



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

**COMUNIDADES BACTERIANAS EN LA FILÓSFERA: UN ANÁLISIS DE LA
GIMNOSPERMA EPIFITA *ZAMIA PSEUDOPARASITICA***

LILISBETH RODRÍGUEZ-CASTRO

Directores de Tesis

Kristin Saltonstall, PhD

Juan Carlos Rodríguez, PhD

**Tesis presentada como uno de
los requisitos para optar al
grado de Maestro en
Microbiología Ambiental**

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2024

Dra. KRISTIN SANTONSTALL, Investigadora de los Laboratorios de Naos, del Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales de Panamá.

CERTIFICA QUE: LILISBETH RODRÍGUEZ-CASTRO

Ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis de Maestría, con el título: COMUNIDADES BACTERIANAS EN LA FILÓSFERA: UN ANÁLISIS DE LA GIMNOSPERMA EPIFITA *ZAMIA PSEUDOPARASITICA*

Revisado este trabajo, autorizan su presentación para ser juzgado, y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Panamá el 27 de noviembre de 2024

DEDICATORIA

A **mi abuela (QEPD) y mamá**, por su amor incondicional, apoyo inquebrantable y por enseñarme el valor del esfuerzo y la perseverancia.

A **mis directores**, quienes con su conocimiento y orientación me han ayudado a crecer académica y personalmente.

A **mis amigos y compañeros**, por su apoyo, motivación y por compartir conmigo cada desafío y logro a lo largo de este proceso.

Y, especialmente, a **la naturaleza y la ciencia**, por despertar en mí la curiosidad y la pasión por descubrir y comprender el mundo que nos rodea.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más profundo agradecimiento a mis directores de tesis, cuya guía y paciencia han sido esenciales para la culminación de este trabajo. A mis compañeros y amigos en la investigación, por compartir ideas, esfuerzos y momentos inolvidables a lo largo del proceso.

Agradezco especialmente el apoyo financiero de la **Beca SENACYT-UP**, la **Beca Short-Term de STRI** y el **Jardín Internacional de Cícadas de la Universidad de Panamá**, cuyo respaldo fue crucial para la realización de este estudio.

Finalmente, a todos aquellos que, de una u otra manera, contribuyeron a este logro, mi más sincero reconocimiento.

ÍNDICE

INDICE GENERAL

Índice

Índice de tablas

Índice de figuras

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	6
MARCO TEÓRICO	8
Diversidad de microorganismos en la filosfera.....	8
Factores que afectan el ensamblaje de la microbiota en la filosfera	8
Funciones de la microbiota en la filosfera	11
Plantas epifitas – microbiota en la filosfera de plantas del dosel.....	14
Microorganismos fijadores de nitrógeno (Bacterias diazotróficas).....	16
Métodos moleculares utilizados para la identificación taxonómica de comunidades bacterianas.....	18
JUSTIFICACIÓN	20
OBJETIVOS:.....	22
Objetivo General:.....	22
Objetivos específicos:	22
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	22
METODOLOGÍA	25
Sitios de estudio.....	25
Muestreo en campo.....	25
Extracción de ADN y secuenciación de amplicones.....	26
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS.....	29
Procesamiento de datos de secuencias de amplicones.....	29
Composición de la comunidad bacteriana en la filosfera de <i>Z. pseudoparasitica</i>	30
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	31
Efecto de la temporada y sitio en la composición de la comunidad bacteriana	31
RESULTADOS	33

Composición de la comunidad bacteriana en la filosfera de <i>Z. pseudoparasitica</i>	33
Variación en los factores ambientales entre cada sitio y temporada de muestreo	34
Composición de la microbiota de la filosfera asociada a cada sitio y temporada	38
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	44
ANEXO.....	61

Índice de Tablas

Tabla 1. Valores promedio de los factores medidos durante cada colecta . 34

Tabla 2. Variación de la composición de la comunidad microbiana de la filosfera 37

Índice de Figuras

Figura 1. Factores bióticos y abióticos que determinan la composición de la microbiota en la filosfera. 9

Figura 2. Importancia de la microbiota de la filosfera..... 14

Figura 3. Individuo femenino con cono ovulado 15

Figura 4. Reacciones químicas durante la fijación biológica de nitrógeno 18

Figura 5. Área de estudio..... 25

Figura 6. Muestreo en campo..... 26

Figura 7. 29

Figura 8. Abundancia relativa 35

Figura 9. Diversidad alfa de las comunidades de la filosfera de *Z. pseudoparasitica* 36

Figura 10. Ordenaciones del Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)	37
Figura 11. Análisis Linear Discriminante (LDA) con el efecto del tamaño (LEfSe)	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ARN	ÁCIDO RIBONUCLEICO
ADN	ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO
ATP	ADENOSÍN TRIFOSFATO
PCR	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
STRI	INSTITUTO SMITHSONIANS DE INVESTIGACIONES TROPICALES
ASV	VARIANTES DE SECUENCIA DE AMPLICONES
EEG	LABORATORIO DE GENÓMICA ECOLÓGICA Y EVOLUTIVA
NSG	NEXT GENERATION SEQUENCING (SECUENCIACIÓN DE PRÓXIMA GENERACIÓN)
MISEQ	PLATAFORMA DE SECUENCIACIÓN DE ILLUMINA
LEFSE	LINEAR DISCRIMINANT ANALYSIS EFFECT SIZE
PCOA	ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES
PERMANOVA	ANÁLISIS MULTIVARIANTE PERMUTACIONAL DE LA VARIANZA
BSA	ALBÚMINA DE SUERO BOVINO
CTAB	BROMURO DE CETILTRIMETILAMONIO
GTR	GENERAL TIME REVERSIBLE (MODELO EVOLUTIVO USADO EN FILOGENIA)
LDA	ANÁLISIS DE DISCRIMINACIÓN LINEAL
NIFH	GEN MARCADOR DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO
UICN	UNIÓN INTERNACIONAL PARA LA CONSERVACIÓN DE LA NATURALEZA
IAA	ÁCIDO INDOLACÉTICO

RESUMEN

La superficie aérea de las plantas como hábitat, es conocido como la filosfera y comprende la capa de microorganismos que coloniza la superficie de las plantas, incluyendo sus hojas. Este hábitat es crucial para los ecosistemas, ya que contribuye a procesos como el ciclo de nutrientes, la fijación de nitrógeno, además de la defensa contra fitopatógenos. En este estudio se analizó la comunidad bacteriana en la filosfera de *Zamia pseudoparasitica*, evaluando su variación en relación con tres sitios (El Cope, Santa Fe y Palo Seco) y dos temporadas (seca y lluviosa) de muestreo. Los resultados mostraron que no existen diferencias significativas en la composición y diversidad bacteriana entre los sitios y las temporadas analizadas, lo que contrasta con hallazgos previos en ecosistemas tropicales, donde se ha observado que las comunidades bacterianas responden a factores geográficos y estacionales. Mediante el análisis de discriminación lineal (LDA), se identificaron géneros bacterianos característicos para cada sitio, sugiriendo adaptaciones locales a condiciones ambientales particulares; por ejemplo, *1174-901-12* fue predominante en Palo Seco, mientras que *Acidothermus* se destacó en Santa Fe. En El Cope, se registraron *Pseudocardia* durante la temporada seca y *Granulicella* en la temporada lluviosa. Estos hallazgos subrayan la necesidad de investigar más a fondo las interacciones microbianas en la filosfera y su impacto en la salud y adaptación de las plantas ante los desafíos ambientales contemporáneos.

Palabras claves: filosfera, *Zamia pseudoparasitica*, microbiota, bacterias diazotróficas, fijación de nitrógeno.

ABSTRACT

The aerial surface of plants as a habitat, known as the phyllosphere, comprises the layer of microorganisms that colonize the surface of plants, including their leaves. This habitat is crucial for ecosystems, as it contributes to processes such as nutrient cycling, nitrogen fixation, as well as defense against phytopathogens. In this study we analyzed the bacterial community in the phyllosphere of *Z. pseudoparasitica*, evaluating its variation in relation to three sites (El Cope, Santa Fe and Palo Seco) and two sampling seasons (dry and rainy). The results showed that there are no significant differences in bacterial composition and diversity among the sites and seasons analyzed, which contrasts with earlier findings in tropical ecosystems, where it has been observed that bacterial communities respond to geographical and seasonal factors. Using linear discrimination analysis (LDA), characteristic bacterial genera were identified for each site, suggesting local adaptations to environmental conditions; for example, *1174-901-12* was predominant in Palo Seco, while *Acidothermus* was prominent in Santa Fe. At El Cope, *Pseudocardia* was recorded during the dry season and *Granulicella* during the rainy season. These findings underscore the need to further investigate microbial interactions in the phyllosphere and their impact on plant health and adaptation to environmental challenges.

Keywords: phyllosphere, *Zamia pseudoparasitica*, microbiota, diazotrophic bacteria, nitrogen fixation.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y MARCO

TEÓRICO

INTRODUCCIÓN

La filosfera, la superficie aérea de las plantas como hábitat para los microorganismos, incluyendo hojas, tallos, flores y frutos (Knief et al. 2010; Lindow y Brandl, 2003), representa uno de los hábitats más diversos de nuestro planeta, con una cobertura estimada de hasta 10^9 km² a nivel mundial (Lindow y Leveau, 2002; Morris et al. 2002). Estas comunidades microbianas pueden desempeñar un papel fundamental en la aptitud y productividad de la planta huésped y, en consecuencia, en la dinámica del ecosistema (Laforest-Lapointe y Whitaker, 2019). Son capaces de alterar el crecimiento de las plantas (Sasse et al. 2018), aportando elementos esenciales como compuestos de azufre (Warshan et al. 2018) y contribuyendo considerablemente al balance de nitrógeno al fijar este elemento crítico, tanto para la defensa como para el crecimiento de las plantas (Laforest-Lapointe y Whitaker, 2019). Sin embargo, la filosfera de las plantas en el dosel de los bosques tropicales sigue siendo la frontera menos explorada (Freiberg, 1998).

En comparación con los diversos ambientes microbianos como la rizosfera, la filosfera representa un ambiente de complejidad bacteriana reducida (Delmotte et al. 2009), en su mayoría aerobios estrictos, miembros de los filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacterias; todos ellos expuestos a un entorno inestable de constantes variaciones ambientales como fluctuaciones de temperatura, humedad relativa y radiación solar (Truchado et al. 2019; Vorholt, 2012) que tiene un efecto directo sobre su diversidad y abundancia; esto combinado con el limitado acceso a nutrientes (Lindow y Leveau, 2002; Hirano y Upper, 2000) y la temporada del año (Redford et al. 2010) pueden influir en el ensamblaje de estas comunidades microbianas. El genotipo del huésped y la presencia de otras plantas en los alrededores, también son factores que contribuyen (Aglar et al. 2016; Balint-Kurti et al. 2010; Hunter et al. 2010;).

En el dosel del bosque, las epífitas vasculares enfrentan varias limitaciones respecto a la adquisición de nutrientes (Stanton et al. 2019), especialmente nitrógeno y fósforo. Y un ejemplo de la importancia de los microorganismos en la filosfera es una de las funciones mejor estudiadas, un grupo de bacterias capaces de utilizar nitrógeno atmosférico para

producir amoníaco mediante un proceso conocido como fijación de nitrógeno (Camelo et al. 2011).

En el dosel de los bosques montanos panameños, solo hay una especie con nódulos en la raíz que albergan bacterias fijadoras de nitrógeno (del género *Nostoc*), la gimnosperma *Zamia pseudoparasitica* (Bell-Doyon et al. 2020). Sin embargo, se desconoce si su filosfera contiene microorganismos que también puedan fijar nitrógeno.

Zamia pseudoparasitica Yates, es una cícada endémica del Istmo de Panamá que está clasificada como “amenazada” en la lista roja de la Unión Internacional Para La Conservación De La Naturaleza (UICN) (Taylor, 2010) debido a la deforestación y la extracción furtiva (Stevenson et al. 2003). Esta es la única especie de *Zamia* y gimnosperma estrictamente epífita en el mundo (Taylor et al. 2012), y se distribuye en bosques húmedos premontanos entre 50-1000 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) en la vertiente atlántica del oeste de Panamá (Stevenson, 1993). Crece adherida a grandes troncos de árboles y anida en las bifurcaciones inferiores de grandes árboles de dosel a alturas entre 7 a 20 m (Monteza-Moreno, et al. 2022; Bell-Doyon y Villarreal, 2020a). Esta especie es uno de los miembros más comunes del dosel premontano tropical, y actualmente existe un creciente conocimiento sobre sus interacciones bióticas con otros organismos (Sierra et al. 2024; Monteza-Moreno, et al. 2022; Bell-Doyon y Villarreal, 2020a; Bell-Doyon et al. 2020;), aunque aún se desconoce la diversidad de las comunidades microbianas en su filosfera. En este trabajo, nos preguntamos si existe una asociación específica planta-microorganismo en la filosfera de *Z. pseudoparasitica*, y cómo diferentes factores ambientales afectan en la composición de su comunidad bacteriana. Por lo que, se propone caracterizar las comunidades bacterianas en su filosfera, considerando la influencia de factores ambientales como la temperatura, humedad relativa, cobertura del dosel y temporada de muestreo.

MARCO TEÓRICO

Diversidad de microorganismos en la filosfera

La filosfera proporciona un hábitat definido por la disponibilidad de nutrientes y un refugio contra el estrés (Van Der Wal y Leveau, 2011; Lindow y Brandl, 2003), por lo que las hojas de diferentes especies hospederas filtran distintas fracciones de la reserva microbiana de la filosfera (Lajoie y Kembel, 2021), dando como resultado un recambio en la composición taxonómica y funcional de las comunidades microbianas de este hábitat (Lajoie et al. 2020).

Las bacterias son consideradas el taxón más abundante de la filosfera, con alrededor de $10^6 - 10^8$ células por cm^2 (Yadav et al. 2010). Entre los grupos de bacterias más comunes en este hábitat encontramos a las Proteobacterias, particularmente las α -Proteobacterias, aunque a veces las γ -Proteobacterias son más frecuentes (Kembel et al. 2014; Redford et al. 2010; Delmotte et al. 2009; Redford y Fierer, 2009) y en algunos casos, las β -Proteobacterias y Firmicutes representan una amplia porción de las comunidades bacterianas, y con menor frecuencia ocurren Actinobacterias, Acidobacterias y Cianobacterias. Estas variaciones en la frecuencia de cada taxón dependen de factores, como las características de la planta hospedera, temporada del año y la ubicación geográfica (Lambais et al. 2014; Rasche et al. 2006a, Rasche et al. 2006b).

Las familias frecuentemente reportadas en este hábitat son principalmente las Metilobacteriaceae y Sphingomonadaceae (α -Proteobacteria), siendo *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Bacillus*, *Massilia*, *Arthrobacter*, y *Pantoea* los géneros más comunes (Delmotte et al. 2009).

Factores que afectan el ensamblaje de la microbiota en la filosfera

Debido a que la filosfera es un nicho abierto, la microbiota asociada proviene de múltiples fuentes y su ensamblaje está sujeto a diferentes variables ambientales, como fluctuaciones de la temperatura, radiación ultravioleta, estrés nutricional, humedad

relativa y desecación (Truchado et al. 2019; Zhou et al. 2019; Stone y Jackson, 2016; Vorholt, 2012), lo que indica que las comunidades de microorganismos que prevalecen en este hábitat, están muy bien adaptados a estas condiciones extremas. Sin embargo, debido a la dinámica que siguen las comunidades microbianas de la filosfera, se mencionan otros factores como la identidad de la planta hospedera, la posición geográfica y la temporada de muestreo (Qian et al. 2020; Bao et al. 2020; Vorholt, 2012; Lindow y Brandl, 2003), como determinantes en la composición y diversidad taxonómica de la microbiota de la filosfera (Bashir et al. 2022).

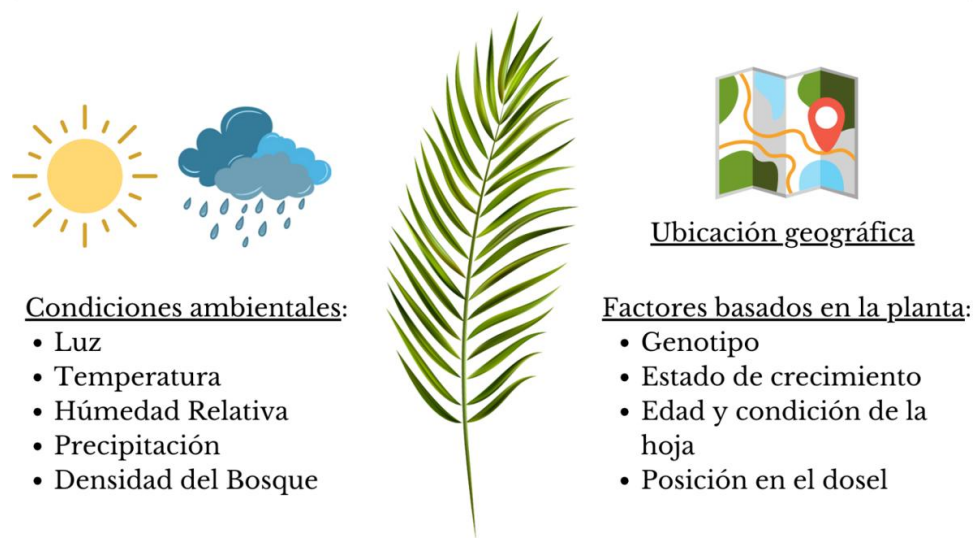


Figura 1. Factores bióticos y abióticos que determinan la composición de la microbiota en la filosfera.

Principales factores que influyen en el ensamblaje de la microbiota en la filosfera:

- **Identidad del hospedero:** diferentes estudios han identificado diferencias en las comunidades microbianas en plantas de diferentes especies (Sapkota et al. 2015; Kembel et al. 2014; Redford et al. 2010).

De acuerdo con lo antes mencionado, pareciera que el reclutamiento microbiano en la filosfera ocurre de acuerdo con la importancia funcional de las diferentes comunidades microbianas para las características de la planta y la estrategia ecológica de la planta hospedera. Esto fue evidenciado por Kembel et al. (2014), cuando realizaron un estudio

de la influencia de 57 especies de árboles hospederos en la composición de las comunidades bacterianas de la filosfera en un bosque en Panamá.

- **Temporada del año:** las variaciones causadas por la temporada del año (temporada seca y temporada lluviosa), provocan cambios radicales en la temperatura, humedad y los niveles de radiación solar, produciendo variaciones en el ensamblaje y, por ende, en la estructura y composición de las comunidades bacterianas de la filosfera (Beattie, 2011; Joung et al. 2017). Uno de los primeros en estudiar esta dinámica en un periodo corto de tiempo fue Jackson et al. (2006), enfocándose en el efecto del cambio de temporada en la composición del microbioma de la filosfera. Encontrando una clara reducción desde 9 linajes, a solo 4 linajes de bacterias después de las lluvias. Otros que atribuyeron la identificación de una variación microbiana a la diferencia entre temporadas del año fueron Laforest-Lapointe et al. (2006a).

Estas variaciones provocadas por la temporada resaltan la importancia de considerar el tiempo de muestreo y la edad del hospedero, al realizar investigaciones de la ecología microbiana de la filosfera (Bashir et al. 2022).

- **Ubicación geográfica:** muchos investigadores han explorado continuamente el patrón en los ensamblajes microbianos a través de diversas ubicaciones biogeográficas (Stone y Jackson, 2016; Qian et al. 2020). Diferentes estudios mencionan la ubicación geográfica como un factor importante que diferencia las comunidades microbianas de la filosfera incluso entre individuos de la misma especie (Finkel et al. 2011; Redford et al. 2010).

Otros estudios han confirmado que, como las plantas, en las comunidades microbianas, también se observa endemismo (Bashir et al. 2020). Por ejemplo, Coleman-Derr et al. (2016) colectaron plantas de agave cultivadas en regiones geográficas lejanas y examinaron la composición de microorganismos en su filosfera, mostrando que el origen del hospedero representa un factor significativo que da forma al ensamblaje de hongos en la filosfera (Bonito et al. 2014). Otros estudios han demostrado una correlación negativa entre la distancia geográfica y la similitud de las comunidades microbianas en la filosfera (Stone y Jackson, 2016; Rastogi et al. 2013; Finkel et al. 2012) y esta relación

indica que las plantas que crecen más cerca tienen comunidades microbianas en la filosfera similares y esta similitud va decayendo con el aumento en la distancia (Stone y Jackson, 2016; Finkel et al. 2012).

Funciones de la microbiota en la filosfera

Una vez establecido completamente en la filosfera, entra en juego la interacción entre los microorganismos y el organismo hospedero, que puede ser positiva (mutualismo), neutra (comensalismo) o negativa (competencia, depredación, parasitismo) (Faust y Raes, 2012). Por ejemplo, en la filosfera se encuentran algunas bacterias promotoras del crecimiento vegetal como *Microbacterium*, *Stenotrophomonas* y *Methylobacterium*, que pueden mejorar el crecimiento y el estado nutricional de la planta hospedera mediante la producción de reguladores de crecimiento naturales (Ej., IAA) y la fijación de nitrógeno (Madhaiyan et al. 2015; Abadi et al. 2021). También, se puede encontrar bacterias metilotróficas predominantes, pertenecientes a los géneros *Hyphomicrobium*, *Methylobacterium*, *Methylibium*, *Methylophilus*, *Methylocapsa*, *Methylocella* y *Methylocystis* (Krishnamoorthy et al. 2018; Mizuno et al. 2013). Estas bacterias utilizan el metanol (CH₃OH) o metano (CH₄) como única fuente de carbono y energía, siendo útiles para la promoción del crecimiento de las plantas (Abanda-Nkpwatt et al. 2006).

Comunidades en la filosfera pueden desempeñar un papel fundamental en el impulso de la aptitud y productividad de la planta hospedera, al afectar las funciones y longevidad de la hoja, crecimiento apical, floración y el desarrollo de la fruta. Al mismo tiempo que son clave en la eliminación de contaminantes (Liu et al. 2019; Stone et al. 2018; Thapa et al. 2018) y en la considerable contribución al presupuesto de nitrógeno a través de la fijación de este importante elemento, tanto para la defensa como el crecimiento de la planta, lo que en consecuencia influye en la dinámica del ecosistema (Laforest-Lapointe y Whitaker, 2019). También, la microbiota de la filosfera influye en la reducción de las emisiones de metanol (Ej., metilotrofos) e isopreno a la atmósfera (Ej., bacterias del género *Variovorax* que degradan el isopreno) (Crombie et al. 2018; Abanda-Nkpwatt et al. 2006).

Principales funciones de la microbiota en la filosfera:

- **Adquisición de nutrientes:** en los ecosistemas tropicales húmedos como nuestros bosques, la fijación de nitrógeno en la filosfera representa el principal mecanismo de adición de nitrógeno (Stanton et al. 2019; Abril et al. 2005), debido a la alta humedad y temperatura en la superficie de las hojas en los ecosistemas tropicales, lo que permite que estas importantes bacterias se encuentren activas, agregando el nitrógeno requerido en las superficies de las hojas (Fürnkranz et al. 2008).

Además del nitrógeno, la microbiota de la filosfera también modifica la disponibilidad de otros nutrientes para su absorción por las plantas. Muchos estudios han confirmado la presencia de microorganismos solubilizadores de fosfato en la filosfera (Thapa et al. 2017; Mwajita et al. 2013). En este proceso, se han documentado diferentes bacterias de la filosfera consideradas como los mejores solubilizadoras de fosfatos para el crecimiento y desarrollo de la planta, encontrándose géneros como *Bacillus* sp. (*B. alcalophilus*, *B. aryabhatai*, *B. thuringiensis*); *Pseudomonas* sp. (*P. fuscovaginae*, *P. fluorescens*); *Methylobacterium* sp. (*M. extorquens*, *M. mesophilicum*, *M. radiotolerans*); *Acetobacter* sp., *Celulosi microbium* sp., *Enterobacter* sp., *Arthrobacter humicola*, *Chryseobacterium*, *Delftia*, *Gordonia*, *Klebsiella terrigena*, *Paenibacillus amylolyticus*, *Phyllobacterium*, *Psychrobacter fozii*, *Rhodococcus*, *Serratia*, etc. (Verma et al. 2014; Kumar et al. 2013; Souza et al. 2013).

Otro proceso importante que también es llevado a cabo por microorganismos en la filosfera, es la solubilización de potasio (K). Se han registrado especies como *Bacillus mucilaginosus*, *Paenibacillus amylolyticus*, *Psychrobacter fozii* capaces de solubilizar el potasio (Verma et al. 2014). Además, algunos autores como Thapa et al. (2018); Fu et al. (2016) y Scavino y Pedraza (2013), han documentado que también algunos microorganismos de la filosfera producen sideróforos para obtener hierro. Mientras que Esitken et al (2010), también han documentado microorganismos de la filosfera involucrados en la absorción de otros micronutrientes como el zinc y cobre.

- **Biocontrol de patógenos de plantas:** uno de los efectos positivos de los microorganismos de la filosfera es el biocontrol de patógenos y plagas asociadas a enfermedades de las plantas. La microbiota mutualista de la filosfera puede desempeñar un papel vital en el mantenimiento de la salud de las plantas y en la supresión del crecimiento excesivo de patógenos vegetales. También, a esta asociación se le atribuye un mejoramiento del estado fitosanitario, otorgando resistencia a las enfermedades y a factores ambientales (Santos et al. 2021; Daval et al. 2020; Edwards et al. 2018; Foo et al. 2017; Vorholt et al. 2017), como es el caso de los miembros del género *Sphingomonas* que pueden contribuir a la salud de las plantas, ya que mostró supresión de síntomas de enfermedades y reducción del crecimiento del patógeno foliar *Pseudomonas syringae* pv. cepa de tomate en *Arabidopsis thaliana* en condiciones de laboratorio (Innerebner et al. 2011), interesantemente este beneficio a la planta hospedera solo se observó en aquellas cepas adaptadas a las plantas y no fue observada en aquellas aisladas del aire o agua.

- **Producción de hormonas de crecimiento de la planta:** a los microorganismos asociados a la filosfera se les otorga la habilidad de modular el crecimiento de la planta a través de la producción de reguladores de crecimiento, como auxinas, ácido giberélico, etileno, citoquininas y ácido abscísico. Estos reguladores de crecimiento de las plantas son producidos por la microbiota de la filosfera y funcionan como contribuidores auxiliares a la usual pool de hormonas de la planta (Bashir et al. 2022).

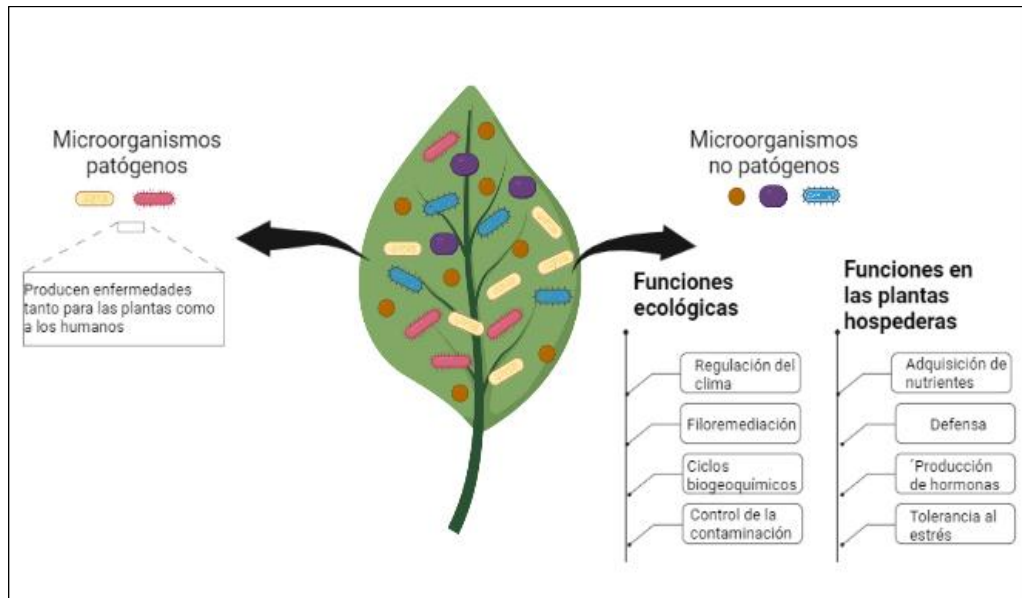


Figura 2. Importancia de la microbiota de la filofera. Las comunidades están representadas por microorganismos patógenos y no patógenos, quienes juegan un papel importante en funciones ecológicas y para la planta huésped.

Plantas epífitas – microbiota en la filofera de plantas del dosel

El dosel de los bosques tropicales y subtropicales ha recibido mucha atención durante las últimas décadas, debido al desarrollo de técnicas de acceso al dosel que incrementaron el conocimiento sobre su importancia para la función del bosque, y la biodiversidad (Perry, 1985), albergando una gran diversidad de plantas epífitas.

Las plantas epífitas (del griego epi que significa “sobre, y phyte, “planta”) son aquellas que crecen sobre otras plantas, adheridas a sus troncos y ramas principalmente, sin causar ningún daño al árbol hospedero. A diferencia de las plantas del suelo, las epífitas se enfrentan a un limitado acceso a nutrientes debido a que están desconectadas del pool de nutrientes del suelo, desplegando variados y novedosos mecanismos sin tomar nada del árbol hospedero, accediendo a los nutrientes necesarios a través de la precipitación e interactuando como mutualistas con microorganismos (Bell-Doyon et al. 2019).

En dosel de los bosque pre montanos panameños, entre 50-1000 m.s.n.m en el lado Atlántico del oeste de Panamá (Stevenson, 1993), crece la única gimnosperma estrictamente epífita conocida hasta ahora (Bell-Doyon y Villarreal, 2020; Taylor et al. 2008, 2012, 2014; Stevenson, 1993), *Zamia pseudoparasitica* (Figura 4), una cícada endémica del Istmo que crece sobre troncos o en las bifurcaciones de grandes árboles a alturas de 7 a 20 m, lo que ha provocado un creciente interés en su historia natural (Monteza-Moreno et al. 2022; Bell-Doyon et al. 2020). Actualmente, se encuentra clasificada como “casi amenazada” según la lista roja de la UICN (Bell-Doyon y Villarreal, 2020; Taylor 2010) debido a la deforestación y la extracción ilegal (Stevenson et al. 2003). Un ejemplo de esto es lo que ocurre en Donoso (Provincia de Colón), en donde sus bosques albergan miles de individuos de *Z. pseudoparasitica*, siendo una de las mayores poblaciones conocidas de esta especie (Bell-Doyon y Villarreal, 2020), y las actividades mineras son una de sus principales amenazas, ya que 12,955.1 hectáreas de este bosque serán deforestadas para trabajar la minería de cobre (First Quantum Minerals, Gaceta oficial de la Ley 406 del 2023).



Figura 3. Individuo femenino con cono ovulado de la única gimnosperma estrictamente epífita del mundo, *Zamia pseudoparasitica*, epífita sobre árbol de 20 m en bosque premontano en el Parque Nacional Santa Fe (crédito de foto: Pedro Castillo-Caballero).

Microorganismos fijadores de nitrógeno (Bacterias diazotróficas)

En los bosques tropicales, la interfaz entre la superficie de las hojas y la atmósfera es una vía fundamental para el ciclo de nutrientes (particularmente nitrógeno), hasta el punto de considerarse incluso más importante que la interfaz suelo-planta (Parker, 1994; Silver et al. 1996).

El nitrógeno es un macroelemento esencial para las plantas, utilizado para la producción de proteínas, ácidos nucleicos, moléculas de transporte y energéticas (Mayz-Figueroa, 2004). Además, es la principal limitante después del agua, en el desarrollo y productividad de las plantas (Arias et al. 1999). Este representa cerca del 80% entre los gases de la atmósfera, sin embargo, debido al triple enlace que forma su molécula ($N\equiv N$) no puede ser utilizado por la mayoría de los seres vivos, debido a que las plantas son incapaces de obtener este elemento de la forma en que se encuentra naturalmente, y solo un grupo de microorganismos conocidos como diazotrofos son capaces de extraerlo del aire para producir amonios y óxidos, haciéndolo disponible para las plantas, por medio de un proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno (Camelo et al. 2011; Orozco, 1999). La fijación biológica de nitrógeno contribuye con alrededor de la mitad de las entradas anuales de nitrógeno en la biosfera (Vitousek et al. 1997), siendo también una importante fuente de nitrógeno en los ecosistemas (Cleveland et al., 1999). Este proceso se lleva a cabo gracias a la nitrogenasa, un complejo enzimático que tiene dos componentes, un núcleo heterotetramérico codificado por *nifD* y *nifK*, y una subunidad dinitrogenasa reductasa codificada por *nifH*. De estos, el gen *nifH* es el biomarcador más utilizado para estudiar la ecología y evolución de las bacterias fijadoras de nitrógeno (Raymond et al. 2004), este es uno de los genes funcionales más secuenciados y >90% de sus secuencias han sido depositadas en la base de datos desde 2005.

Existen diferentes estudios sobre la diversidad de este gen en una amplia gama de entornos, como ecosistemas marinos (Farnelid et al. 2011; Langlois et al. 2005; Zehr et al. 1998), terrestres (Roesch et al. 2008; Izquierdo y Nusslein, 2006; Rosch et al. 2002) e hidrotermales (Mehta et al. 2003), entre otros (Gaby y Buckley, 2014).

Estudios previos han informado de correlaciones entre las comunidades bacterianas sobre las hojas y la actividad de fijación de N (Fürnkranz et al. 2008; Abril et al. 2005), reportando bacterias diazotróficas pertenecientes al grupo de las Proteobacterias como *Azotobacter*, *Beijerinckia*, y *Klebsiella*, también del grupo de las Cianobacterias como *Nostoc*, *Scytonema*, y *Stigonema*.

El dosel de los bosques tropicales representa una amplia superficie que puede ser colonizada por fijadores de nitrógeno de vida libre. La identificación de estas bacterias de acuerdo con sus características metabólicas ha sido posible utilizando pruebas bioquímicas. Sin embargo, actualmente es muy común realizar identificación molecular, analizando secuencias de genes específicos para comprobar el género e inclusive la especie (Fernández et al. 2010).

La identificación a nivel molecular de las bacterias fijadoras de nitrógeno se evalúa por la presencia de los genes *nif*, que hacen parte del complejo enzimático de la nitrogenasa (Oldroyd y Dixon, 2014). Estas moléculas pueden identificarse gracias a técnicas ya desarrolladas como la extracción y amplificación del ADN, y la secuenciación de fragmentos específicos, brindando múltiples beneficios, entre ellos, la certeza y precisión de los resultados que llega a ser muy cercana al 100% (Moreno y Galvis, 2013).

Genes que participan en la fijación de nitrógeno

El proceso de fijación de nitrógeno requiere de mucha energía (16 - 24 ATP) y se lleva a cabo por una serie de reacciones químicas (Figura 4). La reducción de N₂ a amoníaco se realiza mediante un complejo enzimático que se conoce como nitrogenasa; que está compuesto por dos unidades proteicas: el componente reductasa o proteína Fe y el componente catalítico o proteína MoFe (Oldroyd y Dixon, 2014).

Se han reportado tres clases de nitrogenasas homólogas: la de molibdeno (Mo), la de Vanadio (V) y la de hierro (Fe) (Seefeldt et al. 2013); de estas, la más estudiada es la

nitrogenasa Mo de *Azotobacter vinelandii*, que se encuentra formada por una proteína Fe (o *nifH*) y una proteína MoFe (o *nifDK*) (Hu y Ribbe, 2013).

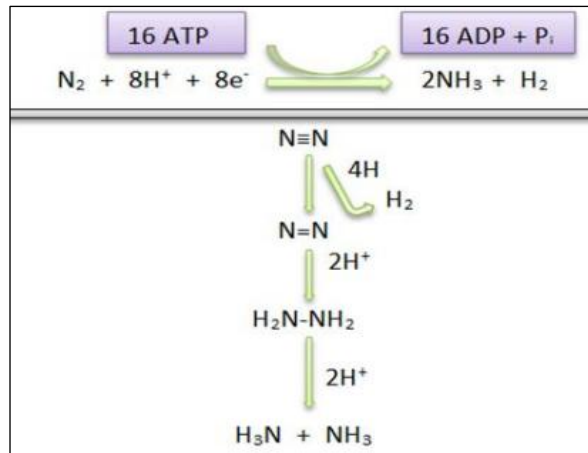


Figura 4. Reacciones químicas durante la fijación biológica de nitrógeno (Fuentes y Massol-Deyá, 2002).

Métodos moleculares utilizados para la identificación taxonómica de comunidades bacterianas

Las interacciones entre las plantas y su microbiota asociada son cruciales en el rendimiento y resiliencia del hospedero ante las perturbaciones del ambiente (p. Ej. El cambio climático) (Zhu et al. 2022) y estudios de aislamiento tradicional han demostrado que la diversidad de bacterias en la filosfera incluye microorganismos patógenos de plantas, descomponedores, productores de fitohormonas y antagonistas de patógenos de plantas (Fürnkranz et al. 2008; Morris y Kinkel, 2002; Hirano y Upper, 2000; Hicks y Silvester, 1985). Sin embargo, la mayoría de los microorganismos en este hábitat son no cultivables (Suda et al. 2008). Estudios recientes han pasado a utilizar técnicas basadas en el ADN ambiental para la identificación de las bacterias dominantes en las comunidades microbianas de las plantas (Banik et al. 2016). Métodos como la secuenciación del ARN ribosómico 16S (ARNr), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos restringidos de los genes del ARNr 16S (16S RFLP) o los análisis de restricción del ADN ribosómico amplificado (ARDRA) se han utilizado para explorar la diversidad y la estructura de las comunidades bacterianas de la filosfera (Venkatachalam et al. 2016; Soka et al. 2012).

Amplificación del gen ARNr 16S

El gen ARNr 16S es un gen que codifica para el polirribonucleótido ARNr 16S y es una diana muy empleada para identificar bacterias. Tiene un tamaño de 1500 pb aproximadamente (Bou et al. 2011) lo que le da una alta resolución, ya que tiene áreas bien conservadas que permite la creación de cebadores universales para todos los filos de bacterias, y también presenta regiones altamente variables que permiten separar taxones, por lo que contienen suficiente información para análisis filogenéticos confiables (Amann et al. 1995; Olsen et al. 2012). La secuenciación de este gen, es considerada 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 (Jang et al. 2021; Starke et al. 2021; Dunbar et al. 2000). Estas características han hecho que la secuenciación con el gen ARNr 16S, proporcione 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).

Amplificación del gen *nifH*

La enzima nitrogenasa es utilizada por los microorganismos para la fijación de nitrógeno y está compuesta por dos unidades (dinitrogenasa y reductasa de dinitrogenasa) codificadas en el genoma bacteriano por los genes *nif*; *nifH* para Fe-proteína y *nifD* y *nifK* para MoFe-proteína (Levy-Booth et al. 2014). De los tres, el gen *nifH* ha sido el más secuenciado, convirtiéndose en el marcador de preferencia para diferentes estudios de filogenia, diversidad, y abundancia de microorganismos fijadores de nitrógeno.

El detectar el gen *nifH* en bacterias de la filosfera, nos ayuda a estimar su potencial para la fijación de nitrógeno, aportando valiosa información, ya que por medio de estas bacterias la planta puede ser afectada positivamente en su crecimiento y desarrollo.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta es una importante técnica que permite amplificar un pequeño fragmento de ADN y obtener millones de copias. Normalmente se emplean diferentes temperaturas y varias repeticiones que van a simular procesos naturales como la desnaturalización de la doble hélice, la unión de los cebadores y la síntesis de la cadena complementaria utilizando la enzima ADN polimerasa (Serrato et al. 2014).

Secuenciación

Desde el desarrollo de la cromatografía bidimensional en 1970, la secuenciación del ADN ha venido recorriendo un largo camino. La tecnología NSG (next generation) no solo ha producido un aumento masivo de la producción de datos, sino que también ha transformado la forma en que se piensa sobre la información genética, pudiendo analizar hoy día entre miles y decenas de miles de muestras en un solo año.

La tecnología Illumina utiliza un método patentado que se basa en un terminador reversible que detecta las bases individuales a medida que se incorporan a las cadenas molde de ADN. Esta tecnología tiene menores tasas de error en bruto en comparación con otras, dando como resultado una secuenciación base a base de gran precisión que elimina prácticamente los errores específicos del contexto de la secuencia, incluso dentro de regiones de secuencias repetitivas y homopolímeros.

JUSTIFICACIÓN

Se han observado variaciones en la composición de la comunidad bacteriana en la filofera de diferentes especies de plantas vecinas (Kembel et al. 2014; Vorholt, 2012), sugiriendo que la identidad de la planta tiene efectos en el reclutamiento de microbios del entorno circundante (Fitzpatrick et al. 2018). Además, la posición en el dosel, debe ser un factor que considerar en el estudio de plantas epífitas, ya que se ha observado que también puede influir en la composición de estas comunidades microbianas (Augusto et al. 2012).

Las comunidades bacterianas de la filosfera están enfrentando un incremento de estrés causado por el cambio climático, particularmente por el calentamiento y la sequía. Este estrés puede dar lugar a estados inestables de las comunidades microbianas, en los que una reducción de los taxones beneficiosos debilita la resistencia de las plantas a la invasión de patógenos y al desarrollo de enfermedades. Siendo esta una de las principales razones por la que los estudios de la microbiota en la filosfera, están actualmente enfocados en conocer la composición de sus comunidades, su distribución, dinámica temporal y, lo más importante, su función para el ecosistema o el hospedero (Vorholt et al. 2017).

Debido al tamaño del hábitat de la filosfera y su importancia para la ecología microbiana, se necesitan estudios sobre la composición de sus comunidades, especialmente en especies como *Z. pseudoparasitica*, una cícada endémica del Istmo de Panamá, que, debido a este endemismo y a su hábito epífita único en el grupo de las Zamias, hacen que esta especie sea una candidata prometedora en temas de ecología.

Este estudio representa la primera caracterización de las comunidades bacterianas de la microbiota en la filosfera de *Z. pseudoparasitica* y los resultados obtenidos serán un importante aporte al conocimiento de la ecología de esta especie y su conservación, que sumados a trabajos anteriores nos brindan una base de datos completa de los microorganismos asociados a *Z. pseudoparasitica*, permitiéndonos hacer inferencias en cuanto a la salud del ecosistema y sirviéndonos como indicadores de la salud de la planta hospedera (Trevelline et al. 2019).

OBJETIVOS:

Objetivo General:

Evaluar la influencia de factores ambientales sobre la interacción planta-microbio en la filosfera de *Z. pseudoparasitica*.

Objetivos específicos:

- 1) Caracterizar las comunidades bacterianas totales en la filosfera de *Z. pseudoparasitica*.
- 2) Identificar potenciales bacterias fijadoras de nitrógeno en la filosfera, a través del uso del gen *nifH*.
- 3) Evaluar la influencia de diferentes factores ambientales como la ubicación geográfica, temperatura, cobertura del dosel y temporada del año en la diversidad de comunidades bacterianas sobre hojas de *Z. pseudoparasitica*.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Ho:

- *Zamia pseudoparasitica* albergará una comunidad bacteriana específica al huésped, determinada por interacción biótica huésped-filósfera y no debida a condiciones abióticas asociadas a variaciones climáticas y estacionales.
- La filosfera no se encuentra compuesta por una diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno.
- La diversidad de comunidades bacterianas sobre las hojas de *Z. pseudoparasitica* no está influenciada por los diferentes factores ambientales. La ubicación geográfica, la temperatura, la densidad boscosa y el mes de muestreo no afectan de manera relevante la composición y abundancia de las bacterias asociadas a estas hojas.

H1:

- La filosfera de *Z. pseudoparasitica* alberga una diversidad de comunidades bacterianas, con una composición específica que puede variar según las condiciones ambientales y la ubicación geográfica.
- La filosfera de *Z. pseudoparasitica* está compuesta por una diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno que expresan el gen *nifH*. Estas bacterias podrían estar desempeñando un papel crucial en la fijación de nitrógeno atmosférico, convirtiéndolo en formas asimilables por la planta hospedante. Además, se espera que la abundancia y diversidad de estas bacterias varíe según la ubicación geográfica y las condiciones ambientales.
- La diversidad de comunidades bacterianas sobre las hojas de *Z. pseudoparasitica* está influenciada por diferentes factores ambientales. La ubicación geográfica, temperatura, densidad boscosa y el mes de muestreo tienen efecto en la composición y abundancia de las bacterias asociadas a estas hojas.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

METODOLOGÍA

Sitios de estudio

El estudio se realizó en tres áreas protegidas en el lado Atlántico del occidente panameño: Bosque Protector Palo Seco, Bocas del Toro (Palo Seco); Parque Nacional Santa Fe, Veraguas (Santa Fe) y Parque Nacional de División General Omar Torrijos Herrera, Coclé (El Cope) (Figura 5), en donde se distribuye *Z. pseudoparasitica* (Yates, 1854). Todos los sitios están compuestos por bosque húmedo tropical premontano.

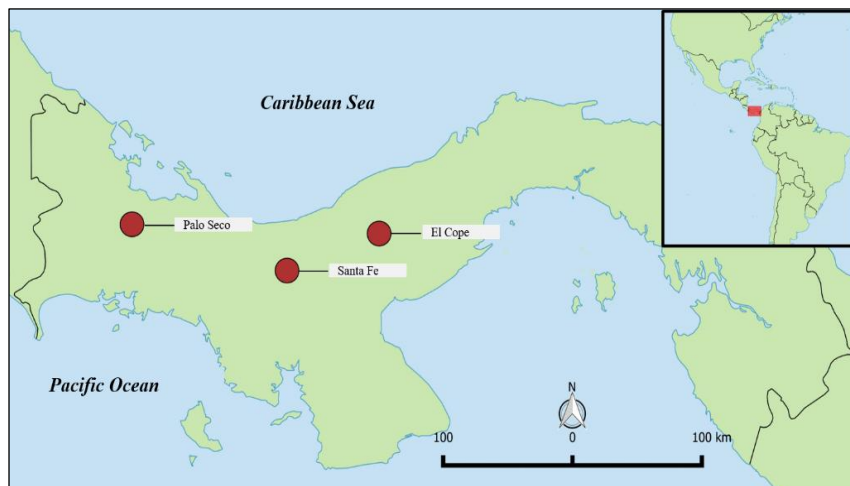


Figura 5. Área de estudio mostrando las ubicaciones de los tres sitios de colecta en áreas protegidas de Panamá.

Muestreo en campo

En cada sitio se seleccionaron 10 individuos medianos de *Z. pseudoparasitica* (con más de 5 y menos de 10 hojas (Bell-Doyon y Villarreal, 2020) (Figura 14), creciendo a una altura media del árbol hospedero (entre 5 y 10 m del suelo). Para medir la altura a la que se encontraban las plantas, se utilizó un hipsómetro y la colecta de los folíolos se realizó utilizando una vara de colecta botánica. Por cada individuo se colectaron dos folíolos de la parte apical de la hoja, libres de briofitas y líquenes epífilos. A cada folíolo se le tomaron fotografías para conocer su área foliar utilizando ImageJ 1.53e (Wayne Rasband y contribuidores, National Institutes of Health, USA). Los folíolos colectados se colocaron

inmediatamente en bolsas estériles, utilizando también estériles. Las muestras se transportaron al laboratorio a 4°C (Figura 16), y luego se colocaron a -20°C hasta su extracción (Figura 6).

Se realizaron dos salidas a campo, para la colecta de muestras. La primera durante la temporada lluviosa, en el mes de octubre del 2022 y la segunda durante la temporada seca, en abril 2023.

Para cada colecta se tomaron medidas de diferentes parámetros ambientales en cada sitio, como la cobertura del dosel (utilizando GLAMA - Gap light Analysis Mobile App) (Tichý, 2015), la humedad relativa y temperatura del sitio (utilizando un higrómetro) y la temperatura local del foliolo colectado (utilizando un termómetro infrarrojo).

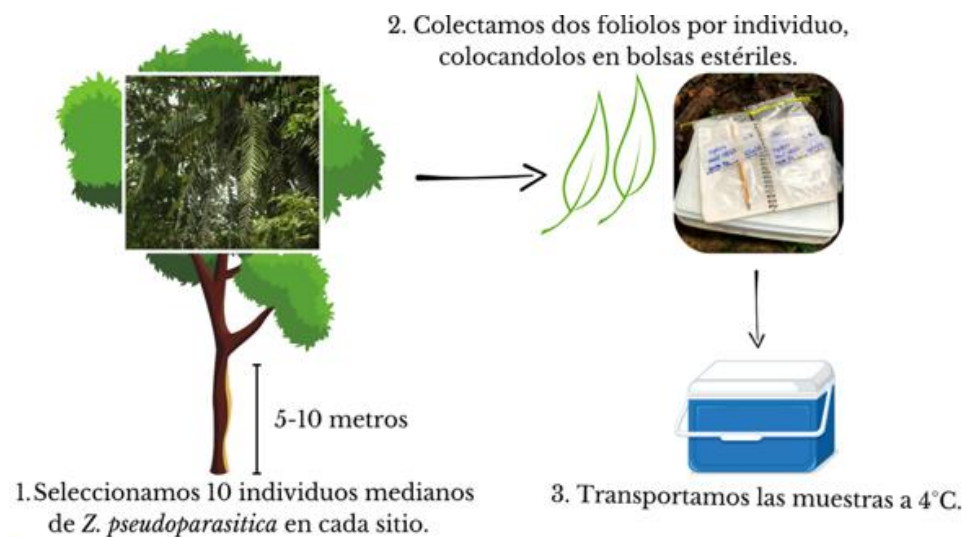


Figura 6. Muestreo en campo. 1) Selección de los individuos de *Z. pseudoparasitica* entre 5-10 m del suelo. 2) Colecta de dos foliolos por cada planta, colocados en bolsas estériles debidamente rotuladas. 3) El transporte de las muestras a 4°C utilizando una nevera portátil.

Extracción de ADN y secuenciación de amplicones

En total se colectaron 120 muestras, cada una con su respectiva réplica (Figura 7). Una vez en el laboratorio, se colocaron 50 mL de una solución de lavado diluida 1:50 (1 M Tris, 5 M NaCl, 0.5 M EDTA, 1.2% CTAB) en las bolsas estériles que contenían cada foliolo y se agitaron durante 10 min a 340 rpm (Figura 17). La solución aislada fue transferida a tubos

tipo Falcon y centrifugada a 10,000 x g por 20 min, y al precipitado resultante, se le realizó la extracción de ADN (Kembel et al. 2014) utilizando el Kit de PowerSoil (QIAGEN, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración y calidad del ADN se evaluó observando los valores de ng/μl usando un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific, USA).

Para caracterizar molecularmente la comunidad de bacterias en la filosfera de *Z. pseudoparasitica* se utilizaron los cebadores específicos de bacterias que excluyen el ADN de cloroplastos 799F (5'- AACMGGATTAGATACCCKG -3') y 1115R (5'- AGGGTTGCGCTCGTTG -3') (Chelius y Triplett, 2001; Redford y Fierer, 2009) para amplificar la región v5-v6 del gen ARNr 16S.

Para amplificar los marcadores moleculares del gen ARNr 16S, se llevó a cabo una PCR en dos pasos y doble índice diseñado específicamente para instrumentos Illumina. En el primer paso, el gen específico secuenciado se fusionó con los cebadores de secuenciación Illumina TruSeq y se llevó a cabo una PCR. Esta reacción de PCR se realizó en un volumen de 10 μL, conteniendo 2.42 μL de agua Sigma grado PCR, 0.2 μL 799F Forward primer (10 μM), 0.2 μL 1115R Reverse primer (10 μM), 5.08 μL de Kapa Taq 2X Mastermix (Roche), 0.1 μL BSA y 2 μL ADNc. La reacción del ciclo térmico inició con la desnaturalización a 95°C por 3 min, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, el anillamiento a 52°C por 30 s, y la extensión a 72°C por 1.5 min, seguido por una extensión final a 72°C por 10 min y 15°C ∞.

Para caracterizar la comunidad de bacterias diazotróficas, utilizamos los cebadores específicos polF (5'- TGCGAYCCSAARGCBGACTC -3') y polR (5'- ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3') (Gaby y Buckley, 2012) para amplificar los marcadores moleculares del gen *nifH*. También, se llevó a cabo una PCR en dos pasos y doble índice diseñado específicamente para instrumentos Illumina. El primer paso se realizó igual que el mencionado para el gen ARNr 16S. Y la reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 25 μL, conteniendo 13.17 μL de agua Sigma grado PCR, 1 μL polF Forward primer (10 μM), 1 μL polR Reverse primer (10 μM), 5.08 μL Kapa Taq 2X Mastermix (Roche), 0.5 μL BSA, 1.25 μL Magnesio y

3 μ L ADNc. La reacción del ciclo térmico inició con la desnaturalización a 95°C por 3 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, el anillamiento a 52°C por 30 s, y la extensión a 72°C por 1.5 min, seguido por una extensión final a 72°C por 10 min y 15°C ∞ . Se realizaron triplicados de cada muestra, para cada uno de los genes.

Para la PCR2 se combinaron cada uno de los triplicados y se añadieron los barcodes de la siguiente forma: Illumina Flow Cell Adapter + Index + Illumina Read Primer Sequence. En esta segunda PCR se utilizó una composición de reacción similar con un volumen de 10 μ L y los cebadores de índices (no específico a un gen de interés). Cada muestra recibió una combinación única de cebadores en la PCR2 para facilitar el multiplexing de las muestras en la librería. Los cambios del ciclo térmico fueron: desnaturalización inicial de 94°C por 3 min, seguido por 5 ciclos de 94°C por 30 s, 50°C por 30 s, y 72°C por 45 s, con una extensión final de 72°C por 5 min. La calidad del producto PCR purificado se comprobó en un gel de agarosa al 1.5%.

Posteriormente, se purificaron y normalizaron cada una de las muestras (producto de la PCR2) utilizando el Kit Just-a-Plate PCR normalization Plates (Charm Biotech, USA) y se construyó la librería de secuenciación mezclando una alícuota de 10 μ L de cada muestra limpia y se concentró la librería con perlas magnéticas (KAPA). La calidad y concentración de la librería se verificó en el equipo BioAnalyzer (Agilent). Por último, se secuenció la librería utilizando el equipo MiSeq de Illumina, en el Laboratorio de Genómica Ecológica y Evolutiva (EEG) en Naos, utilizando un cartucho de v.2, 2 x 250 pb.

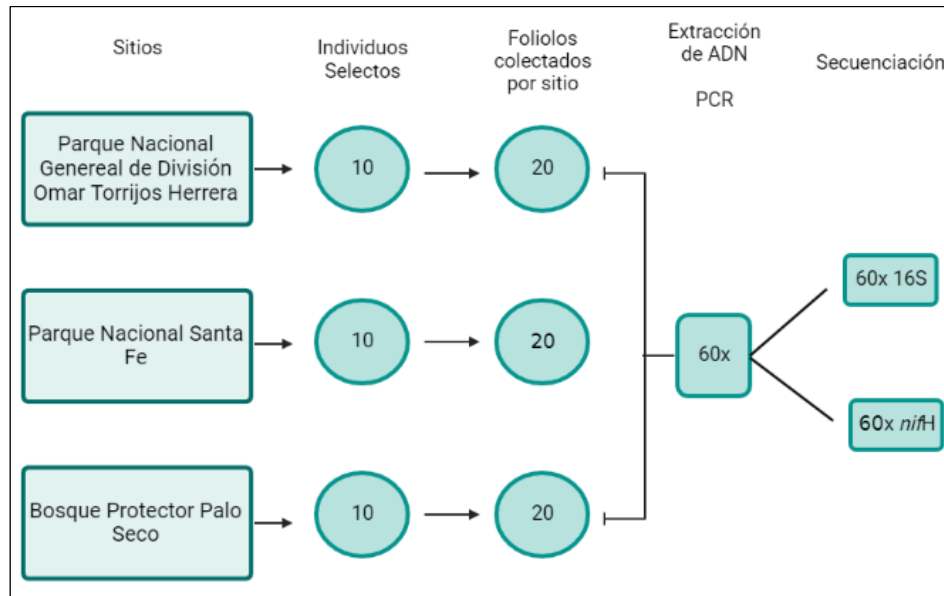


Figura 7. En total se colectaron 120 muestras. Divididas en 20 muestras por cada sitio, y en diferentes temporadas.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

Procesamiento de datos de secuencias de amplicones

Todos los análisis se realizaron con el software R v.4.4.0. Las secuencias bacterianas fueron filtradas, limpiadas e identificadas utilizando el paquete de R dada2 v.1.32.0 (Callahan et al. 2016; R Core Team, 2023a). Este proceso infiere variantes de secuencia de amplicones (ASV), que ofrecen mejor resolución, precisión y reproducibilidad que otros métodos y no están estrictamente limitadas por una base de datos de referencia (Callahan et al. 2017).

Se eliminaron los cebadores utilizando cutadapt v3.0 (Martin, 2011). Las secuencias de baja calidad (definidas como secuencias con más de un error esperado según las puntuaciones de calidad) se eliminaron con la función filterAndTrim. Las ASVs se dedujeron para cada muestra utilizando la función dada, las lecturas directa e inversa se emparejaron con la función mergePairs y las secuencias quiméricas se eliminaron con la función removeBimeraDenovo. Se asignó la taxonomía a cada una de las ASVs, utilizando la base de datos taxonómica silva v.132 (Callahan, 2018) y la base de datos *nifH* (Heller et

al. 2014) para bacterias y bacterias diazotróficas, respectivamente, implementando la función `assignTaxonomy` de `dada2`. Se encontraron ASVs de bacterias en 117 y 86 muestras para el gen 16S y *nifH*, respectivamente.

Se utilizó el paquete de R `phyloseq` v.1.48.0 (McMurdie y Holmes, 2013) para transformar la tabla de secuencias en un objeto `phyloseq` para procesar los datos ASV. En el proceso de eliminación de contaminantes, se eliminaron todas las muestras conteniendo menos de 10 lecturas al final de la curación de los datos. Se eliminaron todas las ASVs de 16S y *nifH* no asignadas al nivel de phylum o que coincidían con secuencias de cloroplastos y mitocondrias. Luego, se estimó el tamaño de la biblioteca por muestra y se eliminó los posibles contaminantes mediante el paquete `decontam` v.1.24.0 (Davis et al. 2018), utilizando los métodos de frecuencia y prevalencia de forma independiente. También, se calculó la prevalencia de ASV para seleccionar aquellos en al menos el 5% de las muestras.

Composición de la comunidad bacteriana en la filosfera de *Z. pseudoparasitica*

Para comparar la composición de la comunidad bacteriana asociada a *Z. pseudoparasitica* en cada uno de los sitios, se transformó el conteo de taxones de 16S y *nifH* a datos de abundancia relativa utilizando `phyloseq`. La abundancia relativa por phylum y orden fueron comparadas entre cada sitio de muestreo. Hicimos un subset de cinco y tres de los taxones más abundantes para 16S y *nifH*, respectivamente, y se comparó su abundancia relativa por phylum entre cada sitio. Se normalizó la tabla de taxones para comparar la diversidad alfa entre cada sitio usando la abundancia relativa y la multiplicamos por una constante de 1000 para obtener los datos de conteo. Para evaluar el efecto de cada sitio y factor ambiental, se evaluó la diversidad alfa entre cada sitio utilizando la abundancia relativa, y para esto normalizamos la tabla de taxones. Se estimó el índice de Shannon utilizando la tabla normalizada y el índice de Chao1 con la tabla con datos sin normalizar. Adicionalmente, se calculó la diversidad filogenética de Faith considerando las relaciones filogenéticas de los taxones, utilizando la distancia por pares derivada del árbol filogenético (Faith DP, 1992).

El árbol filogenético se construyó utilizando un algoritmo de neighbour-joining con el modelo GTR+GAMMA en phangorn v.2.11.1 (Schliep KP., 2011) para los datos de 16S y *nifH*. Se aplicó la prueba de normalidad Shapiro para seleccionar la prueba estadística apropiado y evaluamos las diferencias en los índices de Shannon, Chao1 y Faith tanto para 16S como para *nifH*, entre cada uno de los sitios de muestreo por temporada utilizando la prueba de Mann-Whitney en R v.4.1.3 (R core Team, 2023).

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los análisis estadísticos se realizaron con R 4.40 (R Core Team, 2023a).

Efecto de la temporada y sitio en la composición de la comunidad bacteriana

Se realizó un análisis multivariante permutacional de la varianza (PERMANOVA) usando la función de *adonis2* del paquete *vegan* (Oksanen et al. 2022). Para visualizar los resultados, se realizó un análisis de componentes principales (PCoA) basándonos en ordenaciones UniFrac ponderadas. Para visualizar las diferencias en la composición de la comunidad entre cada sitio y cada temporada, se realizó un análisis discriminante lineal del tamaño efecto (LEfSe) sobre la abundancia relativa de cada género.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

Composición de la comunidad bacteriana en la filosfera de *Z. pseudoparasitica*

La comunidad bacteriana en la filosfera de *Z. pseudoparasitica* contó con un total de 2,969 ASVs en 115 muestras, dominada principalmente por el phylum *Proteobacteria* (52.4%), seguido por *Actinobacteriota* (31.6%), *Bacteriota* (5.6%), *Acidobacteriota* (5.6%) y *Chloroflexi* (2.4%), representando el 97.3% de las ASVs totales (Gráfica 1A). Los 10 órdenes bacterianos más abundantes (con más del 3% de abundancia) fueron *Rhizobiales* (30.3%), *Frankiales* (11.7%), *Pseudonocardiales* (6.1%), *Acetobacterales* (5.6%), *Caudobacterales* (4.6%), *Sphingomonadales* (4.5%), *Acidobacterales* (4.3%), *Solirubrobacterales* (3.9%), *Cytophagales* (3.4%) y *Burkholderiales* (3.0%). Siendo *Beijerinckiaceae* la familia más abundante. Pudimos identificar 242 géneros, representados principalmente por *Methylocella* (13.3%), *1174-901-12* (9.3%) y *Jatrophihabitans* (5.7%).

La amplificación del gen *nifH* resultó en un total de 970 ASVs en 84 muestras. La comunidad de bacterias diazotróficas estuvo dominada principalmente por el phylum *Cyanobacteria* (92.4%), seguido por *Proteobacteria* (4.7%) y *Firmicutes* (2.4%), siendo *Scytonemataceae* (33.5%) y *Nostocaceae* (14.7%) las familias más predominantes (Gráfica 1B). Pudimos identificar 32 géneros de bacterias diazotróficas, representados principalmente por *Brasilonema* (32.6%), *Stigonema* (3.4%) y *Methylocystis* (3.3%).

La estimación de la diversidad alfa muestra que no existen diferencias significativas en la diversidad de especies entre cada uno de los sitios para el gen ARNr 16S (Shannon pvalue = 0.77 y Chao1 pvalue = 0.1), ni para el gen *nifH* (Shannon pvalue = 0.69 y Chao1 pvalue = 0.66).

La estructura de la comunidad, basándonos en la abundancia de ASVs se visualizó utilizando el análisis de coordenadas principales (PCoA) del paquete VEGAN; y para comparar la diversidad en cada sitio considerando los diferentes factores ambientales se utilizó el análisis multivariante permutacional de la varianza (PERMANOVA) en el paquete VEGAN versión 2.4 (Oksanen et al. 2022). Encontramos que la estructura de la comunidad

bacteriana no mostró diferencia significativa entre los sitios ($R^2 = 0.06348$ y $p = 0.002^{**}$). Los resultados del análisis de PERMANOVA se muestran en la tabla (Tabla 2).

Variación en los factores ambientales entre cada sitio y temporada de muestreo

En la tabla 1 mostramos los valores promedio de los factores considerados para cada sitio de colecta, incluyendo los factores ambientales, como aquellos vinculados con la planta hospedera, como la altura y tamaño de la planta, y el área y temperatura del foliolo. No se observaron diferencias significativas en la composición de la comunidad bacteriana en la filosfera de ninguno de los sitios (Figura 3), ni se observaron variaciones significativas en las mediciones de cada uno de los factores (Tabla 1).

Tabla 1. Valores promedio de los factores medidos durante cada colecta, para cada uno de los sitios.

TEMPORADA	SITIO	PALO SECO	SANTA FE	EL COPE
	FACTORES	(mean ± SD)	(mean ± SD)	(mean ± SD)
	Altura de la planta (m)	5.4 ± 1.83	7 ± 1.83	6.9 ± 1.68
	Tamaño de la planta (# de hojas)	8.1 ± 1.58	6 ± 1.58	5.7 ± 1.68
TEMPORADA LLUVIOSA	Temperatura de foliolo (°C)	22.5 ± 2.52	21.1 ± 1.80	23.4 ± 1.13
	Área del foliolo (cm ²)	7 ± 2.73	12.2 ± 3.08	9.4 ± 1.15
	Temperatura ambiental (°C)	23.1 ± 3.60	23.8 ± 0.52	24.3 ± 1.25
	Cobertura del dosel (%)	60.3 ± 10.98	57.2 ± 3.81	53.1 ± 5.50
	Humedad relativa (%)	99.5 ± 12.19	98.7 ± 1.56	94.6 ± 1.51
TEMPORADA SECA	Temperatura de foliolo (°C)	18.8 ± 4.18	20.1 ± 1.63	24.3 ± 1.06
	Área del foliolo (cm ²)	10.2 ± 3.63	10.2 ± 2.38	9.8 ± 2.61
	Temperatura ambiental (°C)	20.9 ± 2.65	25.3 ± 13.25	26.2 ± 1.54
	Cobertura del dosel (%)	57.3 ± 5.56	58.2 ± 4.63	59.3 ± 4.06
	Humedad relativa (%)	99.9 ± 10.75	99.9 ± 0.18	87.1 ± 14.85

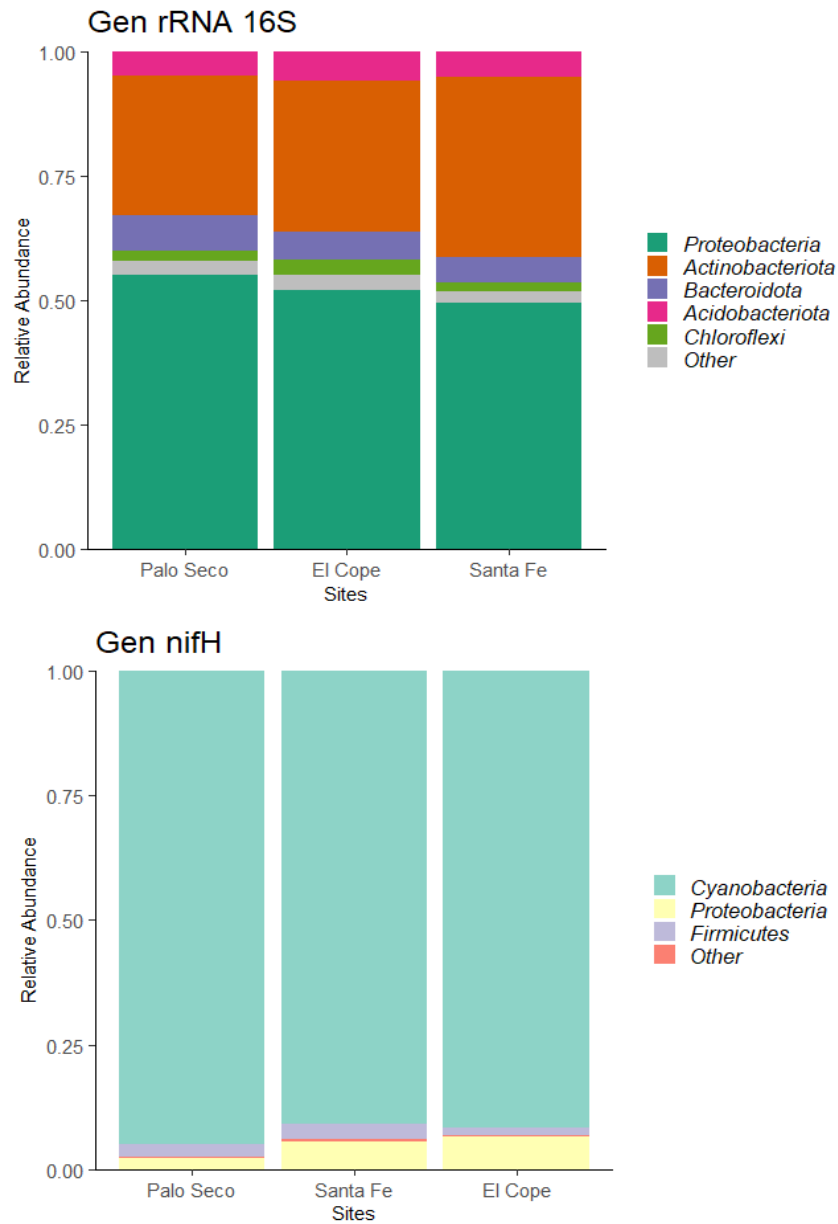


Figura 8. A) Abundancia relativa de los 5 phylum más abundantes asociados a la filosfera de *Z. pseudoparasitica* entre los tres sitios de muestreo, basado en el gen 16S ARNr. El phylum con mayor abundancia relativa fue Proteobacteria con un 52.4%; los phylum con menos de 1% de abundancia relativa fueron agrupados y se muestran como otros. Las muestras por cada sitio se dividen de la siguiente forma: Palo Seco (N = 37), Santa Fe (39) y El Cope (N = 39). B) El phylum más abundante en cada uno de los sitios muestreados fue Cyanobacteria con un 92.4% de abundancia relativa, seguido por Proteobacteria con un 4.7% y Firmicutes con 2.4%. Los phylum con menos de 1% de abundancia relativa fueron agrupados y se muestran como otros.

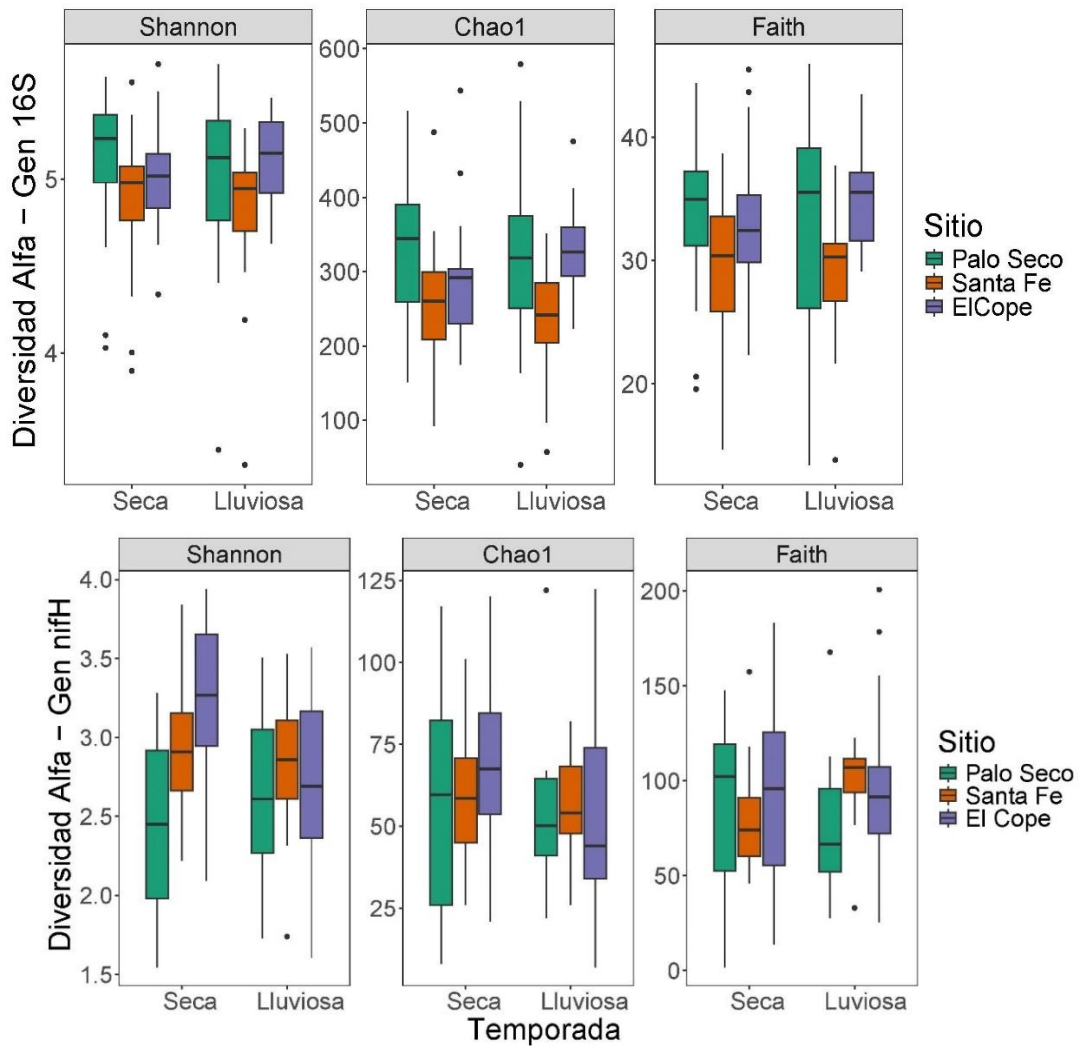


Figura 9. Diversidad alfa de las comunidades de la filosfera de *Z. pseudoparasitica* basada en A) taxones bacterianos (16S rRNA) y B) la comunidad diazotrófica (nifH). El índice de Shannon, Chao1 y el índice filogenético de Faith se estimaron mediante valores recogidos para cada estación. Los recuadros representan el primer cuartil, la mediana y el tercer cuartil, con los bigotes indicando los valores máximo y mínimo, los valores atípicos se representan como puntos negros para cada conjunto de datos en todos los sitios.

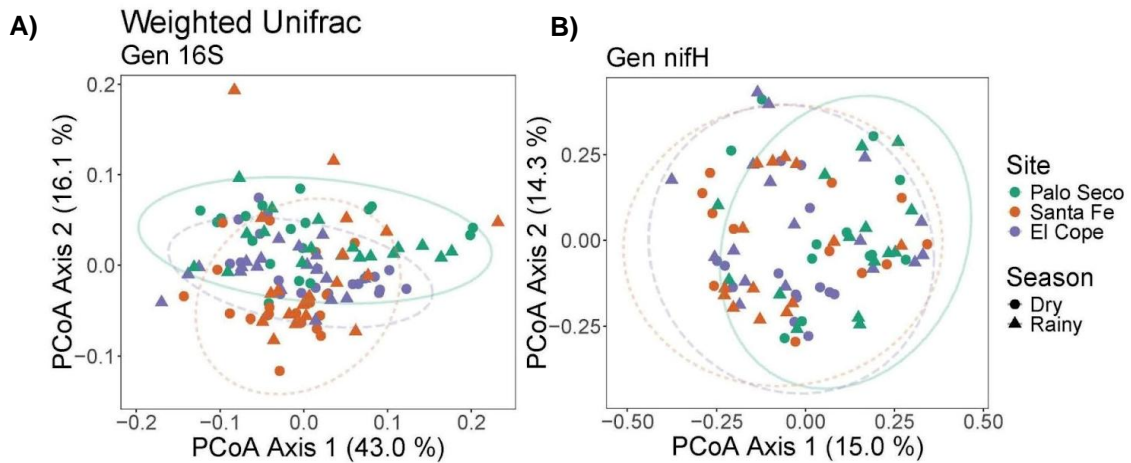


Figura 10. Ordenaciones del Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de las variaciones en la composición de la comunidad microbiana entre estaciones y lugares de muestreo basadas en ordenaciones UniFrac ponderadas para **A)** comunidades bacterianas totales y **B)** comunidades diazotróficas en la filosfera de *Z. pseudoparasitica*. Los datos se recogieron en dos estaciones diferentes (identificadas por la forma de los puntos) en tres lugares (identificados por colores diferentes).

Tabla 2. Variación de la composición de la comunidad microbiana de la filosfera explicada por factores de estación y lugar (PERMANOVA sobre disimilitudes UniFrac ponderadas).

Variables		Gen 16S			Gen <i>nifH</i>		
		R ² (%)	F	Pr(>F)	R ² (%)	F	Pr(>F)
Un solo factor	Sitio	0.06348	3.9228	0.002**	0.04901	2.11236	0.002**
	Temporada	0.01014	1.2530	0.241	0.01132	0.97626	0.422
2 nd orden de interacción	Sitio x Temporada	0.04441	2.7443	0.004**	0.03488	1.50359	0.035*
	Residuales	88.20			90.48		
Total		100			100		

Nota: Los modelos presentados para la comunidad microbiana en la filosfera de *Z. pseudoparasitica* se calcularon con los datos recogidos en ambas temporadas y en cada sitio. Los asteriscos indican los resultados del PERMANOVA.

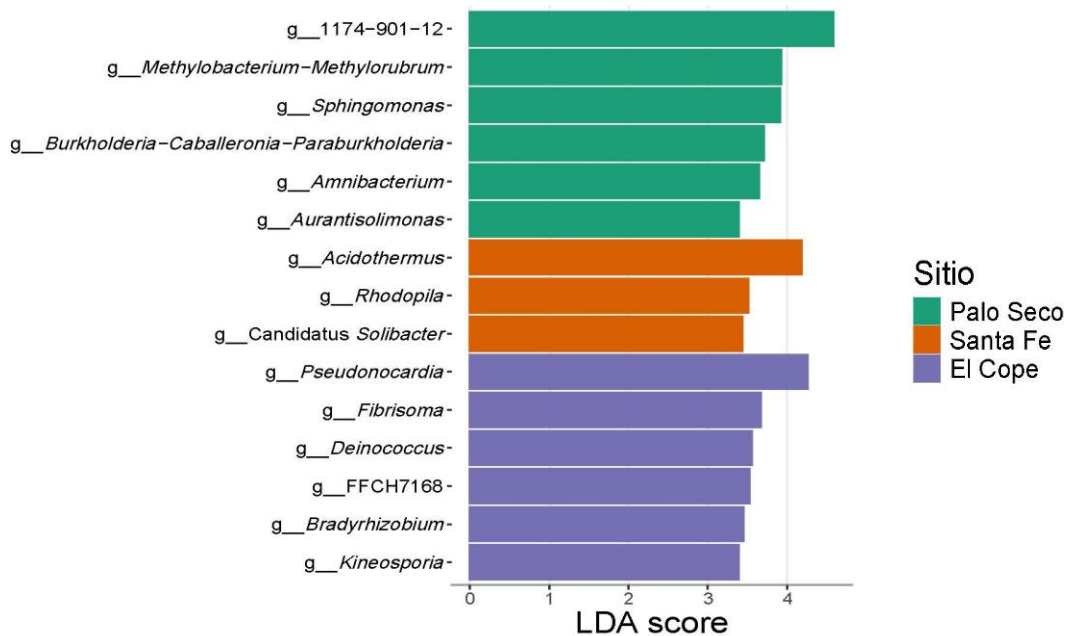
(*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001)

Composición de la microbiota de la filosfera asociada a cada sitio y temporada

Identificamos los géneros característicos mediante el análisis LEfSe para explorar la respuesta específica de la comunidad bacteriana a los sitios y temporada de muestreo. Observamos que las comunidades bacterianas tenían más géneros característicos con los sitios de Palo Seco y El Cope, en comparación con Santa Fe.

El análisis de LEfSe mostró una mayor asociación del género 1174-901-12 (*Spirosomaceae*) al sitio de muestreo de Palo Seco; y el género *Acidothermus* (*Acidothermaceae*) asociado a Santa Fe, durante ambas temporadas de muestreo; mientras que en El Cope mostró mayor asociación del género *Granulicella* (*Acidobacteriaceae*) durante la temporada seca y del género *Pseudonocardia* (*Pseudonocardiaceae*) durante la temporada lluviosa.

A)



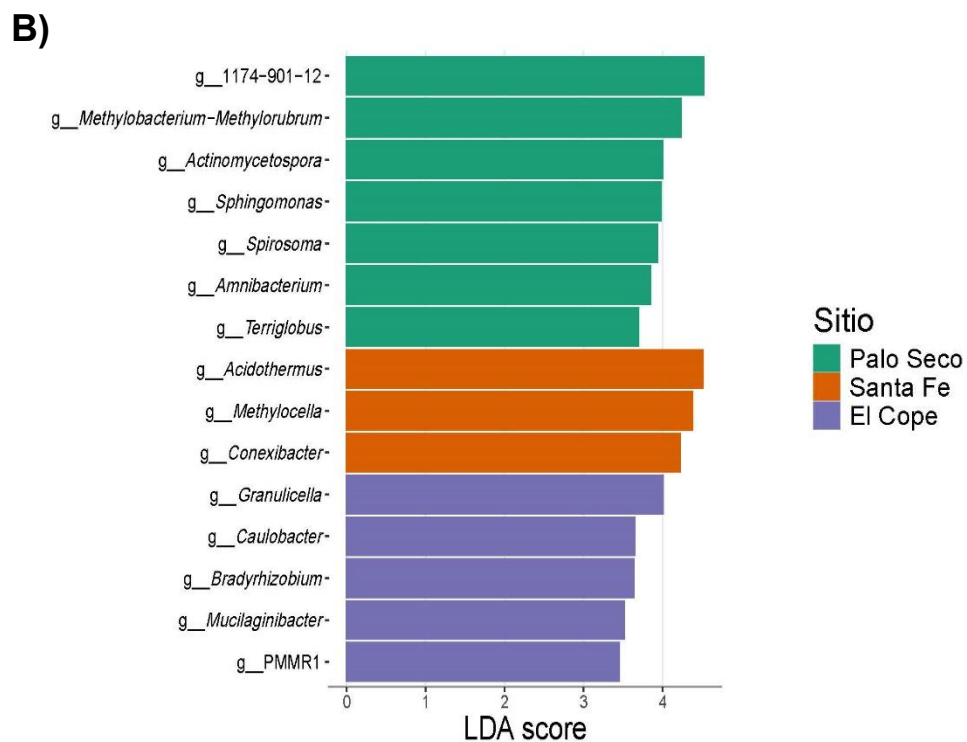


Figura 11. Análisis Linear Discriminante (LDA) con el efecto del tamaño (LEfSe) de la abundancia de diferentes especies entre cada sitio, y cada una de las temporadas de muestreo. Palo Seco (verde), Santa Fe (naranja) y El Cope (lavanda). **A)** Géneros asociados a cada sitio durante la temporada seca. **B)** Géneros asociados a cada sitio durante la temporada lluviosa. El umbral para la puntuación del análisis logarítmico discriminante fue 3.

DISCUSIÓN

Los taxones predominantes de bacterias en la filosfera fueron principalmente Proteobacteria y Actinobacteria, lo cual se alinea con hallazgos reportados en estudios previos por Delmotte et al. (2009) y Rastogi et al. (2013). Además, se detectaron concentraciones significativas de los filos Bacteroidetes, Acidobacteria y Chloroflexi. Investigaciones anteriores han demostrado que la estructura filogenética de la comunidad microbiana en la filosfera está compuesta por un número relativamente limitado de filos, con predominancia de Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes, los cuales generalmente dominan la composición de la comunidad bacteriana (Carvalho et al. 2020; Grady et al. 2019; Durand et al. 2018; Kecskeméti et al. 2016; Kembel et al. 2014; Reisberg et al. 2013; Redford et al. 2010). Las bacterias pertenecientes al filo Proteobacteria son reconocidas por su rica diversidad metabólica y su amplia gama de funciones dentro de la comunidad bacteriana de la hoja, incluyendo metilotrofia, nitrificación, fijación de nitrógeno y fotosíntesis anoxigénica (Watanabe et al. 2016; Atamna-Ismaeel et al. 2012; Fűrnkranz et al. 2008). Adicionalmente, los filos Bacteroidetes y Actinobacteria desempeñan funciones ecológicas diversas en el contexto de la filosfera (Romero et al. 2016). Los géneros bacterianos más prominentes, como *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Massilia*, *Sphingomonas*, *Arthrobacter* y *Pantoea*, constituyen el núcleo de los taxones microbianos presentes en esta región (Knief et al. 2012; Rastogi et al. 2013; Rausch et al. 2001). En este estudio, se observó que los géneros con mayor abundancia relativa en la filosfera de *Z. pseudoparasitica* fueron *Methylocella* (13.3%), *1174-901-12* (9.3%) y *Jatrophihabitans* (5.7%), junto con otros géneros menos abundantes como *Pseudonocardia* (4.8%), *Acidothermus* (4.4%), *Sphingomonas* (3.8%) y *Methylobacterium-Methylorubrum* (2.7%). Las interacciones entre las comunidades microbianas de la filosfera pueden proporcionar mecanismos de protección a la planta hospedera (Innerebner et al. 2011; Ottesen et al. 2015). Un estudio realizado por Aitana et al., evidenció que los géneros *1174-901-12* (Rhizobiales), *Sphingomonas*, *Methylobacterium-Methylorubrum* y *Pseudomonas* tienden a aumentar

en plantas infectadas por *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, lo que sugiere las potenciales propiedades antagonistas de estas bacterias frente a hongos fitopatógenos. Los microorganismos de la filosfera desempeñan un papel crucial en el ciclo del carbono y del nitrógeno mediante la utilización directa de carbohidratos liberados por las plantas o secretados por artrópodos, la interceptación de contaminantes atmosféricos de amonio por bacterias nitrificantes, así como a través de la fijación biológica de nitrógeno. Diversos estudios enfocados en las bacterias diazotróficas de la filosfera (Rico et al. 2014; Fürnkranz et al. 2008; Freiberg, 1998) han demostrado que la diversidad de bacterias fijadoras de N₂ tiende a aumentar en condiciones de sequía, sugiriendo que su reclutamiento podría mejorar la capacidad de adaptación de las plantas a ambientes estresantes (Rico et al. 2014). Entre las bacterias diazotróficas reportadas en la filosfera de bosques tropicales se incluyen tanto Proteobacteria (Ej., *Beijerinckia*, *Azotobacter* y *Klebsiella*) como Cianobacteria (Ej., *Nostoc*, *Scytonema* y *Stigonema*) (Fürnkranz et al. 2008; Bao et al. 2019). En este estudio, mediante el análisis del gen *nifH*, se identificaron los géneros diazotróficos con mayor abundancia relativa como *Brasilónema* (32.6%), *Stigonema* (3.4%) y *Methylocystis* (3.3%), además de otros géneros menos abundantes como *Desmonostoc* (1.7%), *Hassalia* (1.5%) y *Nostoc* (1.3%).

En relación con la variación de la comunidad bacteriana en función de los diferentes sitios y temporadas, nuestros resultados no mostraron diferencias significativas, lo que contradice nuestra hipótesis inicial de que la comunidad bacteriana en la filosfera de *Z. pseudoparasitica* respondería a las variaciones de los sitios y las temporadas de muestreo. Esta falta de variación también contrasta con hallazgos previos en zonas tropicales, donde se ha observado que la composición y diversidad de la comunidad bacteriana son dinámicas a lo largo de las estaciones (Bao et al. 2020; Copeland et al. 2015; Rastogi et al. 2013; Redford y Fierer, 2009). Además, se ha demostrado que la estructura de la comunidad microbiana en la filosfera difiere significativamente entre plantas de la misma especie en función de su ubicación geográfica (Finkel et al. 2011; Redford et al. 2010) y que la composición de dicha comunidad es claramente específica del huésped (Finkel et

al. 2012; Rastogi et al. 2013). En contraste con estas observaciones, nuestros resultados indicaron que la comunidad bacteriana en cada sitio y temporada era similar. Los análisis de discriminación lineal (LDA) revelaron los géneros diferenciales presentes en cada sitio: Palo Seco se caracterizó por el género *1174-901-12*, mientras que Santa Fe estuvo dominado por el género *Acidothermus*, tanto en la temporada seca como en la lluviosa. En El Cope, se identificó el género *Pseudocardia* durante la temporada seca y el género *Granulicella* en la temporada lluviosa.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y

RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

1. Los resultados de este estudio indican que la comunidad bacteriana en la filosfera de *Z. pseudoparasitica* no presenta variaciones significativas en función de los diferentes sitios y temporadas de muestreo.
2. Esta falta de variación, desafía nuestra hipótesis inicial y contrasta con hallazgos previos en zonas tropicales, donde se ha documentado que la composición y diversidad de las comunidades bacterianas son dinámicas y responden a factores estacionales.
3. Sin embargo, el análisis de discriminación lineal (LDA) revela la presencia de géneros específicos que caracterizan cada sitio.
4. Lo que sugiere que, aunque las comunidades bacterianas en general pueden ser similares, existen adaptaciones locales que reflejan las particularidades ambientales de cada hábitat.

RECOMENDACIONES

1. Estos hallazgos subrayan la importancia de investigar más a fondo las interacciones microbianas en la filosfera y su impacto en la salud y adaptación de las plantas, especialmente en un contexto de cambio climático.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadi, V.A.J.M., Sepehri, M., Rahmani, H.A., Dolatabad, H.K., Shamsheeripour, M., Khatabi, B. (2021). Diversity and abundance of culturable nitrogen-fixing bacteria in the phyllosphere of maize. *J. Appl. Microbiol.*
- Abanda-Nkpwatt, D., Müsch, M., Tschiersch, J., Boettner, M., Schwab, W. (2006). Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings, growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. *J. Exp. Bot.* 57 (15), 4025–4032.
- Abril, A.B., Torres, P.A., Bucher, E.H. (2005). The importance of phyllosphere microbial populations in nitrogen cycling in the Chaco semi-arid woodland. *J Trop Eco* 21, 103-107. <https://doi.org/10.1017/S0266467404001981>.
- Agler, M.T., Rije, K., Kroll, S., Morhenn, C., Kim, S.T., Weigel, D., Kemen, E., M., 2016. Microbial hub taxa link host and abiotic factors in plant microbiome variation. *PLoS Biol.* 14, e1002352.
- Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 59: 143-169.
- Arias, R.S., M.A. Sagardoy, and J.W.L. Van Vuurde. (1999). Spatiotemporal distribution of naturally occurring *Bacillus* spp. and other bacteria on the phylloplane of soybean under field conditions. *J. Basic Microbiol.* 39(5-6), 283-292. Doi: 10.1002/(SICI)1521-4028(1999 12)39:5/63.0.CO;2-G.
- Atamna-Ismaeel, N., Finkel, O., Glaser, F., von Mering, C., Vorholt, J. A., Koblížek, M., Belkin, S., & Béjà, O. (2012). Bacterial anoxygenic photosynthesis on plant leaf surfaces. *Environmental microbiology reports*, 4(2), 209–216. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00323.x>.
- Balint-Kurti, P., Simmons, S.J., Blum, J.E., Ballare, C.L., Stapleton, A.E., 2010. Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. *Can. J. Microbiol.* 54, 918–931.

- Bashir, I., Farooq War, A., Rafiq, I., Reshi Z. A., Rashid, Irfan., Shouche, Y. S. (2022). Phyllosphere microbiome: Diversity and functions. *Microbiological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126888>.
- Bao, L., Gu, L., Sun, B., Cai, W., Zhang, S., Zhuang, G., Bai, Z., & Zhuang, X. (2020). Seasonal variation of epiphytic bacteria in the phyllosphere of *Gingko biloba*, *Pinus bungeana* and *Sabina chinensis*. *FEMS microbiology ecology*, *96*(3), fiae017. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae017>.
- Banik, A., Mukhopadhyaya, S.K., Dangar, T.K. (2016) Characterization of N₂-fixing plant growth promoting endophytic and epiphytic bacterial community of Indian cultivated and wild rice (*Oryza* spp.) genotypes. *Planta* *243*, 799-812. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2444-8>.
- Beattie, G.A. (2011). Water relations in the interaction of foliar bacterial pathogens with plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* *49*, 533–555.
- Bell-Doyon, P., & Villarreal Aguilar, J. C. (2020a). New Notes on the Ecology of the Epiphytic Gymnosperm and Panamanian Endemic *Zamia pseudoparasitica*. <http://www.eaglehill.us/>.
- Bell-Doyon, P., & Villarreal Aguilar, J. C. (2020b). New Notes on the Ecology of the Epiphytic Gymnosperm and Panamanian Endemic *Zamia pseudoparasitica*. <http://www.eaglehill.us/>.
- Bell-Doyon, P., Laroche, J., Saltonstall, K., & Villarreal Aguilar, J. C. (2020). Specialized bacteriome uncovered in the coralloid roots of the epiphytic gymnosperm, *Zamia pseudoparasitica*. *Environmental DNA*, *2*(4), 418–428. <https://doi.org/10.1002/edn3.66>.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clinica*, *29*(8), 601–608.
- Bonito, G., Reynolds, H., Robeson, M. S., 2nd, Nelson, J., Hodkinson, B. P., Tuskan, G., Schadt, C. W., & Vilgalys, R. (2014). Plant host and soil origin influence fungal and

- bacterial assemblages in the roots of woody plants. *Molecular ecology*, 23(13), 3356–3370. <https://doi.org/10.1111/mec.12821>.
- Callahan, B., McMurdle, P., Rosen, M., Han, A., Johnson, A., & Holmes, S. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13, 581–583.
- Camelo, C., Vera, S., & Bonilla, R. (2011). Corpoica. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 12(2). <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=449945031010>.
- Cleveland CC, Townsend AR, Schimel DS, et al. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. (1999). *Global Biogeochem. Cycles*. 1999;13:623–645.
- Coleman-Derr, D., Desgarennes, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., North, G., Visel, A., Partida-Martinez, L. P., & Tringe, S. G. (2016). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native Agave species. *The New phytologist*, 209(2), 798–811. <https://doi.org/10.1111/nph.13697>.
- Crombie, A. T., Larke-Mejia, N. L., Emery, H., Dawson, R., Pratscher, J., Murphy, G. P., McGenity, T. J., & Murrell, J. C. (2018). Poplar phyllosphere harbors disparate isoprene-degrading bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(51), 13081–13086. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812668115>.
- Delmotte, N., Knief, C., Chaffron, S., Innerebner, G., Roschitzki, B., Schlapbach, R., von Mering, C., & Vorholt, J. A. (2009). Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(38), 16428–16433. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905240106>.
- Esitken, A., Yildiz, H.E., Ercisli, S., Donmez, M.F., Turan, M., Gunes, A. (2010). Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Sci. Hortic.* 124 (1), 62–66.

- Faith DP (1992) Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biol Conserv* 61:1–10. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(92\)91201-3](https://doi.org/10.1016/0006-3207(92)91201-3).
- Faust, K. & Raes, J. (2012). Microbial interactions, from networks to models. *Nat. Rev. Microbiol.* 10 (8), 538–550.
- Farnelid H, Andersson AF, Bertilsson S, et al. Nitrogenase gene amplicons from global marine surface waters are dominated by genes of non-cyanobacteria. (2011). *Plos One*. 2011;6:e19223.
- Fitzpatrick, J. Copeland, P.W. Wang, D.S. Guttman, P.M. Kotanen, M.T. Johnson, Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115 (2018) E1157–E1165.
- Fernández, A., García, C., Saéz, J. A., & Valdezate, S. (2010). *Metodos de Identificacion Bacteriana En El Laboratorio De Microbiología*. (E. Cercenado & R. Cantón, Eds.). España.
- Finkel, O.M., Burch, A.Y., Lindow, S.E., Post, A.F., Belkin, S. (2011). Geographical location determines the population structure in phyllosphere microbial communities of a salt-excreting desert tree. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (21), 7647–7655.
- Finkel OM, Burch AY, Elad T, Huse SM, Lindow SE, Post AF, Belkin S. (2012) Distance-decay relationships partially determine diversity patterns of phyllosphere bacteria on Tamarix trees across the Sonoran Desert. *Environ Microbiol.* 78(17):6187-93. doi: 10.1128/AEM.00888-12.
- Freiberg, E. (1998). Influence of Microclimate on the Occurrence of Cyanobacteria in the Phyllosphere in a Premontane Rain Forest of Costa Rica.
- Fürnkranz, M., Wanek, W., Richter, A., Abell, G., Rasche, F., Sessitsch, A. (2008). Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. *ISME J* 2, 561–570. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.14>.

- Gaby, J. C., & Buckley, D. H. (2012). A Comprehensive Evaluation of PCR Primers to Amplify the *nifH* Gene of Nitrogenase. *PLoS One*, 7(7), e42149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042149>.
- Heller, P., Tripp, H. J., Turk-Kubo, K., & Zehr, J. P. (2014). ARBitrator: A software pipeline for on-demand retrieval of auto-curated *nifH* sequences from GenBank. *Bioinformatics*, btu417.
- Hicks, B. J.; Silvester, W. B. (1985). Nitrogen fixation associated with the New Zealand mangrove (*Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. var. *resinifera* (Forst. f.) Bakh.). *Applied and environmental microbiology* 49: 955-959.
- Hirano, S.S., Upper, C.D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*—a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (3), 624–653.
- Hu Y. L., Ribbe M. W. (2013). Nitrogenase assembly. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 1112–1122. [10.1016/j.bbabi.2012.12.001](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.12.001).
- Hunter, P.J., Hand, P., Pink, D., Whipps, J.M., Bending, G.D. (2010). Both leaf properties and microbe-microbe interactions influence within-species variation in bacterial population diversity and structure in the lettuce (*Lactuca* species) phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 8117–8125.
- Innerebner G, Knief C, Vorholt JA. (2011) Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. *Appl Environ Microbiol* 77: 3202–3210.
- Izquierdo JA, Nusslein K. Distribution of extensive *nifH* gene diversity across physical soil microenvironments. *Microb. Ecol.* (2006). 51: 441–452.
- Jackson, E.F., Echlin, H.L., Jackson, C.R. (2006). Changes in the phyllosphere community of the resurrection fern, *Polypodium polypodioides*, associated with rainfall and wetting. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58, 236–246.
- Joung, Y.S., Ge, Z., Buie, C.R. (2017). Bioaerosol generation by raindrops on soil. *Nat. Commun.* 8.

- Kembel, S. W., O'Connor, T. K., Arnold, H. K., Hubbell, S. P., Wright, S. J., & Green, J. L. (2014). Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(38), 13715–13720. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216057111>.
- Knief, C., Frances, L., Vorholt, J.A. (2010a). Competitiveness of diverse Methylobacterium strains in the phyllosphere of Arabidopsis thaliana and identification of representative models, including M. Extorquens PA1. *Microb. Ecol.* 60, 440–452.
- Krishnamoorthy, R., Kwon, S. W., Kumutha, K., Senthilkumar, M., Ahmed, S., Sa, T., & Anandham, R. (2018). Diversity of culturable methylotrophic bacteria in different genotypes of groundnut and their potential for plant growth promotion. *3 Biotech*, 8(6), 275. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1291-2>.
- Kumar, V., Singh, P., Jorquera, M. A., Sangwan, P., Kumar, P., Verma, A. K., & Agrawal, S. (2013). Isolation of phytase-producing bacteria from Himalayan soils and their effect on growth and phosphorus uptake of Indian mustard (Brassica juncea). *World journal of microbiology & biotechnology*, 29(8), 1361–1369. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1299-z>.
- Kumar, V., Singh, P., Jorquera, M. A., Sangwan, P., Kumar, P., Verma, A. K., & Agrawal, S. (2013). Isolation of phytase-producing bacteria from Himalayan soils and their effect on growth and phosphorus uptake of Indian mustard (Brassica juncea). *World journal of microbiology & biotechnology*, 29(8), 1361–1369. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1299-z>.
- Laforest-Lapointe, I. and B. K. Whitaker. (2019). Decrypting the phyllosphere microbiota: progress and challenges. *American Journal of Botany* 106(2): 171–173. doi:10.1002/ajb2.1229.
- Lajoie, G., Maglione, R., Kembel, S.W. (2020). Adaptive matching between phyllosphere bacteria and their tree hosts in a neotropical forest. *Microbiome* 8, 1–10.

- Lajoie, G., & Kembel, S. W. (2021). Plant-bacteria associations are phylogenetically structured in the phyllosphere. *Molecular Ecology*, 30, 5572–5587. <https://doi.org/10.1111/mec.16131>.
- Lambais, M.R., Lucheta, A.R., Crowley, D.E. (2014). Bacterial community assemblages associated with the phyllosphere, dermosphere, and rhizosphere of tree species of the Atlantic Forest are host taxon dependent, supplementary data. *Microb. Ecol.* 68, 567–574.
- Langlois RJ, LaRoche J, Raab PA. Diazotrophic diversity and distribution in the tropical and subtropical Atlantic ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* (2005) 71:7910–7919.
- Levy-Booth, D. J., Prescott, C. E., Grayston, S. J. (2014). Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. *Soil Biology & Biochemistry* 75 11-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.03.021>.
- Lindow, S. E., and J. H. J. Leveau. (2002). Phyllosphere microbiology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:238–243. DOI 10.1016/S0958-1669 (02) 00313-0.
- Lindow, S.E., Brandl, M.T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1875–1883.
- Liu, W.Y., M.J. Ke, Z.Y. Zhang, T. Lu, Y.C. Zhu, Y. Li, X.L. Pan, H.F. Qian. (2019). Effects of imazethapyr spraying on plant growth and leaf surface microbial communities in *Arabidopsis thaliana*. *J. Environ. Sci.*, 85 (2019), pp. 35-45.
- Madhaiyan M, Alex THH, Ngoh ST, Prithiviraj B, Ji LH. (2015). Leaf-residing *Methylobacterium* species fix nitrogen and promote biomass and seed production in *Jatropha curcas*. *Biotechnology for Biofuels* 8: 14.
- Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno Juliana Mayz-Figueroa. *UDO Agrícola*, 4(1), 1–20.
- Mehta MP, Butterfield DA, Baross JA. Phylogenetic diversity of nitrogenase (*nifH*) genes in deep-sea and hydrothermal vent environments of the Juan de Fuca ridge. *Appl. Environ. Microbiol.* (2003). 69:960–970.

- Mizuno, M., Yurimoto, H., Iguchi, H., Tani, A., Sakai, Y. (2013). Dominant Colonization and Inheritance of *Methylobacterium* sp. Strain OR01 on *Perilla* Plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 1533–1538.
- Monteza-Moreno, C. M., Rodriguez-Castro, L., Castillo-Caballero, P. L., Toribio, E., & Saltonstall, K. (2022). Arboreal camera trapping sheds light on seed dispersal of the world's only epiphytic gymnosperm: *Zamia pseudoparasitica*. *Ecology and Evolution*, 12(3). <https://doi.org/10.1002/ece3.8769>.
- Moreno, L. Y., & Galvis, F. (2013). Potencial biofertilizante de bacterias diazótrofes aisladas de muestras de suelo rizosférico. (Spanish). *Pastos Y Forrajes*, 36(1), 33–37.
- Morris, C.E., and L.L. Kinkel. (2002). Fifty years of phyllosphere microbiology: significant contributions to research in related fields, p. 365–375. In S.E. Lindow, I. Hecht-Poinar, and V. Elliott (ed.), *Phyllosphere Microbiology*. APS Press, St. Paul, Minn.
- Mwajita, M.R., Murage, H., Tani, A., Kahangi, E.M. (2013). Evaluation of rhizosphere, rhizoplane and phyllosphere bacteria and fungi isolated from rice in Kenya for plant growth promoters. *Springerplus*. 2, 606.
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, et al (2022) *vegan: Community Ecology Package*.
- Oldroyd, G. E. D., & Dixon, R. (2014). Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 19–24.
- Olsen LA, Choffnes ER, Mack A. (2012). *The Social Biology of Microbial Communities. Workshop Summary*. National Academies Press, Washington, D.C., xxviii, 603 pp.
- Orozco, F. H. (1999). *La Biología del Nitrógeno. Conceptos básicos sobre sus transformaciones biológicas 1ª Edición*. Universidad Nacional, Medellín Antioquia. Gráficas Montoya
- Parker, G. G. (1994). Soil fertility, nutrient acquisition, and nutrient cycling. Pp. 54–64 in McDade, L. A., Bawa, K. S., Hespenheide, H. A. & Hartshorn, G. S. (eds.). *La selva: ecology and natural history of a neotropical rain forest*. The University of Chicago Press, Chicago.

- Perry, D.R. (1985). Ecología de la selva tropical húmeda”, *Investigación y Ciencia* 64-73.
- Qian, X., Li, S., Wu, B., Wang, Y., Ji, N., Yao, H., Cai, H., Shi, M., Zhang, D. (2020). Mainland and island populations of *Mussaenda kwangtungensis* differ in their phyllosphere fungal community composition and network structure. *Sci. Rep.* 10 (1), 1–4.
- R Core Team (2017) R Development Core Team. *R A Lang. Environ. Stat. Comput.* 55:275–286.
- Rasche, F., Velvis, H., Zachow, C., Berg, G., Van Elsas, J.D., Sessitsch, A. (2006b). Impact of transgenic potatoes expressing anti-bacterial agents on bacterial endophytes is comparable with the effects of plant genotype, soil type and pathogen infection. *J. Appl. Ecol.* 43, 555–566.
- Rastogi, G., Coaker, G.L. and Leveau, J.H. (2013). New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches. *FEMS Microbiol Lett*, 348: 1-10. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12225>.
- Raymond J, Siefert JL, Staples CR, et al. The natural history of nitrogen fixation. *Mol. Biol. Evol.*(2004). 21:541–554.
- Redford, A.J. & Fierer, N. (2009). Bacterial succession on the leaf surface, a novel system for studying successional dynamics. *Microb. Ecol.* 58 (1), 189–198.
- Redford AJ, Bowers RM, Knight R, Linhart Y, Fierer N. (2010). The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environ. Microbiol.* 12:2885–93.
- Roesch LFW, Camargo FAO, Bento FM, et al. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. *Plant Soil.* (2008). 302:91–104.
- Rosch C, Mergel A, Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68:3818–3829.
- Sasse, J., Martinoia, E., & Northen, T. (2018). Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome? In *Trends in Plant Science* (Vol. 23, Issue 1, pp. 25–41). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.003>.

- Sapkota, R., Knorr, K., Jørgensen, L.N., O'Hanlon, K.A. and Nicolaisen, M. (2015). Host genotype is an important determinant of the cereal phyllosphere mycobiome. *New Phytol*, 207: 1134-1144. <https://doi.org/10.1111/nph.13418>.
- Sierra, A.M., Meléndez, O., Bethancourt, R. et al. Leaf Endophytes Relationship with Host Metabolome Expression in Tropical Gymnosperms. *J Chem Ecol* (2024). <https://doi.org/10.1007/s10886-024-01511-z>.
- Schliep KP (2011) phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics* 27:592–593. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>.
- Scavino, A.F., Pedraza, R.O. (2013). The role of siderophores in plant growth-promoting bacteria. In: Maheshwari, D.K., Saraf, M., Aeron, A. (Eds.), *Bacteria in Agrobiolgy, Crop Productivity*. Springer, Berlin, pp. 265–285.
- Seefeldt, L. C., Yang, Z., Duval, S., & Dean, D. R. (2013). Nitrogenase reduction of carboncontaining compounds. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1827(8-9), 1102–11.
- Serrato, A., Flores, L., Aportela, J., & Sierra, E. (2014). PCR: reacción en cadena de la polimerasa. In A. Cornejo, A. Serrato, B. Rendón, & M. Rocha (Eds.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos (Primera*, pp. 53–74). México.
- Silver, W., Brown, S. & Lugo, A. (1996). Biodiversity and biogeochemical cycles. Pp. 50–67 in Orians, G. H., Dirson, R. & Cushman, H. (eds.). *Biodiversity and ecosystem processes in tropical forest*. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Soka, Y.S., Magdalena, S., Rachelia, D. (2012). The genetic diversity of endophytic and phyllosphere bacteria from several Indonesian Herbal plants. *Makara J Sci* 16, 39–45. <https://doi.org/10.7454/mss.v16i1.1279>.
- Souza, R., Beneduzi, A., Ambrosini, A., Da Costa, P.B., Meyer, J., Vargas, L.K., Schoenfeld, R., Passaglia, L. M. (2013). The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. *Plant Soil* 366, 585–603.

- Stanton, D. E., Batterman, S. A., von Fischer, J. C., & Hedin, L. O. (2019). Rapid nitrogen fixation by canopy microbiome in tropical forest determined by both phosphorus and molybdenum. *Ecology*, 100(9). <https://doi.org/10.1002/ecy.2795>.
- Stevenson, D. W., & Wm, D. (1993). The Zamiaceae in Panama. In *Brittonia* (Vol. 45).
- Stevenson D.W., Vovides A. y Chemnick J. (2003). Regional overview: New World. En: Donaldson J. Ed. *Cycads: Status Survey and Conservation Action Plan*, pp. 31-47. IUCN/SSC Cycad Specialist Group, Gland.
- Stone, B.W., Jackson, C.R. (2016). Biogeographic patterns between bacterial phyllosphere communities of the Southern Magnolia (*Magnolia grandiflora*) in a small forest. *Microb. Ecol.* 71 (4), 954–961.
- Stone, B. W. G., Weingarten, E. A., & Jackson, C. R. (2018). The role of the phyllosphere microbiome in plant health and function. *Annual Plant Reviews Online*, 1, 533–556.
- Suda, W., Oto, M., Amachi, S., Shinoyama, H., & Shishido M. (2008). A Direct Method to Isolate DNA from Phyllosphere Microbial Communities without Disrupting Leaf Tissues. *Microbes and Environments*. Vol. 23, No. 3, 248-252. Doi: 10.1264/jsme2.23.248.
- Thapa, S., Prasanna, R., Ranjan, K., Velmourougane, K., Ramakrishnan, B. (2017). Nutrients and host attributes modulate the abundance and functional traits of phyllosphere microbiome in rice. *Microbiol. Res.* 204, 55–64.
- Thapa, S., Ranjan, K., Ramakrishnan, B., Velmourougane, K., Prasanna, R. (2018). Influence of fertilizers and rice cultivation methods on the abundance and diversity of phyllosphere microbiome. *J. Basic Microbiol.* 58, 172–186.
- Taylor, A. S., Mendieta, J., Bernal, R., & Silvera, G. (2008). Strange but true; a never before reported characteristic of *Zamia pseudoparasitica*. *Cycad Newsletter*, 31(2/3), 8–9.

- Taylor, A. S. (2010). *Zamia pseudoparasitica*. The IUCN Red List of Threatened Species. e.T42175A10648571. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42175A10648571>.
- Taylor, A. S., Haynes, J. L., Stevenson, D. W., Holzman, G., & Mendieta, J. (2012). 5 Biogeographic Insights in Central American Cycad Biology. www.intechopen.com.
- Taylor, A. S., Mendieta, J., & Varela, G. (2014). *Zamia pseudoparasitica* Yates in Seemann, a far-ranging epiphytic endemic cycad mostly of the Atlantic watershed of the isthmus of Panama. *Cycad Newsletter*, 37(4), 4–10.
- Tichý L. (2015). Field test of canopy cover estimation by hemispherical photographs taken with a smartphone. *Journal of Vegetation Science* 27 427-435. Doi: 10.1111/jvs.12350.
- Trevelline, B. K., Fontaine, S. S., Hartup, B. K., & Kohl, K. D. (2019). Conservation biology needs a microbial renaissance: A call for the consideration of host-associated microbiota in wildlife management practices. In *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 286, Issue 1895). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2448>.
- Truchado, P., Gil, M. I., Moreno-Candel, M., & Allende, A. (2019). Impact of weather conditions, leaf age and irrigation water disinfection on the major epiphytic bacterial genera of baby spinach grown in an open field. *Food Microbiology*, 78, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.015>.
- Van Der Wal, A., Leveau, J.H.J. (2011). Modelling sugar diffusion across plant leaf cuticles, the effect of free water on substrate availability to phyllosphere bacteria. *Environ. Microbiol.* 13 (3), 792–797.
- Venkatachalam, A., Parashar, A., and Manoj, K. M. (2016). Functioning of drug-metabolizing microsomal cytochrome P450s- 1. In silico probing of proteins suggest that the distal heme ‘active site’ pocket plays a relatively ‘passive role’ in some enzyme-substrate interactions. In *Silico Pharmacol.* 4, 1–38. doi: 10.1186/s40203-016-0016-7.

- Vorholt, J.A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 828–840.
- Vitousek PM, Aber JD, Howarth RW, et al. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecol. Appl.* (1997). 7:737–750.
- Warshan, D., Liaimer, A., Pederson, E., Kim, S. Y., Shapiro, N., Woyke, T., Altermark, B., Pawlowski, K., Weyman, P. D., Dupont, C. L., & Rasmussen, U. (2018). Genomic changes associated with the evolutionary transitions of nostoc to a plant symbiont. *Molecular Biology and Evolution*, 35(5), 1160–1175. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy029>.
- Watanabe, K., Kohzu, A., Suda, W., Yamamura, S., Takamatsu, T., Takenaka, A., Koshikawa, M. K., Hayashi, S., & Watanabe, M. (2016). Microbial nitrification in throughfall of a Japanese cedar associated with archaea from the tree canopy. *SpringerPlus*, 5(1), 1596. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3286-y>.
- Verma, P., Yadav, A.N., Kazy, S.K., Saxena, A.K., Suman, A. (2014). Evaluating the diversity and phylogeny of plant growth promoting bacteria associated with wheat (*Triticum aestivum*) growing in central zone of India. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 3 (5), 432–447.
- Yadav, R.K., Karamanoli, K., Vokou, D. (2010). Estimating bacterial population on the phyllosphere by serial dilution plating and leaf imprint methods. *Ecoprint Int J Ecol* 17, 47–52. <https://doi.org/10.3126/eco.v17i0.4105>.
- Yates in Seeman, B. (1854). The botany of the voyage of H.M.S. Herald, under the command of Captain Henry Kellett, during the years 1845–51.6, 201–203, 253.
- Zehr JP, Mellon MT, Zani S. New nitrogen-fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by amplification of nitrogenase (*nifH*) genes. *Appl. Environ. Microbiol.* (1998). 64:3444–3450.
- Zhou, S., A.P. Williams, A.M. Berg, B.I. Cook, Y. Zhang, S. Hagemann, R. Lorenz, S.I. Seneviratne, and P. Gentile. (2019). Land-atmosphere feedbacks exacerbate concurrent soil drought and atmospheric aridity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 116, no. 38, 18848-18853, doi:10.1073/pnas.1904955116.

Zhu, Y.-G., Xiong, C., Wei, Z., Chen, Q.-L., Ma, B., Zhou, S.-Y., Tan, J., Zhang, L.-M., Cui, H.-L. and Duan, G.-L. (2022). Impacts of global change on the phyllosphere microbiome. *New Phytol*, 234: 1977-1986. <https://doi.org/10.1111/nph.17928>.

ANEXO

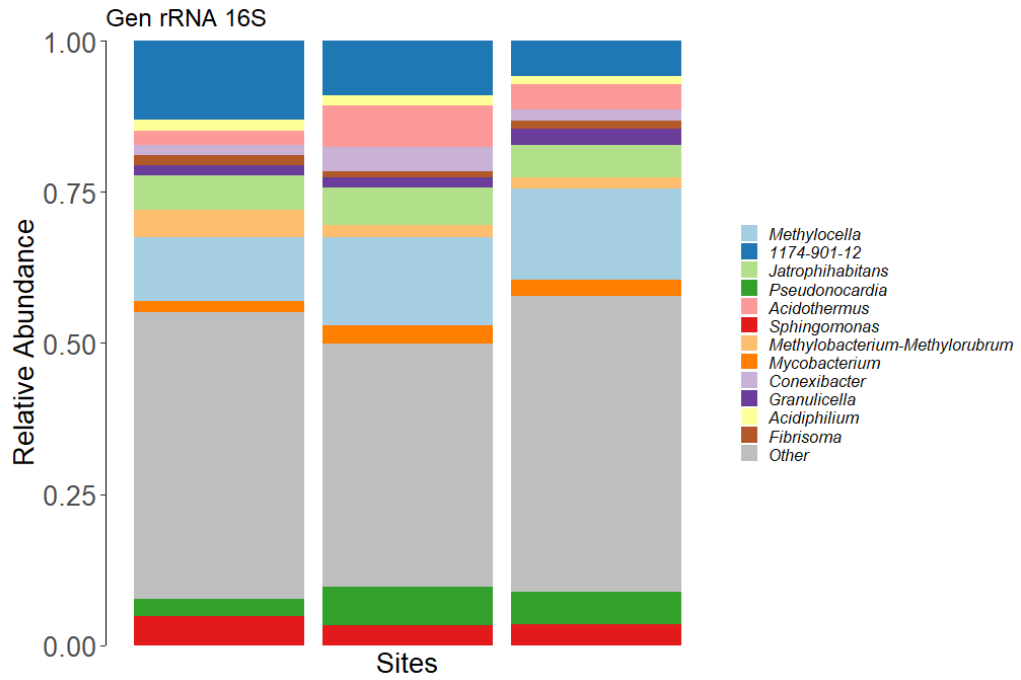


Figura 12. A) Abundancia relativa de los géneros más abundantes asociados a la filosfera de *Z. pseudoparasitica* entre los tres sitios de muestreo, basado en el gen 16S ARNr.

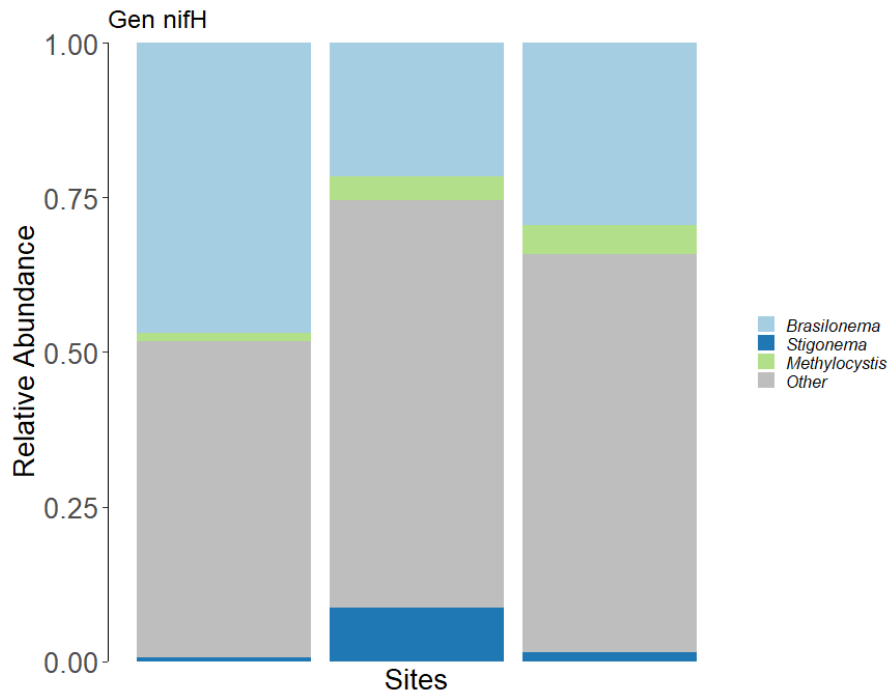


Figura 13. A) Abundancia relativa de los géneros más abundantes asociados a la filosfera de *Z. pseudoparasitica* entre los tres sitios de muestreo, basado en el gen nifH.

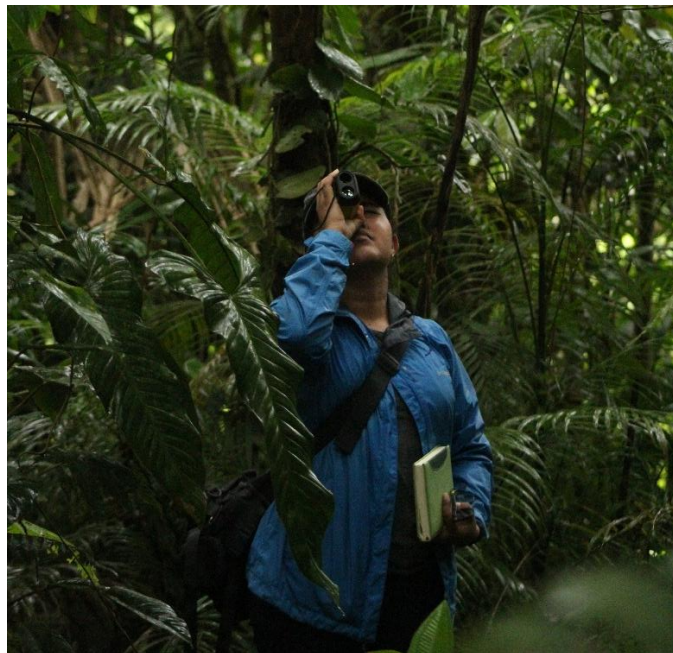


Figura 14. Selección de individuos de *Z. pseudoparasitica* y medición de la altura (entre 5-10 m de altura del árbol hospedero).



Figura 15. Colecta de hojas utilizando una vara de colecta.



Figura 16. Colecta y transporte de foliolos a 4°C.

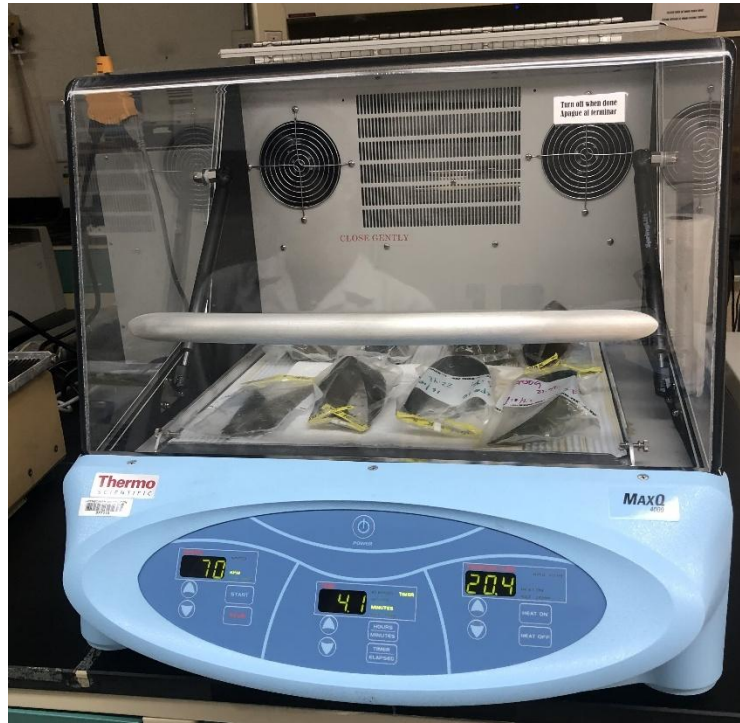


Figura 17. Bolsas estériles conteniendo cada foliolo agitándose durante 10 min a 340 rpm.

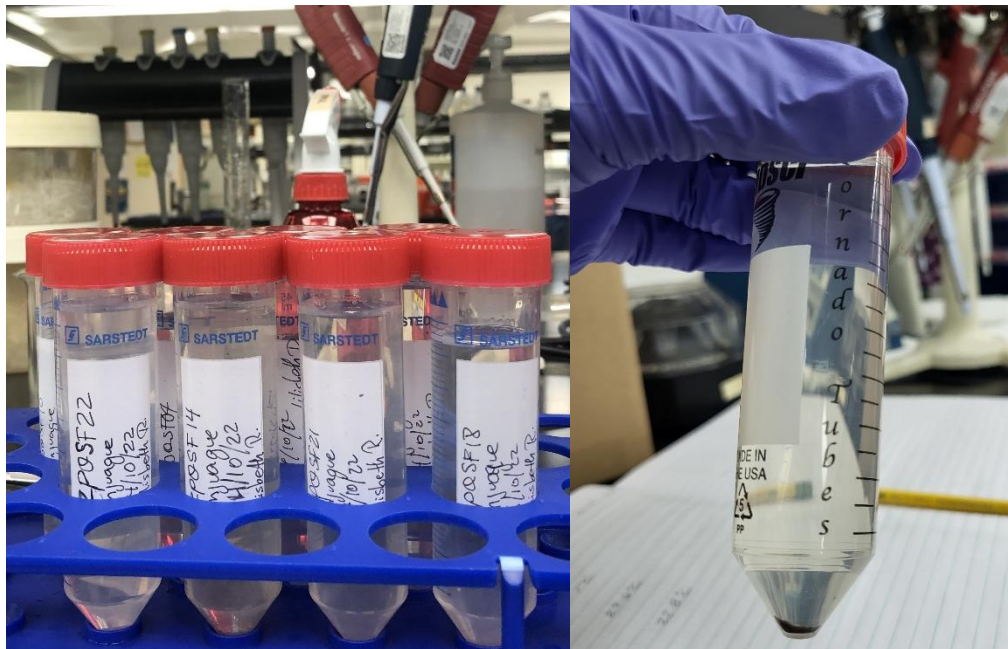


Figura 18. Luego de agitar en la bolsa estéril, la solución fue pasada a tubos falcon de 50ml y luego fue centrifugado. El pellet resultante fue el utilizado para realizar el proceso de extracción utilizando el Kit de extracción PowerSoil.