



# **PROYECTO DE INVESTIGACION CON INCENTIVO A NIVEL DE FACULTADES**

**2022**

## **INFORME FINAL**

### **RIBOTIPIFICACIÓN DE BACTERIAS RELACIONADAS A PUDRICIÓN BLANDA EN BANANO ORGÁNICO DEL DISTRITO DE QUERECOTILLO**

#### **Docente Investigador Responsable:**

Mg. Oscar Patricio Nolasco Cárdenas

#### **Docentes Investigadores Miembros:**

Mg. Mónica Margarita Velarde Vílchez

Mg. Victoria Ysabel Murrugarra Bringas

#### **Colaboradores:**

Mg. Rosalyn Acuña Payano

Candy Isabel Chacón Aguilar. (Estudiante de Pregrado)

#### **Línea de Investigación UNFV:**

**Genética, Bioquímica y Biotecnología**

Comunidad de conocimiento:

Grupo de Investigación en Bioquímica y Biología Sintética.  
GIBBS-UNFV

]



## Resumen

La pudrición blanda a nivel mundial, es una de enfermedad que afecta a cultivos de importancia agrícola económica como lo son cultivos de banano orgánico que se cultivan en la región norte tropical del Perú en el distrito de Querecotillo provincia de Sullana, departamento de Piura.

Diversos estudios relacionan a especies bacterianas del género *Pectobacterium* y *Dickeya* (anteriormente *Erwinia*). Sin embargo, en los últimos años también se ha reportado la presencia de bacterias del género *Klebsiella* en muestras de pudrición blanda en banano.

Con la finalidad de evidenciar que población bacteriana se encuentra presente en muestras de pudrición blanda en banano orgánico de Querecotillo, empleamos un análisis de similitud del gen 16S ARN (fragmento de 1492 nucleótidos) de 37 secuencias obtenidas de los aislados bacterianos de la muestra de pudrición blanda.

Nuestros resultados concluyen que en la muestra de pudrición blanda se encontraban presentes bacterias de la familia *Enterobactereacea*: *Klebsiella michiganensis* (29/37) y *Klebsiella variicola* (8/37).

Este hallazgo refuerza la necesidad de continuar con estudios que permitan evidenciar el rol bacteriano del género *Klebsiella*.



## ABSTRACT

Soft rot worldwide is a disease that affects crops of economic importance such as organic bananas grown in the northern tropical region of Peru in the district of Querecotillo, province of Sullana, department of Piura.

Several studies found the genus *Pectobacterium* and *Dickeya* (formerly *Erwinia*) as infectious agents. However, in recent years the presence of bacteria of the genus *Klebsiella* has also been reported in samples of soft rot in bananas.

In order to demonstrate which bacterial population is present in samples of soft rot in organic bananas from Querecotillo, we used a similarity analysis of the 16S RNA gene ( 1492 nucleotide fragment ) of 37 sequences obtained from bacterial isolates from the soft rot sample.

Our results conclude that bacteria from the *Enterobactereacea* family were present in the soft rot sample: *Klebsiella michiganensis* (29/37) and *Klebsiella variicola* (8/37).

This finding strengthens the need to continue with studies that allow evidencing the bacterial role of the genus *Klebsiella*.



## I. INTRODUCCIÓN:

La pudrición blanda es una de las enfermedades más frecuentes presentes en diversas plantas que causan el deterioro de los tejidos provocando la pérdida de cultivos de importancia agrícola económica como el banano orgánico. Las plantas de banano orgánico que presentan síntomas iniciales de esta enfermedad deben ser removidas para evitar que la enfermedad se propague a otras plantas y en casos graves los cultivos deben tratarse con agroquímicos, lo que lleva a la pérdida de la acreditación de cultivo orgánico.

Diversas especies bacterianas han sido involucradas en el desarrollo de la pudrición blanda, siendo las especies del género *Pectobacterium* y *Dickeya* (anteriormente *Erwinia*) las que se han encontrado en diversos cultivos, incluidos los cultivos de banano orgánico (Basim et al., 2019; Loganathan et al., 2019). Sin embargo, la caracterización de especies aún es compleja por lo que es necesario evaluar las características genético moleculares para poder identificar las especies involucradas.

La ribotipificación que planteó desarrollar en este proyecto, buscaba diferenciar las especies bacterianas mayoritarias que se presentan en las muestras de banano orgánico cultivadas en el distrito de Querecotillo, que muestren síntomas de pudrición blanda.



## 1.1 Planteamiento del Problema

La pudrición blanda impacta negativamente en la producción de banano orgánico generando una gran pérdida económica en el sector agrario. Cultivos de plátano y banano en el norte del Perú son afectados inicialmente presentando manchas de color amarillento, de aspecto acuoso, localizadas en el “pseudotallo” de la planta. En etapas graves de la enfermedad la bacteria puede afectar toda la planta, por lo que una forma de controlar su propagación es que las plantas con síntomas iniciales sean removidas.

La pudrición blanda en el Perú afecta la variedad de banano denominada Cavendish, la cual es de gran importancia económica ya que en el área de sus cultivos orgánicos alcanza las 15 000 hectáreas (ha) en los departamentos de Piura, Lambayeque, Tumbes y la Libertad.

Recientemente en el Perú se han caracterizado bioquímicamente once aislados bacterianos de muestras de pudrición blanda en el valle de Chira (Piura), de los cuales seis se identificaron como *Pectobacterium chrisanthemi* (actualmente del género *Dikeya*) y dos aislados como *Pectobacterium carotavorum subsp carotavorum* (género *Pectobacterium*) (Aguilar-Anccota et al., 2021). Las variaciones que en la última década han sufrido los géneros de *Dikeya* y *Pectobacterium* hacen necesario que se realice un análisis molecular para determinar con mayor precisión cuales son las especies involucrada en la pudrición blanda de los plátanos y/o bananos.

El presente proyecto plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la caracterización por ribotipificación de las principales bacterias aisladas de muestras con síntomas de pudrición blanda de banano orgánico del distrito de Querecotillo?



## 1.2 Antecedentes

El cultivo de plátano y bananos es susceptible a diferentes enfermedades y plagas que atacan a diferentes partes de la planta, lo cual afecta su fisiología de crecimiento y desarrollo y por ende reduce su rendimiento. A nivel global las principales enfermedades, además de la pudrición blanda, son la Sigatoka negra/Raya negra (causada por *Mycosphaerella fijensis* Morelet) que afecta la hoja, y la Marchitez, causada por *Fusarium* (**Foc**) o la llamada “mal de Panamá” (causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyd & Hanses), siendo esta última muy destructiva por afectar la raíz, el corno y el pseudotallo. (Martínez-Solórzano et al., 2019)

En el Perú, la marchitez por *Fusarium* raza 4 (**Foc** R4T) se ha reportado en los últimos años y su incidencia se ha ido incrementando, así como la incidencia de la Pudrición blanda que atacan el pseudotallo y el rizoma.

La pudrición blanda es ocasionada por bacterias que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, que tiene al menos 10 patógenos de mayor importancia en la agricultura, limitando el rendimiento y la calidad de los diferentes cultivos (Fiers et al., 2012); dentro de éstas se encuentra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* (antes *Erwinia caratovora* subsp. *carotovorum* (Jones) (Gardan et al., 2003), identificada en la pudrición blanda, caracterizado como bacilo gram negativo, oxidasa negativo y con actividad pectinolítica.

El género *Pectobacterium* y *Dickeya* (antiguamente denominadas *Erwinia*) pueden vivir en varias plantas o en el suelo en bajas densidades, y se podrían diseminar a través de algunos insectos que lo transportarían y permitirían una infección en heridas frescas de las plantas, hojas senescentes o en plantas infectadas con otros patógenos.



La pudrición blanda ocasionada por *Pectobacterium carotovorum* ha sido reportada en cultivos importantes de la alimentación e industria alimentaria como el pimiento (*Capsicum annuum*) en Argentina y Chile. Además, esta enfermedad también se ha reportado en la papa y en el agave tequilero var. azul.

En el Perú la pudrición blanda está causando grandes pérdidas económicas, recientes estudios han permitido la caracterización morfológica y bioquímica de aislados bacterianos de plantas de banano orgánico del Valle del Chira con síntomas de pudrición blanda, obteniendo seis aislados identificados como *Pectobacterium chrysanthemi* y dos como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.(Aguilar-Ancota et al., 2021)

Frente a esta información, nuestro equipo ha evaluado aislados bacterianos obtenidos a partir de una muestra con síntomas de pudrición blanda de banano orgánico del distrito de Querecotillo, Provincia de Sullana, departamento de Piura, mediante la técnica molecular de ribotipificación empleando el gen 16S ARN..

### **1.3 Justificación e importancia**

En la actualidad los bananos son frutas con gran impacto económico, siendo considerados el primer producto globalizado en el mundo moderno. Casi todos los bananos exportados por Perú son orgánicos y representan alrededor del 3% de la producción del mundo. Según TRADEMAP, (<https://www.trademap.org/Index.aspx?lang=es>) las empresas peruanas aumentaron la exportación de bananos, por un monto de 148,425,000 USD durante el año 2020 y ocupa un lugar importante en la producción y comercio internacional (Crawford & Kueffner, 2020; Food and Agriculture Organization [FAO], 2020a)., siendo la especie Cavendish Valery la más representativa.



Desde el punto de vista alimenticio, se considera parte importante de la dieta y es un cultivo estratégico en la seguridad alimentaria de muchos países (Martínez-Solórzano et al., 2020). Su consumo aporta nutrientes como vitaminas, minerales y otros bioelementos con propiedades medicinales como la lectina que es considerado un agente antiviral de amplio espectro.

La productividad del banano orgánico está amenazada por algunas plagas y patógenos, como Sigatoka negra, fusariosis, Moko (*Ralstonia solanacearum*) y la pudrición bacterial (*Pectobacterium*), las cuales frente a la existencia de una base genética uniforme son responsables del bajo rendimiento y producción, razón por la cual nuestro trabajo aportará en mejorar la caracterización de las bacterias productoras de la pudrición blanda específicamente del género *Pectobacterium*, debido a que al ser una especie muy heterogénea que abarca varias subespecies, requiere de una caracterización a nivel molecular basada en secuencias de ADN para poder diferenciarlas y buscar a futuro mejores herramientas que permitan tomar las medidas de control de esta enfermedad.

## **1.4 Objetivos**

### ***Objetivo Principal***

Realizar la ribotipificación de bacterias causantes de la pudrición blanda en cultivos de *Musa spp.* (banano) del distrito de Querecotillo, Piura

### ***Objetivos Específicos***

Obtener aislados bacterianos a partir de muestras obtenidas de cultivos de banano con síntomas de pudrición blanda.

Obtener la secuencia del gen 16S ARN ribosomal de los aislados bacterianos obtenidos.



Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**



Obtener la clasificación de los aislados bacterianos empleando el gen 16S ARN ribosomal por comparación de las secuencias con secuencias reportadas en el banco de datos mediante alineamiento múltiple.



## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Ribotipificación

La ribotipificación ha sido empleada en muchas bacterias patógenas de plantas, los genes de 16S y Los genes 23S ARN se utilizan ampliamente para inferir la filogenia microbiana (Gutell et al., 1994).

El incremento de los datos de la secuencia de los genes de 16S y 23S ARN en los bancos de datos han hecho que la identificación, clasificación y desarrollo de relaciones filogenéticas de muchos microorganismos se puedan establecer en muchas aplicaciones en microbiología clínica y ambiental, debido también a su alto grado de conservación y baja mutabilidad (Asai et al., 1999).

Los genes de ARN se han utilizado como secuencias objetivos o blancos de amplificación para la detección y discriminación con alta sensibilidad para diferenciar especies o géneros de bacterias (Louws et al. 1999). Así mismo, los polimorfismos en la secuencia Intergénica (IGS) entre el ARN 16S–23S se han empleado para diferenciar bacterias filogenéticamente muy relacionadas (Chun et al., 1999); evaluándose además en la diferenciación de especies de bacterias relacionadas a la pudrición blanda como son *Erwinia spp.* (Toth et al., 2001).



### III. MÉTODOS

Esta es una investigación básica porque trata de diferenciar en base a secuencias génicas diferentes especies bacterianas, de tipo observacional y descriptiva porque compara regiones genéticas para determinar las especies bacterianas relacionadas a la muestra de pudrición blanda de cultivos de banano presentes en el norte del Perú.

#### 3.1 **Ámbito Espacial y Temporal del Estudio**

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Universidad Nacional Federico Villarreal y con aprobación por RESOLUCIÓN DECANAL N° 065-2022-D-VIRTUAL-FCCNM-UNFV.

#### 3.2 **Universo y Muestra (tipo de muestreo)**

##### *Universo*

Cultivos microbiológicos de la muestra de banano con síntomas de pudrición blanda de Querecotillo.

##### *Muestra Biológica*

Aislados bacterianos obtenidos de los cultivos microbiológicos de la muestra con síntomas de pudrición blanda.

#### 3.3 **Procedimientos**

##### *Aislamiento Bacteriano*

La metodología empleada para el aislamiento se basa en el cultivo microbiológico de un homogenizado de la muestra diluida en caldo de tripticasa de soya (TSB del inglés Trypticase



soy broth). Una fracción de 2 cm<sup>2</sup> de pseudotallo fue homogenizada y el producto filtrado empleando gasa estéril para eliminar los restos vegetales, Del filtrado se realizaron diluciones seriadas 1/10 con TSB de las cuales 100 uL se combinaron con 3 mL de TSB suplementado con 6% de agar para un cultivo en doble capa.

Las diluciones sucesivas fueron cultivadas en placas de agar tripticasa de soya (TSA del inglés Trypticase soy agar), incubados por 24 h a 25 - 27°C.

Las placas de cultivo de la dilución bacteriana que presento crecimiento de colonias separadas una de otras fue empleada para obtener los aislados bacterianos.

Obtenidas las colonias individuales, las bacterias se propagaron en medio TSA para su mantenimiento, además una muestra bacteriana de cada colonia almacenada en TSB con glicerol a -20°C.

Adicionalmente, durante el proceso de toma de muestra un tubo conteniendo 3 mL de TSB fue abierto durante todo el tiempo del proceso de colecta de muestra para luego sellarlo. El tubo fue trasladado al Laboratorio y nombrado como muestra control de bacterias ambientales. La muestra de control ambiental también fue sometida al procedimiento de diluciones seriadas para obtener colonias aisladas, seleccionándose 5 colonias como control bacteriano.

### ***Evaluación morfológica de las colonias bacterianas aisladas y evaluación microscópica de los aislados bacterianos***

La evaluación microscópica se realizó por evaluación de tinción Gram clasificando las bacterias por su morfología y tinción.



### ***Extracción de ADN***

Se emplearon dos procesos de extracción de ADN que sirvieron para la estandarización del PCR y para la obtención de los amplicones de las colonias aisladas.

Para la estandarización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se empleó ADN extraído de 3mL de TSB con un cultivo bacteriano en fase logarítmica medida por turbidimetría alrededor de 0,5 unidades ópticas a 600 nm. El cultivo fue centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos dos tubos de 1.5 mL. El pellet bacteriano obtenido fue resuspendido en 150 uL de buffer Tris-EDTA (TE) y sometido a lisis por alcali, empleando 200 uL de solución 0.2N de NaOH y 1% de SDS. La mezcla fue homogeneizada y posteriormente neutralizada con 150uL de Acetato de potasio 5M. La mezcla fue centrifugada y el sobrenadante sometido a precipitación alcohólica empleando un volumen de isopropanol absoluto frio por toda la noche para ser centrifugado por 30 min a 10000 rpm para precipitar el ADN. El ADN precipitado fue lavado con 1 mL de etanol a 70 % y centrifugado a 5 min a 10000 rpm. Descartado el sobrenadante y secado el pellet el ADN se resuspendió en 100 uL de buffer TE. La cantidad de ADN se cuantifico por espectrofotometría y se evaluó la calidad por electroforesis antes de ser usado para la estandarización del PCR

El ADN empleado para obtener el amplicon de cada colonia se obtuvo por extracción simple. Una colonia bacteriana fue colocada en 300 uL de agua grado molecular y sometida a 5 ciclos de 10 minutos a menos 20 °C y 3 minutos a 65 °C. Repeticiones de este ensayo determinaron que una colonia resuspendida en volúmenes mayores a 300 uL pierden capacidad de ser amplificado, al igual que con un tiempo de más de una semana de almacenamiento a menos 20 °C.



### ***Amplificación del gen 16S ARN***

Para obtener los amplicones de cada aislado bacteriano se emplearon los cebadores 27f AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG y L1rc CA(A/G)GGCATCCACCGT descritos por (Fessehaie et al., 2002). La región de amplificación aproximadamente 2Kb abarca el gen 16S ARN y la región intergénica entre los genes 16S ARN y 23S ARN.

El PCR se ha realizado con el kit de amplificación Platinum™ SuperFi™ DNA Polymerase de la empresa Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, en un termociclador PCRmax® ALPHA 1 Thermal Cycler. La enzima tiene capacidad de relectura por lo que se minimizan los errores que pueden producirse durante el proceso de la síntesis de ADN.

Las condiciones de amplificación luego del proceso de estandarización determinaron que la cantidad mínima de ADN para amplificar fue de 0.25 ng en un volumen final de reacción de 25 uL con una denaturación inicial de 98 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 30s, 60 °C por 30s y 72 °C por 60s y una etapa de elongación final de 72 °C 5 min. Los productos fueron verificados por electroforesis a 1% y 30 uL de cada producto se envió a la compañía MACROGEN para el servicio de secuenciamiento.

### ***Secuenciamiento del gen 16S ARN.***

El secuenciamiento de cada uno de los productos de amplificación se realizaron por servicio externo de la compañía MACROGENE mediante la tecnología de secuenciamiento de Sanger y la estrategia de *Primer walking*, empleándose los cebadores 27f, 530f y 926f ubicados a lo largo de los aproximadamente 2 Kb de la longitud total del amplicon.

### ***Análisis de secuencia y clasificación de las bacterias***

El análisis de las secuencias se realizó empleando el software libre MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11 (Stecher et al., 2020; Tamura et al., 2021).



Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**



Las lecturas de secuencias de un mismo producto se alinearon y se agruparon para formar la secuencia total del amplicon, la cual fue comparada con las secuencias reportadas en el banco de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) mediante la aplicación BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).



## IV. RESULTADOS

### 4.1 Obtención de muestras de banano orgánico con pudrición blanda

Muestras de pseudotallo con síndrome de pudrición blanda fueron colectadas de un cultivar de banano orgánico en Vichayal Querocotillo. Ver Figura 1. La actividad agrícola de la zona está dedicada al cultivo de banano orgánico, como lo son también los otros siete distritos de Sullana.

El punto de colecta de muestra fue ubicado en las coordenadas geográficas  $4^{\circ}51'05.1''S$   $80^{\circ}39'15.6''W$  y coordenadas GPS -80.65432 longitud, -4.85141latitud en el distrito de Querecotillo, en la provincia de Sullana en el departamento de Piura en la costa norte del Perú. Ver Figura 2.

La muestra transportada al laboratorio de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SL10LA105) de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal para el respectivo aislamiento bacteriano.



## Figura 1

*Colecta de muestra con síntomas de pudrición blanda de banano*

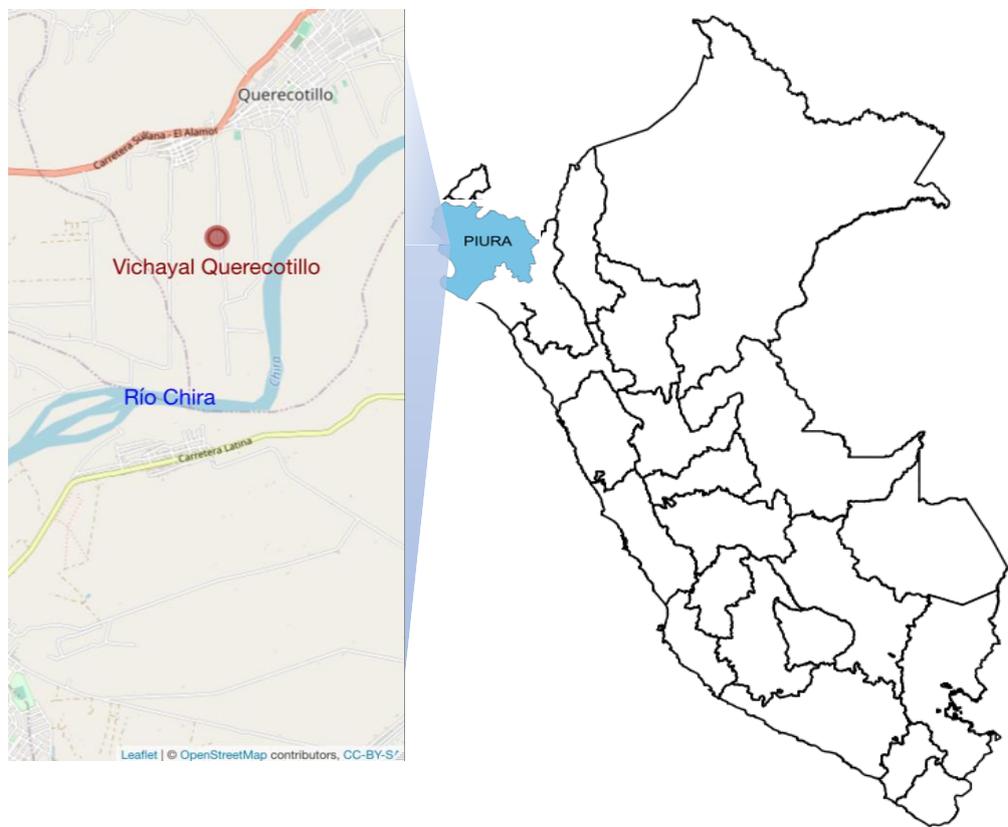


*Nota.* A la izquierda Planta de banano orgánico con síntomas de pudrición blanda. A la derecha detalle de la muestra colectada



## Figura 2

*Mapa de la localización geográfica de la muestra de planta de banano orgánico con síntomas de pudrición blanda*

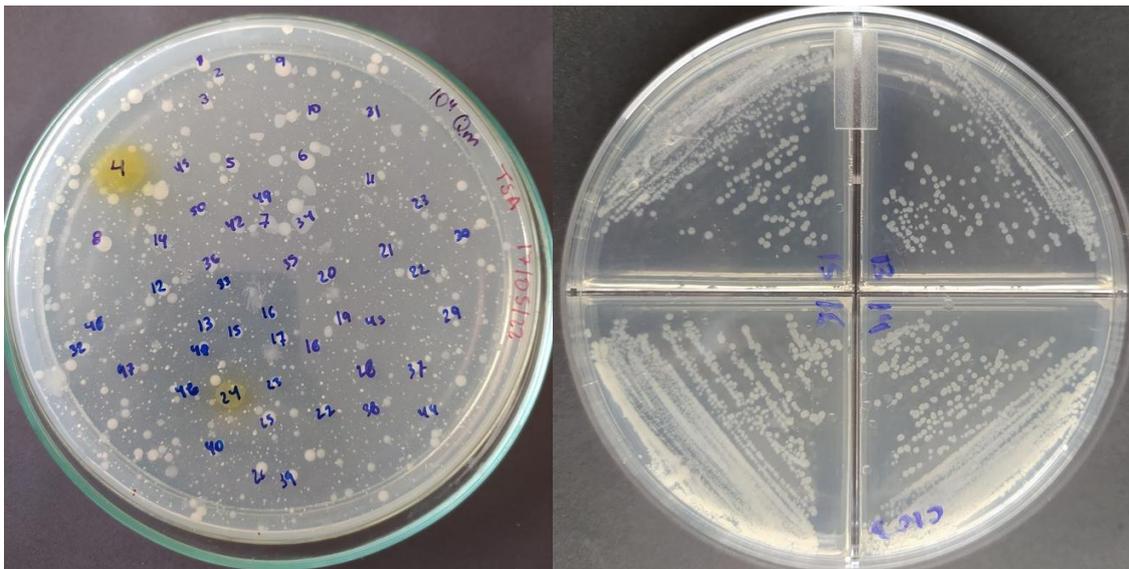


## 4.2 Obtención de aislados bacterianos

Cincuenta y dos colonias aisladas fueron seleccionadas y codificadas para replicarlas por rastrillado sobre TSA en nuevas placas de cultivo de cuatro cuadrantes para mantener los aislados bacterianos. Las 52 colonias fueron obtenidas de la cuarta dilución ( $10^{-4}$ ) en cultivo de doble placa luego de 20 horas de incubación a 25 °C. Ver figura 3.

### Figura 3

*Aislamiento bacteriano de la muestra de Querocotillo.*



*Nota.* A la izquierda Cultivo de la cuarta dilución seriada  $1/10$  mostrando la selección de las colonias aisladas. A la derecha mantenimiento de las colonias aisladas en placas de agar TSA de cuatro cuadrantes.



### **4.3 Características microbiológicas de las bacterianas aisladas de la muestra de pudrición blanda de banano.**

Todos los aislados bacterianos se evaluaron por tinción Gram determinándose 49 aislados como cocobacilos gran negativos, mientras que solo 3 aislados resultaron clasificados como bacilos gran negativos. Ver Tabla 1.

### **4.4 Análisis molecular de las bacterias aisladas de muestras de pudrición blanda de banano.**

Estandarizadas las condiciones de amplificación, de las 52 colonias bacterianas aisladas de muestra de pudrición blanda de banano de la provincia de Querocotillo, solo se pudo obtener un producto de amplificación de 48 aislados, 4 aislados no mostraron amplificación evaluados en geles de electroforesis al 1%.

De los 48 amplicones enviados a secuenciar, solo se pudo obtener secuencias de 37 aislados, todas las secuencia relacionadas a la familia *Enterobacteriaceae*, divididas en dos grupos: un primer grupo de 29 secuencias mostraron una similitud del 100 % en los 1462 nucleótidos del gen 16s RNA a la secuencia del banco de datos *Klebsiella michiganensis* strain Biosolid 27 ( GenBank: CP054159.1 ), mientras un segundo grupo de 8 secuencias mostraron ser similares a la secuencia del banco de datos *Klebsiella variicola* strain NCTC9668 genome assembly ( GenBank: LR134235 ) Ver Tabla 1. La diferencia de los grupos mayoritarios de bacterias encontradas en sus secuencias radica en 27 cambios nucleotídicos de los cuales 12 son transversiones y 15 son transiciones. Ver Figura 4 y 5.

Adicionalmente, las bacterias que se emplearon como control del medio ambiente se clasificaron como bacilos gram positivos y por secuenciamiento 4 de ellos presentaron



Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**



similitud del 100 % con *Bacillus niabensis* ( GenBank: LT223631.1) y uno a *Bacillus firmus* ( GenBank: KY928097.1 ).



**Tabla 1**

*Características microbiológicas y moleculares de los aislados bacterianos*

Código	Gram	Morfología	Amplico n	Similitud al 100% de secuencia en GenBank
QM10401	Negativo	Cocobacilos	SI	NO SE OBTUVO SECUENCIA
QM10402	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10403	Negativo	Cocobacilos	SI	>LR134235.1 <i>Klebsiella variicola</i> strain NCTC9668 genome assembly
QM10404	Negativo	Bacilos	SI	NO SE OBTUVO SECUENCIA
QM10405	Negativo	Cocobacilos	SI	NO SE OBTUVO SECUENCIA
QM10406	Negativo	Cocobacilos	SI	>LR134235.1 <i>Klebsiella variicola</i> strain NCTC9668 genome assembly
QM10407	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10408	Negativo	Cocobacilos	SI	>LR134235.1 <i>Klebsiella variicola</i> strain NCTC9668 genome assembly
QM10409	Negativo	Cocobacilos	SI	>LR134235.1 <i>Klebsiella variicola</i> strain NCTC9668 genome assembly
QM10410	Negativo	Cocobacilos	SI	NO SE OBTUVO SECUENCIA
QM10411	Negativo	Cocobacilos	SI	NO SE OBTUVO SECUENCIA
QM10412	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10413	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10414	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10415	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10416	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10417	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10418	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10419	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10420	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10421	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10422	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10423	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10424	Negativo	Bacilos	SI	NO SE OBTUVO SECUENCIA
QM10425	Negativo	Cocobacilos	SI	>LR134235.1 <i>Klebsiella variicola</i> strain NCTC9668 genome assembly
QM10426	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10427	Negativo	Bacilos	No	-
QM10428	Negativo	Cocobacilos	No	-
QM10429	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10430	Negativo	Cocobacilos	SI	>LR134235.1 <i>Klebsiella variicola</i> strain NCTC9668 genome assembly
QM10431	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10432	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10433	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10434	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10435	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10436	Negativo	Cocobacilos	SI	NO SE OBTUVO SECUENCIA
QM10437	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10438	Negativo	Cocobacilos	SI	>LR134235.1 <i>Klebsiella variicola</i> strain NCTC9668 genome assembly
QM10439	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10440	Negativo	Cocobacilos	SI	>LR134235.1 <i>Klebsiella variicola</i> strain NCTC9668 genome assembly
QM10441	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10442	Negativo	Cocobacilos	SI	NO SE OBTUVO SECUENCIA
QM10443	Negativo	Cocobacilos	SI	NO SE OBTUVO SECUENCIA
QM10444	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10445	Negativo	Cocobacilos	SI	NO SE OBTUVO SECUENCIA
QM10446	Negativo	Cocobacilos	SI	NO SE OBTUVO SECUENCIA
QM10447	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10448	Negativo	Cocobacilos	No	-
QM10449	Negativo	Cocobacilos	No	-
QM10450	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10451	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27
QM10452	Negativo	Cocobacilos	SI	>CP054159.1:4505300-4506756 <i>Klebsiella michiganensis</i> strain Biosolid 27





**Figura 5**

*Alineamiento de nucleótidos del 781 al 1462 de las secuencias representativas de los grupos de secuencias de los aislados bacteriano de la muestra de pudrición blanda de banano.*

GRUP01 KM	GGTTGTTCCCTTGAGGA	GTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAA	GTCGACCGCCTGGGGAGT	840
GRUP02 KV	GGTTGTCCCTTGAGGC	GTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAA	GTCGACCGCCTGGGGAGT	840
consensus	!!!!!!	!!!!!!	!!!!!!	
GRUP01 KM	ACGGCCGCAAGGTTAA	AACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATG	900	
GRUP02 KV	ACGGCCGCAAGGTTAA	AACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATG	900	
consensus	!!!!!!	!!!!!!		
GRUP01 KM	TGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGA	ACCTTACCTACCTCTTGACATCCA	GAGAAGTTAGC	960
GRUP02 KV	TGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGA	ACCTTACCTACCTCTTGACATCCA	GAGAAGTTAGC	960
consensus	!!!!!!	!!!!!!	!!!!!!	
GRUP01 KM	AGAGATGCTTGGTGCCTTCGGGA	ACTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTC	1020	
GRUP02 KV	AGAGATGCTTGGTGCCTTCGGGA	ACTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTC	1020	
consensus	!!!!!!	!!!!!!		
GRUP01 KM	GTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGT	TCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAG	1080	
GRUP02 KV	GTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGT	TCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAG	1080	
consensus	!!!!!!	!!!!!!		
GRUP01 KM	CGGTCCGGCCGGGA	ACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGA	1140	
GRUP02 KV	CGGTCCGGCCGGGA	ACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGA	1140	
consensus	!!!!!!	!!!!!!		
GRUP01 KM	CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGA	GTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAA	1200	
GRUP02 KV	CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGA	GTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAA	1200	
consensus	!!!!!!	!!!!!!		
GRUP01 KM	AGAGAAGCGACCTCCGGAGAGCA	AGCGGACCTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGA	1260	
GRUP02 KV	AGAGAAGCGACCTCCGGAGAGCA	AGCGGACCTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGA	1260	
consensus	!!!!!!	!!!!!!		
GRUP01 KM	GTCTGCAACTCGACTCCATGAAGT	CGGAATCGCTAGTAATCGTGATCAGAATGCCACGG	1320	
GRUP02 KV	GTCTGCAACTCGACTCCATGAAGT	CGGAATCGCTAGTAATCGTGATCAGAATGCCACGG	1320	
consensus	!!!!!!	!!!!!!		
GRUP01 KM	TGAATACGTTCCCGGCCTTGTACAC	ACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAA	1380	
GRUP02 KV	TGAATACGTTCCCGGCCTTGTACAC	ACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAA	1380	
consensus	!!!!!!	!!!!!!		
GRUP01 KM	GAAGTAGGTAGCTTAACTTCGGG	AGGGCGCTTACCCTTTGTGATTCATGACTGGGGTG	1440	
GRUP02 KV	GAAGTAGGTAGCTTAACTTCGGG	AGGGCGCTTACCCTTTGTGATTCATGACTGGGGTG	1440	
consensus	!!!!!!	!!!!!!		
GRUP01 KM	AAGTCGTAACAAGGTAACCGTA	1462		
GRUP02 KV	AAGTCGTAACAAGGTAACCGTA	1462		
consensus	!!!!!!			



## V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los síntomas que causa la pudrición blanda que afectan al banano orgánico pueden encontrarse tanto en el rizoma como en el pseudotallo. La pudrición parda y el mal olor en el rizoma son característicos de estados avanzados mientras que la pudrición parda húmeda es característico en etapas iniciales en el pseudotallo (Loganathan et al., 2019). Como ocurre en otras afecciones de pudrición en otros cultivos los métodos más utilizados para el control son la remoción de la parte afectada o en casos avanzados la remoción de toda la planta.

Son diversas las bacterias que han sido relacionadas con la pudrición. Estas bacterias pueden ingresar a las plantas a través de heridas causadas durante la poda de la planta, mordeduras de insectos y aberturas naturales. Los desechos de las plantas infectadas suelen contaminar el suelo y agua, generando graves problemas principalmente en un clima húmedo.

En el presente estudio analizamos una muestra colectada de una planta de banano orgánico en el distrito de Querecotillo Sullana-Piura, la cual mostraba síntomas de pudrición blanda como se evidencia en la figura 1 con la característica coloración parda del pseudotallo y la emisión del líquido pardo de la pudrición húmeda.

La morfología de las bacterias aisladas y los análisis de secuencia de los 1462 pares de bases dentro del gen 16s ARN nos permiten identificar a las bacterias *Klebsiella michiganensis* y *Klebsiella variicola*, miembros de la familia *Enterobacteriaceae* como bacterias presentes en la muestra de pudrición húmeda del pseudotallo. Diversos reportes también coinciden en relacionar a *Klebsiella variicola* como una bacteria presente en pudrición blanda en regiones del Caribe como en Haití, en regiones tropicales de la India y recientemente en plantaciones de banano de la provincial de Salitral distrito vecino de Querecotillo Sullana-Piura (Fulton et al., 2020; Loganathan et al., 2021; Rafael-Rutte et al., 2022).



Sin embargo, las especies del género *Klebsiella* también se han reportado como bacterias beneficiosas para las plantas por cumplir la función de fijar nitrógeno en el suelo, por lo que su rol bacteriano todavía se encuentra muy incierto. Análisis genómicos de *Klebsiella michiganensis* obtenida de suelo y otras de raíces enfermas de mora han puesto en evidencia la capacidad de estas bacterias de degradar la pared celular de las plantas y de contar con los genes necesarios para la biosíntesis de sistemas de secreción bacteriana de tipo I de tipo II lo cual les permitiría secretar las enzimas para degradar la pared celular de las plantas (Yu et al., 2018; Luo et al., 2022).

Por lo mencionado las bacterias del género *Klebsiella* han tomado una gran notoriedad e importancia para esclarecer el grado de virulencia que pueden presentar como patógenos de plantas y también como bacterias fijadoras de nitrógeno.



## VI. CONCLUSIONES

El presente estudio concluye que en las muestras de pudrición blanda del pseudotallo de banano orgánico del distrito Querocotillo Sullana- Piura, se encuentran presentes bacterias clasificadas por el gen 16s ARN como *Klebsiella michiganensis* y *Klebsiella variicola*, miembros de la familia *Enterobacteriaceas*.

## VII. CONTRIBUCIONES Y LOGROS DEL PROYECTO

El desarrollo del proyecto ha permitido al laboratorio LBBM de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas (FCCNM - UNFV) almacenar y disponer de bacterias relacionadas a pudrición blanda para futuras investigaciones en el desarrollo de agentes controladores para estas bacterias fitopatogénicas.

Cuatro alumnas de Pregrado han desarrollado sus prácticas preprofesionales y se han entrenado a fin de que puedan desempeñarse como recurso humano valioso en futuras investigaciones en las áreas de bioquímica, biología molecular y biología sintética.

Los resultados obtenidos junto a otros resultados de muestras colectadas en Salitral y Mambre de Sullana – Piura formaran parte de una publicación que se esta enviando para su revisión y evaluación a la revista **Plant Disease** publicada por The American Phytopathological Society.



## VIII. REFERENCIAS

- Aguilar-Ancocota, R., Ruiz, W. R., Morales-Pizarro, A., Rafael-Rutte, R., Tirado-Lara, J., Saucedo-Bazalar, M., Tuesta-Albán, C., Apaza-Apaza, S., Teodor, K. K., Aguilar-Ancocota, R., Ruiz, W. R., Morales-Pizarro, A., Rafael-Rutte, R., Tirado-Lara, J., Saucedo-Bazalar, M., Tuesta-Albán, C., Apaza-Apaza, S., & Teodor, K. K. (2021). Pudrición blanda en el pseudotallo de banano orgánico (*Musa* sp): Sintomatología, caracterización cultural y bioquímica, patogenicidad y alternativas de manejo. *Scientia Agropecuaria*, *12*(4), 571–578.  
<https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.061>
- Asai, T., Zaporjets, D., Squires, C., & Squires, C. L. (1999). An *Escherichia coli* strain with all chromosomal rRNA operons inactivated: Complete exchange of rRNA genes between bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(5), 1971–1976. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.1971>
- Basim, H., Basim, E., Bakı, D., & Turgut, A. (2019). Wet rot disease of banana (*Musa* sp.) caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* in Turkey. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *41*(2), 174–187.  
<https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1577302>
- Chun, J., Huq, A., & Colwell, R. R. (1999). Analysis of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(5), 2202–2208. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.5.2202-2208.1999>
- Fessehaie, A., De Boer, S. H., & Lévesque, C. A. (2002). Molecular characterization of DNA encoding 16S– 23S rRNA intergenic spacer regions and 16S rRNA of pectolytic *Erwinia* species. *Canadian Journal of Microbiology*, *48*(5), 387–398.  
<https://doi.org/10.1139/w02-026>



- Fiers, M., Edel-Hermann, V., Chatot, C., Le Hingrat, Y., Alabouvette, C., & Steinberg, C. (2012). Potato soil-borne diseases. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(1), 93–132. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0035-z>
- Fulton, J. C., Bec, S., Fayette, J., Ploetz, R. C., Garrett, K. A., & Harmon, C. L. (2020). First Report of Plantain Soft Rot Caused by *Klebsiella variicola* in Haiti. *Plant Disease*, 104(6), 1851. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2105-PDN>
- Gardan, L., Gouy, C., Christen, R., & Samson, R. 2003. (n.d.). Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(2), 381–391. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.02423-0>
- Gutell, R. R., Larsen, N., & Woese, C. R. (1994). Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *MICROBIOL. REV.*, 58, 17.
- Loganathan, M., Thangavelu, R., P, P., Kalimuthu, M., Ramesh, R., Selvarajan, R., & Uma, S. (2021). First report of rhizome rot of banana caused by *Klebsiella variicola* in India. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-20-2316-PDN>
- Loganathan, M., Thangavelu, R., Padmanaban, B., & Uma, S. (2019). Status of Rhizome and Pseudostem Wet Rot Diseases of Banana. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(05), 764–771. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.805.090>
- Luo, L., Huang, Y., & Liu, J. (2022). Genome Sequence Resources of *Klebsiella michiganensis* AKKL-001, Which Causes Bacterial Blight of Mulberry. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 35(4), 349–351. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-21-0222-A>



- Martínez-Solórzano, G. E., Rey-Brina, J. C., Pargas-Pichardo, R. E., & Manzanilla, E. E. (2019). Marchitez por *Fusarium* raza tropical 4: Estado actual y presencia en el continente americano. *Agronomía Mesoamericana*, 259–276. <https://doi.org/10.15517/am.v31i1.37925>
- Rafael-Rutte, R., Zavala, L., Maldonado, E. A., Aguilar-Ancota, R., Saucedo-Bazalar, M., Tirado-Lara, J., & Aquije, C. (2022). CHARACTERIZATION OF RHIZOME AND PSEUDOSTEM WET ROT OF ORGANIC BANANA (*Musa* sp.) IN PIURA, PERU. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 38(2), Article 2. <https://doi.org/10.29393/CHJAA38-17CRRC70017>
- Stecher, G., Tamura, K., & Kumar, S. (2020). Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS. *Molecular Biology and Evolution*, 37(4), 1237–1239. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz312>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Toth, I. K., Avrova, A. O., & Hyman, L. J. (2001). Rapid Identification and Differentiation of the Soft Rot *Erwinias* by 16S-23S Intergenic Transcribed Spacer-PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism Analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4070–4076. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.9.4070-4076.2001>
- Yu, Z., Li, S., Li, Y., Jiang, Z., Zhou, J., & An, Q. (2018). Complete genome sequence of N2-fixing model strain *Klebsiella* sp. Nov. M5a1, which produces plant cell wall-degrading enzymes and siderophores. *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)*, 17, 6–9. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.11.006>