

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
MOLECULAR**



**Caracterización molecular de la microbiota bacteriana y fúngica
de hojas sanas y con síntomas de enfermedades de manchas
foliares de banano mediante técnicas dependientes e
independientes de cultivo.**

TESIS

**Para optar por el grado académico de maestro en ciencias con
mención en Biotecnología Molecular**

Autor: César Augusto Mogollón Farias

TUMBES, 2024

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



Caracterización molecular de la microbiota bacteriana y fúngica de hojas sanas y con síntomas de enfermedades de manchas foliares de banano mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo.

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. Deza Navarrete Carlos Alberto (presidente).....

Dr. García Seminario Ramón (secretario).....

Ph. D. Cedeño Escobar Virna Alexa (vocal).....

TUMBES, 2024

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



Caracterización molecular de la microbiota bacteriana y fúngica de hojas sanas y con síntomas de enfermedades de manchas foliares de banano mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo.

Los suscritos declaramos que la tesis es original en su contenido y forma:

Ing. Mogollón Farias César Augusto (autor)

Ph.D. Mialhe Matonnier Eric (asesor)

Código ORCID: 0000-0002-7952-6907

Mg. Sánchez Abad Luis Dicson (co-asesor)

Código ORCID: 0000-0001-9397-9024

TUMBES, 2024

ACTA DE SUSTENTACIÓN



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO
Tumbes - Perú

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En Tumbes, a los diecisiete días del mes de noviembre del año dos mil dieciocho, a las 19.45 horas en LA SALA DE SESIONES DE LA ESCUELA DE POSGRADO, se reunieron los miembros del jurado designados con Resolución Directoral N° 091-2018/UNTUMBES-EPG-D, Dr. Carlos Alberto Deza Navarrete - Presidente; Dr. Ramon García Seminario - Secretario; Ph. D. Virna Alexia Cedeño Escobar – Vocal y con Resolución Directoral N° 0176-2018/UNTUMBES-EPG-D, se fijó la fecha de sustentación y defensa de la tesis Caracterización molecular de la microbiota bacteriana y fúngica mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo a partir de hojas sanas y con síntomas de las enfermedades de manchas foliares de banano, presentada por el egresado del Programa de Maestría en Biotecnología Molecular Br. Cesar Augusto Mogollón Farías, asesorado por el Ph. D. Eric Mialhe Matonnier y coasesorado por el M.Sc Luis Dicson Sánchez Abad.

Concluida la exposición y sustentación, absueltas las preguntas y efectuadas las observaciones, lo declaran APROBADA POR UNANIMIDAD, dando cumplimiento al Art. 29° del Reglamento de Investigación con fines de Graduación en la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 20.35 horas, se dio por concluido el acto académico, y dando conformidad se procedió a firmar la presente acta en presencia del público

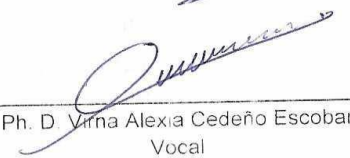
Tumbes, 17 de noviembre de 2018.



Dr. Carlos Alberto Deza Navarrete
Presidente



Dr. Ramon Garcia Seminario
Secretario



Ph. D. Virna Alexia Cedeño Escobar
Vocal

C.c. Jurado de Proyecto de Tesis (3), Asesor (1), sustentante (1), UI (2)

Caracterización molecular de la microbiota bacteriana y fúngica mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo a partir de hojas sanas y con síntomas de las enfermedades de manchas foliare

por César Mogollón

Fecha de entrega: 12-nov-2018 05:02p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 1037700465

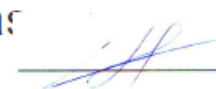
Nombre del archivo: C_MOGOLLON_Turnitin.docx (661.97K)

Total de palabras: 6881

Total de caracteres: 38489

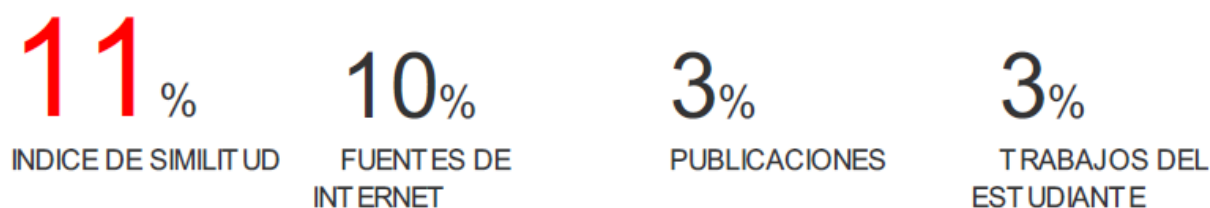


Caracterización molecular de la microbiota bacteriana y fúngica mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo a partir de hojas sanas y con síntomas de las enfermedades de manchas foliares



Dr. Eric Mialhe Matonnier
Asesor de Proyecto de Tesis
Orcid: 0000-0002-7952-6907

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.concytec.gob.pe Fuente de Internet	6%
2	oa.upm.es Fuente de Internet	1%
3	Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León Trabajo del estudiante	1%
4	www.scielo.org.mx Fuente de Internet	1%
5	Submitted to Universidad Nacional de Tumbes Trabajo del estudiante	<1%
6	Gang Fu, Siliang Huang, Yunfeng Ye, Yongguan Wu, Zhenlu Cen, Shanhai Lin. "Characterization of a bacterial biocontrol strain B106 and its efficacies on controlling banana leaf spot and post-harvest anthracnose"	<1%

diseases", Biological Control, 2010

Publicación



7	rmf.smf.org.mx Fuente de Internet	<1%
8	eprints.ucm.es Fuente de Internet	<1%
9	link.springer.com Fuente de Internet	<1%
10	Submitted to Macquarie University Trabajo del estudiante	<1%
11	issuu.com Fuente de Internet	<1%
12	Submitted to Consorcio CIXUG Trabajo del estudiante	<1%
13	theses.gla.ac.uk Fuente de Internet	<1%
14	pt.scribd.com Fuente de Internet	<1%
15	www.smvu.com.uy Fuente de Internet	<1%
16	tede.ufam.edu.br Fuente de Internet	<1%
17	colombiamedica.univalle.edu.co Fuente de Internet	<1%

18	www.kali-gmbh.de Fuente de Internet	<1%
19	repositorio.uam.es Fuente de Internet	<1%
20	L. Clercx, M. Arias Zambrano, J. Dulanto Bejarano, B. Flores Espinoza. "Towards biological control of red rust banana thrips in organic and conventional banana", Acta Horticulturae, 2015 Publicación	<1%
21	tel.archives-ouvertes.fr Fuente de Internet	<1%
22	www.colpos.mx Fuente de Internet	<1%

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Apagado



Dr. Eric Mielke Motonier
Asesor del Proyecto de Tesis
Cred: 0000-8000-7953-6907

DEDICATORIA

A Dios por permitirme llegar hasta esta etapa de mi vida, y haberme dado fortaleza y voluntad para cumplir mis objetivos.

A mis padres; Augusto Mogollón Sócola y Rosa Aura Farias Atoche, que siempre estuvieron ahí guiándome, brindándome su apoyo y confianza total.

A mis maestros, que se convirtieron en amigos, quienes me dieron la oportunidad de formar parte de esta increíble maestría que me permitió ejecutar esta investigación, en el cual me impartieron enseñanzas que me motivaron a seguir amando la ciencia y la investigación.

A mi esposa y mis hijos que siempre me apoyan y son la inspiración para seguir adelante a pesar de cualquier dificultad.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de Tumbes y su convenio con INCA BIOTEC S.A.C, que me permitió concursar y obtener la beca para el programa de la maestría en Biotecnología Molecular.

A los integrantes del equipo científico y técnico de la empresa en biotecnología molecular INCABIOTEC SAC, en especial a Eric Mialhe, Virna Cedeño, Emmerik Motte, Benoit Diringier, Dicson Sánchez, César Santos y Pedro Masías quienes apoyaron este trabajo de investigación durante su desarrollo.

A mis amigos de trabajo Joselyn Aguilar, Jimena Casariego, Evelyn Colobon, Verónica Sernaqué, Erick Suárez, Luis Luna, y a todas las personas que estuvieron involucradas en este trabajo, mi más sincero agradecimiento. Agradezco a mis padres por todo el apoyo brindado desde siempre.

Agradezco a mis mentores de esta maestría en especial al Ph.D Eric Mialhe por sus conocimientos impartidos, dedicación y motivación para la ciencia e investigación.

Agradezco Dr. Carlos Deza Navarrete por el apoyo que me brindo para poder concretar esta meta.

A Anyi y mis hijos Tiziana Valentina, Elisa Luciana y Mathius Sebastián por estar siempre conmigo y por su apoyo incondicional.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	xii
ABSTRACT.....	xiii
I.INTRODUCCIÓN.....	14
II.REVISION DE LITERATURA	17
2.1.Plagas y enfermedades que afectan el banano.....	18
2.2.Generalidades de manchas foliares de sigatoka	19
2.3.Generalidades sobre interacciones microbio-planta	22
III.MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1.Área de estudio y Material vegetal	24
3.2.Microbiología molecular	24
3.3.Extracción de ADN, amplificación por PCR, Secuenciación y Análisis Bioinformático	25
3.4.Análisis metagenómico.....	26
IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1.Microbiología molecular	28
4.2.Análisis metagenómico del Perfil bacteriano en hojas de banano con ausencia y presencia de síntomas de las manchas foliares, cocultivable y directo	30
4.3. Abundancias relativas de las muestras de hojas de banano sano y enfermos, co cultivables y directas a nivel de Filum y Familia bacterianas.	32
4.4. Abundancias relativas de las muestras de hojas de banano sano y enfermos, co cultivables y directas a nivel de géneros bacterianos.	34

4.5.Comunidad bacteriana compartidas en las muestras de hojas de banano asintomáticas y con síntomas de manchas foliares, co cultivables y directas a través de grafico de Venn Euler	37
4.6.Análisis metagenómico a nivel fúngico de las hojas de banano con síntomas de las manchas foliares, cocultivable y directo	39
V.CONCLUSIONES	45
VI.RECOMENDACIONES	46
VII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
VIII.ANEXO	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Bacterias caracterizadas molecularmente de muestras de hojas de banano Musa acuminata	29
Tabla 2. Hongos caracterizados molecularmente de muestras de hojas de banano Musa acuminata.....	30
Tabla 3. Estimadores de diversidad bacteriana para las muestras de hojas sanas y enfermas, dependiente e independientes de cultivo respectivamente.	31
Tabla 4. Abundancia relativa de géneros representativos de la diversidad bacteriana en las hojas de banano Musa acuminata	35

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Desarrollo del ciclo de vida de la enfermedad Sigatoka Negra en banano, causada por el patógeno *P. fijiensis*. Fuente: Churchill 2011.....22
- Figura 2. La curva de rarefacción muestra la diferencia en la diversidad de OTUs en las cuatro muestras (DE, COHE, DS y COHS)31
- Figura 3. Análisis de la comunidad bacterianas basado en el secuenciamiento del ADNr 16S. A) Diversidad taxonómica a nivel de Filum y Familias asociadas con las hojas de banano sanos y enfermos, cocultivables y directas respectivamente (DS, COHS, DE, COHE). Análisis de la microbiota nativa (sin cultivar en medio LB) y cultivada (en medio LB por 24 H)34
- Figura 4. Diversidad bacteriana a nivel de género de la microbiota de hojas sanas y enfermas caracterizados por metagenómica dirigida al ADN ribosómico bacteriano. Análisis de la microbiota nativa (sin cultivar en medio LB) y cultivada (en medio LB por 24 H).36
- Figura 5. Comparación de las comunidades bacterianas de la filósfera de banano a través del Diagrama de Venn (DS, COHS, DE Y COHE).38
- Figura 6. Diversidad fúngica a nivel de Phylum (A) y Familia (B) de la microbiota de hojas enfermas caracterizados por metagenómica dirigida a la región ITS. Análisis de la microbiota nativa (sin cultivar en medio PDA) y cultivada (en medio PDA por 24 H).....40
- Figura 7. Diversidad fúngica a nivel de género (A) y especies (B) de la microbiota de hojas enfermas caracterizados por metagenómica dirigida a la región ITS. Análisis de la microbiota nativa (sin cultivar en medio PDA) y cultivada (en medio PDA por 24 H).42

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Toma de muestra, en campo, en el fundo Los Zarates, (A) en hojas sanas, (B) hoja con síntomas de manchas foliares.	54
Anexo 2. Toma de muestra, en cámara de flujo a partir de tejidos de hojas con síntomas de manchas foliares.	54
Anexo 3. Siembra, aislamiento y purificación de bacterias cultivables.	55
Anexo 4. Placas Petri con bacterias y hongos cultivables.	55

RESUMEN

Las enfermedades de manchas foliares del banano son un serio problema para la industria del banano. Las enfermedades causadas por las manchas foliares del banano están asociadas a un complejo de hongos patógenos, de los cuales sigatoka es considerada la enfermedad foliar más devastadora del cultivo de banano, causado por el hongo *Pseudocercospora fijiensis* responsable de la necrosis de las hojas del banano. En el presente estudio, un enfoque de metagenómica dirigida y comparativa ha sido aplicado para caracterizar las comunidades bacterianas y fúngicas en la filósfera a partir de hojas de plantas con ausencia y presencia de síntomas de enfermedades de manchas foliares. Bacterias y hongos han sido aisladas e identificadas molecularmente basadas en la secuencia parcial del gen ADNr 16S y ITS. La clasificación taxonómica reveló cuatro y nueve Fylum bacterianos conocidos en tejidos de hojas con ausencia y presencia de síntomas respectivamente. El análisis de las comunidades bacterianas reveló 110 OTUs de bacterias. La microbiota bacteriana en hojas sanas fue compuesta principalmente con *Zymobacter* que estuvo presente solo en hojas sanas, seguido de *Pantoea* y *Bacillus*. En hojas de plantas con síntomas los géneros más representativos fueron *Bacillus*, *Halospirulina* y *Erwinia*, mientras *Rubritepida* estuvo presente solo en plantas enfermas. La diversidad fúngica de plantas enfermas reveló 63 OTUs, con los géneros *Cladosporium* y *Alternaria* como los más representativos y *Pseudocercospora* antes conocido como *Mycosphaerella* siempre estuvo presente en hojas de plantas enfermas. Nuestros resultados demuestran que gracias los análisis metagenómicos permite entender las relaciones entre las comunidades microbianas y fúngicas en el microbioma foliar y proporcionar posibles estrategias de control biológico de las enfermedades de manchas foliares del banano.

Palabras claves: Filósfera, Metagenómica, 16S ARNr, ITS, *P. fijiensis*

ABSTRACT

Banana leaf spot diseases are a serious problem for the banana industry. The diseases caused by banana leaf spots are associated with a complex of pathogenic fungi. Sigatoka is considered the most devastating foliar disease of banana crops, caused by the fungus *Pseudocercospora fijiensis* responsible for the necrosis of banana leaves. In the present study, a targeted and comparative metagenomics approach has been applied to characterize the bacterial and fungal communities in the phyllosphere from leaves of plants with the presence and absence of leaf spot diseases. Bacteria and fungi have been isolated and molecularly identified based on the partial sequence of the 16S rDNA and ITS gene. The taxonomic classification revealed 4 and nine known bacterial phylum in leaf tissues with absence and presence of symptoms respectively. Analysis of the bacterial communities revealed 110 bacterial OTUs. The bacterial microbiota in healthy leaves was composed mainly with *Zymobacter* that was present only in healthy leaves, followed by *Pantoea* and *Bacillus*. In leaves of plants with symptoms, the most representative genera were *Bacillus*, *Halospirulina* and *Erwinia*, while *Rubritepida* was present only in diseased plants. The fungal diversity of diseased plants revealed 63 OTUs, with the genera *Cladosporium* and *Alternaria* as the most representative and *Pseudocercospora* formerly known as *Mycosphaerella* was always present in diseased plants. Our results demonstrate that metagenomic analyzes allow us to understand the relationships between microbial and fungal communities in the leaf microbiome and provide possible biological control strategies for banana leaf spot diseases.

Keywords: Phyllosphere, Metagenomic, 16S rRNA, ITS, *P. fijiensis*