras control Z1, 2, 3 y 4 muestras B) Estrés Z5, 6, 7 y 8. Cada color ilustra un orden específico, la abundancia correspondiente al % de lecturas por orden, del total de lecturas.**

Al comparar la composición taxonómica entre muestras control y estrés observamos que los órdenes de mayor a menor abundancia: Para las muestras control son: Rhizobiales, Streptomyetales, Rubrobacterales, Sphingomonadales, Rhodospirillales, Chitinophagales, Xanthomonadales, Caulobacterales y Cytophagales.

Mientras que para las muestras de estrés salino la composición taxonómica a nivel de orden se ordena de la siguiente forma de mayor a menor abundancia: Rhizobiales, Streptomyetales, Chitinophagales, Rubrobacterales Sphingomonadales, Xanthomonadales, Cytophagales Rhodospirillales, Pseudomonadales Caulobacterales y Burkholderiales.

En comparación el orden Rhizobiales se mantiene en ambos tipos de muestras, con la mayor abundancia. Para el orden Streptomyetales la abundancia es un poco mayor para las muestras control (~5%) que para las plantas estresadas, en tercer lugar tenemos para muestras de estrés el orden Chitinophagales con un 7% del total de lecturas, en cambio para muestras control este orden está en 7mo lugar con menos de 3% de las lecturas. En su lugar en la

tercera posición para los controles y cuarta posición para estrés tenemos al orden Rubrobacterales, que se mantiene con abundancias similares en ambos grupos. En quinto lugar para muestras estrés tenemos el orden Sphingomonadales con 5% de lecturas, igualmente en quinto lugar para muestras control con 3.5%. En cambio, en cuarto lugar para muestras control encontramos al orden Burkholderiales, que en muestras estrés se posiciona en el 11vo lugar reduciendo a la mitad su abundancia relativa. En sexto lugar para muestras estrés tenemos Xanthomonadales con 4.5%, seguido de Cytophagales con 4% de lecturas, en séptimo de lecturas. En 8vo observamos a Rhodospirillales para estrés con 3.45% de lecturas que corresponde al 6 lugar de muestras control con el 2.7% de lecturas. Por último, para muestras estrés el orden pseudomonadales se encuentra en el 9no lugar con el 3 % de lecturas, comparado con control donde no se muestra en la tabla debido a que en ninguna muestra obtuvo más del 3% de lecturas.

Dentro del orden Rhizobiales se encuentra el género Rhizobia, que se caracteriza por ser un grupo de bacterias diazotróficas, usadas comúnmente como co-inoculantes junto con otros microbios (tanto hongos como bacterias) usados para amplificar la productividad de las BPCP bajo diferentes condiciones de estrés (Figueiredo et al. 2008; Ahmad et al. 2013; Gomez-Sagasti y Marino 2015).

Se ha reportado a miembros del orden Chitinophagales (familia única Chitinophagaceae) son capaces de degradar quitina y tienen hidrolasas de celulosa. (Zhuang et al. 2020; Lee et al. 2014). Chitinophagales son un grupo conocido por metabolizar glucanos complejos como los que constituyen una gran porción de los EPS (exopolisacaridos) producidos por cianobacterias y diatomeas (Cottrell y Kirchman 2000; Lapébie et al. 2019; Rishworth, et al. 2020 Zhu et al. (2021) encontraron el aumento de la diversidad y abundancia de diazotrofos en suelos con altos contenidos de Hg, y reportaron que el grupo dominante en rizosfera de trebol de las muestras con más alta concentración de mercurio fueron los Chitinophagales.

Las bacterias pertenecientes al grupo Burkholderiales son conocidas por su actividad de BPCP (Ali et al. 2014a; Parra-Cota et al. 2014). Sheibani-Tezerji et al.

(2015) analizaron la secuenciación del transcriptoma completo de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) colonizadas de *Burkholderia. phytofirmans* PsJN para analizar la respuesta de la cepa PsJN al estrés de la planta. El transcriptoma mostró una amplia gama de funcionalidades codificadas en el genoma de la cepa PsJN. Las transcripciones reguladas positivamente en respuesta al estrés por sequía de las plantas estuvieron involucradas principalmente en la regulación transcripcional, la homeostasis celular y la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno, lo que indica una respuesta al estrés oxidativo en PsJN.

La cepa GR01 de *Burkholderia phymatum* es un simbiote de frijol común (*Phaseolus vulgaris*), aislado de nódulos de plantas cultivadas en suelos semiáridos en Marruecos. También se reportó la osmotolerancia de *B. phymatum* GR01N en vida libre y en asociación simbiótica con *P. vulgaris* (Talbi et al. 2012).

## 6. CONCLUSIONES

El contenido de almidón en tejidos de amaranto disminuye en correlación al aumento de azúcares libres cuando la planta se somete a estrés salino. La prolina en raíces de amaranto expuestas a estrés salino se triplica, como ajuste osmótico. La contribución de un conjunto de 6 cepas bacterianas capaces de crecer en condiciones de estrés salino, con la capacidad de producir sideróforos, 2 cepas solubilizadoras de fosfatos. Y su potencial biotecnológico, nos hace apostar por su uso en otros cultivos como BPCP.

Es importante resaltar que el orden Pseudomonadales esta aumentado en el grupo de muestras de estrés salino, comparado con el control. Dicho grupo es un componente dominante de las cepas bacterianas aisladas (*Pseudomonas*) con actividad BPCP, el género *Pseudomonas* es frecuentemente encontrado en suelos de cultivos y asociado a tejidos de plantas. Los grupos de bacterias endófitas presentes más comúnmente pertenecen a las  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -Proteobacteria por lo que en *A. cruentus* pueden ayudar a regular el estrés oxidativo, y la homeostasis para resistir niveles moderados de salinidad, y además los solutos libres como la prolina tienen un papel clave en la regulación homeostática.

Existe alto potencial de las bacterias aisladas en *A. cruentus* como bacterias benéficas que puedan ser empleadas en cultivos de importancia alimentaria y comerciales en suelos afectadas por salinidad. Es de gran interés seguir explorando la diversidad de la microbiota en otros cultivares de amaranto, en especial de *A. hypochondriacus* que crecen de forma silvestre desde la época prehispánica.

Debido a la dificultad para obtener bacterias cultivables, gran parte de la diversidad con potencial BPCP, sigue a la espera de ser empleada en la agricultura, aun así, es de gran importancia conocer la diversidad de microorganismos presente en los cultivos prehispánicos como es el amaranto.

## **PROSPECTIVAS**

Terminar los análisis bioinformáticos que quedan pendientes de endosfera de raíz, filosfera de hojas y tallos, preparar un manuscrito para publicar los datos obtenidos.

## Referencias

- Abbamondi GR, Tommonaro G, Weyens N, et al (2016) Plant growth-promoting effects of rhizospheric and endophytic bacteria associated with different tomato cultivars and new tomato hybrids. *Chem Biol Technol Agric* 3:. <https://doi.org/10.1186/s40538-015-0051-3>.
- Abd Hallah E., Abeer H, Hend AA (2015) Alleviation of Adverse impact of cadmium stress in (*Helianthus annuus* L) by Arbuscular mycorrhizal fungi..
- Aghaei K, Ehsanpour AA, Shah AH, Komatsu S (2009) Proteome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress. *Amino Acids* 36:91–98. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0036-7>.
- Aguilar EG, Albarracín G de J, Uñates MA, et al (2015) Evaluation of the Nutritional Quality of the Grain Protein of New Amaranths Varieties. *Plant Foods Hum Nutr* 70:21–26. <https://doi.org/10.1007/s11130-014-0456-3>.
- Ahmad M, Zahir ZA, Khalid M, et al (2013) Efficacy of Rhizobium and Pseudomonas strains to improve physiology, ionic balance and quality of mung bean under salt-affected conditions on farmer's fields. *Plant Physiol Biochem* 63:170–176. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.11.024>.
- Ali S, Charles TC, Glick BR (2014) Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiol Biochem* 80:160–167. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.04.003>.
- Ali S, Duan J, Charles TC, Glick BR (2014) A bioinformatics approach to the determination of genes involved in endophytic behavior in Burkholderia spp. *J Theor Biol* 343:193–198. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2013.10.007>.
- Amirjani MR (2011) Effect of Salinity stress on growth, sugar content, pigments and enzyme activity of rice. *Int J Bot* 7:73–81. <https://doi.org/10.3923/ijb.2011.73.81> .
- Bacon CW, Hinton DM (2006) Bacterial endophytes: The endophytic niche, its occupants, and its utility. In: *Plant-Associated Bacteria*. Springer Netherlands, pp 155–194.
- Bai Y, Müller DB, Srinivas G, et al (2015) Functional overlap of the Arabidopsis leaf and root microbiota. *Nature* 528:364–369. <https://doi.org/10.1038/nature16192>.
- Bakker PAHM, Doornbos RF, Zamioudis C, et al (2013) Induced systemic resistance and the rhizosphere microbiome. *Plant Pathol J* 29:136–143. <https://doi.org/10.5423/PPJ.SI.07.2012.0111>.
- Ballabio C, Uberti F, Di Lorenzo C, et al (2011) Biochemical and immunochemical characterization of different varieties of amaranth (*Amaranthus* L. ssp.) as a safe ingredient for gluten-free products. *J Agric Food Chem* 59:12969–12974. <https://doi.org/10.1021/jf2041824>.
- Berg G (2009) Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:11–18. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2092-7>.
- Bertin C, Yang X, Weston LA (2003) The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* 256:67–83.
- Bressani R (2018) Composition and nutritional properties of amaranth. *Amaran Biol Chem Technol* 185–205. <https://doi.org/10.1201/9781351069601>.
- Bulgarelli D, Garrido-Oter R, Münch PC, et al (2015) Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host Microbe* 17:392–403. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.011>.

- Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, et al (2012) Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* 488:91–95.
- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, et al (2013) Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annu Rev Plant Biol* 64:807–838. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>.
- Busquets A, Peña A, Gomila M, et al (2012) Genome Sequence of *Pseudomonas stutzeri* Strain JM300 (DSM 10701), a Soil Isolate and Model Organism for Natural Transformation. <https://doi.org/10.1128/JB.01257-12>.
- Carillo P, Grazia M, Pontecorvo G, et al (2011a) Salinity stress and salt tolerance. In: *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*. InTech.
- Carillo P, Parisi D, Woodrow P, et al (2011b) Salt-induced accumulation of glycine betaine is inhibited by high light in durum wheat. *Funct Plant Biol* 38:139–150. <https://doi.org/10.1071/FP10177>.
- Carmen B, Roberto D Soil Bacteria Support and Protect Plants Against Abiotic Stresses.
- Carvalho TLG, Balsemão-Pires E, Saraiva RM, et al (2014) Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. *J. Exp. Bot.* 65:5631–5642.
- Chaparro JM, Badri D V., Vivanco JM (2014) Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME J* 8:790–803. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.196>.
- Chen M, Zhu B, Lin L, et al (2014) Complete genome sequence of *Kosakonia sacchari* type strain SP1 T. *Stand Genomic Sci* 9:1311–1318. <https://doi.org/10.4056/sigs.5779977>.
- Coleman-Derr D, Desgarennes D, Fonseca-Garcia C, et al (2016) Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytol* 209:798–811. <https://doi.org/10.1111/nph.13697>.
- Compant S, Clément C, Sessitsch A (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* 42:669–678. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>.
- Cook RJ, Thomashow LS, Weller DM, et al (1995) Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4197–201. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4197>.
- Corke H, Cai YZ, Wu HX (2016) Amaranth: Overview. In: *Reference Module in Food Science*. Elsevier.
- Correa AD, Jokl L, Carlsson R (1986) Amino acid composition of some *Amaranthus* sp. grain proteins and of its fractions. *Arch Latinoam Nutr* 36:466–476.
- Cottrell MT, Kirchman DL (2000) Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the Cytophaga-flavobacter cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Appl Environ Microbiol* 66:1692–1697. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1692-1697.2000>
- Dardanelli MS, Carletti SM, Paulucci NS, et al (2010) Benefits of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Rhizobia in Agriculture. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 1–20.
- de Souza Silva CMM, Francisconi E (2012) Effect of Salinity on Soil Microorganisms. In: *Soil Health and Land Use Management*. InTech.
- De Vleeschauwer D, Höfte M (2009) Chapter 6 Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance. *Adv. Bot. Res.* 51:223–281.
- Dennis PG, Miller AJ, Hirsch PR (2010) Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiol Ecol* 72:313–327. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00860.x>.

- Ding S, Huang CL, Sheng HM, et al (2011) Effect of inoculation with the endophyte *Clavibacter* sp. strain Enf12 on chilling tolerance in *Chorispora bungeana*. *Physiol Plant* 141:141–151. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2010.01428.x>.
- Do PT, Drechsel O, Heyer AG, et al (2014) Changes in free polyamine levels, expression of polyamine biosynthesis genes, and performance of rice cultivars under salt stress: A comparison with responses to drought. *Front Plant Sci* 5:182–182. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00182>.
- Edgar RC (2013) UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods* 10:996–998. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>.
- Espitia Rangel E, Mapes Sánchez E, Núñez Colín C, Escobedo López D (2010) Distribución geográfica de las especies cultivadas de “*Amaranthus*” y de sus parientes silvestres en México. *Rev Mex Ciencias Agrícolas* 1:421–431.
- Figueiredo MVB, Burity HA, Martínez CR, Chanway CP (2008) Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Appl Soil Ecol* 40:182–188. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.04.005>.
- Frenkel H, Goertzen JO, Rhoades JD (1978) Effects of Clay Type and Content, Exchangeable Sodium Percentage, and Electrolyte Concentration on Clay Dispersion and Soil Hydraulic Conductivity. *Soil Sci Soc Am J* 42:32–39. <https://doi.org/10.2136/sssaj1978.03615995004200010008x>.
- Gao J lian, Yuan M, Wang X ming, et al (2015) *Variovorax guangxiensis* sp. nov., an aerobic, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase producing bacterium isolated from banana rhizosphere. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol* 107:65–72. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0304-3>.
- Ghadiri H, Hussein J, Dordipour AE, Rose C THE EFFECT OF SOIL SALINITY AND SODICITY ON SOIL ERODIBILITY, SEDIMENT TRANSPORT AND DOWNSTREAM WATER QUALITY.
- Ghorbanpour M, Hatami M, Khavazi K (2013) Role of plant growth promoting rhizobacteria on antioxidant enzyme activities and tropane alkaloid production of *Hyoscyamus niger* under water deficit stress. *Turkish J Biol* 350–360. <https://doi.org/10.3906/biy-1209-12>.
- Gómez-Sagasti MT, Marino D (2015) PGPRs and nitrogen-fixing legumes: A perfect team for efficient Cd phytoremediation? *Front. Plant Sci.* 6:81.
- Gregory PJ (2007) *Plant Roots: Growth, Activity and Interaction with Soils*. Blackwell Publishing Ltd.
- Grover M, Ali SZ, Sandhya V, et al (2011) Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World J Microbiol Biotechnol* 27:1231–1240. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0572-7>.
- Gunnell D, Eddleston M, Phillips MR, Konradsen F (2007) The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: Systematic review. *BMC Public Health* 7:1–15.
- Haney CH, Samuel BS, Bush J, Ausubel FM (2015) Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. *Nat Plants* 1:1–9. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.51>.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Biol* 51:463–499. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.463>.
- Hawes MC, Gunawardena U, Miyasaka S, Zhao X (2000) The role of root border cells in plant defense. *Trends Plant Sci* 5:128–133. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01556-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01556-9).

- Ho Y-N, Mathew DC, Huang C-C (2017) Plant-Microbe Ecology: Interactions of Plants and Symbiotic Microbial Communities. In: Plant Ecology - Traditional Approaches to Recent Trends. InTech.
- HUANG Y hong (2018) Comparison of rhizosphere and endophytic microbial communities of Chinese leek through high-throughput 16S rRNA gene Illumina sequencing. *J Integr Agric* 17:359–367. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61731-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61731-3).
- Huerta-Ocampo JA, Barba de la Rosa AP (2011) Amaranth: A Pseudo-Cereal with Nutraceutical Properties. *Curr Nutr Food Sci* 7:1–9. <https://doi.org/10.2174/157340111794941076>.
- Huerta-ocampo JÁ, Barrera-pacheco A, Mendoza- CS, et al (2014) Salt stress-induced alterations in the root proteome of *Amaranthus cruentus* L . Salt stress-induced alterations in the root proteome of *Amaranthus cruentus* L . IPICYT , Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A . C ., Camino a la Pres.
- Kashyap PL, Srivastava AK, Tiwari SP, Kumar S (2018) *Microbes for Climate Resilient Agriculture*. Wiley Blackwell.
- Kaymak HC (2011) Potential of PGPR in Agricultural Innovations. In: Maheshwari DK (ed) *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 45–79.
- Ke X, Feng S, Wang J, et al (2019) Effect of inoculation with nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri* A1501 on maize plant growth and the microbiome indigenous to the rhizosphere. *Syst Appl Microbiol* 42:248–260. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.10.010>.
- Khalifa A (2020) *Enterobacter*. In: *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*. Elsevier, pp 259–270.
- Knights HE, Jorin B, Haskett TL, Poole PS (2021) Deciphering bacterial mechanisms of root colonization. *Environ. Microbiol. Rep.*
- Kuklinsky-Sobral J, Araújo WL, Mendes R, et al (2004) Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ Microbiol* 6:1244–1251. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00658.x>.
- Kumar A, Singh R, Yadav A, et al (2016) Isolation and characterization of bacterial endophytes of *Curcuma longa* L. *3 Biotech* 6:1–8. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0393-y>.
- Lan Y, Wang Q, Cole JR, Rosen GL (2012) Using the RDP classifier to predict taxonomic novelty and reduce the search space for finding novel organisms. *PLoS One* 7:1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032491>.
- Lapébie P, Lombard V, Drula E, et al (2019) Bacteroidetes use thousands of enzyme combinations to break down glycans. *Nat Commun* 10:1–7. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10068-5>
- Leach AW, Mumford JD (2008) Pesticide Environmental Accounting: A method for assessing the external costs of individual pesticide applications. *Environ. Pollut.* 151:139–147.
- Lee KCY, Dunfield PF, Stott MB (2014) The phylum armatimonadetes. In: *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 447–458
- Li Y, Wu X, Chen T, et al (2018) Plant phenotypic traits eventually shape its microbiota: A common garden test. *Front Microbiol* 9:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02479>.
- Liu J, Zhu JK (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* (80- ) 280:1943–1945. <https://doi.org/10.1126/science.280.5371.1943>.
- Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63:541–556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>.

- Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, et al (2013) Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* 501:86–90.
- Maldonado-Cervantes E, Jeong HJ, León-Galván F, González de Mejía E, deLumen BO, Barba de la Rosa AP (2010) Amaranth lunasin-like peptide internalizes into the cell nucleus and inhibits chemical carcinogen-induced transformation of NIH-3T3 cells. *Peptides* 31, 1635-1642.
- Mehta S, Singh B, Patra A, et al (2021) Maize microbiome: current insights for the sustainable agriculture. In: *Microbiomes and Plant Health*. Elsevier, pp 267–297.
- Mendes R, Pizzirani-Kleiner AA, Araujo WL, Raaijmakers JM (2007) Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Appl Environ Microbiol* 73:7259–7267. <https://doi.org/10.1128/AEM.01222-07>.
- Miller SA, Beed FD, Harmon CL (2009) Plant disease diagnostic capabilities and networks. *Annu Rev Phytopathol* 47:15–38. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081743>.
- Molina L, Segura A, Duque E, Ramos JL (2020) The versatility of *Pseudomonas putida* in the rhizosphere environment. In: *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press Inc., pp 149–180.
- Moreno-Espíndola IP, Ferrara-Guerrero MJ, De León-González F, Rivera-Becerril, Facundo González-Halphen D (2013) COMUNIDAD BACTERIANA CULTIVABLE ASOCIADA A LA RIZOCORAZA DE *Amaranthus hypochondriacus*. *Terra Latinoam* 31:57–69.
- Moreno-Espíndola IP, Ferrara-Guerrero MJ, De León-González F, et al (2018) Enzymatic activity and culturable bacteria diversity in rhizosphere of amaranth, as indicators of crop phenological changes. *Bot. Sci.* 96:640–649.
- Mukerji KG, Manoharachary C, Singh J (2006) *Microbial Activity in the Rhizosphere*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Munns R (2005) Genes and salt tolerance: Bringing them together. *New Phytol.* 167:645–663.
- Munns R Salinity – plant stress. <https://plantstress.com/salinity/>. Accessed 21 May 2021.
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59:651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>.
- Nadeem SM, Ahmad M, Zahir ZA, et al (2014) The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnol. Adv.* 32:429–448.
- National Research Council (1984) *Amaranth Modern Prospects for an Ancient Crop*. National Academies Press.
- Oyeyiola GP (2010) Rhizosphere bacterial flora of *Amaranthus hybridus*. *Res J Microbiol* 5:137–143. <https://doi.org/10.3923/jm.2010.137.143>.
- Pandey R, Chavan PN, Walokar NM, et al (2013) *Pseudomonas stutzeri* RP1: A Versatile Plant Growth promoting Endorhizospheric Bacteria inhabiting Sunflower (*Helianthus annuus*). *Res J Biotechnol* 8:48–55.
- Paredes- Lopez O, Barba de la Rosa AP, Becker R, et al (1994) *AMARANTH Biology, Chemistry, and Technology*, 2018 reperi. CRC Presss, Boca Raton, FL 33487-2742.
- Parra-Cota FI, Peña-Cabriales JJ, De Los Santos-Villalobos S, et al (2014) *Burkholderia ambifaria* and *B. caribensis* promote growth and increase yield in grain amaranth (*Amaranthus cruentus* and *A. hypochondriacus*) by improving plant nitrogen uptake. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088094>.
- Patel RR, Thakkar VR, Subramanian BR (2015) A *Pseudomonas guariconensis* strain capable of promoting growth and controlling collar rot disease in *Arachis hypogaea* L. *Plant Soil* 390:369–381. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2436-2>.

- Pavlik V (2012) The revival of Amaranth as a third-millennium food. *Neuroendocrinol Lett* 33:3–7.
- Peiffer JA, Spor A, Koren O, et al (2013) Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:6548–6553. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302837110>.
- Pini F, Galardini M, Bazzicalupo M, Mengoni A (2011) Plant-bacteria association and symbiosis: Are there common genomic traits in alphaproteobacteria? *Genes (Basel)* 2:1017–1032. <https://doi.org/10.3390/genes2041017>.
- Rashid S, Charles TC, Glick BR (2012) Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Appl Soil Ecol* 61:217–224. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.09.011>.
- Rengasamy P (2006) World salinization with emphasis on Australia. In: *Journal of Experimental Botany*. Oxford Academic, pp 1017–1023.
- Riadh K, Wided M, Hans-Werner K, Chedly A (2010) Responses of Halophytes to Environmental Stresses with Special Emphasis to Salinity. In: *Advances in Botanical Research*. Academic Press, pp 117–145.
- Rishworth GM, Dodd C, Perissinotto R, et al (2020) Modern supratidal microbialites fed by groundwater: functional drivers, value and trajectories. *Earth-Science Rev.* 210:103364
- Rosenblueth M, Martínez-Romero E (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol Plant-Microbe Interact* 19:827–837. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0827>.
- Ruan CJ, da Silva JAT, Mopper S, et al (2010) Halophyte Improvement for a Salinized World. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 29:329–359.
- Sessitsch A, Hardoim P, Döring J, et al (2012) Functional Characteristics of an Endophyte Community Colonizing Rice Roots as Revealed by Metagenomic Analysis. *Mol Plant-Microbe Interact* 25:28–36. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-11-0204>.
- Stolz A, Busse HJ, Kämpfer P (2007) *Pseudomonas knackmussii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:572–576. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64761-0>.
- Szymańska S, Płociniczak T, Piotrowska-Seget Z, Hryniewicz K (2016) Endophytic and rhizosphere bacteria associated with the roots of the halophyte *Salicornia europaea* L. - community structure and metabolic potential. *Microbiol Res* 192:37–51. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.05.012>.
- Talaat NB, Shawky BT (2017) Microbe-mediated induced abiotic stress tolerance responses in plants. In: *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives*. Springer Singapore, pp 101–133.
- Van Loon LC (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119:243–254.
- Vardharajula S, Ali SZ, Grover M, et al (2011) Drought-tolerant plant growth promoting bacillus spp.: Effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. *J Plant Interact* 6:1–14. <https://doi.org/10.1080/17429145.2010.535178>.
- Veena Kumari Dn, Vickram A, B ST *European Journal of Molecular & Clinical Medicine* Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) *Pseudomonas stutzeri* from forest soil: A Review.
- Velarde-Salcedo AJ, De Mejía EG, Barba De La Rosa AP (2012) In vitro evaluation of the antidiabetic and antiadipogenic potential of Amaranth protein hydrolysates. *ACS Symp Ser* 1109:189–198. <https://doi.org/10.1021/bk-2012-1109.ch012>.
- Velarde-Salcedo AJ, Barrera-Pacheco A, Lara-González S, et al (2013) In vitro inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth

- (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins. *Food Chem* 136:758–764. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.032>.
- Venskutonis PR, Kraujalis P (2013) Nutritional Components of Amaranth Seeds and Vegetables: A Review on Composition, Properties, and Uses. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 12:381–412. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12021>.
- Vermeer J, McCully ME (1982) The rhizosphere in *Zea*: new insight into its structure and development. *Planta* 156:45–61. <https://doi.org/10.1007/BF00393442>.
- WHO, FAO, UNU (2007) Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition. *Tech Rep Ser WHO* 35:285.
- Wieland G, Neumann R, Backhaus H (2001) Variation of Microbial Communities in Soil , Rhizosphere , and Rhizoplane in Response to Crop Species , Soil Type , and Crop Development Downloaded from <http://aem.asm.org/> on December 21 , 2014 by UNIVERSITATSBIBLIOTHEK GIESSEN. *Appl Environ Microbiol* 67:5849–5854. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5849>.
- Yaish MW, Al-Lawati A, Jana GA, et al (2016) Impact of soil salinity on the structure of the bacterial endophytic community identified from the roots of caliph medic (*Medicago truncatula*). *PLoS One* 11:1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159007>.
- Zamioudis C, Pieterse CMJ (2012) Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25:139–150.
- Zhang W, Jia X, Chen S, et al (2020) Response of soil microbial communities to engineered nanomaterials in presence of maize (*Zea mays* L.) plants. *Environ Pollut* 267:115608. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115608>
- Zhu H, Ying T, Xiaomi W, et al (2021) Changes in clover rhizosphere microbial community and diazotrophs in mercury-contaminated soils. *Sci Total Environ* 767:145473. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.145473>
- Zhu J-K, Bressan RA, Hasegawa PM, et al (2005) Success Stories in Agriculture Salt and Cropr: Salinity Tolerance.