

**ACERCAMIENTO A LA ESTRUCTURA DEL MICROBIOMA FOLIAR DE
UNA VARIEDAD COMERCIAL DE *BACTRIS GASIPAES* (CHONTADURO)
DE BAHÍA MÁLAGA, VALLE DEL CAUCA, COLOMBIA**

Hernán Camilo Díaz Beltrán

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias Naturales

Programa de Biología

Bogotá

**ACERCAMIENTO A LA ESTRUCTURA DEL MICROBIOMA FOLIAR DE
UNA VARIEDAD COMERCIAL DE *BACTRIS GASIPAES* (CHONTADURO)
DE BAHÍA MÁLAGA, VALLE DEL CAUCA, COLOMBIA**

Tesista

Hernán Camilo Díaz Beltrán

Directora de tesis:

PhD en Fitopatología Silvia Restrepo Restrepo

Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad de los Andes - LAMFU

Co-directora de tesis:

PhD en Ciencias-Biología Martha Emiliana Cárdenas Toquica

Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad de los Andes - LAMFU

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias Naturales

Programa de Biología

Bogotá

2021

AGRADECIMIENTOS

De corazón, quiero agradecer a mis tutoras, la Dra. Silvia Restrepo y la Dra. Martha Cárdenas, por aceptarme como estudiante y darme la confianza para permitirme trabajar en este proyecto que disfruté enormemente a pesar de los inconvenientes debido a las circunstancias actuales. En especial, les agradezco por asesorarme, corregirme y guiarme en cada momento. Porque sin ellas este proyecto no hubiera sido posible.

A las biólogas Natalia Inés Bolaños y Angelis Marbello Santrich por acompañarme durante mi estancia en el laboratorio y ser mis mentoras. Además, le agradezco al Dr. Pedro Jiménez, a Angelis y a Nicolás Echeverry por su ayuda en la obtención y clasificación de los morfotipos de hongos endófitos.

A María Juliana Rodríguez, Fabio Herrera Rocha, David González y a Luisa Sacristán por todo su aporte en el análisis bioinformático.

De igual manera quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio por su apoyo y grata compañía a lo largo del tiempo que estuve realizando este proyecto

A la Dra Marcela Guevara y al Centro de secuenciación de ADN de la Universidad de los Andes por generar y subsidiar parte de los conjuntos de datos de secuencia.

A todas las personas que me motivaron, acompañaron y me aportaron en la elaboración de este proyecto.

Y finalmente al Fondo Alianza Bogotá Ciudad Educadora por permitirme realizar mis estudios de pregrado, y así, darme la oportunidad de estar un paso más cerca a lo que son mis sueños.

NOTA DE SALVEDAD

"La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por el Investigador en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético de este en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia"

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	15
2. MARCO DE REFERENCIA.....	17
2.1. <i>Bactris gasipaes</i>	17
2.1.1. Origen.....	17
2.1.2. Taxonomía y principales usos	18
2.1.1. Producción en Colombia	19
2.1.2. Estado fitosanitario.....	21
2.2. Microbioma	22
2.2.1. Microbioma de la filosfera.....	24
2.2.2. Microorganismos endófitos	26
2.3. Estudios del microbioma de <i>B. gasipaes</i>	27
2.4. Metagenómica	28
2.4.1. El gen ARNr 16S.....	28
2.4.1. Región ITS.....	29
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	31
4. JUSTIFICACIÓN.....	32
5. OBJETIVOS.....	34
5.1. Objetivo general:.....	34
5.2. Objetivos específicos:.....	34

6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
6.1.	<i>Diseño experimental y obtención de muestras</i>	35
6.2.	<i>Caracterización de la comunidad endofítica</i>	35
6.2.1.	<i>Aislamiento de hongos y bacterias endófitas</i>	35
6.2.2.	<i>Descripción macroscópica y microscópica de hongos endófitos</i>	36
6.3.	<i>Caracterización del microbioma</i>	37
6.3.1.	<i>Liofilizado de las muestras</i>	37
6.3.2.	<i>Extracción de ADN</i>	37
6.3.3.	<i>Control de calidad del ADN por fluorometría y por electroforesis en gel de agarosa</i>	39
6.3.4.	<i>Secuenciación de ADN de alto rendimiento</i>	39
6.3.5.	<i>Análisis Bioinformáticos</i>	40
6.4.	<i>Análisis de datos</i>	42
7.	RESULTADOS	43
7.1.	<i>Comunidades endófitas</i>	43
7.2.	<i>Caracterización del Microbioma</i>	46
7.2.1.	<i>Extracción del ADN</i>	46
7.2.1.	<i>Resultados secuenciación</i>	47
8.	DISCUSIÓN.....	52
8.1.	<i>Hongos endófitos</i>	52
8.2.	<i>Comunidades bacterianas asociadas a hojas sanas de <i>Bactris gasipaes</i></i>	54
9.	CONCLUSIONES.....	58

10. RECOMENDACIONES	60
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
12. ANEXOS	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Frecuencia porcentual de los morfotipos observados más de una vez en muestras sanas y enfermas de hojas de <i>Bactris gasipaes</i>	44
Figura 2. Riqueza de morfotipos de hongos endófitos de acuerdo a la condición de la hoja (Sana / Enferma) y a la ubicación en la hoja de <i>Bactris gasipaes</i> (Distal, Media, Proximal).	45
Figura 3. Abundancia de los Phyla bacterianos obtenidos a partir de muestras de hojas sanas de <i>Bactris gasipaes</i> . Sitios de muestreo: Mangaña (1), Miramar (2) y La Plata (3) y posición de la hoja (D: distal; M: medial y P: proximal).	48
Figura 4. Diversidad alfa (Riqueza: Phyla observados, izquierda e Índice de Shannon, derecha) de las comunidades bacterianas obtenidas a partir de muestras de hojas sanas de <i>Bactris gasipaes</i> en los tres sitios de muestreo Mangaña (1), Miramar (2) y La Plata (3).	49
Figura 5. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las comunidades bacterianas obtenidas en los tres tipos de muestras (D: distal, M: media y P: proximal) y los tres sitios de muestreos: Mangaña (1), Miramar (2) y La Plata (3).	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de aislamientos (A) y de morfotipos (M) de hongos endófitos obtenidos por tipo de muestra de hojas de Chontaduro (<i>Bactris gasipaes</i>)	43
Tabla 2. Evaluación de la calidad del ADN obtenido a partir de las muestras de hojas de <i>Bactris gasipaes</i> , en términos de concentración (ng/μL) y pureza (relación de la absorbancia a 260 nm y 280 nm).	46

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Descripción general del flujo de trabajo bioinformático. Las cajas bordeadas en azul oscuro muestran el trabajo realizado para el análisis de las secuencias por EPI2ME (ONT). Las cajas bordeadas en verdes son los procesos optados por mejorar los resultados y aumentar la precisión.	88
Anexo 2. Descripción de las características macroscópicas y microscópicas de los morfotipos de hongos endófitos de hojas de <i>Bactris gasipaes</i> , después de 7 a 14 días a 25 °C en medio PDA.	89
Anexo 3. Morfotipos (M) de hongos endófitos de acuerdo a la condición de la hoja (Sana / Enferma) y a la ubicación en la hoja de <i>Bactris gasipaes</i> (Distal, Media, Proximal).	92
Anexo 4. Gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X para determinar la integridad de las muestras de DNA genómico. El primer carril de la columna izquierda (M) corresponde al marcador de peso molecular el DNA Ladder 100bp+3k (Smobio). Las muestras de ADN corresponden a los carriles 3, 5, ,7, 8, 12, 13,14, 17 y 18.....	93
Anexo 7. Abundancia (Número de reads) de cada uno de los 28 Phyla obtenidos por sitio de muestreo: Mangaña (1), Miramar (2) y La Plata (3).....	96
Anexo 8. Índice de diversidad de Shannon por sección de hoja.....	97
Anexo 9. Índice de diversidad de Shannon por puntos de muestreo.	97

RESUMEN

La filosfera es un ecosistema capaz de albergar un microbioma compuesto de comunidades microbianas grandes y diversas, que ha despertado un gran interés debido a que este puede tener efectos profundos en el estado fitosanitario y rendimiento de las plantas; gracias al potencial que presentan principalmente las bacterias y hongos que allí se encuentran. Sin embargo, producto de diversos factores, el conocimiento que se tiene a la fecha sobre el microbioma de la filosfera de palmas amazónicas es limitado. Este es el caso de *Bactris gasipaes* (la palma del chontaduro), una palma de suma relevancia cultural, social y económica en Colombia, que ha experimentado una caída en su productividad derivada de aspectos fitosanitarios.

El presente estudio proporciona la primera caracterización de las comunidades bacterianas del microbioma foliar de *Bactris gasipaes* y el aislamiento de hongos endófitos provenientes de hojas asintomáticas y sintomáticas (presencia de manchas foliares cloróticas). Por medio de la secuenciación del ARNr 16S con Nanopore, empleando el flujo de trabajo sugerido por ONT que utiliza EPI2ME, se determinó una baja diversidad bacteriana representada en un total de 28 filos bacterianos. El filo más abundante fue Cyanobacteria seguido por los filos Firmicutes y Proteobacteria, independientemente del sitio de muestreo y de la posición en la hoja. Se aislaron 48 morfotipos de hongos endófitos cultivables, de los cuales 5 fueron determinados hasta el nivel de género.

Palabras clave: Microbioma, filosfera, *B. gasipaes*, hongos endófitos.

ABSTRACT

The phyllosphere is an ecosystem capable of harboring a microbiome made up of large and diverse microbial communities. The phyllosphere has recently been of great interest because it can have a profound effect on the phytosanitary status and performance of plants because of the potential presented mainly by the bacteria and fungi that can be found there. However, the present knowledge of the microbiome of the phyllosphere of Amazonian palms is limited. This is the case for *Bactris gasipaes* (peach palm), a palm of great cultural, social and economic relevance in Colombia, which has experienced a drop in its productivity due to phytosanitary reasons.

The present study provides the first characterization of the bacterial communities of the *Bactris gasipaes* leaf microbiome and the isolation of endophytic fungi from asymptomatic and symptomatic leaves (presence of chlorotic leaf spots). By sequencing the 16S rRNA with Nanopore and using the workflow suggested by ONT using EPI2ME, a low bacterial diversity represented in a total of 28 bacterial phyla was determined. The most abundant phylum was Cyanobacteria followed by the phyla Firmicutes and Proteobacteria, regardless of the sampling site and the position on the leaf. 48 morphotypes of cultivable endophytic fungi were obtained, of which five were identified to the genus level.

Keywords: Microbiome, phyllosphere, *B. gasipaes*, *fungi endophytes*.

1. INTRODUCCIÓN

El microbioma se define como “el conjunto de genes que se encuentran en asociación con los organismos que colonizan un entorno determinado” (Boon et al., 2014), compuesto de diversas comunidades dinámicas e interactivas de microorganismos, ya sean patógenos, comensales o simbióticos (Lederberg & McCray, 2001) y se encuentran limitados por propiedades fisicoquímicas específicas (Marchesi & Ravel, 2015). Las partes aéreas de la planta (filosfera), como hojas, flores y frutos, son un micro hábitat para diversas comunidades microbianas que colonizan estas superficies en el exterior (epífitas) o en el interior (endófitos) y forman en conjunto el microbioma de la filosfera (Vorholt, 2012). Estas comunidades microbianas forman complejas interacciones moleculares con la planta hospedera (Shakir et al., 2020). Aunque el estudio del microbioma se ha centrado principalmente en la rizosfera, cada vez más se conoce sobre la composición, la dinámica y el papel del microbioma de la filosfera, sin embargo, aún existe una gran diversidad sin explorar de microorganismos potencialmente beneficiosos (Hale et al., 2014). Estos microorganismos pueden otorgarle a las plantas resistencia a las sequias (Gaige et al., 2010), resistencia a enfermedades (Choi et al., 2020), tolerancia osmótica (Sziderics et al., 2007) y, además, es posible que actúen como promotores del crecimiento vegetal (Du et al., 2013; Meiners et al., 2017) y como agentes de biocontrol (Iqar et al., 2021).

En el caso de Colombia hay un enorme desconocimiento de los microbiomas de plantas y particularmente los que están asociados a palmas de interés agrícola. Este es el caso de *Bactris gasipaes* (chontaduro), una palma de origen amazónico que es de gran importancia cultural, social y económica en el país (Jaimes-Roncancio et al., 2018; Saltos, 2018; Smith, 2015). Desde el 2007 hasta el 2016 en Colombia se ha observado una disminución en la producción de chontaduro. En el 2007 la producción de chontaduro era de 74.498 y para el 2016 fue de 37.673 toneladas, una situación generada principalmente por aspectos fitosanitarios (ICA, 2015; Pardo-Locarno et al., 2014),

poniendo en riesgo a toda la cadena de valor que se beneficia de esta planta (Serrano & Guaran, 2019) y a los diversos proyectos que se han generado a partir de los productos del chontaduro como un sustituto prometedor de los cultivos ilícitos (Chamorro, 2017; Ortiz, 2003).

Hasta la fecha, la herramienta más utilizada para el estudio de las comunidades de microorganismos asociados a *B. gasipaes* ha sido el cultivo microbiológico (Ballesteros et al., 2004; Garzón, 2015; Patiño & Sánchez, 2012; Riascos-ortiz et al., 2011; Silva & Nogueira, 2006), sin embargo, esta metodología subestima enormemente la diversidad de microorganismos (Alekklett et al., 2014) dado que se calcula que solo podemos cultivar el 1% de las especies de microorganismos en la naturaleza (Amann et al., 1995). En contraste, estos métodos siguen siendo fundamentales para comprender cómo los microorganismos interactúan entre sí y con su entorno (Preidis & Hotez, 2015). Además, los científicos en los últimos años han podido obtener una cuantificación más exacta de los microorganismos que constituyen el microbioma (Fitzpatrick et al., 2020; Li, 2015). Esto se debe principalmente a los avances recientes en técnicas moleculares como los nuevos métodos de secuenciación de ARNr 16S e ITS ADNr, los microarreglos y la metagenómica, entre otros, y a las herramientas bioinformáticas (Andreote et al., 2014) que tienen el potencial de explorar la estructura taxonómica, la abundancia relativa de microorganismos y ofrecen la oportunidad de comprender mejor, entender y promover el uso sostenible del microbioma (Field et al., 2011; Gilbert et al., 2014; Nelson, 2014).

Es a partir del desconocimiento que existe del microbioma de *B. gasipaes* y de la actual crisis fitosanitaria que vive este cultivo de gran importancia para el país que se propone como objetivo caracterizar la estructura del microbioma de hojas sanas y enfermas de una variedad del chontaduro presente en Bahía Málaga, Valle del Cauca, Colombia.

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1. *Bactris gasipaes*

2.1.1. Origen

Bactris gasipaes, es una palma distribuida de manera silvestre desde Bolivia, hasta honduras (Mora-Urpí et al., 1997). Se conoce comúnmente en Colombia como chontaduro, un nombre acuñado por los españoles basándose en las palabras quechua *rura* (huevos) y *chunta* (palma) “palma que produce huevos” (Patiño, 1992). Es una de las palmas con mayor importancia económica de la Amazonia. Pertenece a la familia Arecaceae (Palmae), una familia que comprende aproximadamente 183 géneros, y presentan una distribución en su mayoría en el trópico (Dransfield et al., 2008). El género *Bactris* incluye aproximadamente 73 especies (Henderson, 2000). La distribución de este género se da principalmente en el neotrópico, en los lugares de las selvas húmedas tropicales con mucha sombra, un hecho que explica su biogeografía (Henderson, 2000).

Las tribus autóctonas precolombinas llevaron a cabo la domesticación del chontaduro, aunque, actualmente no se sabe con certeza la ubicación inicial de la domesticación de *B. gasipaes* (Galluzzi et al., 2015). Sin embargo, varios estudios favorecen la hipótesis de que la domesticación del chontaduro comenzó en una sola área en el suroeste de la Amazonia, distribuyéndola principalmente por la cuenca amazónica, por el Chocó biogeográfico y en América Central (Galluzzi et al., 2015; Hernández-Ugalde et al., 2011; Rodrigues et al., 2005). Esta predilección de las tribus autóctonas del Amazonas por *B. gasipaes* se dio debido a que la palma de chontaduro era de fácil cultivo, requería de pocos cuidados y nutrientes; por su madera dura y flexible; y además, les servía como alimento, para la elaboración de bebidas fermentadas como la “chicha”, armas, cercas, utensilios domésticos, tejidos y diversas artesanías, entre otros (Mora-Urpí et al., 1997; Smith, 2015). Es así que a esta palma se le atribuye una gran importancia cultural, convirtiendo el cultivo del chontaduro en una tradición,

siendo fuente de mitos y el eje central de múltiples ritos espirituales en las épocas de cosecha (Patiño, 1992). Sin embargo, los colonos europeos pasaron por alto los beneficios del cultivo del chontaduro y solamente hasta el siglo XX fue que se empezó a plantar más allá de los cultivos tradicionales (Mora-Urpí et al., 1997).

2.1.2. Taxonomía y principales usos

Anatómica y morfológicamente *B. gasipaes* se caracteriza por ser una palma con un tallo espinoso solitario o cespitoso, con una altura de 4-18 m y un diámetro de 8-25 cm, 7-20 hojas compuestas en una copa plumosa, hojas rizadas, colgantes y espinosas de hasta 3 m de largo; con un raquis de 2m de largo compuesto hasta por 120 foliolos (Henderson, 2000). Las espinas de las hojas tienen de 1-3 cm de largo y frecuentemente se encuentran agrupadas o dispersas en 3 hileras sobre el pecíolo (Henderson, 2000). Las hojas del chontaduro son de gran importancia para la planta por su rol como principal órgano fotosintético, y por la responsabilidad que tiene en el incremento de biomasa de la planta (Clement & Urpí, 1983).

El fruto del chontaduro está constituido por pequeñas drupas (3-4 cm de diámetro) con un mesocarpio y un epicarpio de coloración amarilla, anaranjada o roja (Chisté & Fernandes, 2016). El mesocarpio del chontaduro es aceitoso, con un perfil de ácidos grasos saturados e insaturados similar al del aceite de oliva, con un gran potencial para uso industrial y doméstico (Arkcoll & Aguiar, 1984; Restrepo et al., 2012); es altamente calórico; con niveles importantes de fibra alimentaria; contiene todos los aminoácidos esenciales, aunque con pocos minerales (pero aporta las cantidades diarias recomendadas de potasio, selenio y cromo) (Yuyama et al., 2003). La cáscara del fruto es una fuente importante de carotenoides, principalmente de β -caroteno; un pigmento natural y compuesto bioactivo que presenta beneficios para la salud humana, que puede ser utilizado por las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria (Noronha et al., 2019). El fruto del chontaduro también es rico

en almidón. Particularmente, su contenido de amilosa indica un gran potencial para aplicaciones alimentarias (Ferrari-Felisberto et al., 2020) y no alimentarias, como en películas, revestimientos y en envases biodegradables (Neto et al., 2017; Silva et al., 2016).

A partir del procesamiento de los residuos agrícolas generados de la extracción de *B. gasipaes* se ha obtenido nanocelulosa (un biopolímero biodegradable de celulosa a escala nanométrica (Eichhorn, 2011); con usos en la industria de la confección, farmacéutica, biomédica, alimentaria, y de la construcción) (Franco et al., 2019); compuestos para aplicaciones de envasado de alimentos (se han logrado desarrollar a partir de la fibra del chontaduro, ya que es un compuesto lignocelulósico) (Pereira da Silva et al., 2017; Sá et al., 2019); y la obtención de sustratos para la siembra de plántulas de chontaduro (Sá et al., 2020).

2.1.1. Producción en Colombia

A nivel mundial, desde hace unas décadas los principales productores de *B. gasipaes* son Brasil, Colombia, Perú, Costa Rica y Ecuador (Clement et al., 2004). En el caso de Colombia los principales departamentos productores del fruto de la palma de chontaduro son Cauca y Valle del Cauca, y el principal municipio productor del fruto es El Tambo, seguido de Buenaventura (Agronet, 2016). El cultivo de la palma de chontaduro en Colombia se da principalmente en sistemas agroforestales de pequeña escala y en monocultivos, en especial para la producción del fruto, generando un incremento de diversas cadenas de valor en áreas rurales y urbanas, que vinculan al productor con el consumidor (Clement et al., 2004). Un ejemplo de estas cadenas de valor es el de la ciudad de Cali, gracias a que muchas personas en la ciudad prefieren al chontaduro como “snack”, lo que ha conllevado a la creación de diversas fuentes de trabajos informales y de desarrollo en la costa pacífica colombiana (Serrano & Guaran, 2019).

Aunque hoy en día no exista un mercado internacional para la venta de chontaduro en conserva por parte de Colombia, recientes estudios de mercadeo concluyen que el fruto y los productos derivados de la palma de *B. gasipaes* son atractivos para la exportación a países como Canadá, Países Bajos, Estados Unidos, Corea del Sur, Alemania y Suiza (Escobar, 2015; Serrano & Guaran, 2019). Lo anterior debido a los diversos beneficios nutricionales del fruto, las tendencias de consumo (preferencia hacia las frutas exóticas colombianas y el alto consumo de alimentos sostenibles y principalmente saludables) y los tratados de libre comercio existentes con estos países (Escobar, 2015; Serrano & Guaran, 2019).

En Colombia, en las últimas décadas el cultivo de chontaduro se ha considerado un sustituto prometedor para los cultivos ilícitos en el país. Por este motivo, muchos campesinos apoyados por proyectos gubernamentales y ONGs, tomaron la decisión de empezar a subsistir por medio de otros cultivos. Por ejemplo, durante 1993 en el departamento de Putumayo, se implementó el proyecto agroindustrial de palmito de chontaduro patrocinado por la ONU. Este proyecto dio lugar a la creación de cinco asociaciones de pequeños productores agropecuarios en los municipios de Puerto Asís, Puerto Caicedo, Orito, Valle del Guamuéz y San Miguel durante el año 1997 (Sanchez, 2005). Para el año 2003, estas asociaciones tenían en total 523,5 ha de cultivos de palma de chontaduro, lo que equivale al 85% de las estipuladas originalmente para llevar a cabo el proyecto. Doce años después del inicio del proyecto, el área de cultivos ilícitos fumigados en las zonas se redujo al 11% con relación al área reportada durante el 2002 (Chamorro, 2017; Ortiz, 2003; Sanchez, 2005). Además, la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), informó que durante los años 2008-2009 hubo una reducción de las plantaciones de coca en áreas donde se cultivaba normalmente la palma de chontaduro, sobre todo en la región amazónica (Caquetá) (UNODC, 2010).

Desde el 2007 hasta el 2016 en Colombia se ha observado una disminución en la producción de chontaduro. Anteriormente eran destinadas al cultivo de chontaduro, 11.058 hectáreas con una producción de 74.498 toneladas al año. En el 2016, el área de producción aumentó a 11.124, sin embargo, hubo una disminución en la producción anual, estimándose en 37.673 toneladas de chontaduro para ese año (Agronet, 2016). La falta de asistencia fitotécnica para los agricultores con respecto al manejo del cultivo y del suelo, problemas fitosanitarios (plagas del estípote, raquis foliar, hojas y frutos), son los principales causales de la pérdida de productividad durante esos años (Pardo-Locarno et al., 2014; Vargas et al., 2020).

2.1.2. Estado fitosanitario

Las enfermedades en la palma del chontaduro eran consideradas de poca importancia por falta de evidencia y porque el daño que generaban no había afectado de forma significativa el rendimiento de los cultivos (Vargas, 1999). Sin embargo, en los últimos años debido a la falta de monitoreo y sumado al mal manejo de las plantaciones en Colombia, se han generado plagas que tienen un impacto negativo en el cultivo de *B. gasipaes*. Por esto, en el 2015 el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) decretó por medio de la Resolución 1786 de mayo del 2015, a *Rhynchophorus palmarum* y un agente aún desconocido, como plagas con alto riesgo de generar epidemias, debido a que prosperan en la palma por su fácil adaptación a diversos factores ambientales (ICA, 2015).

Rhynchophorus palmarum es un gorgojo especialista en palmeras, considerado como la peor plaga para palmeras en América tropical (Löhr et al., 2015) debido a que es el vector del nematodo del anillo rojo *Bursaphelenchus cocophilus* y que genera además, un daño directo en el hospedero (Sehlschlager et al., 2002). Otras plagas que afectan principalmente el raquis en *B. gasipaes* son *Rhodoabaenus* aff. *nauradii* Kirsch y *Cholus* sp. (propicia la muerte prematura del macollo, por desnutrición y atrae otras plagas); y defoliadores como *Alurnus costatus* Ros (Pardo-Locarno et al.,

2014). Además de esto, se han identificado entre 15 y 20 diferentes fitopatógenos, entre hongos, bacterias y protozoarios que podrían reducir en forma considerable la producción de chontaduro (Arroyo et al., 2004). Por ejemplo, durante el año 2016, se realizó el primer reporte de infección de *Phytophthora palmivora* en *B. gasipaes* en Ecuador, una enfermedad que causa la pudrición de la yema (Ordoñez et al., 2016). Se cree, que esta enfermedad se transmitió principalmente por plantas como *Elaeis guineensis*, *Theobroma cacao*, *Coffea arabica*, *Ananas comosus*, entre otros, que se cultivan a las proximidades de la palma de chontaduro y que ya se habían visto afectadas por este patógeno (Ordoñez et al., 2016). En Costa Rica, se han reportado patógenos en las plantas de chontaduro como *Colletotrichum* sp. (mancha negra de las hojas); *P. palmivora*; *Drechslera setariae*, (mancha de anillo); *Lasiodiplodia theobromae* (hoja deshilachada) y *Erwinia* sp., (pudrición del tallo, quema de hojas y hoja guía) (Arroyo et al., 2004; Pérez, 2010).

2.2. Microbioma

El microbioma se define como el conjunto de genes que se encuentran en asociación con los organismos que colonizan un entorno determinado” (Boon et al., 2014), compuesto por diversas comunidades dinámicas e interactivas de microorganismos, ya sean patógenos, comensales o simbióticos (Lederberg & McCray, 2001). El término también abarca las actividades metabólicas, elementos estructurales y las condiciones ambientales del hábitat que definen a esta comunidad (Whipps et al., 1988). Por lo tanto, el microbioma generalmente incluye la microbiota (conjunto de microorganismos presentes en un lugar específico) y su material genético (Marchesi & Ravel, 2015).

En el caso de las plantas, el microbioma vegetal se refiere a las comunidades de microorganismos asociados con la planta y que pueden vivir, prosperar e interactuar en los diferentes órganos de las plantas, como por ejemplo en las hojas (Orozco-Mosqueda et al., 2018). Estos microorganismos son de gran importancia debido a que el conjunto de estos afectan la fisiología, inmunología, nutrición y

el metabolismo del hospedero (Foo et al., 2017; Ottman et al., 2012). En cuanto a la composición del microbioma de las plantas este varía según la especie (Lundberg et al., 2012; Redford et al., 2010; Turner et al., 2013), el estado de desarrollo (Chaparro et al., 2014; Lundberg et al., 2012), el ecosistema (Fierer, 2008; Fitzpatrick et al., 2020; Martiny et al., 2006) y el genotipo del hospedero (Lundberg et al., 2012).

La investigación actual del microbioma tiene como objetivo principal “revelar la composición de la microbiota, su distribución, dinámica temporal y, lo más importante, su función para el ecosistema o el hospedero” (Vorholt et al., 2017). Estos factores permiten hacer uso potencial de las diversas funciones del microbioma, enfocando su estudio hacia múltiples escalas espaciales, temporales y tróficas para comprender y predecir mejor el cambio en la comunidad de microorganismos y su función en el hospedero (Christian et al., 2015). Su investigación es de especial interés para estudios del ciclo del carbono y el cambio climático, de ecología y conservación, y también para los relacionados con la salud humana y agrícola (Gilbert et al., 2010).

Entre las múltiples funciones que se le han atribuido al microbioma, podemos destacar en el área agrícola, cómo los microbiomas pueden favorecer las funciones de la planta, contribuyendo principalmente a un mayor crecimiento y al mejoramiento del estado fitosanitario y fisiológico (Daval et al., 2020; Edwards et al., 2018; Foo et al., 2017; Santos et al., 2021; Vorholt et al., 2017). Algunas de las aplicaciones de las funciones del microbioma vegetal son, por ejemplo, la restauración y mejoramiento de ecosistemas (Foo et al., 2017).

Una de las razones por lo que se dice que el microbioma mejora el estado fitosanitario de las plantas es porque les otorga resistencia a las enfermedades y a factores ambientales. Por ejemplo, Choi et al. (2020) por medio de un análisis de la comunidad microbiana de la planta de tomate (*Solanum*

lycopersicum) encontraron que la microbiota de la rizosfera afecta la resistencia de las plantas de tomate contra la marchitez bacteriana del suelo causada por *Ralstonia solanacearum*. Por su parte, Bae et al. (2009), por medio de la inoculación del hongo endófito *Trichoderma hamatum* promovieron el crecimiento de las plántulas y redujeron la marchitez de *Theobroma cacao* (cacao) en condiciones de sequía, aumentando principalmente el contenido del agua y el tamaño de la raíz (Bae et al., 2009).

2.2.1. Microbioma de la filosfera

Aunque se conocen los beneficios del microbioma para las plantas, actualmente se sabe muy poco sobre las bacterias promotoras de crecimiento vegetal y agentes de biocontrol, aislados de la filosfera de diferentes especies vegetales, debido a que el estudio del microbioma en plantas se ha basado principalmente en el microbioma de la rizosfera (Barrera et al., 2019). La rizosfera de la planta es la zona estrecha de suelo que rodea el sistema de raíces de la planta (Gans et al., 2005), y la filosfera se refiere a la superficie aérea de la planta, como flores, polen, frutos, tallos, corteza y sobre todo, las hojas (Leveau, 2019). Las hojas se consideran un hábitat microbiano muy grande, debido a que se estima que la superficie de las hojas terrestres a nivel mundial que puede ser colonizada por microorganismos es de aproximadamente $640 \times 10^6 \text{ km}^2$, lo que posiblemente la hace uno de los hábitats más grandes de microorganismos (Morris & Kinkel, 2002).

Dentro de las características que diferencian al microbioma de la filosfera del de la rizosfera, es que en la filosfera, en la mayoría de las plantas, el microbioma dominante está compuesto más que todo por una microbiota bacteriana de aerobios estrictos, representados principalmente por miembros de las familias Methylobacteriaceae y Sphingomonadaceae (Alphaproteobacteria), teniendo un microbioma menos abundante que la rizosfera, donde se presenta una gran diversidad de anaerobios facultativos (Müller et al., 2016). Sin embargo, en la filosfera también pueden ser importantes las

arqueas, los hongos filamentosos y las levaduras; que se encuentran como epífitas en la superficie de las plantas y como endófitas dentro de los tejidos vegetales (Whipps et al., 2008).

Una característica distintiva del microbioma de la filosfera es su dinamismo, ya que se encuentra expuesto a variaciones de las condiciones ambientales (Andrews, 1992), como lo son los cambios irregulares de temperatura, aire, radiación ultravioleta, humedad relativa y humedad de las hojas (Lindow & Brandl, 2003). Además, este microbioma está influenciado por la edad de las hojas, los rasgos de las hojas, las estaciones y por la historia evolutiva de la planta (Carper, 2018; A. Redford et al., 2010; Williams et al., 2013). Por ejemplo, un estudio realizado por Carper (2018) demostró cuáles eran los principales factores abióticos y bióticos que estructuraban los microbiomas de las coníferas de la familia Pinaceae, encontrando, que el factor que más influye en las comunidades bacterianas en esas plantas son variables como el aire, el polvo y la lluvia, que a su vez dependen de la ubicación geográfica de la planta.

El microbioma foliar tiene varias funciones en la planta, ya que se considera importante en funciones claves en el ciclo de fijación de nitrógeno (Lighthart, 1997; A. Redford et al., 2010) y como una fuente de carbono y energía de gran importancia para las plantas (Vokou et al., 2012). Además, el microbioma de la filosfera también presenta varias funciones en el tratamiento y reducción de enfermedades. Por ejemplo, por medio de trasplantes de microbioma foliar se ha logrado conferir resistencia a enfermedades en plantas que se encuentran en peligro crítico en Hawái (Zahn & Amend, 2017). También con esta misma metodología, se ha logrado otorgarle resistencia a enfermedades, a plantas de interés agrícola, como es el caso de las plantas de lechuga (Williams & Marco, 2014); y de manera similar, por medio de la inoculación de hojas libres de endófitos con endófitos aislados frecuentemente de hospederos asintomáticos infectados naturalmente, se ha logrado disminuir de

manera significativa la necrosis de las hojas de plántulas de *T. cacao* cuando son inoculadas con uno de sus patógenos principales (*Phytophthora* sp.) (Arnold et al., 2003). En otro estudio, encontraron que varias especies de bacterias endófitas aislados del microbioma foliar de plantas medicinales inhibieron de manera significativa a *Phytophthora parasitica* (Iqar et al., 2021). No sólo se ha demostrado la eficacia del microbioma foliar para evitar enfermedades causadas por microorganismos, sino también, se ha demostrado que los hongos endófitos de las hojas, funcionan como un control de la herbivoría de insectos (Hartley & Gange, 2009). Todas estas funciones, indican que el microbioma foliar tiene un potencial uso para disminuir el uso de agroquímicos, y adicionalmente, aumentan la productividad de los cultivos (Barrera et al., 2019; Iqar et al., 2021).

2.2.2. *Microorganismos endófitos*

El termino endófito hace referencia a la ubicación donde se encuentra un organismo, etimológicamente *endo* significa dentro y *phyte* significa planta (Wilson, 1995). Por lo que un endófito se define como un organismo que vive dentro de una planta (Wilson, 1995). Este término se usa comúnmente para hongos, bacterias y actinomicetos que durante todo o parte de su ciclo de vida habitan dentro de los tejidos de las plantas vivas de forma asintomática (Kaul et al., 2016; Wilson, 1995). Estos microorganismos endófitos desempeñan un rol importante en la salud y patogénesis de las plantas (Yang et al., 2020), ya que los endófitos tienen una interacción íntima y a menudo simbiótica con sus anfitriones. Otro factor importante de resaltar de los endófitos, es que algunos se heredan de generación en generación (transmisión vertical), mientras que la mayoría se adquiere del medio ambiente (transmisión horizontal) (Leach et al., 2017). Aunque se desconocen muchos aspectos de la biología endofítica, los endófitos han surgido como una fuente valiosa de metabolitos novedosos (Kaul et al., 2016; Masand et al., 2015; Schulz et al., 2002) y de enzimas de importancia industrial (Carvalho et al., 2019; Kaul et al., 2016).

2.3. Estudios del microbioma de *B. gasipaes*

En los últimos años, el microbioma de las plantas ha ganado cada vez más atención (Snelders et al., 2018; Vorholt et al., 2017). Los avances recientes en la tecnología de secuenciación de nueva generación han marcado el comienzo de una era en la recopilación de información sobre las comunidades microbianas de varios hospederos. Esta estrategia ha enriquecido enormemente el conocimiento sobre la abundancia relativa de diferentes grupos filogenéticos en las comunidades microbianas de plantas y ha llevado a su reconocimiento como un factor clave para el estado fitosanitario (Berendsen et al., 2012; Vorholt et al., 2017).

Almeida et al. (2009) observaron que, en las células parenquimatosas de las hojas, y también en las raíces y los rizomas de las palmas de chontaduro, están presentes *Moraxella* sp. y *Brevibacillus* sp., y lo que se cree una cianobacteria no cultivable. Este estudio demostró que incluso los embriones extraídos de las semillas de la palma de *B. gasipaes* contenían microorganismos endosimbiontes. Veira et al. (2005) aislaron hongos endófitos del vértice del tallo de palmas de chontaduro cultivadas *in vivo* e *in vitro*, reportando hongos como *Fusarium oxysporum*, *Neotyphodium* sp. y *Epicoccum nigrum*; y en las plantas *in vivo*: *Fusarium* sp., *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum* sp., *Alternaria gaisen*, *Neotyphodium* sp. y *E. nigrum*.

Sin embargo, hasta la fecha no se encuentran estudios sobre el microbioma de *B. gasipaes* y estudios donde aislen hongos endófitos de hojas de plantas sanas y enfermas de esta palma; ya que los estudios realizados hasta el momento se centran principalmente en el aislamiento e identificación de microorganismos de la rizosfera (Ballesteros et al., 2004; Garzón, 2015; Patiño & Sánchez, 2012; Riascos-ortiz et al., 2011; Silva & Nogueira, 2006) de hongos endófitos del tallo (Esposito-Polesi et

al., 2013), de la microbiota fúngica de los brotes (Veira et al., 2005) y bacterias endófitas de la semilla (Almeida et al., 2009).

2.4. Metagenómica

La metagenómica es una herramienta utilizada para analizar la colección de genomas y genes obtenidos mediante la secuenciación rápida del ADN extraído de las muestras (Marchesi & Ravel, 2015). La metagenómica, en estudios de microbioma, se suele utilizar para obtener información genómica de microorganismos no cultivables o previamente desconocidos (Handelsman et al., 1998; Whon et al., 2021). La metagenómica se ha vuelto más útil cuando se aplica al campo de la ecología viral porque no hay genes marcadores para amplificar, como sí ocurre con los genes de ARNr 16S en bacterias (Whon et al., 2021).

2.4.1. El gen ARNr 16S

Los ARN ribosomales han sido fuente de estudios desde las últimas décadas del siglo pasado, ya que proporcionan una conexión medible entre todos los organismos, lo que ha permitido el desarrollo de una filogenia universal (Olsen et al., 1986). Existen diversas razones por la predilección de los investigadores hacia los genes ARNr, primero, porque los ARNr son moléculas esenciales y se encuentran extremadamente conservados en su estructura general (Fox et al., 1980). Al poseer este grado de conservación, ha proporcionado dianas de hibridación convenientes para clonar los genes de ARNr y para técnicas de secuenciación dirigidas por primers (Fox et al., 1980) Además, los ARNr son elementos clave de la maquinaria de síntesis de proteínas, son funcional y evolutivamente homólogos en todos los organismos (Fox et al., 1980).

Los primeros intentos de caracterizar muestras ambientales mediante el estudio del ARNr comenzaron aproximadamente en 1985 (Amann et al., 1995), un año después, se describió el uso del gen ARNr 16S para estudios en ecología de microorganismos (Olsen et al., 1986). Hasta hoy en día, esta ha sido una herramienta de gran importancia para estudios de diversidad en comunidades microbianas, principalmente por su alta resolución taxonómica, su bajo costo, sus extensas bases de datos, entre otros beneficios (Dunbar et al., 2000; Jang et al., 2021; Starke et al., 2021). Una de las razones de la alta resolución que se obtiene con el gen ARNr 16S, se debe a su longitud, una molécula de ARNr 16S bacteriana promedio tiene una longitud de 1500 nucleótidos, por lo cual, contienen información suficiente para análisis filogenéticos confiables (Amann et al., 1995; Olsen et al., 1986).

Finalmente, otra característica del gen ARNr 16S es que posee nueve regiones (V1-V9) hipervariables (menos conservadas), que son las que aportan la mayor información útil para estudios de filogenética y taxonomía (Baker et al., 2003). Todas estas características que definen la secuenciación con el gen ARNr 16S, han proporcionado una base para investigar la diversidad y la composición de microorganismos en diversos ambientes sin recurrir solamente a métodos dependientes de cultivos microbiológicos (Amann et al., 1995; Wagner, 2000).

2.4.1. Región ITS

La región del espaciador interno transcrito 1 (ITS1) del grupo ribosómico eucariótico es una región de ADN de código de barras (Schoch et al., 2012), que se encuentra en eucariotas entre los genes de ARNr 18S y 5.8S (Eberhardt, 2010). La región ITS1 fue propuesta para identificar comunidades fúngicas (Iwen et al., 2002). La región ITS tiene 550 pares de bases (pb), lo que ha permitido, una amplia cobertura taxonómica adecuada para la identificación de organismos fúngicos a nivel de especie (Usyk et al., 2017). Las regiones codificantes de ITS juegan un papel indispensable en el

desarrollo de ARNr funcional, permitiendo descifrar la inferencia filogenética a nivel de género, la delimitación de especies y la identificación de especies (Eberhardt, 2010; Iwen et al., 2002). Además, debido a que la región ITS es de múltiples copias ha permitido la amplificación a partir de muestras que contienen una baja concentración de ADN (Monard et al., 2013), lo que la hace ideal para secuenciar.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la composición del microbioma asociado a hojas de una variedad de *B. gasipaes* presente en tres localidades de Bahía Málaga, Valle del Cauca, Colombia?

4. JUSTIFICACIÓN

Dada la magnitud del hábitat de la filosfera y la relevancia de este entorno para la ecología microbiana, existe una clara necesidad de comprender la composición del microbioma foliar, en este caso asociado a *B. gasipaes*. Esto puede ayudar a comprender la participación de los microorganismos de las hojas de la palma de chontaduro en funciones importantes para el crecimiento y la salud de las plantas (Compant et al., 2019). Además, permite conocer la diversidad microbiológica asociada a nuestros ecosistemas, sirviendo como punto de partida para estudiar las interacciones entre las diferentes comunidades de plantas y su posible bioprospección. A partir del conocimiento obtenido de la caracterización del microbioma, se puede lograr la búsqueda de nuevos organismos de biocontrol (Ellis, 2017; Orozco-Mosqueda et al., 2018; Vorholt, 2012), lo que permite encontrar no solo microorganismos que reduzcan la incidencia de las enfermedades en las plantas, sino también que logren aumentar la producción agrícola empleando menos insumos de síntesis química, lo que genera prácticas agrícolas más sostenibles, racionales y seguras (Cook, 1993; Marrone, 2019; Teixeira et al., 2019; Turner, James, et al., 2013).

Actualmente en Colombia el chontaduro es considerado como una importante alternativa de cultivos alimentarios, y es objeto de estudio en diversas disciplinas, generando distintas fuentes de trabajo y de desarrollo en el país, sobre todo en el pacífico colombiano (Ramírez & Triana, 2020). Además, en los últimos años, el cultivo de chontaduro se ha considerado un sustituto prometedor para los cultivos ilícitos, especialmente en la región amazónica (Chamorro, 2017). Es por todo esto que estudios relacionados con el cultivo de chontaduro tienen un impacto positivo en el desarrollo social, económico y del medio ambiente de las comunidades que se han vinculado en diversos programas de cultivo de *B. gasipaes*.

A pesar de que el chontaduro se ve como un cultivo prometedor, éste ha tenido una problemática principal, que son los aspectos fitosanitarios (plagas del tallo, raquis foliar, hojas y frutos), lo que conlleva a implementar técnicas que son perjudiciales para el medio ambiente y la salud humana (Pardo-Locarno et al., 2014). Por estas razones, como manera de revertir esta situación es importante desarrollar estudios basados en el microbioma, teniendo en cuenta que el microbioma foliar tiene múltiples beneficios fitosanitarios. Y es así que, debido al interesante potencial y a la falta de exploración del microbioma foliar, así como a los desafíos y necesidades del cultivo de *B. gasipaes*, se plantea como objetivo de este estudio, la caracterización de la estructura del microbioma de hojas de una variedad del chontaduro presente en Bahía Málaga, Valle del Cauca, Colombia.

5. OBJETIVOS

5.1. *Objetivo General:*

Caracterizar el microbioma asociado a hojas de una variedad comercial de *B. gasipaes* (chontaduro) presente en tres localidades de Bahía Málaga, Valle del Cauca, Colombia.

5.2. *Objetivos específicos:*

1. Caracterizar las comunidades fúngicas y bacterianas asociadas a hojas de *B. gasipaes* por medio de secuenciación en Nanopore.
2. Caracterizar las comunidades endófitas de hongos y bacterias cultivables de hojas sanas y enfermas de *B. gasipaes*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. *Diseño experimental y obtención de muestras*

Para la toma de muestras, se realizó una salida de campo durante el mes de enero del 2021 a Bahía Málaga, en el departamento de Valle del Cauca, Colombia. Allí se seleccionaron tres puntos de muestreo, que tuvieran una variedad de *B. gasipaes*, los cuales, estaban creciendo de manera silvestre. La variedad no fue determinada ya que las plantas no se encontraban en época de cosecha. Se espera que en el segundo semestre del año se pueda realizar la identificación correspondiente. El primer punto de muestreo (sitio 1) se ubicó en la vereda de Mangaña (4°3'42.7"N, 77°15'6.89"O), el segundo (sitio 2) en la vereda de Miramar (4°2'38.36"N, 77°13'40.07"O) y el tercero (sitio 3) en la vereda de La Plata (4°3'14.38"N, 77°13'28.92"O). En cada punto se seleccionó un espécimen al azar de *B. gasipaes* y se escogieron de cada uno, al azar, una hoja asintomática y una sintomática, completamente desarrolladas, de tamaño y edad similar. Las hojas sintomáticas presentaban manchas cloróticas alargadas. Debido a que las hojas de *B. gasipaes* son hojas compuestas, se recolectaron muestras de un foliolo ubicado en la parte distal, otro en la proximal y otro en la parte media de cada hoja seleccionada, para un total de 18 muestras. Una vez retiradas de la planta, las hojas fueron depositadas en bolsas plásticas estériles y se conservaron en una nevera de icopor con hielo por 48 horas. Una vez en el laboratorio, las muestras fueron almacenadas a 4°C, para el posterior aislamiento de las comunidades endófitas y a -30°C para la caracterización por secuenciación del microbioma asociado.

6.2. *Caracterización de la comunidad endofítica*

6.2.1. *Aislamiento de hongos y bacterias endófitas*

Para el aislamiento de bacterias y hongos endófitos se realizó el siguiente procedimiento:

De cada muestra se tomaron segmentos de 4 cm aproximadamente y se sometieron a un proceso de desinfección que consistió en un lavado inicial con agua corriente y luego con agua destilada estéril (ADE). Posteriormente los segmentos fueron sumergidos en etanol al 70% por 3 minutos al cabo de los cuales se realizó un lavado con ADE. Se lavaron luego con una solución de Hipoclorito de sodio al 3% por 3 minutos y se les retiró el exceso con 4 lavados con ADE. Los segmentos se secaron con papel absorbente estéril y se realizó la prueba de impronta con cada uno de ellos en PDA a $\frac{1}{2}$ de la concentración,. A partir de cada segmento, se obtuvieron fragmentos de $3 \times 3 \text{ mm}^2$ los cuales fueron sembrados en medio PDA a la mitad de la concentración (PDA $\frac{1}{2}$), con el fin de inducir la producción de estructuras de reproducción (SENASICA, 2018) e incubados a 24° C . Las cajas se revisaron diariamente y a medida que se evidenciaba crecimiento microbiano se realizaron los correspondientes subcultivos en PDA a $\frac{1}{2}$ de la concentración, hasta obtener los aislamientos puros.

6.2.2. Descripción macroscópica y microscópica de hongos endófitos

Luego de obtener aislamientos puros de hongos endófitos en medio PDA, se realizó la descripción macroscópica y microscópica de cada morfotipo obtenido. Macroscópicamente se describió el color en el anverso y reverso de la colonia y si liberó pigmento al medio; el tamaño de la colonia y la apariencia o textura. Para la observación microscópica, se realizaron montajes de cada morfotipo empleando azul de lactofenol y se observaron en microscopio óptico, describiendo las características del micelio; si era delgado o ancho, hialino o dematiáceo, septado o escasamente septado. Adicionalmente, se realizó una descripción de las estructuras reproductivas en caso de estar presentes.

De acuerdo a las características macro y microscópicas se definieron morfotipos que posteriormente serán identificados de manera tradicional por medio de claves dicotómicas, así como empleando marcadores moleculares.

6.3. Caracterización del microbioma

6.3.1. Liofilización de las muestras

Para poder realizar la extracción del ADN total de cada una de las muestras se llevó a cabo un proceso de liofilización, ya que tener las muestras liofilizadas facilita la maceración. Las muestras se dispusieron en tubos Falcon® de 50 ml y la boca del tubo se selló con papel parafinado, al cual se le realizaron agujeros (para permitir la salida del agua durante el proceso de liofilización). Se congelaron previamente a -80°C durante 24 horas, debido a que en la liofilización no ocurre la evaporación del agua a partir del estado líquido, sino la sublimación del hielo. Las muestras fueron liofilizadas en el liofilizador FreeZone (Labconco, cat. No 7740020) durante 24 horas a -49° C y 0,150~0,125 mBar.

6.3.2. Extracción de ADN

Se extrajo el ADN genómico utilizando el kit DNeasy Plant Mini™ (Qiagen, cat. No. 69104) siguiendo las instrucciones del fabricante como se describe a continuación. Primero, se pesaron 100 mg de la muestra previamente liofilizada y se maceraron con nitrógeno líquido en un mortero hasta obtener un polvo fino. El polvo obtenido se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se dejó evaporar el nitrógeno líquido.

Posteriormente, se le agregaron 400 µl de Buffer AP1 y 4 µl de Solución stock de RNasa A y se agitó en un vórtex hasta que no se observaran grumos de tejido. Después, para lisar la mezcla, se

incubó en baño maría durante 10 minutos a 65° C y se mezcló cada 3 minutos por medio de inversión del tubo. Una vez incubada la mezcla, se añadieron 130 µl de Buffer P3 al lisado, se homogenizó y se dejó durante 5 minutos en hielo. Tras concluir el tiempo de incubación, se centrifugó el lisado durante 6 minutos a 13.000 rpm (todas las centrifugaciones del procedimiento se realizaron a temperatura ambiente).

Luego de centrifugar el lisado, se transfirió el sobrenadante generado a la columna *spin* QIAshredder Mini colocada en un tubo de colección de 2 ml y se centrifugó durante 3 minutos a 13.000 rpm. Después, se transfirió el filtrado a un tubo nuevo de centrifugación de 1.5 ml sin alterar el sedimento de desechos celulares y se añadieron 1,5 volúmenes de Buffer AW1 al lisado aclarado y se mezcló.

De la mezcla resultante entre el Buffer AW1 y el lisado aclarado se tomaron 650 µl (incluido cualquier precipitado que pudo haberse formado) y se añadieron a la columna de centrifugación DNeasy Mini colocada en un tubo de colección de 2 ml. Después, se centrifugó durante 1 minuto a 8000 rpm y se desechó el filtrado. Nuevamente, se centrifugó durante 1 minuto a 8000 rpm con la muestra restante.

Posterior a la centrifugación se colocó la columna de centrifugación DNeasy Mini en un nuevo tubo de colección de 2 ml, se le agregó 500 µl de Buffer AW2 y se centrifugó durante 1 minuto a 8000 rpm. Una vez centrifugado, se desechó el filtrado y se añadió nuevamente 500 µl de Buffer AW2 a la columna de centrifugación DNeasy Mini y se centrifugó durante 2 minutos a 14.000 rpm para secar la membrana.

Finalmente, para eluir el ADN, se transfirió la columna de centrifugación DNeasy Mini a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se adicionaron 200 μ l de Buffer AE directamente sobre la membrana DNeasy. Luego, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y terminado el tiempo se centrifugó durante 1 minuto a 8000 rpm para eluir. En un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml se repitió este último paso y se mezclaron las dos eluciones en un solo tubo. Las muestras fueron refrigeradas durante una semana a 4° C, ya que el ADN es estable durante varias semanas cuando se almacena a 2-8 ° C en Buffer AE.

6.3.3. Control de calidad del ADN por fluorometría y por electroforesis en gel de agarosa

Para determinar el tamaño, distribución e integridad de los extractos de ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se cargaron 2 μ L de cada muestra de ADN extraído y se utilizó como marcador de peso molecular el DNA Ladder 100bp+3k (Smobio). Los geles se corrieron en tampón TAE durante 60 min a 100 V. Después de la electroforesis, las bandas obtenidas se observaron utilizando un sistema de documentación de imágenes. La cantidad y pureza de los ADN se determinaron midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm usando un espectrofotómetro (Nanodrop-2000, Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington, EE. UU.) de acuerdo al protocolo del fabricante. A las muestras que no cumplieron con los requisitos mínimos para proceder a la preparación de la genoteca se les repitió la extracción.

6.3.4. Secuenciación de ADN de alto rendimiento

Para estudiar las comunidades microbianas presentes en cada muestra se realizaron amplificaciones del ARNr 16S para las comunidades bacterianas y la región ITS ADNr (ITS 1) para las comunidades fúngicas. Se seleccionan estas regiones ya que su secuenciación es ampliamente empleada para

estudiar la composición, organización y patrones espacio-temporales de las comunidades microbianas (Olsen et al., 1986; Sinclair et al., 2015).

Las secuenciaciones fueron realizadas por el Centro de Secuenciación de la Universidad de los Andes (GenCore, Bogotá, Colombia). El equipo de secuenciación realizó la preparación de las librerías y la secuenciación para bacterias mediante tecnología Nanopore en MinION™ de Oxford Nanopore Technologies (ONT) usando el 16S Barcoding Kit™ (ONT), donde se amplificó el ADN mediante PCR utilizando primers 16s específicos 27F y 1492R que contienen códigos de barras.

La secuenciación de las comunidades fúngicas se encuentra en proceso debido a las circunstancias particulares que se presentaron durante el semestre. Para el caso de los hongos, se amplificará empleando los primers ITS1f-Kyo y se procesarán mediante tecnología Nanopore en MinION™ (ONT). La preparación de la biblioteca se hará siguiendo los protocolos sugeridos por el fabricante (Mafune et al., 2020).

6.3.5. *Análisis Bioinformáticos*

Una vez finalizada la secuenciación, los datos en formato de archivo FAST5 se procesaron mediante el software Guppy™ 4.4.1 de ONT (Heikema et al., 2020). Debido a que los datos en formato FAST5, son datos de señales eléctricas sin procesar, se utiliza este software para realizar el llamado de las bases generando un archivo formato FASTQ. Sin embargo, este paso se lleva a cabo como una aproximación preliminar y rápida para el procesamiento de los datos (Anexo 1).

Una vez llamadas las bases por Guppy, se analizaron los datos obtenidos por el flujo de trabajo Fastq16S (2021.03.05) de EPI2ME (ONT) (Heikema et al., 2020; Helmersen & Aamot, 2020; J. Sakai et al., 2019). EPI2ME es una herramienta con interfaz web, incluida en WIMP (What's In My Pot)

para la clasificación taxonómica de las lecturas (Juul et al., 2015). Esta plataforma bioinformática tiene la ventaja de realizar la demultiplexación y la clasificación de secuencias de manera sencilla (Helmersen & Aamot, 2020). Debido a que los pasos anteriores corresponden a un procesamiento preliminar, se optó por un análisis bioinformático más robusto, adicional al proporcionado por EPI2ME.

Los datos crudos, en formato FAST5, se transfirieron a una máquina virtual de la Universidad de los Andes, con las siguientes características: 12 núcleos, 112 GB de RAM, GPU y 500 GB de almacenamiento. En esta máquina se corrió Guppy™ por línea de comandos, añadiendo la información de las celdas y los kits empleados para la realización de las librerías. Una vez obtenidos los FASTQ se realizó un control de calidad de los datos para remover las lecturas de baja calidad y las lecturas cortas por medio del script de Python NanoFilt (Lee et al., 2021). El parámetro que utilizamos para el filtrado, fue en función de la calidad mínima de la lectura (-q 10). El software toma el puntaje de calidad Phred promedio de toda la lectura y lo acepta o rechaza en función de un punto de corte de puntaje de calidad promedio elegido por el usuario (-q 10) (De Coster et al., 2018; Loman & Quinlan, 2014; Rang et al., 2018).

Una vez filtradas las lecturas, se realizó el demultiplexado utilizando el software qcat v1.1.0 (<https://github.com/nanoporetech/qcat>), creado específicamente para demultiplexar lecturas indexadas con los kits de códigos de barras de ONT (Seah et al., 2020). Durante este proceso se hace la reclasificación de las lecturas y se remueven los barcodes.

Finalmente, para realizar la identificación de los organismos presentes en cada una de las muestras se utilizó EzTaxon, dentro de la plataforma EzBioCloud que incluye una base de datos compuesta por 61700 especies y 62362 conjuntos de genomas completos que se identificaron taxonómicamente

a nivel de género, especie y subespecie de *Bacteria* y *Archaea*. Esta base de datos incluye información de genomas y secuencias de ARNr 16S de alta calidad (Iqrar et al., 2021; Vishal et al., 2020) (Yoon et al., 2017).

6.4. Análisis de datos

Tanto para comunidades fúngicas como para comunidades bacterianas, la riqueza se evaluó entre los diferentes puntos de muestreo y la porción de la muestra. Para estimar las diversidades α y β de las comunidades bacterianas se calcularon los índices de Shannon y de disimilitud de Bray-Curtis. Todos los análisis se realizaron en el software estadístico R.

7. RESULTADOS

7.1. Comunidades endófitas

De las 18 muestras de hojas de *B. gasipaes*, se obtuvieron 72 aislamientos fúngicos, 41 de las muestras asintomáticas y 31 de las muestras sintomáticas (Tabla 1). No se logró obtener aislamientos bacterianos. Los aislamientos fúngicos teniendo en cuenta tanto las muestras sintomáticas y asintomáticas correspondieron a 48 morfotipos, los cuales fueron definidos por sus características morfológicas, tanto macro como microscópicas. De estos, se lograron identificar hasta género 5 (Anexo 2); *Fusarium* sp. (morfotipo 1); *Epicoccum* sp. (morfotipo 4); *Pestalotia* sp. (morfotipo 13) y *Trichoderma* sp. (morfotipo 27 y 29) (Anexo 2).

Tabla 1. Número de aislamientos (A) y de morfotipos (M) de hongos endófitos obtenidos por condición de muestra de hojas de *B. gasipaes* y ubicación de la hoja

Ubicación de la hoja	Sanas		Enfermas	
	A	M	A	M
Proximal	11	7	23	23
Media	17	12	6	6
Distal	13	6	2	2
Total	41	25	31	31

Condición (Sana/Enferma); Ubicación en la hoja (Proximal, Media y Distal). Los aislamientos obtenidos se agruparon en morfotipos de acuerdo a las características morfológicas observadas.

De los 48 morfotipos de hongos endófitos aislados en este estudio (Anexo 2) sólo 9 se encontraron representados por más de un aislamiento (Figura 1). Los morfotipos de hongos endófitos más frecuentemente aislados independientemente de la condición de la muestra fueron *Fusarium* sp. (morfotipo 1), el morfotipo 2 y 3, con una frecuencia del 8% cada uno (Figura 1). Los morfotipos 4 (*Epicoccum* sp.), 2 y 3 fueron aislados tanto de muestras sanas como de enfermas (Anexo 3).

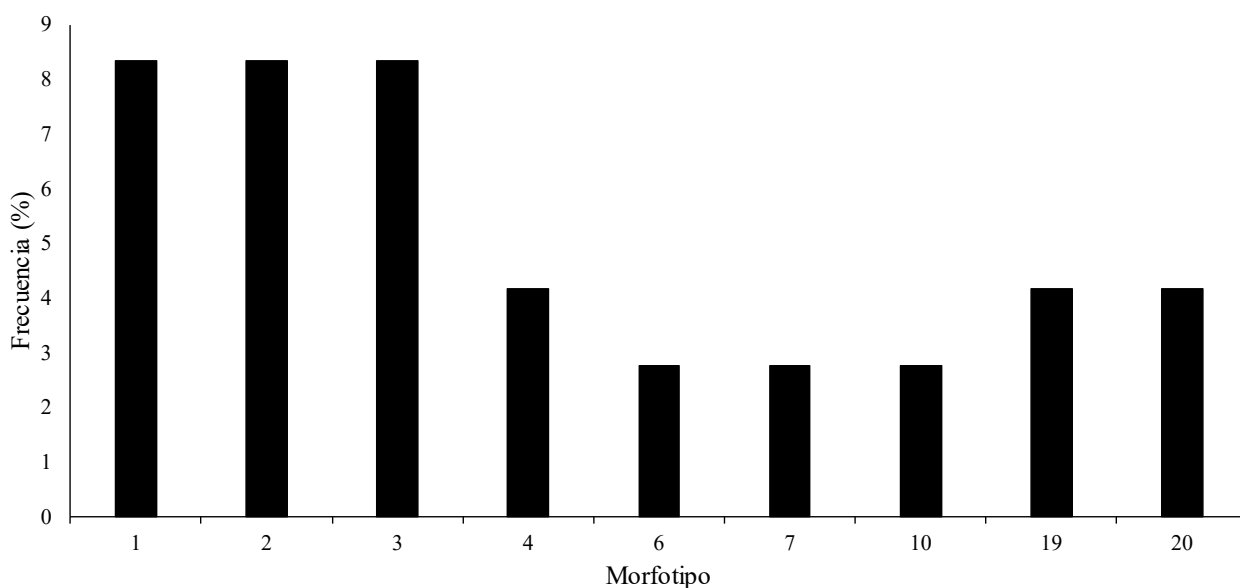


Figura 1. Frecuencia porcentual de los morfotipos observados más de una vez en muestras sanas y enfermas de hojas de *Bactris gasipaes*.

El número de morfotipos fúngicos endófitos teniendo en cuenta solo la condición de la hoja fue mayor en el caso de las muestras enfermas (28) comparados con los de las muestras sanas (20). De la misma manera, la riqueza de morfotipos, teniendo en cuenta tanto la condición de la hoja y la ubicación de la hoja, fue mayor en las muestras enfermas (31) y menor en las muestras sanas (25) (Tabla 1; Figura 2; Anexo 3). La razón de que haya un mayor número de morfotipos en este último caso, se debe a que se comparten morfotipos al evaluar la riqueza según la condición y la ubicación

de la hoja, por ejemplo, el caso del morfotipo 3, que se encuentra presente tanto en las muestras sana parte distal, sana parte media y sana proximal (Anexo 3).

De los 31 morfotipos obtenidos a partir de las muestras enfermas, la mayoría, 23, correspondieron a la parte proximal, 6 a la parte media y 2 a la parte distal (Figura 2). En el caso de las plantas sanas, se obtuvo mayor riqueza de morfotipos en la parte media (12).

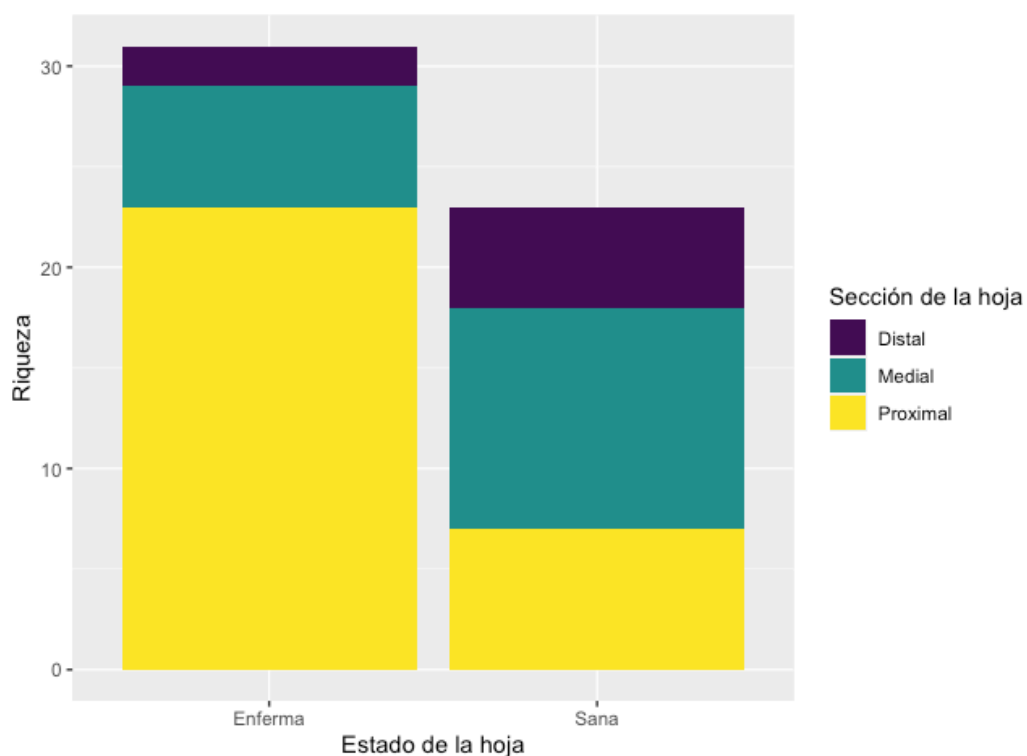


Figura 2. Riqueza de morfotipos de hongos endófitos de acuerdo a la condición de la hoja (Sana / Enferma) y a la ubicación en la hoja de *Bactris gasipaes* (Distal, Media, Proximal).

7.2. Caracterización del Microbioma

7.2.1. Extracción del ADN

De las 18 muestras extraídas de hojas asintomáticas (9) y hojas sintomáticas (9) de *B. gasipaes*, 13 de las muestras cumplieron con los criterios de calidad para su posterior secuenciación, es decir, no se encontraban degradadas y la cantidad fue suficiente para la preparación de la genoteca. Las muestras 11, 12, 13, 15 y 16, se encontraban levemente degradadas y la 14, estaba completamente degradada (Anexo 4), por lo que se les repitió la extracción. Para todas las muestras se obtuvo la concentración mínima solicitada por el centro de secuenciación, 10 ng/μL (Tabla 2).

Tabla 2. Evaluación de la calidad del ADN obtenido a partir de las muestras de hojas de *Bactris gasipaes*, en términos de concentración (ng/μL) y pureza (relación de la absorbancia a 260 nm y 280 nm).

ID Muestra	Concentración (ng/μL)	Relación 260/280
ED2-1	149,3	1,78
EP2-2	55,7	1,79
SP2-3	66,2	1,8
EM2-4	46	1,8
SD1-5	50,6	1,8
EM1-6	40,3	1,76
SP1-7	126,9	1,81
SM1-8	70	1,81
EP1-9	124,3	1,81
ED1-10	101,8	1,79
EP3-11	141,2	1,8
SM3-12	168,6	1,82
SP3-13	108,9	1,81
SD3-14	241,2	1,82

ED3-15	98,3	1,8
EM3-16	207,8	1,8
SM2-17	77,5	1,81
SD2-18	108,8	1,8

Usando un espectrofotómetro (*Nanodrop-2000*, *Thermo Fisher Scientific Inc*, *Wilmington, EE.UU.*). El ID de cada muestra corresponde a: Sana (S), Enferma (E), Distal (D), Proximal (P), Media (M), el primer número corresponde al punto de muestreo y el segundo al número de la muestra.

7.2.1. Resultados secuenciación

Debido a las circunstancias particulares que se presentaron durante el semestre sólo fue posible obtener los resultados para las comunidades bacterianas asociadas a las hojas sanas de *Bactris gasipaes* (n=9). La caracterización de las comunidades bacterianas de las muestras con síntomas y la secuenciación para estimar la composición de las comunidades fúngicas se encuentra en proceso.

En cuanto al análisis de las secuencias de bacterias en muestras sanas, utilizando el *pipeline* preliminar sugerido por ONT, se lograron identificar un total de 28 filos bacterianos. Independientemente de la muestra, la mayor abundancia de lecturas correspondió a miembros del filo Cyanobacteria, seguido por los filos Firmicutes y Proteobacteria (Figura 3, Anexo 5). Los demás filos que se lograron identificar se presentaron un número mucho menor de lecturas. En general, todos los filos se recuperaron en los tres sitios de muestreo, a excepción de Armatimonadetes e Ignavibacteriae, que se recuperaron únicamente de un sitio (1 y 3 respectivamente). De igual forma, los filos Balneolaeota, Calditrichaeota, Chlorobi, Lentisphaerae y Nitrospirae se encontraron sólo en dos de los 3 sitios de muestreo.

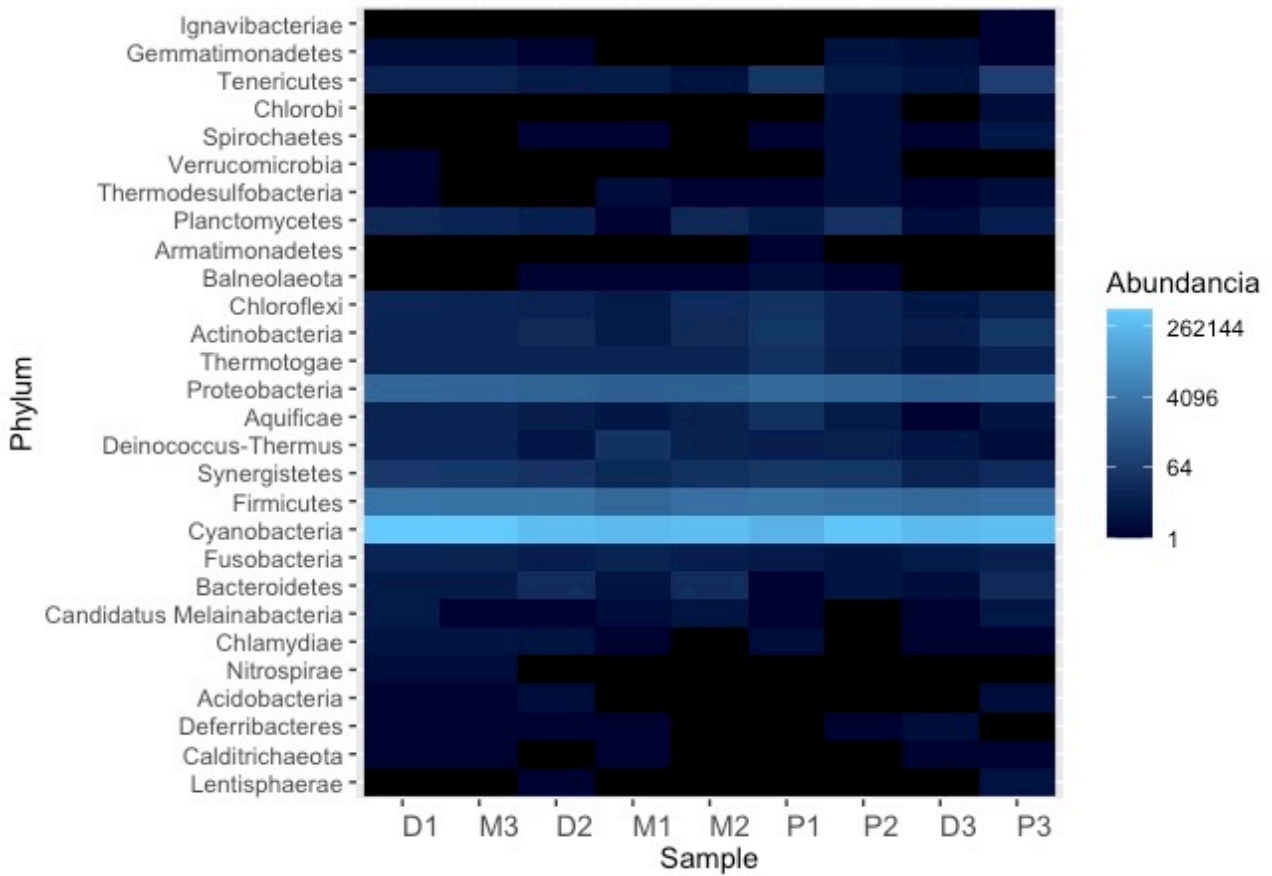


Figura 3. Abundancia de los Phyla bacterianos obtenidos a partir de muestras de hojas sanas de *Bactris gasipaes*. Sitios de muestreo: Mangaña (1), Miramar (2) y La Plata (3) y posición de la hoja (D: distal; M: medial y P: proximal).

Con relación al sitio de muestreo, las comunidades bacterianas que presentaron la mayor diversidad fueron las que se encontraron en el sitio de muestreo 1 (Shannon = 0,068) (Figura 4), especialmente aquellas que se encontraron en la parte proximal de las hojas (Shannon = 0,14) (Anexo 8). Sin embargo, en general la diversidad fue baja en todos los sitios de muestreo según el índice de Shannon y no se encontraron diferencias en la diversidad de los 3 puntos de muestreo (Figura 4; Anexo 9).

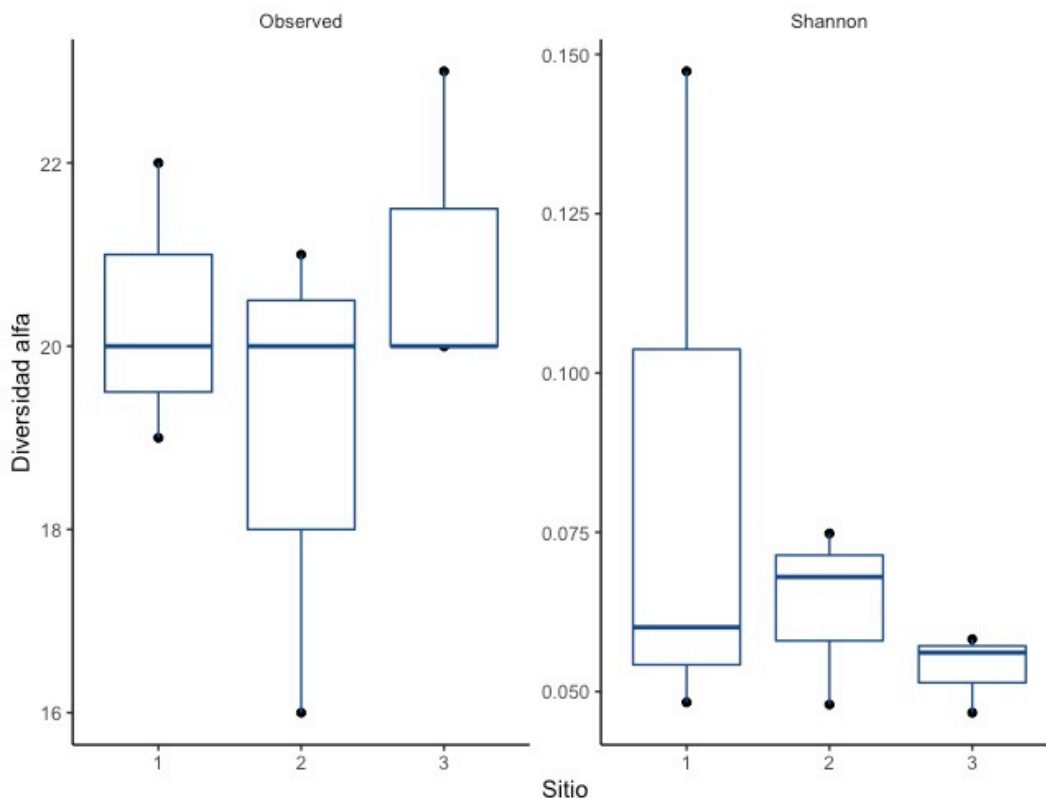


Figura 4. Diversidad alfa (Riqueza: Phyla observados, izquierda e Índice de Shannon, derecha) de las comunidades bacterianas obtenidas a partir de muestras de hojas sanas de *Bactris gasipaes* en los tres sitios de muestreo Mangaña (1), Miramar (2) y La Plata (3). El Índice de Shannon expresa la heterogeneidad de las comunidades en cada sitio de muestreo teniendo en cuenta el número de los Phyla presentes y su abundancia relativa. Valores cercanos a 0, indican que la diversidad es baja.

Por último, con el objetivo de evaluar si la composición de las comunidades bacterianas estaba determinada por el sitio de muestreo y por el tipo de muestra, se realizó un PCoA, encontrando, que las comunidades bacterianas no se vieron influidas por los lugares de muestreo, ni por la sección de la hoja. No se observa en la figura que haya un agrupamiento por el sitio de muestreo (colores) o por la posición en la hoja de *Bactris gasipaes* (Figura 5).

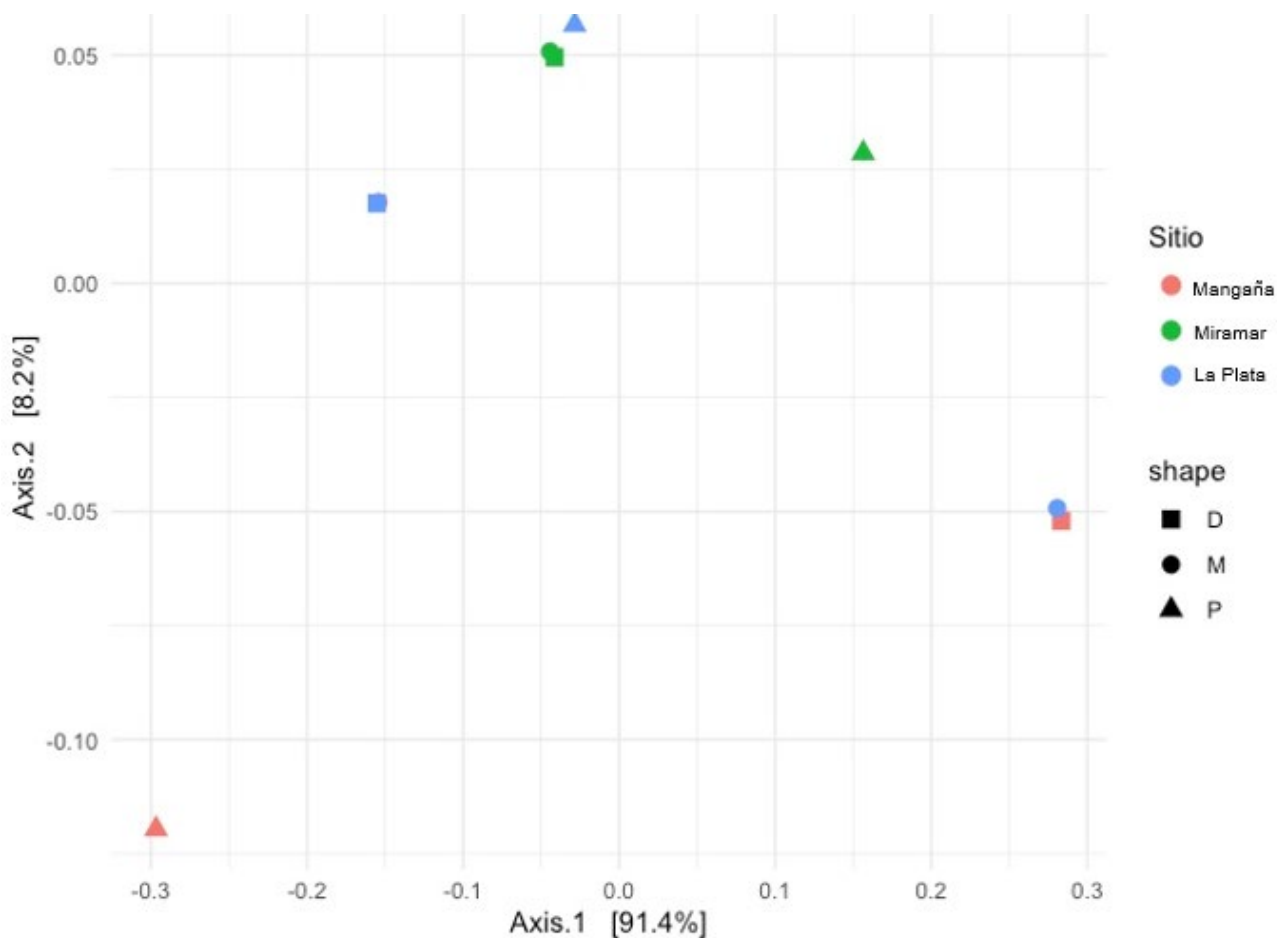


Figura 5. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las comunidades bacterianas obtenidas en los tres tipos de muestras (D: distal, M: media y P: proximal) y los tres sitios de muestreos: Mangaña (1), Miramar (2) y La Plata (3).

EPI2ME realiza el reconocimiento de los *barcodes* asociados a las lecturas cuando está procesando los datos. El archivo de entrada corresponde a la carpeta con la totalidad de lecturas clasificadas por Guppy para cada barcode. No obstante, el clasificador de EPI2ME evidenció que algunas lecturas no fueron clasificadas. Por lo anterior, se decidió realizar un pipeline más robusto. Los resultados de este proceso indicaron que es necesario realizar una limpieza más exhaustiva por calidad de lecturas y no

fue posible obtener resultados en EzTaxon. A pesar de que el filtrado por NanoFilt fue correcto, se deben utilizar algoritmos como Kraken2 que permitan descartar aquellas lecturas que no correspondan con los organismos de interés, como son lecturas que correspondan a la planta, antes de demultiplexar con qcat.

8. DISCUSIÓN

8.1. Hongos endófitos

No se lograron aislar bacterias endófitas de hojas sintomáticas o asintomáticas. Esto pudo deberse al tipo de metodología utilizada para el aislamiento, el cual favoreció el crecimiento de hongos endófitos. Con el fin de favorecer también el aislamiento de bacterias se podría haber macerado los fragmentos de hojas una vez desinfectados (Al-Nadabi et al., 2021; De Souza et al., 2021; Meziani et al., 2019) y haber sembrado posteriormente el macerado en medios específicos para bacterias como Agar Nutritivo (Al-Nadabi et al., 2021; Salo & Novero, 2020), Agar Müller Hinton, y Agar Tripticosa de Soja (Siala et al., 2016).

En el presente estudio se obtuvo un total de 48 morfotipos. El número de morfotipos de hongos endófitos fue mayor en el caso de las muestras enfermas en comparación con las muestras sanas. En un estudio previo, sucedió algo similar, pero con bacterias endófitas en plantas de *Agave sisalana* (De Souza et al., 2021). Esto posiblemente se debe a la capacidad que tienen las hojas sanas de controlar la diversidad de la microbiota epífita y endófitas que las coloniza, lo que limita el crecimiento de tanto de fitopatógenos como de endófitos (Zamioudis & Pieterse, 2012). En el caso de las hojas sintomáticas, tienden a perder su capacidad de limitar el crecimiento de microorganismos, lo que incrementa considerablemente la diversidad de microorganismos en estas hojas (Cooper et al., 2008; Manching et al., 2014).

Cinco morfotipos de los 48 que pudieron ser aislados como endófitos de hojas de *Bactris gasipaes*, fueron determinados a nivel de género. Los cinco pertenecientes al Phylum Ascomycota.

De estos cinco, *Fusarium* sp. ha sido reportado como un hongo fitopatógeno responsable de la muerte de *Bactris gasipaes* a causa de la pudrición del sistema radicular o caída de la parte aérea (Riascos-Ortiz et al., 2011; Veira et al., 2005). Así mismo, Pizzinatto et al. (2001) en Brasil, reportaron cinco

especies fitopatógenas de *Fusarium*, responsables de la muerte de plantas de *B. gasipaes* en vivero y en plantación (Pizzinatto et al., 2001). Sin embargo, en este estudio solo se identificó *Fusarium* sp. (morfotipo 1) en las muestras de plantas sanas. Este hecho puede deberse a la diversidad ecológica y genética de las especies del género, más de 70 especies (Summerell & Leslie, 2011), dentro de las que se encuentran especies endófitas. Toghueo (2020) recopiló evidencia del potencial bioactivo de los metabolitos producidos por endófitos del género *Fusarium*, con un potencial uso como biocontrol frente a patógenos vegetales y nemátodos (Toghueo, 2020).

Uno de los morfotipos que se encontraban tanto en las muestras sanas como en las enfermas, fue *Epicoccum* sp., un género que se sabe causa varias enfermedades en las plantas y, que se encuentra en la filósfera de las plantas (Melgarejo et al., 1985; Taguam et al., 2021). *Epicoccum nigrum* ha sido reportado como un hongo capaz de establecer interacciones endófitas con *B. gasipaes* (Veira et al., 2005). Veira et al. (2005) encontraron que esta especie tiene un gran potencial en el control biológico de insectos en la palma de chontaduro. Por ende, se podría considerar su uso como agente de control biológico para plagas como *Rhynchophorus palmarum* y el defoliador *Alurnus costatus*, que han afectado el cultivo de la palma de chontaduro en Colombia, evaluando previamente la actividad antagonica de *Epicoccum* sp contra estas plagas y la producción de enzimas que podrían proteger a la planta de la herbivoría de los insectos (Quesada-Moraga et al., 2014). Sin embargo, es importante identificar hasta especie los morfotipos presentes tanto en hojas sanas y en hojas enfermas, ya que no se puede olvidar que varias especies de este género son patógenas en muchas especies de plantas, y que generan en la mayoría marchitamiento y formación de lesiones en las hojas (Taguam et al., 2021).

En el estudio de Riascos-ortiz et al. (2011), un género de hongos fue el más dominante en la rizosfera de la palma de chontaduro, *Trichoderma* (Harman et al., 2004; Riascos-ortiz et al., 2011).

En este estudio este género correspondió a dos morfotipos encontrados en muestras enfermas. El género *Trichoderma* es común para diversas especies vegetales, actuando como antagonista de otros microorganismos, y se encuentra entre los hongos que más frecuentemente se aísla del suelo y en raíces (Vinale et al., 2008). Además, protege a las plantas de enfermedades debido a su rol antagonista contra muchos hongos fitopatógenos (Harman et al., 2004). Es posible que este género característico de la rizosfera se haya encontrado en hojas, debido a que parte de las comunidades de la filosfera, tanto epífitas como endófitas, al parecer se originan en el suelo (Vorholt, 2012; Zarraonaindia et al., 2015).

El género *Pestalotia* ha sido reportado como un microorganismo patógeno que ha perjudicado a la palma de chontaduro, generando daños en los cultivos en el Valle del Cauca. Es transmitido por el insecto *Demotispa* sp., conocido como raspador de hojas. Este insecto se aloja, alimenta y reproduce en los folíolos plegados (Peña-Rojas, 1996). Sin embargo, *Pestalotia* también se ha reportado como un género de hongos con propiedades antibacterianas y antioxidantes (Raheman et al., 2011; Verma et al., 2016).

Con el fin de completar la caracterización de la comunidad endofítica asociada a las hojas de *B. gasipaes*, se realizará la identificación molecular de los 48 morfotipos, empleando inicialmente el barcode establecido para hongos, la región ITS (Schoch et al., 2012).

8.2. Comunidades bacterianas asociadas a hojas sanas de *Bactris gasipaes*.

La diversidad de bacterias presentes en el cultivo de la palma de chontaduro se ha explorado principalmente utilizando enfoques dependientes del cultivo (Almeida et al., 2009). Además, ninguno de los estudios disponibles se ha centrado en el microhábitat de la filosfera (Patiño & Sánchez, 2012).

En el presente estudio realizamos el análisis de las comunidades bacterianas presentes en las hojas sanas de *Bactris gasipaes* en un ambiente silvestre en tres sitios de Bahía Málaga, Valle del Cauca, Colombia por medio de enfoques moleculares.

De los 28 filos bacterianos que componen la microbiota bacteriana de las hojas del chontaduro de este estudio, el más abundante correspondió al filo Cyanobacteria, lo cual es poco común en el microbioma de la filosfera, ya que en la mayoría de las plantas, el microbioma dominante de la filosfera se compone más que todo por una comunidad bacteriana de aerobios estrictos, representados principalmente por miembros del Phylum Proteobacteria, especialmente de las familias Methylobacteriaceae y Sphingomonadaceae (Alphaproteobacteria) (Müller et al., 2016), aunque en otros estudios de microbioma de plantas, los filos Firmicutes y Proteobacteria son los más representativos (Carrión et al., 2020; Flores-Núñez et al., 2020; Mercado, 2018; Zhang et al., 2019). En nuestro caso estos dos grupos bacterianos se hallaron en segundo y tercer lugar, respectivamente.

Las cianobacterias desempeñan un papel importante en el suministro de carbono, nitrógeno, fitohormonas y polisacáridos (Priya et al., 2015; Venkatachalam et al., 2016). Este grupo de bacterias se ha reportado en la filosfera del mangle (Rigonato et al., 2012) y en vegetación de selvas tropicales (Herrmann et al., 2021). Aunque esto no significa que las cianobacterias sean habitantes comunes en las hojas de los árboles, ya que varios autores coinciden en el hecho de que son habitantes casi ausentes o de poca frecuencia en las hojas (Flores-Núñez et al., 2020; Redford et al., 2010).

Asimismo, esta composición inusual de las comunidades bacterianas asociadas con las hojas de chontaduro también podría ser el resultado de una inadecuada clasificación taxonómica de las lecturas, atribuible a la falta de limpieza de las secuencias. Sin embargo, junto con las muestras de

este proyecto se corrieron muestras de un origen completamente distinto, las cuales se sometieron al mismo flujo de trabajo y las comunidades bacterianas encontradas presentaron una composición completamente diferente, lo que sugiere que los resultados obtenidos no están sesgados por un error de procedimiento.

Sin embargo, es posible que un gran porcentaje de las lecturas atribuidas a cianobacterias en este estudio sean contaminantes de la planta, debido a tres principales motivos. Primero, el kit de extracción de ADN utilizado en este estudio, permite obtener tanto ADN nuclear, mitocondrial y de cloroplastos. Segundo, los primers que se usaron, 27f / 1492r, también amplifican ADNr 16S del cloroplasto y la mitocondria (Lane, 1991; Yu et al., 2013). No obstante, esta es una limitación que afecta en general los primers universales 16S (Lucaciu et al., 2019; Rastogi et al., 2010; Sakai et al., 2004) y que constituye un tema de gran importancia para los estudios de microbiomas asociados a plantas (Lucaciu et al., 2019). Por fortuna, la amplificación no deseada del ADN de organelos, se puede superar mediante la selección de los primers, por ejemplo, se han diseñado primers que excluyen eficazmente la interferencia del ADN del cloroplasto y el ADN, cómo lo es el 799f (Sun et al., 2008), que combinado con el 1391R, ha alcanzado coberturas de hasta el 74,5% de todas las secuencias de ARNr 16S y amplifica sólo el 0,8% de las secuencias clasificadas como cloroplasto (Lucaciu et al., 2019).

Por último, el tercer motivo, es el origen evolutivo de los cloroplastos (Giovannoni et al., 1988; Martin & Kowallik, 1999; Sato, 2020). Por este motivo, es probable que una gran parte de las lecturas que en este estudio fueron clasificadas como pertenecientes al filo Cyanobacteria, realmente correspondan a cloroplastos.

De igual importancia, uno de los factores que influyen en la composición del microbioma de la filósfera, son las condiciones ambientales asociadas con ubicaciones geográficas particulares (Noble et al., 2020). Debido a las características de las zonas de muestreo, lugares muy cercanos a las costas y con elevadas precipitaciones, se puede pensar que estas condiciones hayan estructurado la composición de la microbiota bacteriana en nuestro estudio. Dado que los tres sitios de muestreo no estaban muy alejados y seguramente compartían las mismas condiciones ambientales se explicaría por qué presentan comunidades bacterianas similares, todas dominadas por Cyanobacteria. Por lo que sería interesante evaluar cómo es la composición del microbioma foliar de *Bactris gasipaes* en otra región geográfica, por ejemplo, en el Guaviare donde las condiciones ambientales son diferentes.

Por otro lado, en cuanto a la composición de las comunidades bacterianas de acuerdo con la posición en la hoja de *B. gasipaes*, se mantuvo el mismo patrón de dominancia del filo Cyanobacteria, independientemente de la posición de la comunidad en la hoja. Esto podría ser el efecto de las condiciones ambientales, como se mencionó anteriormente o a que la escala representada por la posición distal, medial, proximal no es la adecuada para permitir que se observen patrones espaciales entre las comunidades bacterianas asociadas.

9. CONCLUSIONES

El presente estudio ha sido pionero en la exploración de la diversidad de la microbiota bacteriana foliar de la palma de chontaduro, por medio de tecnologías de última generación de secuenciación empleando Nanopore.

Se logró establecer que las comunidades bacterianas presentes en la microbiota foliar de las palmas de chontaduro evaluadas en este estudio, estuvieron representadas por 28 filos, principalmente por el filo Cyanobacteria, seguido por los filos Firmicutes y Proteobacteria.

De manera preliminar, la posición en la hoja y las tres localidades evaluadas no parecieron afectar la composición de las comunidades bacterianas. No obstante, es posible que el gran número de lecturas correspondientes al filo Cyanobacteria, haya opacado los otros Phyla y no haya dejado observar un patrón claro entre la composición de las comunidades bacterianas, las tres localidades y la posición de la hoja.

Se espera obtener próximamente los datos de las comunidades fúngicas con el fin de evaluar si presentan el mismo comportamiento y así poder obtener resultados más concluyentes sobre este patrón. De igual manera se espera poder establecer el efecto de la presencia de síntomas en las hojas sobre la composición de las comunidades bacterianas y fúngicas.

En cuanto al aislamiento de hongos y bacterias endófitas provenientes de hojas sintomáticas y hojas asintomáticas, se logró aislar y describir 48 morfotipos de hongos endófitos, encontrando una mayor

riqueza de morfotipos en las muestras sintomáticas. Sin embargo, no se lograron aislar morfotipos bacterianos. Además, se lograron identificar 4 géneros de hongos endófitos de los 48 morfotipos, los cuales posiblemente puedan jugar un papel importante en el mejoramiento del estado fitosanitario de la palma de chontaduro debido a su potencial uso como controladores biológicos de patógenos y plagas vegetales

10. RECOMENDACIONES

En términos del estudio de comunidades microbianas, los resultados obtenidos mediante la secuenciación de amplicones de ARNr 16S a través del dispositivo MinION son prometedores con trabajos adicionales. Se sugiere que el flujo de trabajo incluya en el futuro un paso adicional empleando el software Kraken2 antes del demultiplexado, eliminando aquellas secuencias que puedan corresponder a la planta, asegurando que las lecturas puedan ser analizadas en EzTaxon y obtener así una clasificación taxonómica más precisa, que nos permita realizar los análisis de composición de comunidades bacterianas empleando niveles taxonómicos más bajos. Además, se sugiere el uso paralelo de la herramienta QIIME, con el fin de obtener un análisis más robusto, el cual no fue posible utilizar en este estudio por su alta demanda de tiempo y capacidad computacional.

A propósito de los morfotipos de hongos endófitos aislados en este estudio, se recomienda una vez identificados hasta especie, evaluar en futuros estudios la capacidad antifúngica, antimicrobiana y también evaluar su capacidad como posibles controladores de la herbívora de insectos. Además, se sugiere seguir un método más específico para el aislamiento de bacterias endófitas.

Con el fin de poder relacionar la sintomatología observada en las hojas con la composición de las comunidades de bacterias y de los hongos endófitos, es necesario determinar sus causas.

Finalmente, se sugiere en futuros estudios, evaluar la composición del microbioma foliar de la palma de chontaduro en diferentes regiones geográficas, para lograr una evaluación del efecto de la ubicación y las características ambientales correspondientes a esas zonas en la composición del microbioma foliar de *B. gasipaes*.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agronet. (2016). Área Sembrada Y Área Cosechada Del Cultivo De Chontaduro 2007-2016. In *Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural*.
<http://www.agronet.gov.co/Documents/CHONTADURO2016.pdf>
- Al-Nadabi, H. H., Al-Buraiki, N. S., Al-Nabhani, A. A., Maharachchikumbura, S. N., Velazhahan, R., & Al-Sadi, A. M. (2021). In vitro antifungal activity of endophytic bacteria isolated from date palm (*Phoenix doctylifera* L.) against fungal pathogens causing leaf spot of date palm. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00413-6>
- Aleklett, K., Hart, M., & Shade, A. (2014). The microbial ecology of flowers: An emerging frontier in phyllosphere research1. *Botany*, 92(4), 253–266. <https://doi.org/10.1139/cjb-2013-0166>
- Almeida, C. V., Andreote, F. D., Yara, R., Tanaka, F. A. O., Azevedo, J. L., & de Almeida, M. (2009). Bacteriosomes in axenic plants: Endophytes as stable endosymbionts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(10), 1757–1764. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0073-8>
- Amann, R., Ludwig, W., & Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *American Society for Microbiology*, 59(1), 143–169. <https://doi.org/10.1128/aem.59.1.143-169.1995>
- Andreote, F. D., Gumiere, T., & Durrer, A. (2014). Exploring interactions of plant microbiomes. *Scientia Agricola*, 71(6), 528–539. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0195>
- Andrews, J. H. (1992). Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology*. Vol. 30, 603–635. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.30.090192.003131>

- Arkcoll, D. B., & Aguiar, J. P. L. (1984). Peach palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.), a new source of vegetable oil from the wet tropics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35(5), 520–526. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740350508>
- Arnold, A. E., Mejia, L. C., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N., & Herre, E. A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 15649–15654.
- Arroyo, C., Arauz, L. F., & Mora-Urpí, J. (2004). Incidencia de enfermedades en pejibaye (*Bactris gasipaes* Kunth) para palmito. *Agronomía Mesoamericana*, 15, 61–68.
- Bae, H., Sicher, R. C., Kim, M. S., Kim, S. H., Strem, M. D., Melnick, R. L., & Bailey, B. A. (2009). The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany*, 60(11), 3279–3295. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp165>
- Baker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), 541–555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>
- Ballesteros, W., Unigarro, A., Rosero, S., & Solarte, A. (2004). Determinación de hongos formadores de micorrizas (hma) en *Theobroma cacao*, *Musa* sp., *Borojoa patinoi* y *Bactris gasipaes* hbk en el municipio de Tumaco, Nariño. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 21(1), 41–50.
- Barrera, S. E., Sarango-Flóres, S.-W., & Montenegro-Gómez, S.-P. (2019). The phyllosphere microbiome and its potential application in horticultural crops. A review. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 13(3), 384–396. <https://doi.org/10.17584/rcch.2019v13i3.8405>
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome

and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), 478–486.

<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>

Boon, E., Meehan, C. J., Whidden, C., Wong, D. H. J., Langille, M. G. I., & Beiko, R. G. (2014).

Interactions in the microbiome: Communities of organisms and communities of genes. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(1), 90–118. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12035>

Carper, D. L. (2018). *Abiotic and Biotic Factors Structuring the Microbiomes of Conifers in the Family Pinaceae*. 126.

<https://search.proquest.com/docview/2236348414/abstract/7CDD05C7F6724C68PQ/1%0Ahttps://media.proquest.com/media/pq/classic/doc/4327443829/fmt/ai/rep/NPDF?cit%253Aauth=Carper%252C+Dana+Lynn&cit%253Atitle=Abiotic+and+Biotic+Factors+Structuring+the+Microbiome>

Carrión, O., Gibson, L., Elias, D. M. O., McNamara, N. P., Van Alen, T. A., Op Den Camp, H. J.

M., Supramaniam, C. V., McGenity, T. J., & Murrell, J. C. (2020). Diversity of isoprene-degrading bacteria in phyllosphere and soil communities from a high isoprene-emitting environment: A Malaysian oil palm plantation. *Microbiome*, 8(1), 1–13.

<https://doi.org/10.1186/s40168-020-00860-7>

Carvalho, C. R. De, Ferreira, M. C., Amorim, S. S., Hellen, R., Catarine, J., Assis, S. De, Zani, C.

L., & Rosa, L. H. (2019). *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi* (Vol. 3, Issue October).

Chamorro, I. (2017). Cultivo y Agroindustria de Palmito de Chontaduro: ¿Una Alternativa de

Desarrollo Local? Estudio de Caso: Asociación de Productores Agropecuarios El Cuembí APAC, en Puerto Asís, Putumayo Irley.

Chaparro, J. M., Badri, D. V., & Vivanco, J. M. (2014). Rhizosphere microbiome assemblage is

affected by plant development. *ISME Journal*, 8(4), 790–803.

<https://doi.org/10.1038/ismej.2013.196>

Chisté, R. C., & Fernandes, E. (2016). Bioactive Compounds from Amazonian Fruits and their Antioxidant Properties. In *Natural Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables as Health Promoters Part I* (pp. 244–264). Bentham Science Publishers.

<https://doi.org/10.2174/9781681082394116010011>

Choi, K., Choi, J., Lee, P. A., Roy, N., Khan, R., Lee, H. J., Weon, H. Y., Kong, H. G., & Lee, S. W. (2020). Alteration of Bacterial Wilt Resistance in Tomato Plant by Microbiota Transplant. *Frontiers in Plant Science*, *11*(August), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01186>

Christian, N., Whitaker, B. K., & Clay, K. (2015). Microbiomes: Unifying animal and plant systems through the lens of community ecology theory. *Frontiers in Microbiology*, *6*(SEP), 1–15.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00869>

Clement, C., & Mora-Urpí, J. (1983). Leaf morphology of the Pejibaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.). *Revista de Biología Tropical*, *31*(1), 103–112.

<https://doi.org/10.15517/rbt.v31i1.25131>

Clement, C. R., Weber, J. C., Van Leeuwen, J., Astorga Domian, C., Cole, D. M., Arévalo Lopez, L. A., & Argüello, H. (2004). Why extensive research and development did not promote use of peach palm fruit in Latin America. *Agroforestry Systems*, *61–62*(1–3), 195–206.

<https://doi.org/10.1023/B:AGFO.0000028999.84655.17>

Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, *19*, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>

Cook, J. R. (1993). Making Greater Use of Introduced Microorganisms for Biological Control of Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, *31*, 53–80.

<https://doi.org/10.1146/annurev.py.31.090193.000413>

- Cooper, A. J., Latunde-Dada, A. O., Woods-Tör, A., Lynn, J., Lucas, J. A., Crute, I. R., & Holub, E. B. (2008). Basic compatibility of *Albugo candida* in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica juncea* causes broad-spectrum suppression of innate immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(6), 745–756. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-6-0745>
- Daval, S., Gazengel, K., Belcour, A., Linglin, J., Guillerm-Erckelboudt, A. Y., Sarniguet, A., Manzanares-Dauleux, M. J., Lebreton, L., & Mougel, C. (2020). Soil microbiota influences clubroot disease by modulating *Plasmodiophora brassicae* and *Brassica napus* transcriptomes. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1648–1672. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13634>
- De Coster, W., D’Hert, S., Schultz, D. T., Cruts, M., & Van Broeckhoven, C. (2018). NanoPack: Visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics*, 34(15), 2666–2669. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty149>
- De Souza, J. T., Silva, A. C. M., de Jesus Santos, A. F., Santos, P. O., Alves, P. S., Cruz-Magalhães, V., Marbach, P. A. S., & Loguercio, L. L. (2021). Endophytic bacteria isolated from both healthy and diseased *Agave sisalana* plants are able to control the bole rot disease. *Biological Control*, 157(October 2020). <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104575>
- Dransfield, J., Uhl, N. W., Asmussen, C. B., Baker, W. J., Harley, M. M., & Lewis, C. E. (2008). *Genera Palmarum. Evolution and Classification of the Palms. 2nd Ed. Royal Botanic Gardens: Kew Publishing.*
- Du, H. J., Zhang, Y. Q., Liu, H. Y., Su, J., Wei, Y. Z., Ma, B. P., Guo, B. L., & Yu, L. Y. (2013). *Allonocardiopsis opalescens* gen. nov., sp. nov., a new member of the suborder Streptosporangineae, from the surface-sterilized fruit of a medicinal plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART3), 900–904. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.041491-0>

- Dunbar, J., Ticknor, L. O., & Kuske, C. R. (2000). Assessment of microbial diversity in four Southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 2943–2950. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.7.2943-2950.2000>
- Eberhardt, U. (2010). A constructive step towards selecting a DNA barcode for fungi. *New Phytologist*, 187(2), 265–268. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03329.x>
- Edwards, J. A., Santos-Medellín, C. M., Liechty, Z. S., Nguyen, B., Lurie, E., Eason, S., Phillips, G., & Sundaresan, V. (2018). Compositional shifts in root-associated bacterial and archaeal microbiota track the plant life cycle in field-grown rice. *PLoS Biology*, 16(2), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003862>
- Eichhorn, S. J. (2011). Cellulose nanowhiskers: Promising materials for advanced applications. *Soft Matter*, 7(2), 303–315. <https://doi.org/10.1039/c0sm00142b>
- Ellis, J. G. (2017). Can plant microbiome studies lead to effective biocontrol of plant diseases? *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(3), 190–193. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-16-0252-CR>
- Escobar, H. L. (2015). Oportunidades de internacionalización para la pupunha (*Bactris gasipaes*) del departamento del Vaupés. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Esposito-Polesi, N., Almeida, C. V., & Almeida, M. (2013). Avaliação histoquímica de espécies de microplantas hospedeiras de endófitos Histochemical evaluation of endophytes hosts microplants species. *Revista Biociências*, 19(2), 61–71.
- Ferrari Felisberto, M. H., Souza Costa, M., Villas Boas, F., Lopes Leivas, C., Maria Landi Franco, C., Michielon de Souza, S., Pedrosa Silva Clerici, M. T., & Mach Côrtes Cordeiro, L. (2020). Characterization and technological properties of peach palm (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes*)

fruit starch. *Food Research International*, 136(May), 109569.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109569>

Field, D., Amaral-Zettler, L., Cochrane, G., Cole, J. R., Dawyndt, P., Garrity, G. M., Gilbert, J., Glöckner, F. O., Hirschman, L., Karsch-Mizrachi, I., Klenk, H. P., Knight, R., Kottmann, R., Kyrpides, N., Meyer, F., Gil, I. S., Sansone, S. A., Schriml, L. M., Sterk, P., ... Wooley, J. (2011). The Genomic Standards Consortium. *PLoS Biology*, 9(6), 8–10.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001088>

Fierer, N. (2008). *Microbial Diversity Across Space and Time*. 95–116.

Fitzpatrick, C. R., Salas-González, I., Conway, J. M., Finkel, O. M., Gilbert, S., Russ, D., Teixeira, P. J. P. L., & Dangl, J. L. (2020). The Plant Microbiome: From Ecology to Reductionism and beyond. *Annual Review of Microbiology*, 74, 81–100. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-022620-014327>

Flores-Núñez, V. M., Fonseca-García, C., Desgarenes, D., Eloë-Fadrosh, E., Woyke, T., & Partida-Martínez, L. P. (2020). Functional Signatures of the Epiphytic Prokaryotic Microbiome of Agaves and Cacti. *Frontiers in Microbiology*, 10(January), 1–13.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03044>

Foo, J. L., Ling, H., Lee, Y. S., & Chang, M. W. (2017). Microbiome engineering: Current applications and its future. *Biotechnology Journal*, 12(3), 1–11.

<https://doi.org/10.1002/biot.201600099>

Fox, G. E., Stackebrandt, E., Hespell, R. B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T. A., Wolfe, R. S., Balch, W. E., Tanner, R. S., Magrum, L. J., Zahlen, L. B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B. J., Stahl, D. A., Luehrsen, K. R., Chen, K. N., & Woese, C. R. (1980). The phylogeny of prokaryotes. *Science*, 209(4455), 457–463.

<https://doi.org/10.1126/science.6771870>

- Franco, T. S., Potulski, D. C., Viana, L. C., Forville, E., de Andrade, A. S., & de Muniz, G. I. B. (2019). Nanocellulose obtained from residues of peach palm extraction (*Bactris gasipaes*). *Carbohydrate Polymers*, 218(February), 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.035>
- Gaige, A. R., Ayella, A., & Shuai, B. (2010). Methyl jasmonate and ethylene induce partial resistance in *Medicago truncatula* against the charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(5–6), 412–418. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2010.07.001>
- Galluzzi, G., Dufour, D., Thomas, E., Van Zonneveld, M., Salamanca, A. F. E., Toro, A. G., Rivera, A., Duque, H. S., Baron, H. S., Gallego, G., Scheldeman, X., & Mejia, A. G. (2015). An integrated hypothesis on the domestication of *Bactris gasipaes*. *PLoS ONE*, 10(12), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144644>
- Gans, J., Wolinsky, M., & Dunbar, J. (2005). Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil. *Science*, 309(5739), 1387–1390. <https://doi.org/10.1177/002205741508100313>
- Garzón, L. P. (2015). Importancia De Las Micorrizas Arbusculares (Ma) Para Un Uso Sostenible Del Suelo En La Amazonia Colombiana. *Luna Azul*, 42, 217–234. <https://doi.org/10.17151/luaz.2016.42.14>
- Gilbert, J. A., Jansson, J. K., & Knight, R. (2014). The Earth Microbiome project: Successes and aspirations. *BMC Biology*, 12(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0069-1>
- Gilbert, J., Meyer, F., Jansson, J., Gordon, J., Pace, N., Tiedje, J., Ley, R., Fierer, N., Field, D., Kyrpides, N., Glockner, F.-O., Klenk, H.-P., Wommack, K., Glass, E., Docherty, K., Gallery, R., Stevens, R., & Knight, R. (2010). The Earth Microbiome Project: Meeting report of the “1st EMP meeting on sample selection and acquisition” at Argonne National Laboratory October 6th 2010. *Standards in Genomic Sciences*, 3, 249–253.

<https://doi.org/10.4056/sigs.1443528>

- Giovannoni, S. J., Turner, S., Olsen, G. J., Barns, S., Lane, D. J., & Pace, N. R. (1988). Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *Journal of Bacteriology*, *170*(8), 3584–3592. <https://doi.org/10.1128/jb.170.8.3584-3592.1988>
- Hale, I. L., Broders, K., & Iriarte, G. (2014). A Vavilovian approach to discovering crop-associated microbes with potential to enhance plant immunity. *Frontiers in Plant Science*, *5*(September), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00492>
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chemistry and Biology*, *5*(10). [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90108-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90108-9)
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). Trichoderma species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(1), 43–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Hartley, S. E., & Gange, A. C. (2009). Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: Mutualism in a multitrophic context. *Annual Review of Entomology*, *54*, 323–342. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090614>
- Heikema, A. P., Horst-Kreft, D., Boers, S. A., Jansen, R., Hiltemann, S. D., de Koning, W., Kraaij, R., de Ridder, M. A. J., van Houten, C. B., Bont, L. J., Stubbs, A. P., & Hays, J. P. (2020). Comparison of illumina versus nanopore 16s rRNA gene sequencing of the human nasal microbiota. *Genes*, *11*(9), 1–17. <https://doi.org/10.3390/genes11091105>
- Helmersen, K., & Aamot, H. V. (2020). DNA extraction of microbial DNA directly from infected tissue: an optimized protocol for use in nanopore sequencing. *Scientific Reports*, *10*(1), 2985. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59957-6>

- Henderson, A. (2000). *Bactris* (Palmae). (Vol. 79).
- Hernández-Ugalde, J. A., Mora-Urpí, J., & Rocha, O. J. (2011). Genetic relationships among wild and cultivated populations of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth, Palmae): Evidence for multiple independent domestication events. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58(4), 571–583. <https://doi.org/10.1007/s10722-010-9600-6>
- Herrmann, M., Geesink, P., Richter, R., & Küsel, K. (2021). Canopy Position Has a Stronger Effect than Tree Species Identity on Phyllosphere Bacterial Diversity in a Floodplain Hardwood Forest. *Microbial Ecology*, 81(1), 157–168. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01565-y>
- ICA. (2015). *Resolución 1786*. [https://www.ica.gov.co/getattachment/fcbc4f95-8834-40a1-89b8-374ea4a10154/2015R1-\(2\).aspx](https://www.ica.gov.co/getattachment/fcbc4f95-8834-40a1-89b8-374ea4a10154/2015R1-(2).aspx)
- Iqrar, I., Khan, Z., Ashraf, S., Abdel, S., El, F., Gul, S., & Ali, S. (2021). Exploration of microbiome of medicinally important plants as biocontrol agents against *Phytophthora parasitica*. *Archives of Microbiology*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02237-2>
- Iwen, P. C., Hinrichs, S. H., & Rupp, M. E. (2002). Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Medical Mycology*, 40(1), 87–109. <https://doi.org/10.1080/mmy.40.1.87.109>
- Jaimes-Roncancio, M. S., Betancur, J., & Cámara-Leret, R. (2018). Palmas útiles en tres comunidades indígenas de La Pedrera, Amazonia colombiana. *Caldasia*, 40(1), 112–128. <https://doi.org/10.15446/caldasia.v40n1.68851>
- Jang, M. J., Kim, S. Y., Ricke, S. C., Rhee, M. S., & Kim, S. A. (2021). Microbial ecology of alfalfa, radish, and rapeseed sprouts based on culture methods and 16S rRNA microbiome sequencing. *Food Research International*, 144(November 2020), 110316.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110316>

Juul, S., Izquierdo, F., Hurst, A., Dai, X., Wright, A., Kulesha, E., Pettett, R., & Turner, D. (2015).

What's in my pot? Real-time species identification on the MinION. *BioRxiv*, 030742.

<https://doi.org/10.1101/030742>

Kaul, S., Sharma, T., & Dhar, M. K. (2016). "Omics" tools for better understanding the plant–endophyte interactions. *Frontiers in Plant Science*, 7(June), 1–9.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00955>

Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, 115–175.

Leach, J. E., Triplett, L. R., Argueso, C. T., & Trivedi, P. (2017). Communication in the Phytobiome. *Cell*, 169(4), 587–596. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.025>

Lederberg, B. J., & McCray, A. T. (2001). ' Ome Sweet ' Omics-- A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist*, 15(7), 8.

Lee, S., Nguyen, L. T., Hayes, B. J., & Ross, E. (2021). *Prowler : A novel trimming algorithm for Oxford Nanopore sequence data*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/xxxxxx>

Leveau, J. H. (2019). A brief from the leaf: latest research to inform our understanding of the phyllosphere microbiome. *Current Opinion in Microbiology*, 49, 41–49.

<https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.002>

Li, H. (2015). Microbiome, Metagenomics, and High-Dimensional Compositional Data Analysis. *Annual Review of Statistics and Its Application*, 2, 73–94. <https://doi.org/10.1146/annurev-statistics-010814-020351>

Lighthart, B. (1997). The ecology of bacteria in the alfresco atmosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 23, 263–274.

- Lindow, S. E., & Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the Phyllosphere MINIREVIEW
Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 1875–
1883. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.1875>
- Löhr, B., Vásquez-Ordóñez, A. A., & Lopez-Lavalle, L. A. B. (2015). *Rhynchophorus palmarum* in
Disguise: Undescribed Polymorphism in the “black” Palm Weevil. *PLoS ONE*, 10(12), 1–14.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143210>
- Loman, N. J., & Quinlan, A. R. (2014). Poretools: A toolkit for analyzing nanopore sequence data.
Bioinformatics, 30(23), 3399–3401. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu555>
- Lucaciu, R., Pelikan, C., Gerner, S. M., Zioutis, C., Köstlbacher, S., Marx, H., Herbold, C. W.,
Schmidt, H., & Rattei, T. (2019). A Bioinformatics Guide to Plant Microbiome Analysis.
Frontiers in Plant Science, 10(October), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01313>
- Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., Tremblay, J.,
Engelbrekton, A., Kunin, V., Rio, T. G. Del, Edgar, R. C., Eickhorst, T., Ley, R. E.,
Hugenholtz, P., Tringe, S. G., & Dangl, J. L. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana*
root microbiome. *Nature*, 488(7409), 86–90. <https://doi.org/10.1038/nature11237>
- Mafune, K. K., Godfrey, B. J., Vogt, D. J., & Vogt, K. A. (2020).
A rapid approach to profiling diverse fungal communities using the MinION™ nanopore
sequencer. *BioTechniques*, 68(2), 72–78. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0072>
- Manching, H. C., Balint-Kurti, P. J., & Stapleton, A. E. (2014). Southern leaf blight disease severity
is correlated with decreased maize leaf epiphytic bacterial species richness and the
phyllosphere bacterial diversity decline is enhanced by nitrogen fertilization. *Frontiers in Plant
Science*, 5(AUG), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00403>
- Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal.

Microbiome, 3(1), 1–3. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>

Marrone, P. G. (2019). Pesticidal natural products – status and future potential. *Pest Management Science*, 75(9), 2325–2340. <https://doi.org/10.1002/ps.5433>

Martin, W., & Kowallik, K. (1999). Annotated english translation of mereschkowsky's 1905 paper 'Über natur und ursprung der chromatophoren impflanzenreiche.' *European Journal of Phycology*, 34(3), 287–295. <https://doi.org/10.1080/09670269910001736342>

Martiny, J. B. H., Bohannan, B. J. M., Brown, J. H., Colwell, R. K., Fuhrman, J. A., Green, J. L., Horner-Devine, M. C., Kane, M., Krumins, J. A., Kuske, C. R., Morin, P. J., Naeem, S., Øvreås, L., Reysenbach, A. L., Smith, V. H., & Staley, J. T. (2006). Microbial biogeography: Putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology*, 4(2), 102–112. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1341>

Masand, M., Jose, P. A., Menghani, E., & Jebakumar, S. R. D. (2015). Continuing hunt for endophytic actinomycetes as a source of novel biologically active metabolites. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(12), 1863–1875. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1950-y>

Meiners, S. J., Phipps, K. K., Pendergast, T. H., Canam, T., & Carson, W. P. (2017). Soil microbial communities alter leaf chemistry and influence allelopathic potential among coexisting plant species. *Oecologia*, 183(4), 1155–1165. <https://doi.org/10.1007/s00442-017-3833-4>

Melgarejo, P., Carrillo, R., & Sagasta, E. M. (1985). Mycoflora of peach twigs and flowers and its possible significance in biological control of *Monilinia laxa*. *Transactions of the British Mycological Society*, 85(2), 313–317. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(85\)80194-7](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(85)80194-7)

Mercado, V. (2018). *Análisis de las poblaciones bacterianas mediante secuenciación del gen ARNr 16S en un ambiente agrícola para la producción de melón.*

- Meziani, R., Mazri, M. A., Essarioui, A., Alem, C., Diria, G., Gaboun, F., El Idrissy, H., Laaguidi, M., & Jaiti, F. (2019). Towards a new approach of controlling endophytic bacteria associated with date palm explants using essential oils, aqueous and methanolic extracts from medicinal and aromatic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *137*(2), 285–295.
<https://doi.org/10.1007/s11240-019-01570-1>
- Monard, C., Gantner, S., & Stenlid, J. (2013). Utilizing ITS1 and ITS2 to study environmental fungal diversity using pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, *84*(1), 165–175.
<https://doi.org/10.1111/1574-6941.12046>
- Mora-Urpí, J., Weber, J. C., & Clement, C. . . (1997). Peach palm: *Bactris gasipaes* Kunth (Pupunha). In J. Heller, J. Engels, & K. Hammer (Eds.), *Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops* (Issue May). International Plant Genetic Resources Institute.
- Morris, C. E., & Kinkel, L. L. (2002). Fifty years of phyllosphere microbiology: Significant contributions to research in related fields. In *Phyllosphere Microbiology*.
- Müller, D. B., Vogel, C., Bai, Y., & Vorholt, J. A. (2016). The Plant Microbiota: Systems-Level Insights and Perspectives. *Annual Review of Genetics*, *50*, 211–234.
<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-034952>
- Nelson, K. E. (2014). Metagenomics as a Tool To Study Biodiversity. *Accessing Uncultivated Microorganisms*, 153–169. <https://doi.org/10.1128/9781555815509.ch9>
- Neto, B. A. de M., Fernandes, B. S., Junior, C. C. M. F., Franco, M., Bonomo, R. C. F., de Almeida, P. F., & Pontes, K. V. (2017). Thermal-morphological characterisation of starch from peach-palm (*Bactris Gasipaes* kunth) fruit (Pejibaye). *International Journal of Food Properties*, *20*(5), 1007–1015. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1192645>

- Noble, A. S., Noe, S., Clearwater, M. J., & Lee, C. K. (2020). A core phyllosphere microbiome exists across distant populations of a tree species indigenous to New Zealand. *PLoS ONE*, *15*(8 August), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237079>
- Noronha, K. A., Praia, D., Pereira, A. P., Zerlotti, A., & Campos, R. (2019). Peels of tucumã (*Astrocaryum vulgare*) and peach palm (*Bactris gasipaes*) are by-products classified as very high carotenoid sources. *Food Chemistry*, *272*(April 2018), 216–221. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.053>
- Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R., & Stahl, D. A. (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Review of Microbiology*, *40*, 337–365. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.40.100186.002005>
- Ordoñez, M. E., Jácome, D. A., Keil, C. B., Montúfar, R. J., & Evans, T. A. (2016). First report of phytophthora palmivora causing crown and root rot on pear (*Pyrus communis*) trees in Turkey. *Plant Disease*, *100*(2), 519. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-15-0397-PDN>
- Orozco-Mosqueda, M. del C., Rocha-Granados, M. del C., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2018). Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. *Microbiological Research*, *208*(January), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.005>
- Ortiz, M. (2003). Evaluation: Promotion of Heart of Palm Cultivation, Industrialization and Commercialization in Putumayo. *Chemonics International Inc.*, 1–15.
- Ottman, N., Smidt, H., de Vos, W. M., & Belzer, C. (2012). The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *2*(August), 104. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00104>
- Pardo-Locarno, L., Vallecilla, H., & Caicedo, R. (2014). Avances En El Diagnóstico Fitosanitario Del Cultivo De Chontaduro En La Zona Rural De Buenaventura, Valle. *Revista Científica*

Sabia, 1(3), 39–53.

http://www.unipacifico.edu.co:8095/publicacionesunipa/documentos/SABIA_3_VERSION_FINAL.pdf

Patiño, C., & Sánchez, M. (2012). Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos, habitantes de la rizósfera de chontaduro (*B. gasipaes* kunth). *Bioteología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 10(2), 177–187.

Patiño, V. M. (1992). An ethnobotanical sketch of the palm *Bactris* (Guilielma) *gasipaes*. *Principes*, 36(3), 143–147.

Peña-Rojas, E. (1996). Plagas y enfermedades del chontaduro (*Bactris gasipaes*). *Coorpoica*, 63–68. https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/31941/38897_21809.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Pereira da Silva, J. S., Farias da Silva, J. M., Soares, B. G., & Livi, S. (2017). Fully biodegradable composites based on poly(butylene adipate-co-terephthalate)/peach palm trees fiber. *Composites Part B: Engineering*, 129, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2017.07.088>

Pérez, R. A. (2010). *Identificación y evaluación de enfermedades en cuatro frutales sembrados en diferentes tipos de sustratos bajo condiciones de vivero, en la zona de Iquitos* [Universidad Nacional De La Amazonía Peruana]. <https://doi.org/10.1007/s10584-013-0699-2>

Pizzinatto, M. A., Bovi, M. L. A., Spiering, S. H., & Binotti, C. S. (2001). Pathogenicity of five species of *Fusarium* to pejobaye plants (*Bactris gasipaes*). In *Summa Phytopathologica (Brazil)* (Vol. 27, pp. 263–266).

Preidis, G. A., & Hotez, P. J. (2015). The Newest “Omics”—Metagenomics and Metabolomics—Enter the Battle against the Neglected Tropical Diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*,

9(2), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003382>

Priya, H., Prasanna, R., Ramakrishnan, B., Bidyarani, N., Babu, S., Thapa, S., & Renuka, N.

(2015). Influence of cyanobacterial inoculation on the culturable microbiome and growth of rice. *Microbiological Research*, 171, 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.12.011>

Quesada-Moraga, E., Herrero, N., & Zabalgogezcoa, Í. (2014). Entomopathogenic and nematophagous fungal endophytes. In *Advances in Endophytic Research*.

https://doi.org/10.1007/978-81-322-1575-2_4

Raheman, F., Deshmukh, S., Ingle, A., Gade, A., & Rai, M. (2011). Silver nanoparticles: Novel antimicrobial agent synthesized from an endophytic fungus *Pestalotia* sp. Isolated from leaves of *Syzygium cumini* (L). *Nano Biomedicine and Engineering*, 3(3), 174–178.

<https://doi.org/10.5101/nbe.v3i3.p174-178>

Ramírez, K., & Triana, L. (2020). *Análisis del consumo actual de chontaduro (Bactris gasipaes) en la ciudad de Cali* [Universidad Autónoma De Occidente].

<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Rang, F. J., Kloosterman, W. P., & de Ridder, J. (2018). From squiggle to basepair: Computational approaches for improving nanopore sequencing read accuracy. *Genome Biology*, 19(1), 1–11.

<https://doi.org/10.1186/s13059-018-1462-9>

Rastogi, G., Tech, J. J., Coaker, G. L., & Leveau, J. H. J. (2010). A PCR-based toolbox for the culture-independent quantification of total bacterial abundances in plant environments. *Journal of Microbiological Methods*, 83(2), 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.08.006>

Redford, A., Bowers, R., Knight, R., Linhart, Y., & Fierer, N. (2010). Variability in the Distribution of Bacteria on Tree Leaves. *Environmental Microbiology*, 12(11), 2885–2893.

<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02258.x>.The

- Redford, A. J., Bowers, R. M., Knight, R., Linhart, Y., & Fierer, N. (2010). The ecology of the phyllosphere: Geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environmental Microbiology*, *12*(11), 2885–2893. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02258.x>
- Restrepo, J., Vinasco, L. E., & Estupiñán, J. A. (2012). Estudio Comparativo Del Contenido De Ácidos Grasos En 4 Variedades De Chontaduro (*Bactris Gasipaes*) De La Región Del Pacífico Colombiano. *Revista de Ciencias*, *16*, 123–129. <https://doi.org/10.25100/rc.v16i0.508>
- Riascos-Ortiz, Sarria-Villa, Agudelo, Carabalí, E. (2011). Recognition of potential beneficial fungi associated with Chontaduro (*Bactris gasipaes* H. B. K.) rhizosphere in the Pacific region of Valle del Cauca, Colombia. *Acta Agronomica*, *60*, 319–327. https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/28846/29154
- Riascos-ortiz, D., Sarria-Villa, G., Agudelo, F., Gómez-Carabalí, A., & Mosquera-Espinosa, A. (2011). Reconocimiento de hongos con potencial benéfico asociados a la rizósfera de chontaduro (*Bactris gasipaes* HBK) en la región Pacífico del Valle del Cauca, Colombia. *Acta Agronómica*, *60*(4), 319–327.
- Rigonato, J., Alvarenga, D. O., Andreote, F. D., Dias, A. C. F., Melo, I. S., Kent, A., & Fiore, M. F. (2012). Cyanobacterial diversity in the phyllosphere of a mangrove forest. *FEMS Microbiology Ecology*, *80*(2), 312–322. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01299.x>
- Rodrigues, D. P., Filho, S. A., & Clement, C. R. (2005). Molecular marker-mediated validation of morphologically defined landraces of Pejibaye (*Bactris gasipaes*) and their phylogenetic relationships. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *51*(8), 871–882. <https://doi.org/10.1007/s10722-005-0774-2>
- Sá, F. P. De, Artner, M. A., Samponi, M., Arantes, T., Matos, M. De, Luiz, W., & Magalhães, E. (2019). *Preparation of biodegradable composites with peach palm biomass*. 2019.

- Sá, F. P., Belniaki, A. C., Panobianco, M., Moreno, M., Kratz, D., Alves de Lima, E., Wendling, I., & Esteves, W. L. (2020). Peach palm residue compost as substrate for *Bactris gasipaes* self-sustaining seedlings production. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 9, 183–192.
- Sakai, J., Tarumoto, N., Kodana, M., Ashikawa, S., Imai, K., Kawamura, T., Ikebuchi, K., Murakami, T., Mitsutake, K., Maeda, T., & Maesaki, S. (2019). An identification protocol for ESBL-producing gramnegative bacteria bloodstream infections using a MinION nanopore sequencer. *Journal of Medical Microbiology*, 68(8), 1219–1226.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.001024>
- Sakai, M., Matsuka, A., Komura, T., & Kanazawa, S. (2004). Application of a new PCR primer for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the bacterial communities in plant roots. *Journal of Microbiological Methods*, 59(1), 81–89.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.06.005>
- Salo, E. N., & Novero, A. (2020). Identification and characterisation of endophytic bacteria from coconut (*Cocos nucifera*) tissue culture. *Tropical Life Sciences Research*, 31(1), 57–68.
<https://doi.org/10.21315/tlsr2020.31.1.4>
- Saltos, I. (2018). *Estudio Gastronómico del Chontaduro (Bactris Gasipaes) y su Aplicación en la Repostería*. Universidad de Guayaquil.
- Sanchez, J. A. (2005). *La política de erradicación de fumigaciones con glifosato y el “efecto globo”*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Santos, S. S., Rask, K. A., Vestergård, M., Johansen, J. L., Priemé, A., Frøslev, T. G., González, A. M. M., He, H., & Ekelund, F. (2021). Specialized microbiomes facilitate natural rhizosphere microbiome interactions counteracting high salinity stress in plants. *Environmental and Experimental Botany*, 186(December 2020), 1–12.

<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104430>

Sato, N. (2020). Complex origins of chloroplast membranes with photosynthetic machineries:

multiple transfers of genes from divergent organisms at different times or a single

endosymbiotic event? *Journal of Plant Research*, 133(1), 15–33.

<https://doi.org/10.1007/s10265-019-01157-z>

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W.,

Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K.

D., Bai, F. Y., Barreto, R. W., Begerow, D., Bergeron, M. J., Blackwell, M., ... Schindel, D.

(2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode

marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

America, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>

Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A. K., & Krohn, K. (2002). Endophytic fungi: A

source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 106(9), 996–

1004. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006342>

Seah, A., Lim, M. C. W., McAloose, D., Prost, S., & Seimon, T. A. (2020). Non-Invasively

Collected Wildlife Samples. *Genes*, 11(4), 445.

Sehlschlager, A. C. O., Chinchilla, C., Castillo, G., & Gonzalez, L. (2002). Control of red ring

disease by mass trapping of *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae). *Florida*

Entomologist, 85(3), 507–513. [https://doi.org/10.1653/0015-](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2002)085[0507:corrdb]2.0.co;2)

[4040\(2002\)085\[0507:corrdb\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2002)085[0507:corrdb]2.0.co;2)

SENASICA. (2018). *Protocolo de Diagnóstico: Guignardia bidwellii, Anamorfo: Phyllosticta*

ampelicida (Pudrición negra de la vid) [Version 2.0]. 30.

Serrano, L. M., & Guaran, J. L. (2019). *Estudio de viabilidad de exportación de chontaduro en*

conserva desde Colombia a Paises Bajos [Universidad Autonoma de Occidente].

<https://red.uao.edu.co/bitstream/10614/11715/5/T08841.pdf>

Shakir, S., Zaidi, S. S. e. A., de Vries, F. T., & Mansoor, S. (2020). Plant Genetic Networks Shaping Phyllosphere Microbial Community. *Trends in Genetics*, 1–11.

<https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.09.010>

Siala, R., Ali Triki, M., Vallaeys, T., & Jrad, M. (2016). Analysis of the Cultivable Endophytic Bacterial Diversity in the Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) and Evaluation of Its Antagonistic Potential against Pathogenic Fusarium Species that Cause Date Palm Bayound Disease. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 4(5), 93–104.

<https://doi.org/10.12691/jaem-4-5-2>

Silva, I. F., Langbehn, R. K., Silva, R. G. C., Pantoja, L. de A., Vanzela, A. P. F. C., & Santos, A. S. dos. (2016). α -Amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens* utilizing macauba cake (*Acrocomia aculeata*) and peach palm flour (*Bactris gasipaes*–kunth) as substrates.

Biocatalysis and Biotransformation, 34(2), 76–82.

<https://doi.org/10.1080/10242422.2016.1227794>

Silva, J., & Nogueira, E. J. (2006). Micorriza arbuscular em cupuaçu e pupunha cultivados em sistema agroflorestal e em monocultivo na Amazônia Central. *Pesquisa Agropecuária*

Brasileira, 41(5), 819–825. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2006000500014>

Sinclair, L., Osman, O. A., Bertilsson, S., & Eiler, A. (2015). Microbial community composition and diversity via 16S rRNA gene amplicons: Evaluating the illumina platform. *PLoS ONE*,

10(2), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116955>

Smith, N. (2015). Palms and People in the Amazon. In *Books*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-05509-1>

- Snelders, N. C., Kettles, G. J., Rudd, J. J., & Thomma, B. P. H. J. (2018). Plant pathogen effector proteins as manipulators of host microbiomes? *Molecular Plant Pathology*, *19*(2), 257–259. <https://doi.org/10.1111/mpp.12628>
- Starke, R., Pylro, V. S., & Morais, D. K. (2021). 16S rRNA Gene Copy Number Normalization Does Not Provide More Reliable Conclusions in Metataxonomic Surveys. *Microbial Ecology*, *81*(2), 535–539. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01586-7>
- Summerell, B. A., & Leslie, J. F. (2011). Fifty years of *Fusarium*: How could nine species have ever been enough? *Fungal Diversity*, *50*, 135–144. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0132-y>
- Sun, L., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., Dong, X., & Song, W. (2008). Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbial Ecology*, *55*(3), 415–424. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9287-1>
- Sziderics, A. H., Rasche, F., Trognitz, F., Sessitsch, A., & Wilhelm, E. (2007). Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Canadian Journal of Microbiology*, *53*(11), 1195–1202. <https://doi.org/10.1139/W07-082>
- Taguiam, J. D., Evallo, E., & Balendres, M. A. (2021). *Epicoecum* species: ubiquitous plant pathogens and effective biological control agents. *European Journal of Plant Pathology*, *159*(4), 713–725. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02207-w>
- Teixeira, P. J. P., Colaianni, N. R., Fitzpatrick, C. R., & Dangl, J. L. (2019). Beyond pathogens: microbiota interactions with the plant immune system. *Current Opinion in Microbiology*, *49*(September), 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.08.003>
- Toghueo, R. M. K. (2020). Bioprospecting endophytic fungi from *Fusarium* genus as sources of bioactive metabolites. *Mycology*, *11*(1), 1–21. <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1645053>
- Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome Biology*, *14*(6),

1–10. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-209>

Turner, T. R., Ramakrishnan, K., Walshaw, J., Heavens, D., Alston, M., Swarbreck, D., Osbourn, A., Grant, A., & Poole, P. S. (2013). Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *ISME Journal*, 7(12), 2248–2258.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2013.119>

UNODC. (2010). *Colombia Coca Cultivation Survey 2010*.

Usyk, M., Zolnik, C. P., Patel, H., Levi, M. H., & Burk, R. D. (2017). Novel ITS1 Fungal Primers for Characterization of the Mycobiome. *MSphere*, 2(6).
<https://doi.org/10.1128/msphere.00488-17>

Vargas, V., Clement, C., & Moraes, M. (2020). *Bactris gasipaes* (Arecaceae): Una palmera con larga historia de aprovechamiento y selección en Sud América. *Plural Editores*, 978–99954, 37–46.

Veira, C., Yara, R., & Almeida, M. (2005). Endophytic fungi in shoot tip of the pejibaye cultivated in vivo and in vitro. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 40(5), 467–470.
<https://doi.org/10.1590/s0100-204x2005000500007>

Venkatachalam, S., Ranjan, K., Prasanna, R., Ramakrishnan, B., Thapa, S., & Kanchan, A. (2016). Diversity and functional traits of culturable microbiome members, including cyanobacteria in the rice phyllosphere. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, 18(4), 627–637.
<https://doi.org/10.1111/plb.12441>

Verma, S. K., Gond, S., Mishra, A., Sharma, V., Kumar, J., Singh, D., & Kharwar, R. (2016). Biofabrication of Antibacterial and Antioxidant Silver Nanoparticles (AgNps) by an Endophytic Fungus *Pestalotia* Sp. Isolated from *Madhuca Longifolia*. *J Nanomaterial and Molecular Nanotechnology*, 5. <https://doi.org/10.4172/2324-8777.1000189>

- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). Trichoderma-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>
- Vishal, V., Rahaman, S., Munda, S. S., Singh, G., & Lal, S. (2020). Diverse Rhizosphere Bacterial Communities Associated With Wild Edible Mushroom *Astraeus asiaticus* - Metagenomics Insights . Discussion : June, 2–3. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.24283.39203>
- Vokou, D., Vareli, K., Zarali, E., Karamanoli, K., Constantinidou, H. I. A., Monokrousos, N., Halley, J. M., & Sainis, I. (2012). Exploring Biodiversity in the Bacterial Community of the Mediterranean Phyllosphere and its Relationship with Airborne Bacteria. *Microbial Ecology*, 64(3), 714–724. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0053-7>
- Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 10(12), 828–840. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2910>
- Vorholt, J. A., Vogel, C., Carlström, C. I., & Müller, D. B. (2017). Establishing Causality: Opportunities of Synthetic Communities for Plant Microbiome Research. *Cell Host and Microbe*, 22(2), 142–155. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.004>
- Wagner, M. (2000). Phylogeny of All Recognized Species of Ammonia Oxidizers Based on Comparative 16S rRNA and. *Society*, 66(12), 5368–5382.
- Whipps, J. M., Hand, P., Pink, D., & Bending, G. D. (2008). Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology*, 105(6), 1744–1755. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03906.x>
- Whipps, J. M., Karen, L., & Cooke, R. C. (1988). Mycoparasitism and plant disease control. In *Fungi in biological control systems*. <https://doi.org/10.1186/s40101-015-0061-7>
- Whon, T. W., Shin, N. R., Kim, J. Y., & Roh, S. W. (2021). Omics in gut microbiome analysis.

Journal of Microbiology, 59(3), 292–297. <https://doi.org/10.1007/s12275-021-1004-0>

Williams, T. R., & Marco, M. L. (2014). *Transplantation on Lettuce Plants Grown Indoors*. 5(4), 1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.01564-14.Editor>

Williams, T. R., Moyne, A. L., Harris, L. J., & Marco, M. L. (2013). Season, Irrigation, Leaf Age, and *Escherichia coli* Inoculation Influence the Bacterial Diversity in the Lettuce Phyllosphere. *PLoS ONE*, 8(7), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068642>

Wilson, D. (1995). Endophyte: The Evolution of a Term, and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos*, 73(2), 274. <https://doi.org/10.2307/3545919>

Yang, F., Zhang, J., Zhang, H., Ji, G., Zeng, L., Li, Y., Yu, C., Fernando, W. G. D., & Chen, W. (2020). Bacterial Blight Induced Shifts in Endophytic Microbiome of Rice Leaves and the Enrichment of Specific Bacterial Strains With Pathogen Antagonism. *Frontiers in Plant Science*, 11(July), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00963>

Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>

Yu, J., Zhou, X. F., Yang, S. J., Liu, W. H., & Hu, X. F. (2013). Design and application of specific 16S rDNA-targeted primers for assessing endophytic diversity in *Dendrobium officinale* using nested PCR-DGGE. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(22), 9825–9836. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5294-y>

Yuyama, L. K. O., Aguiar, J. P. L., Yuyama, K., Clement, C. R., Macedo, S. H. M., Fávares, D. I. T., Afonso, C., Vasconcellos, M. B. A., Pimentel, S. A., Badolato, E. S. G., & Vannucchi, H. (2003). Chemical composition of the fruit mesocarp of three peach palm (*Bactris gasipaes*)

populations grown in Central Amazonia, Brazil. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 54(1), 49–56. <https://doi.org/10.1080/096374803/000061994>

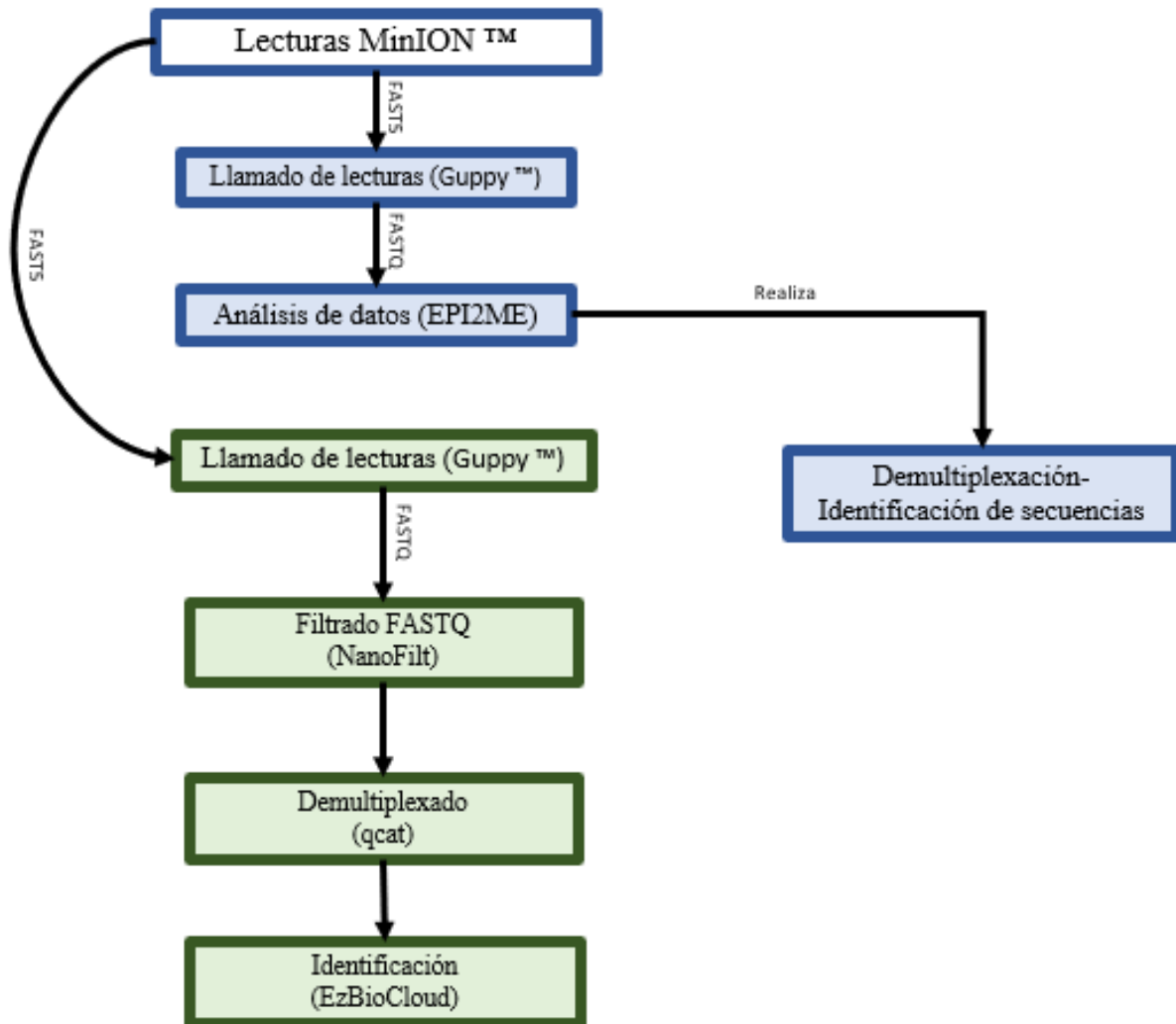
Zahn, G., & Amend, A. S. (2017). Foliar microbiome transplants confer disease resistance in a critically-endangered plant. *PeerJ*, 2017(11), 1–16. <https://doi.org/10.7717/peerj.4020>

Zamioudis, C., & Pieterse, C. M. J. (2012). Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(2), 139–150. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-11-0179>

Zarraonaindia, I., Owens, S. M., Weisenhorn, P., West, K., Hampton-Marcell, J., Lax, S., Bokulich, N. A., Mills, D. A., Martin, G., Taghavi, S., van der Lelie, D., & Gilbert, J. A. (2015). The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *MBio*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.02527-14>

Zhang, Q., Acuña, J. J., Inostroza, N. G., Mora, M. L., Radic, S., Sadowsky, M. J., & Jorquera, M. A. (2019). Endophytic Bacterial Communities Associated with Roots and Leaves of Plants Growing in Chilean Extreme Environments. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41160-x>

12. ANEXOS



Anexo 1. Descripción general del flujo de trabajo bioinformático. Las cajas bordeadas en azul oscuro muestran el trabajo realizado para el análisis de las secuencias por EPI2ME (ONT). Las cajas bordeadas en verdes son los procesos optados por mejorar los resultados y aumentar la precisión.

Anexo 2. Descripción de las características macroscópicas y microscópicas de los morfotipos de hongos endófitos de hojas de *Bactris gasipaes*, después de 7 a 14 días a 25 °C en medio PDA.

Morfotipos	Características macroscópicas	Características microscópicas
1 (<i>Fusarium</i> sp.)	Tamaño: 38 mm de diámetro; margen irregular; moderado micelio aéreo; Textura: algodonosa; anverso blanco; reverso concoloro (del mismo color que el anverso).	Micelio hialino, delgado y septado, de pared delgada y lisa. Macroconidios falciformes septados (fragmoconidios) y microconidios elipsoides septados (didimoconidios), ambos producidos en fiálides, formando falsas cabezas.
2	Tamaño: 38 mm de diámetro; margen irregular; escaso micelio aéreo; Textura: algodonosa; anverso con centro marrón y borde blanco; reverso concoloro.	Micelio dematiáceo, delgado y septado, de pared delgada y rugosa. Produce didimoconidios hialinos elipsoides; no se observó su origen.
3	Tamaño: 38 mm de diámetro; margen irregular; moderado micelio aéreo; Textura: algodonosa; anverso blanco; reverso concoloro.	Micelio hialino, delgado y septado, de pared delgada y lisa. No se observaron estructuras reproductivas.
4 (<i>Epicoccum</i> sp.)	Tamaño: 37 mm de diámetro; margen irregular; escaso micelio aéreo; Textura: algodonosa/lanosa; blanca en el anverso con puntos de esporodoquios negros; marrón en el reverso; libera pigmento naranja al medio.	Micelio dematiáceo, delgado y septado, de pared delgada y rugosa. Esporodoquios que producen dictioconidios sésiles globosos.
5	Tamaño: 50 mm de diámetro; margen regular; escaso micelio aéreo; Textura: aterciopelada; amarilla en el anverso; marrón en el reverso; produce esclerocios.	Micelio dematiáceo, delgado y septado, de pared delgada y lisa. No se observaron estructuras reproductivas.
6	Tamaño: 50 mm de diámetro; margen regular; moderado micelio aéreo; Textura: algodonosa; anverso blanco; reverso beige.	Micelio hialino, delgado y septado, de pared delgada y rugosa. No se observaron estructuras reproductivas.
7	Tamaño: 50 mm de diámetro; margen regular; abundante micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; reverso con centro marrón y borde negro. Produce esclerocios.	Micelio hialino, delgado y escasamente septado, de pared delgada y lisa. No se observaron estructuras reproductivas.
8	Tamaño: 50 mm de diámetro; margen regular; abundante micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; reverso con centro marrón y borde blanco.	Micelio hialino, delgado y septado, de pared delgada y rugosa. No se observaron estructuras reproductivas.
9	Tamaño: 45 mm de diámetro, margen irregular; escaso micelio aéreo; Textura: aterciopelada; blanca en el anverso; reverso concoloro. Produce estructuras estromáticas cilíndricas de color gris, entre 0.1 y 0.5 mm.	Micelio hialino, delgado y septado, de pared delgada y lisa. No se observaron estructuras reproductivas.
10	Tamaño: 42 mm de diámetro; margen regular; moderado micelio aéreo; Textura: algodonosa; anverso con centro verde, blanco hacia la periferia; reverso concoloro.	Micelio hialino, delgado y escasamente septado, de pared delgada y lisa. No se observaron estructuras reproductivas.
11	Tamaño: 50 mm de diámetro; margen regular; moderado micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; reverso concoloro. Produce esclerocios.	Micelio hialino, delgado y septado, de pared delgada y rugosa. No se observaron estructuras reproductivas
12	Tamaño: 50 mm de diámetro; margen irregular; moderado micelio aéreo; Textura: algodonosa; anverso blanco; reverso concoloro.	Micelio hialino, delgado y septado, de pared delgada y lisa. Produce ameroconidios verdes equinulados.

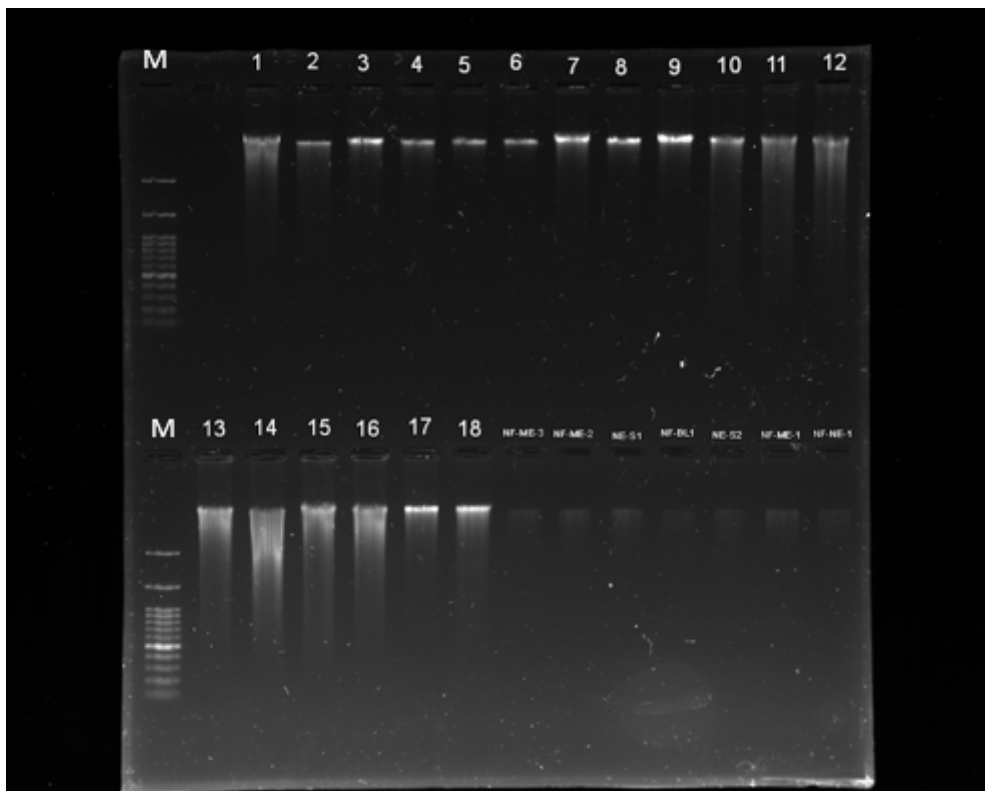
Morfotipos	Características macroscópicas	Características microscópicas
13 (<i>Pestalotia</i> sp.)	Tamaño: 50 mm de diámetro; margen regular; escaso micelio aéreo; Textura: aterciopelada/granulosa; anverso blanco con puntos de esporodoquios negros; reverso concoloro.	Micelio hialino, delgado y septado, de pared delgada y lisa. Produce fragmoconidios fusiformes dematiáceos y ligeramente curvados, con presencia de apéndices
14	Tamaño: 50 mm de diámetro; margen regular; moderado micelio aéreo; Textura: algodonosa; anverso blanco, gris hacia la periferia; reverso blanco, marrón hacia la periferia. Produce esclerocios.	Micelio hialino, delgado y septado, de pared lisa y delgada. No se observaron estructuras reproductivas.
15	Tamaño: 40 mm de diámetro; margen regular; moderado micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso, reverso concoloro.	Micelio hialino, delgado y septado, de pared lisa y delgada. No se observaron estructuras reproductivas.
16	Tamaño: 35 mm de diámetro; margen irregular; moderado micelio aéreo; Textura: algodonosa; gris en el anverso; marrón en el reverso.	Micelio dematiáceo, delgado y septado, de pared gruesa y rugosa. No se observaron estructuras reproductivas.
17	Tamaño: 50 mm de diámetro; margen irregular; moderado micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; marrón en el reverso.	Micelio hialino, delgado y escasamente septado, de pared delgada y lisa. No se observaron estructuras reproductivas.
18	Tamaño: 50 mm de diámetro; margen regular; moderado micelio aéreo; Textura: algodonosa; marrón en el anverso; reverso concoloro.	Micelio dematiáceo, grueso y septado, de pared gruesa y rugosa, con ramificaciones en ángulo recto y ligera constricción en los septos. No se observaron estructuras reproductivas.
19	Tamaño: 50 mm de diámetro; margen regular; escaso micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; reverso concoloro. Produce esclerocios.	Micelio hialino, delgado y escasamente septado, de pared delgada y lisa. No se observaron estructuras reproductivas.
20	Tamaño: 50 mm de diámetro; margen irregular; moderado micelio aéreo; Textura: granulosa; anverso gris, blanco hacia la periferia; reverso blanco.	Micelio dematiáceo, delgado y septado, de pared gruesa y rugosa. No se observaron estructuras reproductivas.
21	Tamaño: 50 mm de diámetro; margen regular; moderado micelio aéreo; Textura: algodonosa; anverso con centro verde, blanca hacia la periferia; reverso marrón.	Micelio dematiáceo, delgado y septado, de pared delgada y rugosa. No se observan estructuras reproductivas.
22	Tamaño: 50 mm de diámetro; margen regular; escaso micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; reverso concoloro.	Micelio hialino, delgado y escasamente septado, de pared delgada y lisa. No se observan estructuras reproductivas.
23	Tamaño: 50 mm de diámetro; margen regular; moderado micelio aéreo; Textura: algodonosa; gris en el anverso; negro en el reverso.	Micelio dematiáceo, delgado y septado, de pared gruesa y rugosa. No se observan estructuras reproductivas.
24	Tamaño: 18 mm de diámetro; margen regular, escaso micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; reverso concoloro.	Micelio hialino, delgado y septado, de pared delgada y lisa. No se observan estructuras reproductivas.
25	Tamaño: 20 mm de diámetro; margen regular, moderado micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; rosado en el reverso.	Micelio hialino, delgado y escasamente septado, de pared delgada y lisa. Ameroconidios solitarios, elipsoides originados en fiálides.
26	Tamaño: 42 mm de diámetro; margen regular, moderado micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; reverso concoloro.	Micelio hialino, delgado y escasamente septado, de pared delgada y lisa. No se observan estructuras reproductivas.
27 (<i>Trichoderma</i> sp.)	Tamaño: 50 mm de diámetro; margen regular; abundante micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; reverso concoloro.	Micelio hialino, delgado y escasamente septado, de pared delgada y lisa. Conidióforos ramificados, ameroconidios redondos, producidos en falsas cabezas, a partir de fiálides en forma de botella.

Morfotipos	Características macroscópicas	Características microscópicas
28	Tamaño: 38 mm de diámetro; margen irregular; moderado micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; reverso concoloro.	Micelio hialino, delgado y septado, de pared delgada y lisa. No se observan estructuras reproductivas.
29 (<i>Trichoderma</i> sp.)	Tamaño: 28 mm de diámetro; margen regular; escaso micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; naranja en el reverso.	Micelio hialino, delgado y septado, de pared delgada y lisa. Conidióforos ramificados, ameroconidios redondos originados en fiálides en forma de botella.
30	Tamaño: 40 mm de diámetro; margen irregular; escaso micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; marrón en el reverso.	Micelio hialino, delgado y escasamente septado, de pared delgada y lisa. No se observan estructuras reproductivas.
31	Tamaño: 50 mm de diámetro; margen regular; abundante micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; reverso concoloro.	Micelio hialino, delgado y septado, de pared delgada y lisa. No se observan estructuras reproductivas.
32	Tamaño: 50 mm de diámetro; margen irregular; escaso micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; beige en el reverso.	Micelio hialino, delgado y escasamente septado, de pared delgada y lisa. No se observan estructuras reproductivas.
33	Tamaño: 50 mm de diámetro; margen regular; moderado micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; reverso concoloro.	Micelio hialino, delgado y septado, de pared delgada y rugosa. No se observan estructuras reproductivas.
34	Tamaño: 48 mm de diámetro; margen irregular; escaso micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; reverso concoloro.	Micelio hialino, delgado y septado, de pared delgada y lisa. No se observan estructuras reproductivas.
35	Tamaño: 48 mm de diámetro; margen irregular; moderado micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; marrón en el reverso.	Micelio hialino, delgado y septado, de pared delgada y lisa. No se observan estructuras reproductivas.
36	Tamaño: 40 mm de diámetro; margen regular; moderado micelio aéreo; Textura: algodonosa; gris en el anverso; reverso verde con borde blanco.	Micelio hialino, delgado y escasamente septado, de pared delgada y lisa. No se observan estructuras reproductivas.
37	Tamaño: 29 mm de diámetro; margen irregular; escaso micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; reverso concoloro.	Micelio hialino delgado y escasamente septado, de pared delgada y lisa. No se observan estructuras reproductivas.
38	Tamaño: 26 mm de diámetro; margen regular; moderado micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; rosado en el reverso.	Micelio hialino, delgado y escasamente septado, de pared delgada y lisa. Ameroconidios elipsoides, solitarios, originados en fiálides.
39	Tamaño: 50 mm de diámetro; margen regular; escaso micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; gris en el reverso.	Micelio hialino, delgado y septado, de pared delgada y rugosa. No se observan estructuras reproductivas.
40	Tamaño: 50 mm de diámetro; margen regular; escaso micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; verde en el reverso.	Micelio hialino, delgado y septado, de pared delgada y rugosa. No se observan estructuras reproductivas.
41	Tamaño: 42 mm de diámetro; margen regular; escaso micelio aéreo; Textura: algodonosa; naranja con borde blanco en el anverso; naranja en el reverso; libera pigmento naranja al medio.	Micelio dematiáceo, delgado y septado, de pared gruesa y rugosa. No se observan estructuras reproductivas.
42	Tamaño: 44 mm de diámetro; margen regular; escaso micelio aéreo; Textura: algodonosa; naranja en el anverso; marrón en el reverso; libera pigmento naranja al medio.	Micelio dematiáceo, delgado y septado, de pared gruesa y rugosa. No se observan estructuras reproductivas.

Morfotipos	Características macroscópicas	Características microscópicas
43	Tamaño: 42 mm de diámetro; escaso micelio aéreo; Textura: algodonosa; amarilla en el anverso; naranja en el reverso; libera pigmento naranja al medio.	Micelio hialino, delgado y septado, de pared delgada y lisa. No se observan estructuras reproductivas.
44	Tamaño: 38 mm de diámetro; margen irregular; moderado micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; reverso concoloro.	Micelio hialino, delgado y escasamente septado, de pared delgada y lisa. No se observan estructuras reproductivas.
45	Tamaño: 40 mm de diámetro; margen regular; escaso micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; reverso blanco con borde verde.	Micelio hialino, delgado y escasamente septado, de pared delgada y lisa. No se observan estructuras reproductivas.
46	Tamaño: 28 mm de diámetro; margen regular; escaso micelio aéreo; Textura: algodonosa; blanca en el anverso; beige en el reverso.	Micelio hialino, delgado y escasamente septado, de pared delgada y lisa. No se observan estructuras reproductivas
47	Tamaño: 48 mm de diámetro; margen irregular; escaso micelio aéreo; Textura: aterciopelada; gris en el anverso; negro en el reverso.	Micelio dematiáceo, ancho y septado, de pared gruesa y rugosa. No se observan estructuras reproductivas.
48	Tamaño: 37 mm de diámetro; margen regular; escaso micelio aéreo; Textura: aterciopelada; gris en el anverso; marrón en el reverso.	Micelio dematiáceo, delgado y septado, de pared delgada y rugosa. Ameroconidios elipsoides.

Anexo 3. Morfotipos (M) de hongos endófitos de acuerdo a la condición de la hoja (Sana / Enferma) y a la ubicación en la hoja de Bactris gasipaes (Distal, Media, Proximal).

Tipo de muestra	Morfotipos de hongos endófitos
Sana Distal	M-1, M-2, M- 3, M 4, M-5 y M-6.
Sana Media	M-1, M-2, M-3, M-6, M-7, M-8, M-9, M-10, M-11, M-12, M-13 y M-14.
Sana Proximal	M- 7, M-15, M-16, M-17, M-18, M-19 y M-20.
Enferma Distal	M-47 y M-48.
Enferma Media	M-21, M-22, M-23, M-24, M-25 y M-26.
Enferma Proximal	M-2, M-3, M-4, M-27, M-28, M-29, M-30, M-31, M-32, M-33, M-34, M-35, M-36, M-37, M-38, M-39, M-40, M-41, M-42, M-43, M-44, M-45, M-46



Anexo 4. Gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X para determinar la integridad de las muestras de DNA genómico. El primer carril de la columna izquierda (M) corresponde al marcador de peso molecular el DNA Ladder 100bp+3k (Smobio). Las muestras de ADN corresponden a los carriles 3, 5, ,7, 8, 12, 13,14, 17 y 18.

Anexo 5. Abundancia (Número de reads) de cada uno de los 28 Phyla obtenidos por posición en las hojas sanas de *Bactris gasipaes*: distal (D), media (M) y proximal (P).

Posición	D	M	P
Acidobacteria	3	1	2
Actinobacteria	39	38	101
Aquificae	21	26	40
Armatimonadetes	0	0	1
Bacteroidetes	36	36	24
Balneolaeota	1	2	3
Calditrichaeota	2	2	1
Candidatus Melainabacteria	8	7	6
Chlamydiae	8	5	3
Chlorobi	0	0	4
Chloroflexi	31	41	63
Cyanobacteria	1327841	1321356	1060794
Deferribacteres	4	2	1
Deinococcus-Thermus	24	64	20
Firmicutes	8000	7334	7086
Fusobacteria	28	32	20
Gemmatimonadetes	5	2	4
Ignavibacteriae	0	0	1
Lentisphaerae	1	0	3
Nitrospirae	2	2	0
Planctomycetes	26	31	54
Proteobacteria	3280	3299	3950
Spirochaetes	2	1	8
Synergistetes	110	97	111
Tenericutes	20	21	149
Thermodesulfobacteria	2	3	5
Thermotogae	27	35	58
Verrucomicrobia	1	0	2

Anexo 6. Abundancia (Número de reads) de cada uno de los 28 Phyla obtenidos en cada una de las muestras: distal punto 1 (D1), distal punto 2 (D2), distal punto 3 (D3); media punto 1(M1), media punto 2 (M2), media punto 3 (M3) y proximal punto 1 (P1); proximal punto 2 (P2), proximal punto 3 (P3).

	D1	M1	P1	D2	M2	P2	D3	M3	P3	Total
Acidobacteria	1	0	0	2	0	0	0	1	2	6
Actinobacteria	13	7	45	18	18	14	8	13	42	178
Aquificae	12	5	29	8	10	7	1	11	4	87
Armatimonadetes	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Bacteroidetes	6	4	1	28	26	4	2	6	19	96
Balneolaeota	0	1	2	1	1	1	0	0	0	6
Calditrichaeota	1	1	0	0	0	0	1	1	1	5
Candidatus Melainabacteria	6	2	1	1	4	0	1	1	5	21
Chlamydiae	4	1	2	3	0	0	1	4	1	16
Chlorobi	0	0	0	0	0	2	0	0	2	4
Chloroflexi	15	6	37	11	21	14	5	14	12	135
Cyanobacteria	708717	272813	182833	346864	344974	521465	272260	703569	356496	3709991
Deferribacteres	1	1	0	1	0	1	2	1	0	7
Deinococcus-Thermus	14	41	8	5	9	10	5	14	2	108
Firmicutes	3330	1476	2903	3089	2634	2215	1581	3224	1968	22420
Fusobacteria	13	12	6	8	8	4	7	12	10	80
Gemmatimonadetes	2	0	0	1	0	3	2	2	1	11
Ignavibacteriae	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Lentisphaerae	0	0	0	1	0	0	0	0	3	4
Nitrospirae	2	0	0	0	0	0	0	2	0	4
Planctomycetes	16	1	7	8	16	39	2	14	8	111
Proteobacteria	1557	898	1798	1003	937	1284	720	1464	868	10529
Spirochaetes	0	1	1	1	0	2	1	0	5	11
Synergistetes	60	17	46	39	30	43	11	50	22	318
Tenericutes	11	7	43	6	3	7	3	11	99	190
Thermodesulfobacteria	1	2	1	0	1	2	1	0	2	10
Thermotogae	11	12	35	12	12	10	4	11	13	120
Verrucomicrobia	1	0	0	0	0	2	0	0	0	3

Anexo 5. Abundancia (Número de reads) de cada uno de los 28 Phyla obtenidos por sitio de muestreo: Mangaña (1), Miramar (2) y La Plata (3).

Sitio	1	2	3
Acidobacteria	1	2	3
Actinobacteria	65	50	63
Aquificae	46	25	16
Armatimonadetes	1	0	0
Bacteroidetes	11	58	27
Balneolaeota	3	3	0
Calditrichaeota	2	0	3
Candidatus Melainabacteria	9	5	7
Chlamydiae	7	3	6
Chlorobi	0	2	2
Chloroflexi	58	46	31
Cyanobacteria	1164363	1213303	1332325
Deferribacteres	2	2	3
Deinococcus-Thermus	63	24	21
Firmicutes	7709	7938	6773
Fusobacteria	31	20	29
Gemmatimonadetes	2	4	5
Ignavibacteriae	0	0	1
Lentisphaerae	0	1	3
Nitrospirae	2	0	2
Planctomycetes	24	63	24
Proteobacteria	4253	3224	3052
Spirochaetes	2	3	6
Synergistetes	123	112	83
Tenericutes	61	16	113
Thermodesulfobacteria	4	3	3
Thermotogae	58	34	28
Verrucomicrobia	1	2	0

Anexo 6. Índice de diversidad de Shannon por sección de hoja.

Sección de la hoja	Índice de Shannon
Distal punto 1	0.04831693
Media punto 1	0.06009150
Proximal punto 1	0.1473480713
Distal punto 2	0.07480713
Media punto 2	0.06799272
Proximal punto 2	0.04796302
Distal punto 3	0.05610658
Media punto 3	0.04668107
Proximal punto 3	0.05822561

Anexo 7. Índice de diversidad de Shannon por puntos de muestreo.

Sitio	Índice de Shannon
Mangaña	0.06875650
Miramar	0.06174798
La Plata	0.05185142