

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología – Microbiología

**Estudio de las comunidades bacterianas endófitas del fruto de la
fresa (*Fragaria ananassa*) presentes en cultivos orgánicos
de Cerro Blanco - Calana, Tacna**

TESIS

Presentada por:

Bach. Alexandra Alférez Manrique

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

TACNA-PERÚ

2024

Acta de Sustentación de Tesis N°411

En la ciudad de Tacna, en el auditorio de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; siendo las 09:25 horas del día 08 de abril del 2024, estando presente el jurado calificador designado por Resolución de Facultad N°10841-2024-FACI-UN/JBG, conformado por los siguientes docentes:

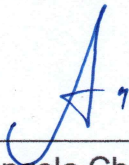
Dra. Angela Verónica Choque Miranda	Presidenta
Dr. Carlos Francisco Tito Vargas	Secretario
Dr. Roberto Castellanos Cabrera	Vocal

Acto seguido, se dio lectura a la Resolución correspondiente.

A continuación, el Presidente del jurado instó a la Bachiller Srta. Alexandra Alférez Manrique a la exposición de su tesis titulada: Estudio de las comunidades bacterianas endófitas del fruto de la fresa (*Fragaria ananassa*) presentes en cultivos orgánicos de Cerro Blanco - Calana, Tacna. Para optar el Título Profesional de Biólogo- Microbiólogo.

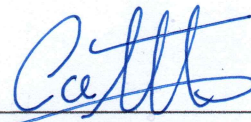
Siendo las 10:20 horas, la tesista concluye su exposición, luego se procedió a la formulación de preguntas por parte de los miembros del jurado calificador. Terminando este proceso, se invitó a que los miembros del jurado emitan su calificación de acuerdo a reglamento. El promedio de la calificación dio el siguiente resultado: Aprobado por unanimidad, con el calificativo de Bueno, nota 16, de acuerdo al reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

Siendo las 10:40 horas, se dio por concluido el acto de sustentación de la tesis, firmando los señores miembros del jurado calificador, en señal de conformidad.



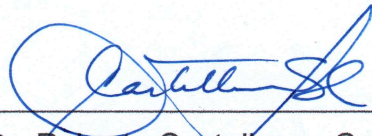
Dra. Angela Choque Miranda

Presidenta



Dr. Carlos Francisco Tito Vargas

Secretario



Dr. Roberto Castellanos Cabrera

Vocal

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Roberto Castellanos Cabrera en mi condición de asesor acreditado por la Resolución de Facultad N° 10306-2022-FACI-UN/JBG, de la tesis titulada: Estudio de las comunidades bacterianas endófitas del fruto de la fresa (*Fragaria ananassa*) presentes en cultivos orgánicos de Cerro Blanco - Calana, Tacna, presentado por la Bach. Alexandra Alférez Manrique, para optar el Título Profesional de Biólogo - Microbiólogo.

Habiendo cumplido con lo establecido en el reglamento de originalidad y similitud de trabajos de investigación y producción intelectual, considerando que según la revisión, evaluación y análisis realizado a través del software de similitud textual **TURNITIN** cuenta con el nivel de similitud permitido cuyo porcentaje es 15%. Por lo que **CERTIFICO QUE LA SIMILARIDAD** de la Tesis está de acuerdo al nivel **PERMITIDO**, para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

Se emite el presente certificado con fines de continuar con los tramites respectivos para la obtención del título profesional.



Dr. Roberto Castellanos Cabrera

Asesor

NOMBRE DEL TRABAJO

Tesis Pre grado Bach. Alexandra Alferez Manrique_Sin referencias.docx

AUTOR

Alexandra Alferez Manrique

RECUENTO DE PALABRAS

15430 Words

RECUENTO DE CARACTERES

95228 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

107 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

6.3MB

FECHA DE ENTREGA

Apr 16, 2024 12:05 PM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Apr 16, 2024 12:07 PM GMT-5**● 15% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 15% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 9% Base de datos de trabajos entregados
- 3% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)
- Material citado

DEDICATORIA

A mis padres, Rodi David e Ingrid María, por su amor, ejemplo y preocupación en mi formación académica.

A mi hermano Ángel David, por su apoyo incondicional en cada decisión que tomo.

A Milwar, mi compañero de vida, por creer en mí y mis sueños, y acompañarme en todo momento.

A mi familia, por su aliento y comprensión a lo largo de este arduo camino. Su ánimo y cariño han sido mi refugio en los momentos difíciles.

A Mercy, Fernanda, Mariagracia y Oriana, mis mejores amigas, por estar en los momentos que más las necesite en mi vida.

Este logro no solo es mío, sino de todos ustedes. Gracias por ser parte fundamental de mi vida y por motivarme a alcanzar mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, Dr. Roberto Castellanos y mi co-asesor, Dr. Alonso Poma, por ser mis guías en este camino, cuya orientación experta y sabios consejos fueron cruciales en esta investigación.

Al equipo de investigación del proyecto de investigación: Aplicación de tecnología del ADN recombinante en la generación de cocteles enzimáticos para la biodegradación de residuo orgánico vegetal, del Laboratorio de Biotecnología Enzimática.

A mis maestros de la Escuela Profesional de Biología – Microbiología.

Y a todas aquellas personas que contribuyeron de manera significativa en la realización de mi tesis quisiera expresar mi profundo agradecimiento a ellos.

CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
CONTENIDO	iv
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Planteamiento del problema	3
1.2 Justificación del problema.....	3
1.3 Hipótesis.....	4
1.4 Objetivos	4
1.4.1 Objetivo general	4
1.4.2 Objetivos específicos	4
1.5 Antecedentes de la investigación	5

1.5.1 Antecedentes Internacionales.....	5
1.5.2 Antecedentes Locales y Nacionales.....	7
1.6 Fundamento Teórico.....	8
1.6.1 Fresa (<i>Fragaria ananassa</i>).....	8
1.6.2 Bacterias Endófitas.....	11
1.6.3 Metagenómica de comunidades bacterianas.....	13
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
2.1 Tipo y Diseño del Estudio.....	17
2.2 Población y Muestra.....	17
2.2.1 Población.....	17
2.2.2 Muestras.....	17
2.3 Operacionalización de Variables.....	17
2.4 Definición de Conceptos Operacionales.....	18
2.4.1 Variedades de Fresa.....	18
2.4.2 Comunidades Bacterianas Endófitas.....	19
2.5 Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos.....	19
2.5.1 Materiales y Equipos.....	19

2.5.2 Ambientes	21
2.6 Procesamiento y Análisis de datos	21
2.6.1 Tomas de Muestras y Cultivo Bacteriano	21
2.6.2. Extracción y Cuantificación de ADN	22
2.6.3 Análisis Bioinformático y Estadístico.....	24
III. RESULTADOS.....	28
3.1. Extracción y Cuantificación de ADN	28
3.2 Ensamblaje de Lecturas.....	30
3.3 Pre-Procesamiento y Agrupamiento	33
3.4 Asignación taxonómica.....	36
3.4.1 Composición Taxonómica a Nivel de Filo.....	37
3.4.2 Composición Taxonómica a Nivel de Clase	39
3.4.3 Composición Taxonómica a Nivel de Orden:.....	41
3.4.4 Composición Taxonómica a Nivel de Familia.....	43
3.4.5. Composición Taxonómica a Nivel de Género	46
3.4.6 Composición Taxonómica a Nivel de Especie.....	49
3.5 Estadísticas de Diversidad.....	54

3.5.1 Riqueza y Diversidad de Comunidad.....	54
3.5.2 Rarefacción	58
3.5.3 Árbol Filogenético de Especies Bacterianas	61
IV. DISCUSIÓN	65
4.1. Extracción y Cuantificación de ADN	65
4.2. Ensamblaje de Lecturas y Agrupamiento	67
4.3. Asignación Taxonómica.....	69
4.4. Estadísticas de Diversidad: Riqueza y Diversidad de Comunidad	73
CONCLUSIONES	76
RECOMENDACIONES	77
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ANEXOS.....	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de variables	18
Tabla 2. Cuantificación de ADN bacteriano en el espectrofotómetro.....	29
Tabla 3. Resultados del ensamblaje	30
Tabla 4. Agrupación de lecturas.....	33
Tabla 5. Resumen de recuentos/muestras.....	34
Tabla 6. Recuento de lecturas filtradas	35
Tabla 7. Composición taxonómica de cada variedad hasta el nivel de filo	37
Tabla 8. Composición taxonómica de cada variedad hasta el nivel clase.....	39
Tabla 9. Composición taxonómica de cada variedad hasta el nivel de orden	41
Tabla 10. Composición taxonómica de cada variedad hasta el nivel familia	44
Tabla 11. Composición taxonómica de cada variedad hasta el nivel género	47
Tabla 12. Composición taxonómica de cada variedad hasta el nivel especie.....	49
Tabla 13. Riqueza y diversidad de la comunidad bacteriana	55
Tabla 14. Especies bacterianas obtenidas y que fluctúan entre 78,62 % y 99,77 % de porcentaje de similitud.	56
Tabla 15. Especies bacterianas aceptadas por ser superiores al 97 % de similitud.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resultados de ensamblaje: Pares de bases.....	32
Figura 2. Representación de los filos bacterianos en las tres variedades de fresa.....	38
Figura 3. Representación de las clases bacterianas en las tres variedades de fresa.....	40
Figura 4. Representación de las ordenes bacterianas en las tres variedades de fresa.....	42
Figura 5. Representación de las familias bacterianas en las tres variedades de fresa.....	45
Figura 6. Representación de los Géneros Bacterianos en las tres variedades de fresa.....	48
Figura 7. Representación de las especies bacterianas en la variedad Criolla de fresa.....	51
Figura 8. Representación de las especies bacterianas en la variedad Monterrey de fresa.....	52
Figura 9. Representación de las especies bacterianas en la variedad San Andreas de fresa.....	53
Figura 10. Curvas de rarefacción	59

Figura 11. Curvas de rarefacción de nueve muestras de secuencias por muestras versus el índice de Chao1	60
Figura 12. Árbol filogenético del total de las especies obtenidas en el presente estudio.....	63

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Geolocalización de la zona de muestreo, Cerro Blanco, Calana-Tacna.	93
Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN genómico para bacterias Gram (+)...	94
Anexo 3. Vista a la parcela de cultivos de fresa, donde se hizo el muestreo.....	95
Anexo 4. Muestras de las tres variedades de fruto de fresa.	95
Anexo 5. Proceso de trituración de muestras de cada variedad de fresa.	96
Anexo 6. Sembrado de las nueve muestras de las tres variedades de fresa en caldo BHI.....	96
Anexo 7. Filtrado de los caldos BHI, después de 48 horas de incubación.	97
Anexo 8. Kit de ADN genómico bacteriano de 70 purificaciones, GenElute Bacterial Genomic DNA Kits- NA2110-1Kt.....	97
Anexo 9. Preparación de las nueve muestras para la extracción de ADN genómico.	98
Anexo 10. Electroforesis de las nueve muestras y una de control.....	98
Anexo 11. Observación de las nueve muestras en el fotodocumentador.....	99
Anexo 12. Secuencias representativas (OTUs).....	100

RESUMEN

Este estudio se centra en la investigación de las comunidades bacterianas endófitas presentes en el receptáculo de los frutos de la fresa (*Fragaria ananassa*) cultivados en sistemas orgánicos en Cerro Blanco - Calana, Tacna. El objetivo principal fue analizar la diversidad y composición de estas comunidades bacterianas presentes en los cultivos orgánicos de fresas. Se espera que los resultados proporcionen información relevante sobre la interacción entre las bacterias endófitas y las fresas en entornos de agricultura orgánica, contribuyendo así al conocimiento del microbiota asociado a este cultivo en condiciones de producción sostenible. Se realizó el muestreo biológico en tres variedades de fresa: Criolla, Monterrey y San Andreas, con el objeto de obtener el ADN existente en el microbiota del receptáculo de la fresa, aplicando el estudio metagenómico, que nos permitió obtener especies bacterianas en el entorno indicado. De esta manera, se aplicó el estudio de las regiones V3-V4 del gen ADNr 16S, que nos permitió realizar la identificación de las especies existentes en las tres variedades. Se determinó las comunidades bacterianas existentes en el receptáculo de las tres variedades de fruto de la fresa (*Fragaria ananassa*) presentes en los cultivos orgánicos de Cerro Blanco - Calana, Tacna, siendo los siguientes: *Bacillus zanthoxyli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus xiamenensis*, *Bacillus wiedmannii*, *Priestia flexa* y *Clostridium perfringens*, pertenecientes al filo Bacillota y las especies

Enterobacter mori, *Pantoea conspicua*, *Rosenbergiella epipactidis* y *Tatumella ptyseos* que pertenecen al filo Pseudomonadota.

Palabras clave: Comunidades bacterianas, endófitas, fresa, cultivos orgánicos.

ABSTRACT

This study focuses on the investigation of the endophytic bacterial communities present in the receptacle of strawberry fruits (*Fragaria ananassa*) grown in organic systems in Cerro Blanco - Calana, Tacna. The main objective was to analyze the diversity and composition of these bacterial communities present in organic strawberry crops. The results are expected to provide relevant information on the interaction between endophytic bacteria and strawberries in organic farming environments, thus contributing to the knowledge of the microbiota associated with this crop under sustainable production conditions. Biological sampling was carried out in three strawberry varieties: Criolla, Monterrey and San Andreas, in order to obtain the DNA existing in the microbiota of the strawberry receptacle, applying the metagenomic study, which allowed us to obtain bacterial species in the indicated environment. In this way, the study of the V3-V4 regions of the 16S rDNA gene was applied, which allowed us to identify the existing species in the three varieties. The bacterial communities existing in the receptacle of the three varieties of strawberry fruit (*Fragaria ananassa*) present in the organic crops of Cerro Blanco - Calana, Tacna are determined, being the following: *Bacillus zanthoxyli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus xiamenensis*, *Bacillus wiedmannii*, *Priestia flexa*, *Clostridium perfringens*, belonging to the phylum Bacillota and the species *Enterobacter mori*,

Pantoea conspicua, *Rosenbergiella epipactidis* and *Tatumella ptyseos* that belong to the phylum Pseudomonadota.

Keywords: Bacterial communities, endophytes, strawberry, organic crops.

I. INTRODUCCIÓN

En la comunidad agrícola de Cerro Blanco - Calana, Tacna donde la población se dedica con pasión al cultivo de diversos frutos, destaca la presencia arraigada de la fresa, adaptada a lo largo de los años mediante el aprovechamiento de los recursos hídricos de los pozos locales. En este contexto, surge la importante necesidad de comprender la comunidad bacteriana endófito que reside en los frutos de la fresa, considerando el papel crucial que las bacterias desempeñan al aportar metabolitos esenciales para el crecimiento y la madurez de este apreciado fruto.

El propósito fundamental de este estudio fue determinar las comunidades bacterianas endófitas que coexisten en los frutos de tres variedades de fresas cultivadas en Cerro Blanco, empleando enfoques metagenómicos para explorar la composición microbiana. Este conocimiento profundo no solo busca revelar la diversidad bacteriana, sino que servirá para investigaciones futuras, además comprender las complejas interacciones que estas comunidades bacterianas establecen con las fresas, así como también, avanzar con el mejoramiento biotecnológico de los frutos de la fresa, aprovechando el potencial de estas bacterias para optimizar la calidad y rendimiento de la cosecha en diferentes cultivos de la región Tacna.

La estructura de este estudio se despliega en seis capítulos, cada uno contribuyendo de manera integral al entendimiento y avance del conocimiento en este ámbito:

En el primer capítulo, se presenta el planteamiento del problema, justificación, hipótesis y objetivos, estableciendo el marco conceptual que guiará la exploración de las bacterias endófitas en los cultivos orgánicos de las variedades de fresa en Cerro Blanco-Calana, Tacna. Así como también, se presenta una revisión exhaustiva de los antecedentes internacionales, nacionales y regionales, respaldada por un marco teórico que engloba los conceptos y definiciones esenciales relacionados con el estudio de las comunidades bacterianas endófitas en el fruto de la fresa.

El segundo capítulo considera la metodología que se empleó a lo largo de la investigación, delineando las estrategias y técnicas utilizadas para capturar la riqueza microbiana presente en los frutos.

Los resultados de la investigación se despliegan en el tercer capítulo, proporcionando la plataforma necesaria para ser minuciosamente discutidos en el cuarto capítulo, donde se analizan las implicaciones y hallazgos de manera crítica.

La culminación del estudio se refleja en las conclusiones derivadas de la investigación, así como también, las recomendaciones pertinentes para orientar futuras investigaciones en este apasionante campo de estudio.

1.1 Planteamiento del problema

En el idílico entorno de Cerro Blanco, en el distrito de Calana, Tacna – Perú, la actividad agrícola se centra en el cultivo de diversos frutos, destacando la fresa como un cultivo arraigado que ha prosperado a lo largo de los años. Este estudio tiene como propósito fundamental identificar las bacterias endófitas presentes en los frutos de las fresas cultivadas en esta localidad. A través de un enfoque metagenómico, se busca explorar la composición microbiana y comprender las complejas interacciones que estas comunidades bacterianas mantienen. Este conocimiento se traducirá posteriormente en mejoras biotecnológicas para potenciar la calidad y rendimiento de los frutos de la fresa.

El planteamiento del problema se formula de la siguiente manera: ¿Qué especies bacterianas endófitas estarán presentes en los frutos de los cultivos orgánicos de la fresa?

1.2 Justificación del problema

La población de Cerro Blanco, dedicada al cultivo de diversos frutos alimentada por pozos de agua dulce locales, ha visto en la fresa un cultivo adaptado a sus condiciones geográficas. La necesidad de comprender la comunidad bacteriana endófitas en estos frutos surge como un elemento esencial para optimizar su crecimiento y madurez, dado que se reconoce que las bacterias aportan metabolitos cruciales para este proceso.

El estudio se centra en la identificación de especies bacterianas en los frutos de la fresa a través del análisis del ADN metagenómico.

1.3 Hipótesis

Se postula que en los cultivos orgánicos de Cerro Blanco - Calana, Tacna, se identificarán bacterias endófitas en los frutos de la fresa (*Fragaria ananassa*). Este estudio permitirá revelar la riqueza y diversidad de estas bacterias, contribuyendo así al entendimiento de las interacciones microbianas en este entorno específico y proporcionando información valiosa para el mejoramiento biotecnológico de los cultivos de fresa en la región.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

El objetivo general del presente es determinar las comunidades bacterianas endófitas existentes en el fruto de la fresa (*Fragaria ananassa*) presentes en los cultivos orgánicos de Cerro Blanco- Calana, Tacna.

1.4.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos son:

- Realizar la extracción y purificación del ADN metagenómico bacteriano existente en la fruta de la fresa.
- Solicitar por servicio la secuenciación de las regiones V3-V4 de los genes ARNr 16S bacterianos.

- Realizar el análisis bioinformático de las secuencias V3-V4 obtenidas de cada muestra.
- Proceder al análisis estadístico de las especies de bacterias obtenidas.

1.5 Antecedentes de la investigación

1.5.1 Antecedentes Internacionales

Fueron De Melo et al., (2012) quienes han caracterizado por el uso simultáneo de métodos dependientes e independientes del cultivo, para investigar las comunidades bacterianas endófitas en frutos de fresa (*Fragaria x ananassa*). Los ácidos nucleicos se extrajeron de la fruta de la fresa y se sometieron a electroforesis en gel de gradiente desnaturizante. Se aislaron un total de 92 endófitos bacterianos y se agruparon inicialmente por su patrón de bandas de PCR palindrómico extragénico repetitivo y sus características bioquímicas. El análisis filogenético de las secuencias del gen ARNr 16S de 45 representantes mostró que los aislados pertenecían a las especies *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Enterobacter ludwigii*, *Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas* sp., *Pantoea punctata* y *Curtobacterium citreum*.

Además, fueron Moura et al., (2021), en su estudio de bacterias endófitas de las plantas de fresa que controlan el moho gris en las frutas a través de la producción de compuestos antifúngicos contra *Botrytis cinerea* L. cuyo objetivo fue evaluar el potencial biológico de bacterias endófitas aisladas de plantas de fresa para el control biológico de la pudrición gris. Probaron con seis cepas en pseudofrutos de fresa, de

las cuales dos de cinco cepas seleccionadas pertenecieron al género *Bacillus* y uno al género *Pantoea* sp. Las cepas seleccionadas fueron capaces de inhibir más del 80% de crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* L. por la producción de compuestos difusibles y el 90% por la producción de compuestos antifúngicos volátiles.

En la investigación de Sangiorgio et al., (2022) realizaron un estudio sobre la composición taxonómica y funcional del microbioma de la fresa dependiendo del genotipo, estableciendo como objetivo, proporcionar la primera descripción completa del microbioma bacteriano y fúngico, funcional y taxonómico de los órganos subterráneos y superficiales de tres genotipos de fresa comercialmente importantes en condiciones de cultivo. Por lo cual, se caracterizaron mediante secuenciación de próxima generación y las funciones potenciales expresadas por el microbioma bacteriano, donde se analizaron mediante la caracterización tanto *in silico* como *in vitro* de las capacidades de promoción del crecimiento vegetal de las bacterias nativas, demostrando la presencia de clases como Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria y Bacteroidia.

Ryan et al., (2008) encontraron bacterias endófitas prácticamente en todas las plantas estudiadas, donde colonizaron los tejidos internos de la planta huésped y formaron una variedad de relaciones diferentes como simbiótica, mutualista, comensalista y trofobiótica. La mayoría de los endófitos parecen originarse en la rizosfera o filosfera; sin embargo, algunos se transmitieron a través de la semilla. Las bacterias endófitas pueden promover el crecimiento y el rendimiento de las

plantas y pueden actuar como agentes de biocontrol. Los endófitos también pueden ser beneficiosos para su huésped al producir una variedad de productos naturales que podrían aprovecharse para su uso potencial en medicina, agricultura o industria.

Fue Mercado (2015), quien afirmó que los endófitos se definen como bacterias y hongos que pueden ser detectados en un momento determinado en el interior de los tejidos de plantas aparentemente sanas y sin producir síntomas visibles. Las potentes aproximaciones metagenómicas y las metodologías independientes del cultivo microbiológico están revelando la enorme complejidad que tienen las comunidades endófitas, mucho mayor que la adquirida mediante las tradicionales técnicas cultivo-dependientes, enriqueciendo nuestro conocimiento sobre la diversidad y abundancia de los microbiomas endófitos. Es importante subrayar que la capacidad endófitas de una determinada bacteria debe ser verificada mediante técnicas de microscopía, además de demostrar su capacidad de colonizar los tejidos internos de la planta a partir de la inoculación de semillas desinfectadas. Por tanto, el simple aislamiento desde tejidos desinfectados en superficie no es criterio suficiente para considerar a un endófito como tal.

1.5.2 Antecedentes Locales y Nacionales

El anexo de Cerro Blanco, comprensión del distrito de Calana, se encuentra ubicado a 769 m.s.n.m. con clima templado, seco y estable. Cuenta con suelo favorable para la producción de frutales, hortalizas, y diversificación de actividades en las explotaciones agrarias. La mayoría de explotaciones agrarias se apartan del

modelo de intensificación y especialización productiva, que se presenta normalmente como dominante y coherente con la tendencia general de evolución del sistema productivo, desarrollando diversas actividades productivas, así también es evidente la pluriactividad, es decir la realización de diversas actividades laborales que realizan los componentes de la familia, la decisión de una producción en vergel viene siendo cuestionada debido a la baja rentabilidad que les generaría a los productores agrarios (Olivera, 2016).

La producción de diversas variedades de frutos de la fresa, fue establecido en Cerro Blanco hace unos años, sosteniendo su producción con riego tecnificado proveniente de los pozos de agua del sector de Cerro Blanco y usando productos orgánicos como abonos orgánicos (del proyecto Haku Wiñay, Tacna- Fondo de Cooperación para el Desarrollo Social (Foncodes)).

A nivel nacional no se ha realizado a la fecha, ningún estudio relacionado con la identificación de bacterias endófitas en los frutos de alguna variedad de la fresa, utilizando la metagenómica.

1.6 Fundamento Teórico

1.6.1 Fresa (Fragaria ananassa)

La fresa es una planta herbácea, perenne, pertenece al orden Rosales, familia Rosaceae, sub familia Rosoideae, género *Fragaria* con más de 20 especies y 1 000 variedades. La fresa cultivada proviene del cruzamiento entre *Fragaria virginiana*

del Este de Norteamérica y *Fragaria chiloensis*, "fresón chileno" una planta originaria de Chile y las costas del Pacífico (Olivera, 2012; Chiqui y Lema, 2010).

La planta necesita suelos con un pH ligeramente ácido a neutro (6,0 a 7,0) y con una conductividad eléctrica no superior a 2 mmhos/cm, no se desarrolla bien en suelos salinos. Se recomienda suelos francos arenosos, ya que filtra mejor que el suelo arcilloso. Se adapta a diferentes condiciones de temperatura, pero prefiere climas templados con temperaturas de 18 a 22 °C durante la fructificación y de 23 a 28 °C para un óptimo crecimiento de la planta, especialmente en los cultivares de día cortos. Existen variedades que se adaptan a climas cálidos y pueden desarrollarse sin que la planta tenga un periodo previo de acumulación de horas frío, pero para lograr mejores rendimientos y precocidad, algunos cultivares exigen un periodo de frío inferior a 7 °C (Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego, 2008).

La fresa produce estolones de pequeño tamaño y alcanza una altura de 40 cm. Tiene raíces fibrosas, con un desarrollo superficial. El tallo denominado corona, es corto, con tres tipos de yemas que producen nuevas coronas que forman inflorescencias, constituido por un eje corto de forma cónica, donde se observan numerosas escamas foliares. Las hojas aparecen en roseta y se insertan en la corona, son largamente pecioladas y provistas de dos estípulas rojizas. Su limbo está dividido en tres folíolos pediculados con bordes aserrados, con un gran número de estomas (300-400/mm²), por lo que pueden perder cantidades de agua por transpiración (Olivera, 2012).

El fruto de la fresa es una infrutescencia, cuya parte carnosa, el cual corresponde al receptáculo y los verdaderos frutos son las semillas que lo recubren y se llaman aquenios. Ellos son los que producen las hormonas que estimulan el engrosamiento del receptáculo floral. Por problemas de fecundación pueden aparecer deformaciones en el fruto, al no desarrollarse todos los aquenios. En una misma inflorescencia se pueden encontrar frutos primarios, secundarios y terciarios; el tamaño del fruto y el número de aquenios varían según el orden de aparición de los frutos. El tiempo entre la polinización y la maduración del fruto puede ser de 20 a 50 días. Los frutos grandes primarios que maduran en la primavera lo hacen con bajas temperaturas y cuando hay menos polen disponible, por lo que son irregulares en forma y maduran en 30 días. La mayor parte de las frutillas que son cosechadas con altas temperaturas abren sus flores cuando el polen es abundante, son algo más pequeñas, pero más regulares en forma, y maduran en 23 días aproximadamente (Quispe y Orellana, 2017).

En el Perú existen diversas variedades de fresa, las cuales se han introducido en países como Estados Unidos, Europa y otras regiones del mundo. Las variedades de día corto, sembradas entre abril y mayo se adaptan al clima costero peruano, mientras que las variedades neutras se pueden cultivar durante todo el año. Para la sierra, en valles interandinos y valles abrigados se recomienda las variedades de día corto (Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego, 2008).

Entre las variedades existentes, Monterrey es un cultivar de día neutro, que sobresale por su firmeza superior e índice de madurez, presenta un diámetro de aproximadamente 3,12 cm, muy parecido a la variedad Albión. También, por el mejor sabor y potencial para su uso en consumo fresco y en la industria de alimentos (López-Valencia et al., 2018).

San Andreas es un cultivar de día neutro moderado con producción similar a Monterrey y Albión y poca producción de estolones en verano (Olivera, 2012). También, presenta una excelente calidad de fruta, similar a ambas variedades. Además, un excelente sabor, con poca necesidad del frío en viveros, y es resistente a enfermedades (Eurosemillas, 2020).

La variedad Criolla es un tipo de variedad que se introdujo desde Arequipa a Tacna hace unos años, carece de información bibliográfica actualmente.

1.6.2 Bacterias Endófitas

Las bacterias asociadas con las plantas pueden ser beneficiosas o dañinas. Todas las superficies vegetales tienen microorganismos sobre ellas (epífitos), así como algunos microorganismos viven dentro de las plantas (endófitos). Algunos de ellos son permanentes y otros temporales (Mangui, 2006).

El término "endófito" se deriva de las palabras griegas "*endon*" que significa dentro, y "*phyton*" que significa planta. Las bacterias endófitas que habitan dentro de los tejidos de la fresa sin causar daño alguno al hospedero durante una parte de su ciclo de vida, establecen asociación simbiótica y producen grandes beneficios

para el crecimiento de las plantas. Las bacterias endófitas cumplen una gran diversidad de funciones como promotoras de crecimiento vegetal, control biológico sobre una diversidad de fitopatógenos, mejora en la eficiencia de los procesos de fitoremediación de compuesto tóxicos en la rizósfera (Perez y Chamorro, 2013).

Las bacterias se encuentran entre los microorganismos que colonizan a las plantas en forma sucesiva a medida que estas maduran. Para observar las células bacterianas individuales se necesita un microscopio, sin embargo, grandes poblaciones de bacterias se vuelven visibles en forma de agregados en medio líquido, como biofilms en plantas, suspensiones viscosas taponando los vasos de las plantas, o como colonias en placas de Petri en el laboratorio. Asimismo, se requieren poblaciones de 10^6 UFC/ml o superior para que las bacterias puedan funcionar como agentes de control biológico, con fines benéficos, o como patógenos, causando enfermedades infecciosas en la planta (Mangui, 2006).

Las bacterias como patógenos vegetales pueden causar enfermedades graves y económicamente devastadoras, desde manchas mosaicos o pústulas en hojas y frutos, hasta la muerte de las plantas. Algunas de las causas son, la distorsión de las hojas y tallos relacionados con hormonas, llamada fascinación o agalla de corona, una proliferación de células vegetales que producen un abultamiento en el cuello de las plantas y sus raíces (Mangui, 2006).

Por otro lado, se han encontrado en investigaciones, microorganismos benéficos presentes en los biopreparados de muestras vegetales en tres pisos

altitudinales (1 950 m.s.n.m, 2 250 m.s.n.m y 2 550 m.s.n.m). En el cultivo de fresa, se identificaron *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus* spp., *Lactobacillus delbrueckii* spp., *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus damnosus* (Alvarez et al., 2018). También, se han descubierto comunidades bacterianas endófitas presentes en raíces y tallos de plantas de fresa. Por ejemplo, bacterias endófitas con similitudes en los géneros: *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Flavobacterium*, *Pantoea*, *Xanthomonas* y *Agrobacterium* (Mutiana, 2018). Por otro lado, en otro estudio, se ha encontrado en los tejidos meristemáticos en las variedades Camarosa y Oso grande de la fresa, las siguientes bacterias endófitas: *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Sphingopyxis* sp., *Bacillus* sp. y *Virgibacillus* sp. (Dias et al., 2009).

Según Ramírez, (2012) en su estudio, el género predominante dentro de los microorganismos endofíticos aislados de la fresa fue *Pseudomona* sp., que demostró ser capaz de solubilizar nutrientes y producir fitohormonas.

1.6.3 Metagenómica de comunidades bacterianas

La metagenómica es una técnica de secuenciación de nueva generación (NGS) que se presenta como un método confiable para la microbiología en general, ya que va a permitir identificar la totalidad de microorganismos presentes en una muestra, a nivel de género y especie, a través de la amplificación y secuenciación

de su ADN, sin necesidad de que sean cultivables en el laboratorio (Lorenzo et al. 2018).

Por lo tanto, la metagenómica se divide en dos categorías: la metagenómica funcional, basada en descubrir genes con una función determinada basada en el tamizado de una biblioteca metagenómica y la metagenómica estructural, la cual a partir de la secuenciación de ADN metagenómico se realizan análisis bioinformáticos para tratar de responder dos preguntas importantes ¿Qué microorganismos están presentes?, y ¿qué hace cada uno de ellos? (Rivera et al., 2021).

El análisis metagenómico de las comunidades bacterianas se basa en la secuencia del gen ARNr 16S, un polirribonucleótido de unos 1 500 nucleótidos codificados por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S). El ARNr 16S se pliega como una secuencia nucleótida de cadena sencilla y adquiere una estructura secundaria que se caracteriza por tener segmentos de doble cadena que permiten la formación de asas y hélices.

Esta molécula es reconocida como un poderoso marcador universal debido a que se encuentra en todos los organismos conocidos. Su estructura parece mantenerse por largos periodos de tiempo y, dado que su función no ha cambiado, los cambios en la secuencia probablemente son aleatorios. Sin embargo, los ARNr poseen suficiente variabilidad para distinguir no solo los organismos más distantes, sino también los más cercanos, y es posible diferenciar especies, cepas o variedades.

Además, el tamaño relativamente largo de los ARNr 16S (1 500 nucleótidos) minimiza las fluctuaciones estadísticas, y la conservación de su estructura secundaria favorece el alineamiento preciso durante la comparación de secuencias.

El ARNr 16S contiene nueve regiones (V1-V9) relativamente conservadas o hipervariables, que brindan la mayor información útil para estudios filogenéticos y taxonómicos. Las regiones conservadas son muy importantes para diseñar iniciadores universales que permiten la amplificación de diferentes regiones hipervariables de la gran mayoría de los ARNr 16S de los microorganismos presentes en una comunidad (Valenzuela-Gonzalez et al., 2015).

Las regiones V1-V4 tienen dos ventajas cuando se trata de la asignación taxonómica: (i) proporcionan una alta resolución para distinguir entre especies debido a su elevada variabilidad; (ii) existen un mayor número de secuencias parciales correspondientes a estas regiones en las bases de datos, facilitando la asignación taxonómica (Barcelos, 2018). Es importante también elegir bien los cebadores que se van a utilizar. Los más utilizados amplifican la región V3-V4 del gen ADNr 16S, con base en su “universalidad” para la mayoría de las especies bacterianas (Del Campo-Moreno et al, 2018).

Se han realizado investigaciones con la finalidad de identificar las poblaciones bacterianas utilizando el análisis metagenómico, como, por ejemplo, se identificó comunidades bacterianas de la rizosfera de la quinua (*Chenopodium*

quinoa) en diferentes suelos. Se amplificó la región hipervariable V3-V4 del gen ARNr 16S, empleando IlluminaMiseq en FISABIO (España). Después, Se utilizó FastQC y SEED2 para el procesamiento de secuencias, lo que permitió obtener 67 235 secuencias normalizadas de 430 a 470 nucleótidos. Se clasificó las secuencias en la plataforma de RDP11 (Ribosomal Database Project). Finalmente, se identificó géneros como: *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Gaiella*, y *Paenibacillus* (Mancilla, 2019).

Otro estudio determinó la comunidad microbiana del suelo, rizosfera y hojas de la planta del banano (*Musa × paradisiaca* L.) bajo manejo orgánico y convencional. El análisis se basó en la secuenciación de la región V3-V4 del gen del ARNr 16S para bacterias, lo que permitió caracterizar y distinguir los microorganismos. Se identificó mayor diversidad en el suelo y la rizosfera bajo manejo convencional, se encontró que la abundancia de los filos Proteobacteria y Bacteroidetes es mayor en suelo y rizosfera bajo manejo orgánico, mientras que los filos Acidobacteria y Actinobacteria fueron más abundantes en el manejo convencional (Zapata et al., 2022).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Tipo y Diseño del Estudio

El tipo de estudio será observacional, porque no habrá manipulación de la variable; prospectivo, porque los datos a obtener serán a propósito del estudio; transversal, porque se realizará una sola medición a la misma población; y descriptivo, porque el análisis estadístico será univariado (Supo, 2014).

2.2 Población y Muestra

2.2.1 Población

Se tomó en consideración los cultivos ubicados en las parcelas de la familia Monasterio, que tenían 3 Ha. para fresa, su ubicación es en el distrito de Calana en la provincia de Tacna, en la zona identificada como Cerro Blanco (Latitud 17°58'25.1" S, Longitud 70°11'04.9" W), en el anexo 1 se muestra la geolocalización.

2.2.2 Muestras

El presente trabajo conto con 9 muestras en total, 3 muestras de la variedad Criolla, 3 muestras de la variedad San Andreas y 3 muestras de la variedad Monterrey.

2.3 Operacionalización de Variables

La siguiente tabla muestra la operacionalización.

Tabla 1*Operacionalización de variables*

Variables	Indicadores	Escala De Medición
VI: Variedades de frutos de fresa.	ADN Génómico.	100 ng de ADN metagenómico.
VD: Comunidades bacterianas endófitas.	OTUs (Unidades Taxonómicas Operativas).	Especies bacterianas identificadas. Árbol filogenético.

2.4 Definición de Conceptos Operacionales**2.4.1 Variedades de Fresa**

La fresa pertenece al orden Rosales, de la familia Rosaceae, la sub familia Rosoideae, del género *Fragaria* con más de veinte especies y 1 000 variedades.

Existen más de 1 000 variedades de fresas en el mundo. Según el estudio de la fresa en el Perú y el mundo, las variedades más conocidas de fresas que se cultivan en el Perú son Camarosa, Chandler, Tajo, Sern, San Andreas, Monterrey, entre otras. Las diferentes variedades de fresas se pueden distinguir por su tamaño, forma, color, sabor, textura y aroma. Según el Ministerio de Agricultura (2012), los cultivares de día neutro son aquellos donde el fotoperíodo no influye en la floración, como en los cultivares de día corto (necesitan un fotoperíodo corto de 12 horas de luz), la temperatura o la acumulación de horas frío tampoco induce la floración. Los frutos son firmes, de color rojo intenso y de buen sabor. Las variedades que son cultivares de días neutros son San Andreas y Monterrey.

2.4.2 Comunidades Bacterianas Endófitas

Las bacterias son microorganismos procariotas unicelulares que presentan un tamaño entre 0,5 y 5 μm , por lo general, con diversas formas, incluyendo esferas, bastones y espirales. Ellas son los organismos más abundantes del planeta. Son ubicuas, encontrando esta comunidad en todo hábitat de la tierra, creciendo en el suelo, en manantiales calientes y ácidos, en desechos radioactivos, en las profundidades del mar y de la corteza terrestre (Marcano, 2008).

2.5 Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

2.5.1 Materiales y Equipos

Reactivos

- Hipoclorito de sodio (1%) para la desinfección del material vegetal.
- Agua destilada ultrapura para el enjuague de las muestras.
- Caldo BHI (Brain Heart Infusion). Utilizado en el proceso de cultivo bacteriano.
- Tampón TAE 1X (Tris-Acetato y EDTA) (500 ml) para el procesamiento de ADN.

Materiales

- Bolsas de polietileno estériles para el transporte y almacenamiento de las muestras.
- Protección personal (EPP). Incluyendo guantes, batas, y mascarillas para garantizar condiciones asépticas.

- Kit de extracción de ADN Genómico (GenElute Bacterial Genomic DNA Kits- NA2110-1Kt) para la extracción del ADN bacteriano.
- Placas Petri. Utilizadas en el cultivo y procesamiento de las muestras.
- Morteros de porcelana estériles para la trituración de los receptáculos de las variedades de frutos.
- 50 Tubos Eppendorf de 1,5 ml para el almacenamiento y procesamiento de muestras.
- 50 Tubos de elución de 1,7 ml. Utilizados en el proceso de extracción de ADN.
- Tampón de carga de ADN (1 ml) para la preparación de las muestras para la amplificación.
- Micropipetas de vol. 0,5-10 μ l, 10-100 μ l y 20- 200 μ l.
- Puntas para Micropipetas de volumen 0,5-10 μ l, 10-100 μ l y 20-200 μ l.

Equipos

- Espectrofotómetro de microplacas Biotek Epoch 2 UV-VIS para determinar la concentración y pureza del ADN extraído.
- Microcentrífuga de 16 000 g. Utilizada en la centrifugación de muestras.
- Cabina de flujo laminar y Cabina para PCR. Garantiza condiciones asépticas durante la manipulación de las muestras.
- Sistema horizontal de electroforesis para analizar la calidad del ADN.

- Fotodocumentador. Utilizado en la documentación de geles de electroforesis.
- Ordenador portátil LENOVO para el procesamiento y análisis de datos.
- Impresora multifuncional EPSON para la impresión de documentos y registros.

2.5.2 Ambientes

Laboratorio de Biotecnología Enzimática de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

Estos materiales, equipos y ambientes fueron esenciales para llevar a cabo el procesamiento de las muestras, la extracción del ADN, y la preparación de las muestras para la secuenciación. La combinación de técnicas moleculares y microbiológicas permitirá analizar las comunidades bacterianas presentes en los frutos de fresa con un enfoque metagenómico.

2.6 Procesamiento y Análisis de datos

El procesamiento y análisis de datos en este estudio sobre las fresas y sus comunidades bacterianas implica varias etapas que van desde la preparación de las muestras hasta la interpretación de los resultados obtenidos. A continuación, se describe detalladamente este proceso:

2.6.1 Tomas de Muestras y Cultivo Bacteriano

Para el muestreo, se esperó el final del ciclo de producción de la fresa. Posteriormente, se recolectó por cada variedad, 15 frutos (de 3 plantas diferentes se

obtuvo 5 frutos) distribuidas en el área de campo, obteniendo un total de 45 frutos recolectados en Cerro Blanco-Calana, Tacna.

Se llevó los frutos inmediatamente al laboratorio y se procesó. Se usó el hipoclorito de sodio (NaClO) para la desinfección del material vegetal a una concentración de 1%, con un tiempo de 5 minutos. Después, se enjuagó tres veces con agua destilada estéril.

Se colocó en placas Petri para la disección de las frutas, obteniendo el receptáculo de cada fruto.

Después, se procedió a triturar los cinco receptáculos de los frutos recolectados de cada planta según su variedad en diferentes morteros previamente esterilizados, obteniendo un total final de 9 muestras listas para sembrar (3 de la variedad Criolla, 3 de la variedad San Andreas y 3 de la variedad Monterrey)

Luego, se sembró en 9 matraces (de 25 ml) de Caldo BHI cada una de las muestras, y se incubó por 48 horas a una temperatura de 28 °C.

Seguidamente, se filtró el caldo en papel filtro y se centrifugó en una minicentrífuga a 14 000 rcf por 2 minutos.

2.6.2. Extracción y Cuantificación de ADN

Para la extracción de ADN bacteriano, en una cabina para PCR se utilizó el kit comercial GenElute Bacterial Genomic DNA Kits- NA2110-1Kt, siguiendo las indicaciones del fabricante (Anexo 8).

Además, se determinó su concentración y pureza con un espectrofotómetro de microplacas Biotek Epoch 2. La cuantificación se realizó en ng/μl basada en la medición de la absorbancia a 260 nm (Ley de Beer-Lambert). La calidad del ADN se analizó a través de la ratio de la absorbancia a 260/280, donde una relación de absorbancia entre 1,8-2,0, así se consideró un ADN de buena calidad. La integridad del ADN bacteriano también se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), y después, se visualizó en un fotodocumentador de geles con transiluminador UV.

Las muestras conteniendo el ADN genómico bacteriano fueron enviadas a la empresa MacroGen Inc. (Gangnam-gu, Seúl, Corea del Sur) para su secuenciación por el método Miseq del Sistema Illumina, donde las muestras de ADN genómico fueron utilizadas como plantilla para generar amplificación de regiones V3-V4 del gen ARNr 16S utilizando cebadores Bakt_341F: CCTACGGGNGGCWGCAG y Bakt_805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC siguiendo el protocolo de PCR sugerido por Illumina.

2.6.3 Análisis Bioinformático y Estadístico

2.6.3.1 Pre-Procesamiento y Agrupamiento (por CD-HIT-OTU Misaq/FLX).

Se filtró las lecturas cortas y se recortó las colas extralargas. Luego, se agrupó las lecturas filtradas con una identidad del 100% mediante CD-HIT-DUP, programa auxiliar que se utilizó para ayudar en el análisis de datos, eliminando duplicados de lecturas de secuenciación (con un paso opcional para detectar y eliminar lecturas quiméricas). Se identificó las lecturas quiméricas. También, se incorporó los grupos secundarios con los grupos primarios. También, se eliminó las secuencias de ruido en grupos de tamaño “x” o inferior. Donde “x” se calculó estadísticamente, para determinar cuándo las secuencias son demasiado raras para ser consideradas significativas. Además, las lecturas representativas restantes de grupos no quiméricos se agruparon utilizando un algoritmo codicioso en OTU en un límite de OTU especificado por el usuario (por ejemplo, 97% de identificación a nivel de especie, para ser agrupadas juntas).

2.6.3.2 Pre-Procesamiento y Agrupamiento (por rDNA Tools PacBio).

Estos pasos proporcionan una visión general del preprocesamiento y agrupamiento de datos de rDNA obtenidos mediante tecnología PacBio.

Primero, se filtró las lecturas ambiguas y se recortó las colas extralargas. Luego se identificó quimeras eliminadas (Archivos referenciales. – RDP (Ribosomal Database Project) como la base de datos de ribosomas

https://mothur.org/wiki/rdp_reference_files/). Después, se generó los archivos y se agrupó por el Método Average Neighbor.

2.6.3.3. Asignación Taxonómica y Estadísticas de Diversidad

Se utilizó las secuencias representativas de cada OTU para asignar su taxonomía.

Se construyó los árboles filogenéticos a partir de secuencias representativas de OTUs alineadas filtradas. Además, se produjo resultados de gráficos con calidad mediante visualización y análisis estadístico.

El proceso para el ensamblaje de las secuencias V3-V4 se realizó en el secuenciador MiSeq PE, con el programa FLASH, cuyos resultados dieron lecturas ensambladas (fastq).

El análisis de diversidad se realizó con QIIME, plataforma bioinformática de microbiomas de próxima generación que es para realizar los análisis:

- Diversidad alfa, mediante el programa `alfa_diversidad.py`, para obtener los OTUs, los índices de Chao1, Shannon, Simpson y Buena Cobertura.

- La taxonomía, mediante el programa UCLSUT es un método de agrupación que aprovecha USEARCH para asignar secuencias a grupos, ampliamente utilizado, que incluyen mayor velocidad, menor uso de memoria, sensibilidad mejorada, agrupamiento en identidades más bajas y clasificación de conjuntos de datos mucho más grandes y RDP(16S) es la principal base de datos de secuencias de ADNr va a permitir la comparación de secuencias on line, y otras

muchas posibilidades (incluida la construcción de árboles filogenéticos), para obtener la composición taxonómica.

- El Árbol UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) es un método de grupo de pares no ponderados con media aritmética, también conocido como enlace promedio; con el programa MEGA11 para obtener los gráficos de árboles UPGMA.

Las secuencias se agruparon en OTUs con una identidad de secuencia del 97% utilizando los métodos de agrupamiento del vecino más cercano. Las secuencias se clasificaron utilizando las referencias de la base de datos Ribosomal Database Project (RDP) proporcionadas en Mothur. Las OTUs que sean singletons y doubletons fueron eliminadas.

Las muestras se normalizaron a 6,886 secuencias cada una (el tamaño de la muestra más pequeña) para garantizar que el análisis no se viera influenciado por las profundidades de secuenciación diferencial. Los datos de secuenciación del gen bacteriano ARNr 16S Illumina se depositaron en la biblioteca NCBI BioProject.

Para evaluar la cobertura de la profundidad de secuenciación, se realizó un análisis de rarefacción individual para cada muestra utilizando la función 'diversidad' en Past 4.11. A la profundidad de secuenciación analizada, todas las rarefacciones individuales demostraron ser suficientes para inferir la composición y riqueza de la comunidad bacteriana en las muestras.

El microbioma central se definió como las comunidades bacterianas que se componen de OTUs que se detectaron en todos los genotipos de fresa y presentaron en más del 75% de las muestras. Los efectos del genotipo de fresa sobre la riqueza de OTUs bacterianas se analizaron mediante análisis bidireccional de varianza (ANOVA), incorporando la prueba de normalidad de Jarque-Bera JB. Las elipses coloreadas en las ordenaciones NMDS son intervalos de confianza del 95% de los centroides de las especies para cada nivel de tratamiento.

El efecto significativo del genotipo de fresa de la comunidad bacteriana se determinó utilizando el análisis bidireccional de similitud (ANOSIM) y el análisis de varianza multivariado permutacional bidireccional (PERMANOVA) basado en los datos de presencia-ausencia y la medida de distancia de Jaccard sobre 999 permutaciones. Dado que los datos de abundancia relativa de NGS pueden no usarse completamente cuantitativamente, la composición de la comunidad microbiana se analizó utilizando conjuntos de datos de presencia/ausencia y abundancia relativa.

Este proceso integró técnicas moleculares, microbiológicas y bioinformáticas para caracterizar las comunidades bacterianas presentes en las muestras de frutas de fresa. Desde la extracción del ADN hasta el análisis estadístico, cada paso contribuyó a comprender la diversidad bacteriana en los frutos y su relación con las variedades de fresas estudiadas.

III. RESULTADOS

3.1. Extracción y Cuantificación de ADN

El uso del Kit de extracción de ADN genómico GenElute Bacterial Genomic DNA Kits- NA2110-1Kt. permitió obtener ADN de buena calidad y cantidad. La pureza y concentración del ADN se estimó utilizando el espectrofotómetro de microplacas Biotek Epoch 2. Se obtuvo ADN genómico bacteriano de una concentración y calidad adecuada (Tabla 2). La concentración de ADN bacteriano estuvo comprendida entre 29,002 ng/μl y 78,260 ng/μl, con una media de 49 ng/μl.

La integridad del ADN también se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, seguidamente se visualizó en un fotodocumentador de geles con transiluminador UV (Anexo 11).

Tabla 2*Cuantificación de ADN bacteriano en el espectrofotómetro*

Nº	Nombre de las Variedades	Código de muestra	260	280	260/280	ng/µl	Promedio ng/µl
1		C1	0,031	0,017	1,818	30,581	29,002
			0,027	0,015	1,87	27,423	
2	Criolla	C2	0,041	0,023	1,80	41,356	41,654
			0,042	0,023	1,826	41,953	
3		C3	0,043	0,022	1,939	42,737	44,434
			0,046	0,024	1,891	46,13	
4		SA1	0,081	0,044	1,87	81,455	78,260
			0,075	0,039	1,904	75,066	
5	San Andreas	SA2	0,05	0,027	1,852	50,45	49,634
			0,049	0,026	1,865	48,818	
6		SA3	0,047	0,025	1,856	46,547	47,369
			0,048	0,025	1,939	48,19	
7		M1	0,051	0,028	1,835	50,937	49,702
			0,048	0,026	1,848	48,467	
8	Monterrey	M2	0,06	0,032	1,869	60,015	58,669
			0,057	0,031	1,852	57,322	
9		M3	0,043	0,026	1,626	42,928	42,337
			0,042	0,027	1,561	41,746	

La secuenciación se realizó por parte de la empresa MacroGen Inc. (Gangnam-gu, Seúl, Corea del Sur). Se envió las muestras con los requisitos que indicó MacroGen Inc. por muestra, una concentración de 0,1 ng/µl y un volumen de 10- 15 µl/muestra. El tipo de lectura solicitado fue de pares emparejados, con una longitud de 301 pares de bases. El Kit de biblioteca fue de Herculase II ADN polimerasa de fusión Nextera XT Index V2 Kit. El protocolo de biblioteca de secuenciación metagenómica 16S y el secuenciador utilizado fue el MiSeq del sistema Illumina.

3.2 Ensamblaje de Lecturas

El ensamblaje de lecturas (301 bp) de las regiones V3-V4 del gen ADNr 16S bacteriano se utilizó para unir fragmentos de secuencias de ADN que se han obtenido a partir de la amplificación de la región V3-V4 del gen ADNr 16S bacteriano. La secuenciación de esta región permitió la identificación de especies bacterianas y la comparación de su diversidad y composición en diferentes muestras. El ensamblaje de lecturas se realizó con un software especializado que alineó y unió las secuencias de ADN para generar una secuencia consenso más larga y precisa. Esta secuencia consenso se utilizó para la identificación de especies y el análisis de la diversidad y composición de comunidades bacterianas. Los resultados del ensamblaje de lecturas (301 bp) de las regiones V3-V4 del gen ADNr 16S bacteriano se presentan en la tabla 3.

Tabla 3

Resultados del ensamblaje

Nombre de muestra	Pares de Bases	Recuento lecturas	N (%)	CG (%)	AT (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
Criolla	278 863 793	599 498	0,0001	54,983	45,016	98,476	94,350
Monterrey	296 549 890	637 870	0,0001	54,950	45,050	98,646	94,980
San Andreas	272 648 927	586 346	0,0001	55,486	44,513	98,716	95,183

Nota: Al dividir la cantidad de pares de bases de nucleótidos obtenidos entre el número de lecturas se obtendrá el tamaño promedio de las lecturas, es decir de los amplicones ensamblados.

Como se puede ver en la tabla 3, existe una descripción general de las columnas presentes en la tabla:

Nombre de muestra: Los nombres asignados a cada muestra ensamblada.

Bases totales: La cantidad total de bases nucleótidas en el ensamblaje para cada muestra.

Recuento de lecturas: Número total de lecturas utilizadas en el ensamblaje para cada muestra.

N (%): Porcentaje de bases ambiguas (N) en el ensamblaje.

CG (%): Porcentaje de contenido de guanina y citosina (CG) en el ensamblaje.

AT (%): Porcentaje de las bases totales que son adenina (A) o timina (T), indicando la proporción de las bases formadas por estos nucleótidos.

Q20 (%): Porcentaje de bases con una calidad de secuencia superior al valor de calidad 20.

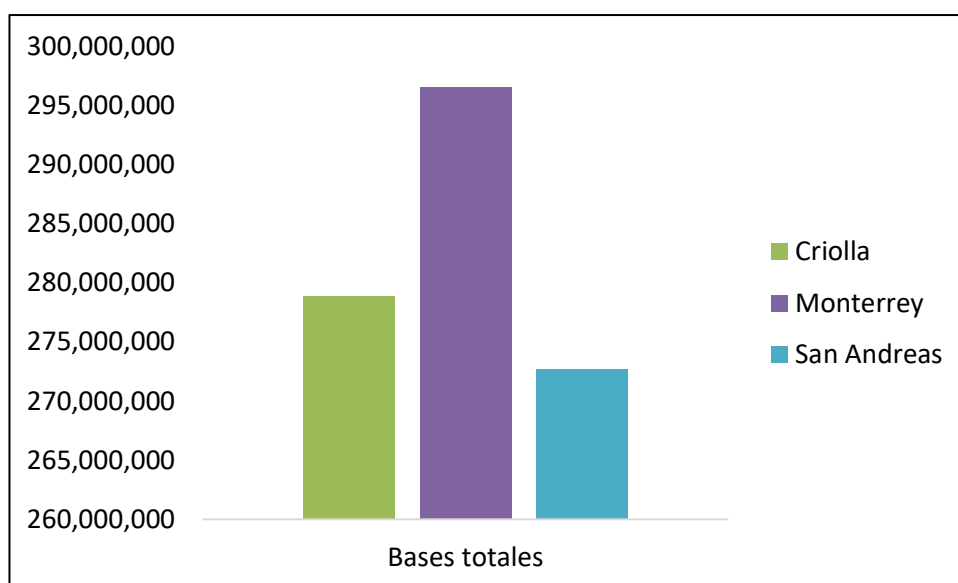
Q30 (%): Porcentaje de bases con una calidad de secuencia superior al valor de calidad 30.

Se observa los datos específicos, en general, las muestras parecen tener longitudes de ensamblaje bastante similares, con bases totales que varían entre 272 y 296 millones. Los recuentos de lecturas se presentan entre 586 346 y 637 870. El porcentaje de bases ambiguas (N (%)) es muy bajo en todas las muestras (0,0001%), lo cual es positivo. El contenido de CG varía entre el 54,950% y el 55,486%, y el

contenido de AT varía entre el 44,513% y el 45,050%, lo que sugiere diferencias en la composición de las secuencias entre las muestras. Los porcentajes de Q20 y Q30 son altos en todas las muestras, indicando que la calidad de la secuencia es generalmente alta. En resumen, estos resultados sugieren que el ensamblaje realizado con FLASH fue exitoso, con secuencias de alta calidad y longitudes de ensamblaje similares entre las muestras. La variación en el contenido de CG podría deberse a diferencias biológicas reales entre las muestras.

Figura 1

Resultados de ensamblaje: pares de bases



En la figura 1, se representa la distribución de las tres variedades con el número de pares de bases, siendo el mayor la variedad Monterrey (296 549 890 bp), seguido de la variedad Criolla (278 863 793 bp) y finalmente la variedad San Andreas (272 648 927 bp).

3.3 Pre-Procesamiento y Agrupamiento

En el preprocesamiento de las secuencias V3-V4 se realizó una serie de pasos para limpiar y filtrar los datos brutos de secuenciación antes de su análisis. El preprocesamiento incluyó la eliminación de secuencias de baja calidad, la eliminación de adaptadores y la eliminación de secuencias cortas. El objetivo de estos pasos fue mejorar la calidad de los datos y reducir el ruido en los datos de secuenciación.

Tabla 4.

Agrupación de lecturas

Resultados de la Agrupación (límite 97%)		
Nº	Nombre de muestra	Lecturas
1	C1	47 557
2	C2	75 866
3	C3	84 675
4	M1	55 466
5	M2	64 220
6	M3	47 696
7	SA1	64 973
8	SA2	62 237
9	SA3	75 507

La tabla 4 indica los resultados de agrupación realizada mediante CD-HIT-OTU con un límite del 97%. Antes se realiza una descripción general de las columnas presentes en la tabla:

Nº: Número de identificación de la muestra.

Nombre de muestra: Los nombres asignados a cada muestra.

Lecturas: Número total de lecturas después del preprocesamiento y agrupación, considerando un límite del 97%. Indica la cantidad de secuencias agrupadas en unidades taxonómicas operativas (OTUs).

Se observa que, las muestras están numeradas del 1 al 9, y cada muestra tiene un nombre asociado (por ejemplo, C1, M1, SA1, etc.). El recuento leído varía entre las muestras, con valores que van desde alrededor de 47 000 a 84 000.

Tabla 5

Resumen de recuentos/muestras

Mínimo	47 557,0
Máximo	84 675,0
Mediana	64 220,0
Media	64 244,1

Antes se realiza una descripción general de las columnas presentes en la tabla:

Mínimo: Número mínimo de secuencias por muestra.

Máximo: Número máximo de secuencias por muestra.

Mediana: Número que separa la mitad superior de una muestra de datos.

Media: Número promedio de la secuencia de muestras.

En la tabla 5, observamos que el valor mínimo de recuento por muestra es 47 557,0. Esto indica la menor cantidad de lecturas en una muestra individual. Mientras que el valor máximo de recuento por muestra es 84 675,0. Esto indica la mayor cantidad de lecturas en una muestra individual. También, la mediana del

recuento por muestra es 64 220,0 y la media (promedio) del recuento por muestra es 64 244,1.

Estos valores resumen la distribución del recuento de lecturas por muestra. La mediana y la media ofrecen medidas centrales, mientras que el mínimo y el máximo proporcionan información sobre la variabilidad en los recuentos de lecturas entre las muestras. En conjunto, estos datos dan una visión general de la distribución y la variabilidad del recuento de lecturas en las muestras analizadas.

Tabla 6

Recuento de lecturas filtradas

Ambiguo		948
Prefijo o cebadores incorrectos (Secuencia de prefijo o cebador)	CCTACGGG[ACGT]GGC[AT]GCAG	60 590
Secuencias de baja calidad		11 405
Quimeras		41 152
Otro		1 131 422

Antes se realiza una descripción general de las columnas presentes en la tabla:

Ambiguo: Secuencias filtradas con llamadas de base ambiguas

Baja calidad: Secuencias filtradas con bases de baja calidad (compensación del puntaje de calidad 33)

Quimera: Secuencias filtradas con lecturas quiméricas

Eliminación de ruido: Secuencias filtradas con todo el resto del ruido

Como se puede ver en la tabla 6, se presenta el recuento de lecturas filtradas durante el proceso de análisis de secuencias: hay 948 lecturas que se consideraron ambiguas, 60,590 lecturas tenían problemas con los prefijos o cebadores. Se especifica la secuencia de prefijo o cebador específico. CCTACGGG[ACGT]GGC[AT]GCAG, hay 11 405 lecturas que se consideraron de baja calidad, también, hay 41 152 lecturas que se identificaron como quimeras y finalmente, 1 131 422 lecturas se filtraron por otras razones no especificadas en las categorías anteriores. Esto podría incluir problemas diversos que no se agruparon en las categorías mencionadas anteriormente.

En resumen, esta tabla refleja los resultados del filtrado de lecturas para eliminar aquellas que presentan problemas específicos, como ambigüedad, errores en los cebadores, baja calidad, quimeras, y otros problemas no clasificados. Estos pasos son comunes en el procesamiento de datos de secuenciación para garantizar la calidad de las lecturas utilizadas en análisis posteriores.

3.4 Asignación taxonómica

Para la asignación taxonómica se clasificaron y organizaron los organismos en categorías taxonómicas con base a sus características biológicas y evolutivas. Las categorías taxonómicas comenzaron desde niveles más amplios hasta niveles más específicos. Las principales categorías taxonómicas, en orden descendente, son dominio, reino, filo, clase, orden, familia, género y especie.

3.4.1 Composición Taxonómica a Nivel de Filo

El nivel de filo es una categoría taxonómica que agrupa varios ordenes relacionados entre sí. Los organismos dentro de un filo comparten características más generales que aquellos en un orden, una clase o cualquier nivel inferior. Por ejemplo, los filos Bacillota, Bacteroidota, etc.

Tabla 7

Composición taxonómica de cada variedad hasta el nivel de filo

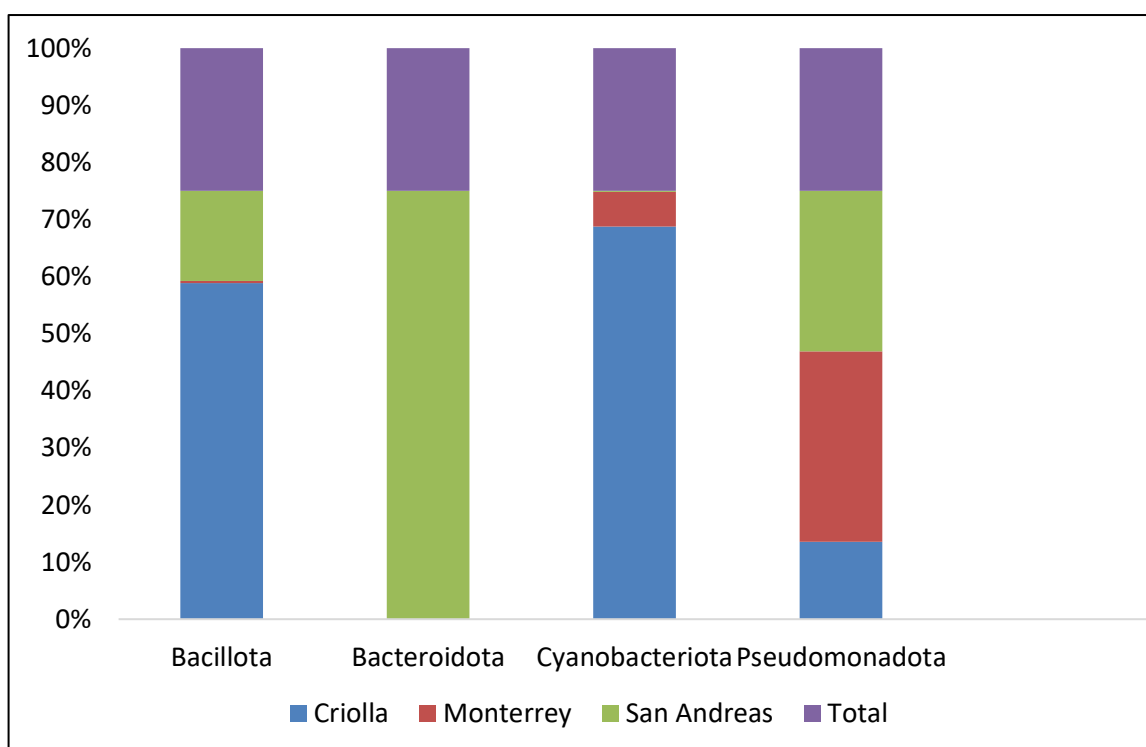
Filo	Criolla	Monterrey	San Andreas	Total	(%)
Bacillota	122 759	508	32 084	155 351	26,868
Bacteroidota	0	0	6	6	0,001
Cyanobacteriota	1 081	76	3	1 160	0,201
Pseudomonadota	84 258	166 798	170 624	421 680	72,930
Total	208 098	167 382	202 717	578 197	100,000

Esta tabla representa la distribución de los filos en tres variedades diferentes (Criolla, Monterrey y San Andreas), con los valores numéricos indicando el conteo asociado. Una interpretación simplificada indica que existen cuatro filos diferentes: Bacillota, Bacteroidota, Cyanobacteriota y Pseudomonadota. el filo Bacillota prevalece en la variedad Criolla (122 759 OTUs), seguida del filo Pseudomonadota (84 258 OTUs) y Cyanobacteriota (1 081 OTUs). En cambio, en la variedad Monterrey, prevalece el filo Pseudomanadota (166 798 OTUs) seguido de Bacillota (508 OTUs). En la variedad San Andreas prevalecen los filos Bacillota (32 051 OTUs) y Pseudomonadota (170 624 OTUs). Puede generalizarse, que las tres

variedades se encuentran mayor representadas por los filos Bacillota y Pseudomonadota.

Figura 2

Representación de los filos bacterianos en las tres variedades de fresa



En la figura 2, se representa la distribución de los filos en las tres diferentes variedades de fruto de la fresa (Criolla, Monterrey y San Andreas), con los porcentajes totales. Se indica que existen cuatro filos diferentes: Bacillota, Bacteroidota, Cyanobacteriota y Pseudomonadota. El filo Bacillota prevalece en la variedad Criolla (58,99%), seguida del filo Pseudomonadota (40,47%) y Cyanobacteriota (0,52%). En cambio, en la variedad Monterrey, prevalece el filo

Pseudomonadota (99,65%) seguido de Bacillota (0,3%). La variedad San Andreas prevalecen los filos Bacillota (15,83%) y Pseudomonadota (84,17%).

El total muestra el porcentaje total de ese filo en todas las muestras combinadas.

3.4.2 Composición Taxonómica a Nivel de Clase

El nivel de clase agrupa a varios ordenes relacionados entre sí. Los organismos dentro de una clase comparten características más específicas que aquellos en un filo. Por ejemplo, las clases Bacilli, Clostridia, Flavobacteriia, etc.

Tabla 8

Composición taxonómica de cada variedad hasta el nivel clase

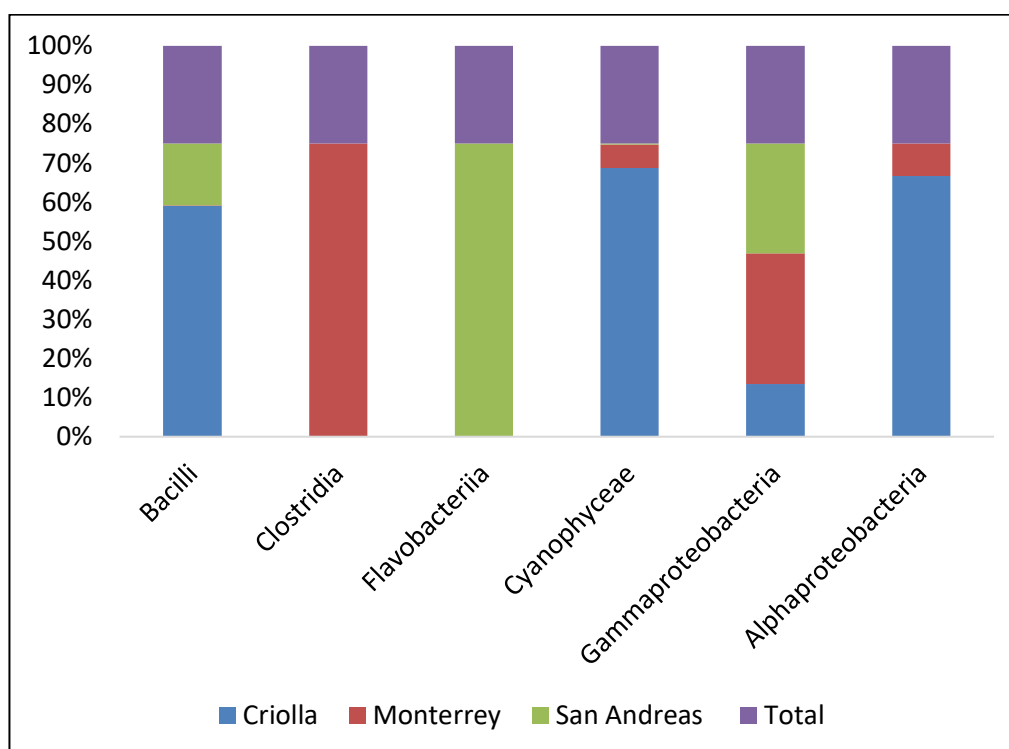
Clase	Criolla	Monterrey y	San Andreas	Total	(%)
Bacilli	122 759	59	32 084	154 902	26,791
Clostridia	0	449	0	449	0,078
Flavobacteriia	0	0	6	6	0,001
Cyanophyceae	1 081	76	3	1 160	0,201
Gammaproteobacteria	84 208	166 793	170 624	421 625	72,921
Alphaproteobacteria	50	5	0	55	0,01%
Total	208 098	167 382	202 717	578 197	100,000

En la tabla 8, representa la distribución de las clases en las tres variedades diferentes (Criolla, Monterrey y San Andreas), con los valores numéricos indicando el conteo asociado. Una interpretación simplificada indica que existen seis clases específicas diferentes: Bacilli, Clostridia, Flavobacteriia, Cyanophyceae, Gammaproteobacteria y Alphaproteobacteria. La clase Bacilli prevalece en la variedad Criolla (122 759 OTUs), seguida de la clase Gammaproteobacteria (84 208 OTUs) y Cyanophyceae (1 081 OTUs). En cambio, en la variedad Monterrey,

prevalece la clase Gammaproteobacteria (166 793 OTUs) seguido de Clostridia (449 OTUs). Finalmente, en la variedad San Andreas prevalecen las clases Gammaproteobacteria (170 624 OTUs) y Bacilli (32 084 OTUs).

Figura 3

Representación de las clases bacterianas en las tres variedades de fresa



En la figura 3, observamos más de cinco clases bacterianas identificadas en las tres variedades del fruto de la fresa. La clase Bacilli es dominante en la variedad Criolla (59%). La clase Clostridia está presente solo en la variedad Monterrey (0,3%). La clase Flavobacteriia está presente solo en la variedad San Andreas (0,003%). La clase Cyanophyceae está presente en todas las variedades, pero dominante en la

variedad Criolla (0,5%). La clase Gammaproteobacteria es dominante en todas las variedades, especialmente en la variedad San Andreas (84,2%). Finalmente, se identificó Alphaproteobacteria presente en muy bajas proporciones, en las variedades Criolla y Monterrey.

3.4.3 Composición Taxonómica a Nivel de Orden:

El nivel de orden es una categoría que agrupa a varias familias relacionadas. Los organismos dentro de un orden comparten características más específicas que aquellos en una clase. Por ejemplo, los ordenes Bacillales, Eubacteriales, Flavobacteriales, etc.

Tabla 9

Composición taxonómica de cada variedad hasta el nivel de orden

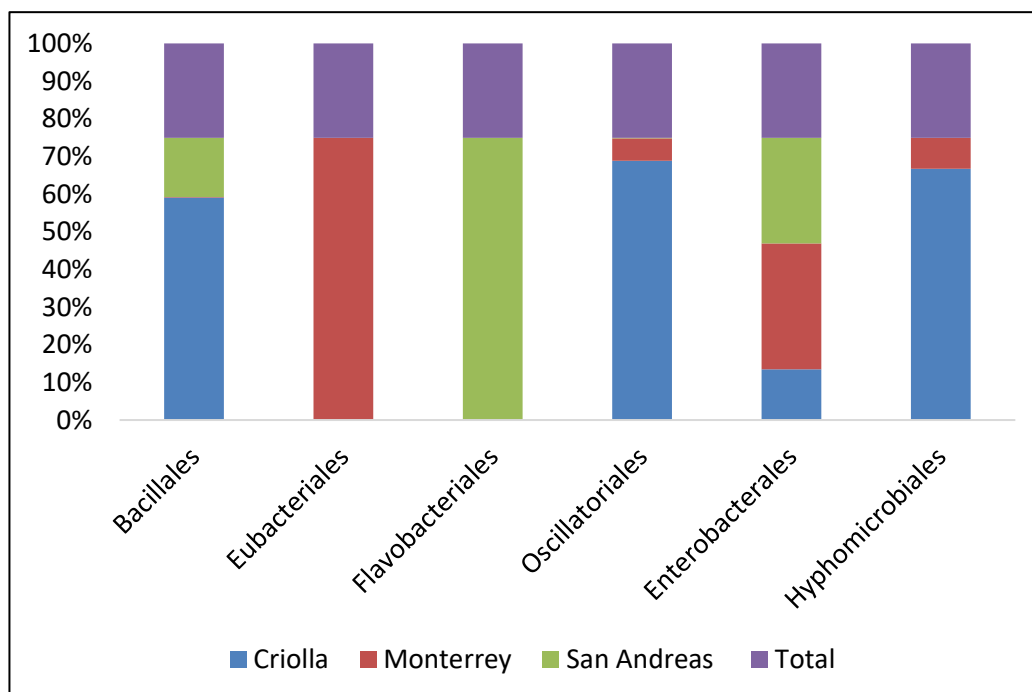
Orden	Criolla	Monterrey	San Andreas	Total	(%)
Bacillales	122 759	59	32 084	154 902	26,791
Eubacteriales	0	449	0	449	0,078
Flavobacteriales	0	0	6	6	0,001
Oscillatoriales	1 081	76	3	1 160	0,201
Enterobacterales	84 208	166 793	170 624	421 625	72,921
Hyphomicrobiales	50	5	0	55	0,010
Total	208 098	167 382	202 717	578 197	100,000

En la tabla 9 se representa la distribución de los ordenes en las tres variedades diferentes (Criolla, Monterrey y San Andreas), con los valores numéricos indicando el conteo asociado. Una interpretación simplificada indica que existen seis ordenes específicas diferentes: Bacillales, Eubacteriales, Flavobacteriales, Oscillatoriales, Enterobacterales y Hyphomicrobiales. El orden

Bacillales prevalece en la variedad Criolla (122 759 OTUs), seguida del orden Enterobacterales (84 208 OTUs) y Oscillatoriales (1 081 OTUs). En cambio, en la variedad Monterrey, prevalece el orden Enterobacterales (166 793 OTUs) seguido de Eubacteriales (449 OTUs). Finalmente, en la variedad San Andreas prevalecen los ordenes Enterobacterales (170 624 OTUs) y Bacillales (32 084 OTUs).

Figura 4

Representación de las ordenes bacterianas en las tres variedades de fresa



En la figura 4 observamos que el orden Bacillales son prominentes en la variedad Criolla (59%), representando la mayor proporción de la comunidad bacteriana en comparación con las otras muestras. El orden Eubacteriales está

presente solo en la variedad Monterrey y contribuye con una proporción relativamente baja (0,26%). El orden Flavobacteriales se encuentran solo en la variedad San Andreas, pero en una proporción muy baja (0,003%). El orden Oscillatoriales están presentes en todas las variedades, con una proporción más significativa en la variedad Criolla (0,51%). El orden Enterobacterales son dominantes en todas las muestras, especialmente en Monterrey (99,648%) y San Andreas (84,16%).

3.4.4 Composición Taxonómica a Nivel de Familia

El nivel de familia agrupa a varios géneros relacionados. Los organismos dentro de una familia comparten características más específicas que aquellos en un orden. Por ejemplo, las familias Bacillaceae, Clostridiaceae, etc.

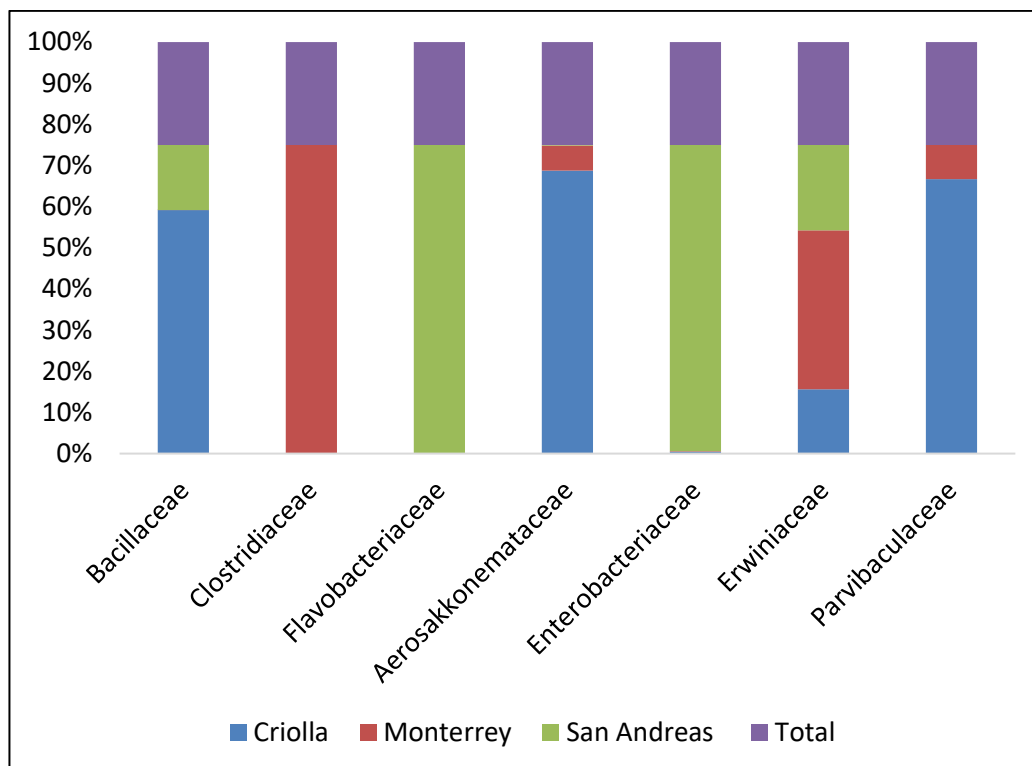
Tabla 10*Composición taxonómica de cada variedad hasta el nivel familia*

Familia	Criolla	Monterrey	San Andreas	Total	(%)
Bacillaceae	122 759	59	32 084	154 902	26,791
Clostridiaceae	0	449	0	449	0,078
Flavobacteriaceae	0	0	6	6	0,001
Aerosakkonemataceae	1 081	76	3	1 160	0,201
Enterobacteriaceae	399	43	61 805	62 247	10,766
Erwiniaceae	83 809	166 750	108 819	359 378	62,155
Parvibaculaceae	50	5	0	55	0,010
Total	208 098	167 382	202 717	578 197	100,000

En la tabla 10, representa la distribución de las familias en las tres variedades diferentes (Criolla, Monterrey y San Andreas), con los valores numéricos indicando el conteo asociado. Una interpretación simplificada indica que existen siete familias específicas diferentes: Bacillaceae, Clostridiaceae, Flavobacteriaceae, Aerosakkonemataceae, Enterobacteriaceae, Erwiniaceae y Parvibaculaceae. La familia Bacillaceae prevalece en la variedad Criolla (122 759 OTUs), seguida de la familia Erwiniaceae (83 809 OTUs) y Aerosakkonemataceae (1 081 OTUs). En cambio, en la variedad Monterrey, prevalece la familia Erwiniaceae (166 750 OTUs) seguido de Clostridiaceae (449 OTUs). Finalmente, en la variedad San Andreas prevalecen las familias Erwiniaceae (108 819 OTUs) y Enterobacteriaceae (61 805 OTUs).

Figura 5

Representación de las familias bacterianas en las tres variedades de fresa



En la figura 5, podemos observar que la familia Bacillaceae es dominante en la variedad Criolla (59%) y contribuye significativamente en la variedad San Andreas (15%). La familia Clostridiaceae está presente solo en la variedad Monterrey (0,27%). La familia Flavobacteriaceae está presente solo en la variedad San Andreas (0,003%). La familia Aerosakkonemataceae está presente en todas las variedades, pero es dominante en la variedad Criolla (0,52%). La familia Enterobacteriaceae es dominante en la variedad San Andreas (30%). La familia

Erwiniaceae es dominante en todas las variedades, especialmente en la variedad Monterrey (99%).

Estos resultados proporcionan información sobre la composición relativa de las familias bacterianas en cada variedad, lo que puede ser útil para comprender la diversidad y distribución de las bacterias en los diferentes entornos.

3.4.5. Composición Taxonómica a Nivel de Género

El nivel de género es un grupo que incluye una o varias especies estrechamente relacionadas. Los organismos dentro de un género comparten características más específicas que aquellos en una familia. Por ejemplo, en el género *Bacillus*, se agrupan diferentes especies como el *Bacillus zanthoxyli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus xiamenensis*, etc.

Tabla 11

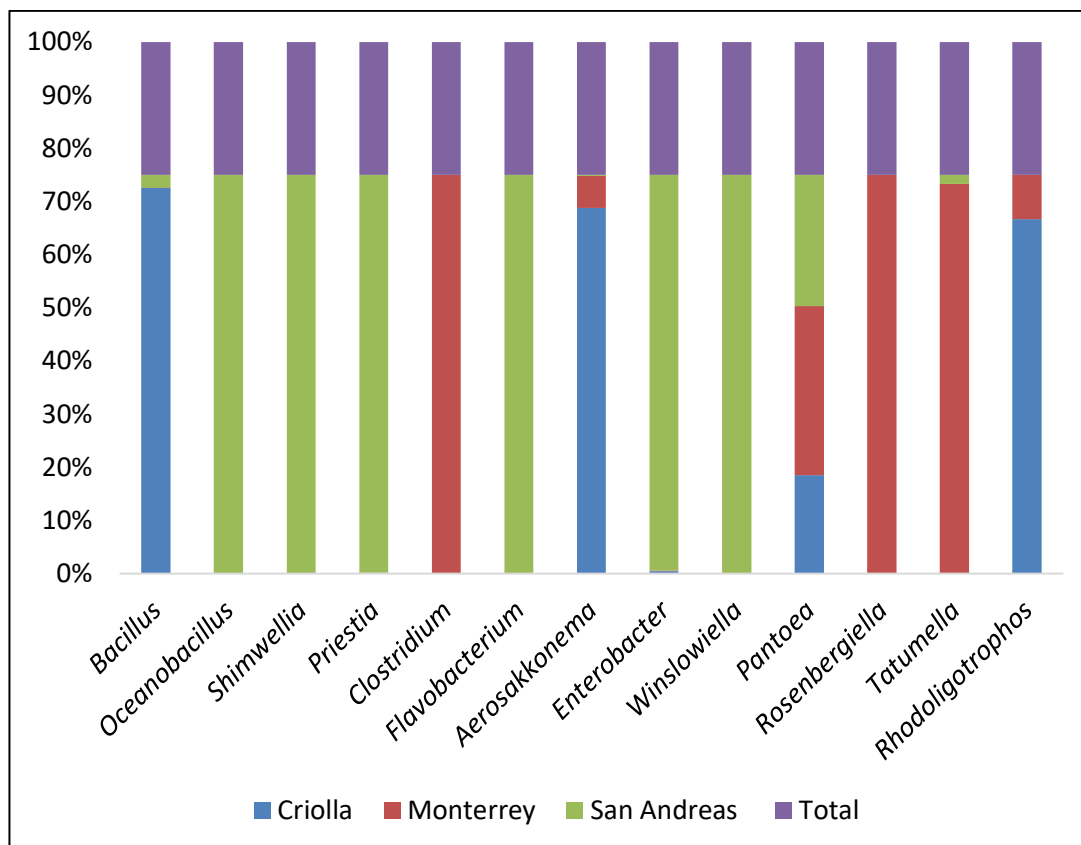
Composición taxonómica de cada variedad hasta el nivel género

Género	Criolla	Monterrey	San Andreas	Total	(%)
<i>Bacillus</i>	122 759	6	3 902	126 667	21,907
<i>Oceanobacillus</i>	0	0	3	3	0,001
<i>Shimwellia</i>	0	0	6	6	0,001
<i>Priestia</i>	0	53	28 179	28 232	4,883
<i>Clostridium</i>	0	449	0	449	0,078
<i>Flavobacterium</i>	0	0	6	6	0,001
<i>Aerosakkonema</i>	1 081	76	3	1 160	0,201
<i>Enterobacter</i>	399	43	61 799	62 241	10,765
<i>Winslowiella</i>	0	0	274	274	0,047
<i>Pantoea</i>	83 809	115 995	108 542	308 346	53,329
<i>Rosenbergiella</i>	0	50 645	0	50 645	8,759
<i>Tatumella</i>	0	110	3	113	0,020
<i>Rhodoligotrophos</i>	50	5	0	55	0,010
Total	208 098	167 382	202 717	578 197	100,000

La tabla 11 representa la distribución de los géneros en las tres variedades (Criolla, Monterrey y San Andreas), con los valores numéricos indicando el conteo asociado. Una interpretación simplificada indica que existen trece géneros específicos diferentes: *Bacillus*, *Oceanobacillus*, *Shimwellia*, *Priestia*, *Clostridium*, *Flavobacterium*, *Aerosakkonema*, *Enterobacter*, *Winslowiella*, *Pantoea*, *Rosenbergiella*, *Tatumella* y *Rhodoligotrophos*. El género *Bacillus* prevalece en la variedad Criolla (122 759 OTUs), seguida del género *Pantoea* (83 809 OTUs) y *Aerosakkonema* (1 081 OTUs). En cambio, en la variedad Monterrey, prevalece el género *Pantoea* (115 995 OTUs) seguido de *Rosenbergiella* (50 645 OTUs). Finalmente, en la variedad San Andreas prevalecen los géneros *Pantoea* (108 542 OTUs) y *Enterobacter* (61 799 OTUs).

Figura 6

Representación de los géneros bacterianos en las tres variedades de fresa



En la figura 6, podemos observar que los géneros más dominantes en la variedad Criolla es el género *Bacillus* (59%) y *Pantoea* (40%), en la variedad Monterrey, los géneros que más dominaron fueron, *Pantoea* (69%) y *Rosenbergiella* (30%). También, la variedad San Andreas, estuvo dominado por los géneros *Pantoea* (53%) y *Enterobacter* (30%).

3.4.6 Composición Taxonómica a Nivel de Especie

El nivel de especie, representa a la unidad mas básica de clasificación taxonómica. Los organismos dentro de una especie comparten características más específicas que aquellos en un género. Por ejemplo, la especie *Bacillus subtilis* pertenece al género *Bacillus*.

Tabla 12

Composición taxonómica de cada variedad hasta el nivel especie

Especies	Criolla	Monterrey	San Andreas	Total	(%)
<i>Pantoea conspicua</i>	83 809	115995	108 542	308 346	53,329
<i>Bacillus subtilis</i>	75 765	6	3 863	79 634	13,773
<i>Rosenbergiella epipactidis</i>	0	50645	0	50 645	8,759
<i>Bacillus xiamenensis</i>	46 988	0	0	46 988	8,127
<i>Enterobacter mori</i>	399	43	61 799	62 241	10,765
<i>Priestia flexa</i>	0	53	28 154	28 207	4,878
<i>Aerosakkonema funiforme</i>	1 081	76	3	1 160	0,201
<i>Clostridium perfringens</i>	0	449	0	449	0,078
<i>Winslowiella toletana</i>	0	0	258	258	0,045
<i>Tatumella ptyseos</i>	0	110	3	113	0,020
<i>Rhodoligotrophos jinshengii</i>	50	5	0	55	0,010
<i>Priestia flexa</i>	0	0	25	25	0,004
<i>Winslowiella toletana</i>	0	0	10	10	0,002
<i>Bacillus zanthoxyli</i>	0	0	33	33	0,006
<i>Bacillus zanthoxyli</i>	0	0	6	6	0,001
<i>Shimwellia blattae</i>	0	0	6	6	0,001
<i>Flavobacterium acidificum</i>	0	0	6	6	0,001
<i>Winslowiella toletana</i>	0	0	6	6	0,001
<i>Bacillus wiedmannii</i>	6	0	0	6	0,001
<i>Oceanobacillus chironomi</i>	0	0	3	3	0,001
Total	208 098	167 382	202 717	578 197	100,000

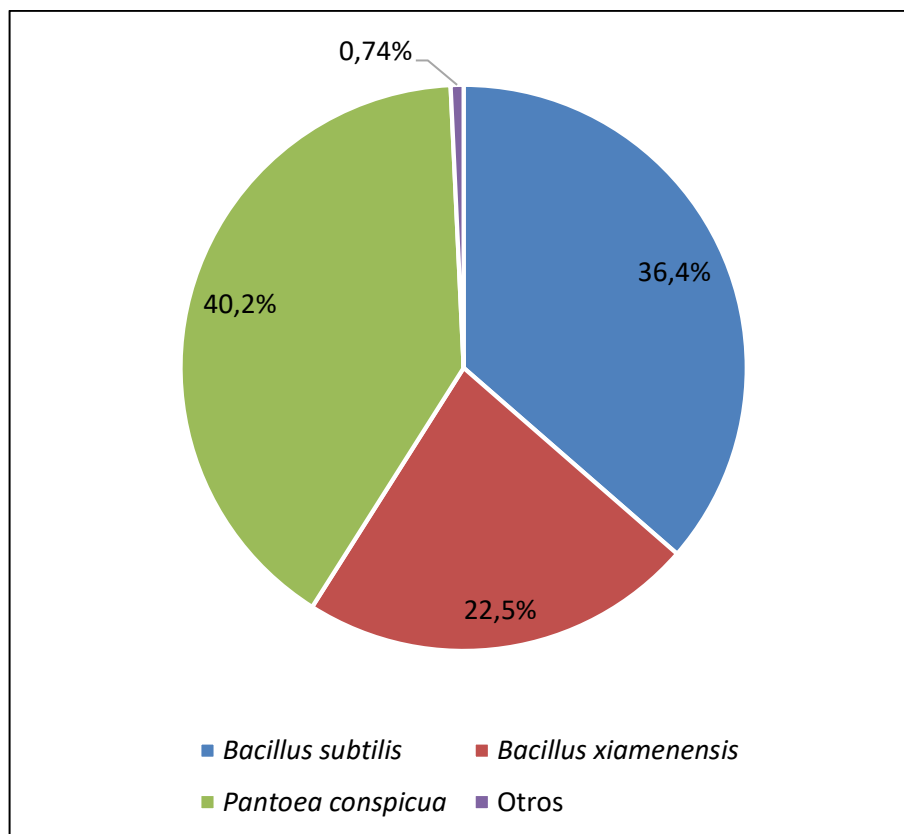
En la tabla 12, representa la distribución de las especies identificadas en las tres variedades (Criolla, Monterrey y San Andreas), con los valores numéricos

indicando el conteo asociado. Una interpretación simplificada indica que existen las siguientes especies: *Pantoea conspicua*, *Bacillus subtilis*, *Rosenbergiella epipactidis*, *Bacillus xiamenensis*, *Enterobacter mori*, *Priestia flexa*, *Aerosakkonema uniforme*, *Clostridium perfringens*, *Winslowiella toletana*, *Tatumella ptyseos*, *Rhodoligotrophos jinshengii*, *Bacillus zanthoxyli*, *Shimwellia blattae*, *Flavobacterium acidificum*, *Bacillus wiedmannii* y *Oceanobacillus chironomi*.

En la variedad Criolla prevalece mayormente *Pantoea conspicua* (83 809 OTUs) seguido de *Bacillus subtilis* (75 765 OTUs) y *Bacillus xiamenensis* (46 988 OTUs). En cambio, en la variedad Monterrey, domina *Pantoea conspicua* (115 995 OTUs), seguido de *Rosenbergiella epipactidis* (50 645 OTUs). Finalmente, en la variedad San Andreas también, prevalecen como mayor dominio, la especie *Pantoea conspicua* (108 542 OTUs), seguido de la especie *Enterobacter mori* (61 799 OTUs) y *Priestia flexa* (28 154 OTUs).

Figura 7

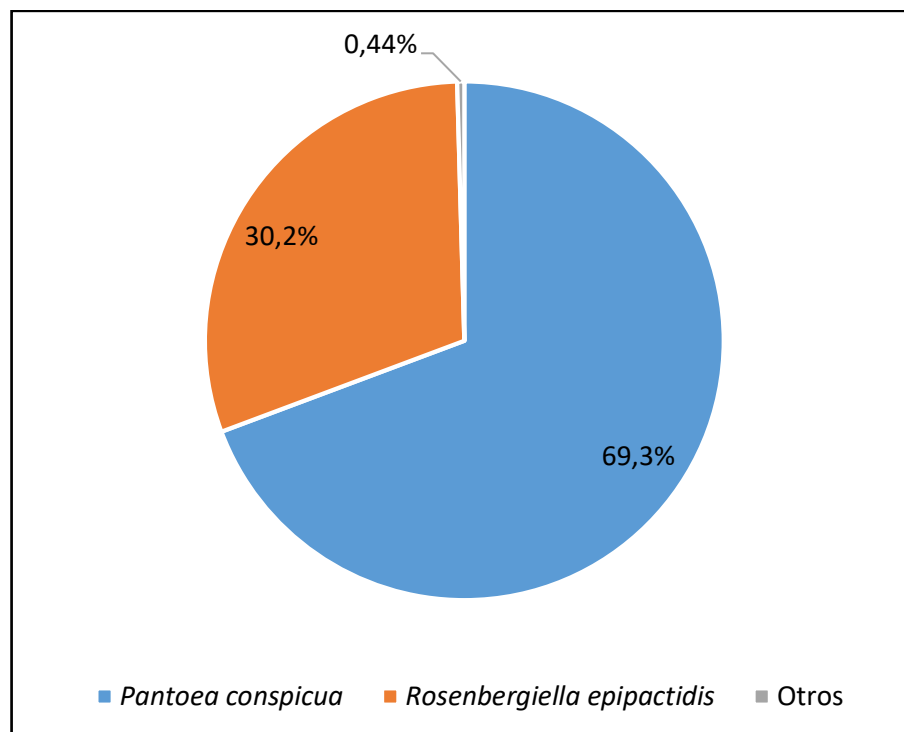
Representación de las especies bacterianas en la variedad Criolla de fresa



En la figura 7, se observa que la variedad Criolla tiene una presencia significativa mayor de *Pantoea conspicua* (40,2%), siguiendo de *Bacillus subtilis* (36,4%) y *Bacillus xiamenensis* (22,5%). Además, otras especies de la variedad Criolla han tenido presencia menor al 1% (0,74%), como *Aerosakkonema funiforme* (0,52%) y *Enterobacter mori* (0,19%) .

Figura 8

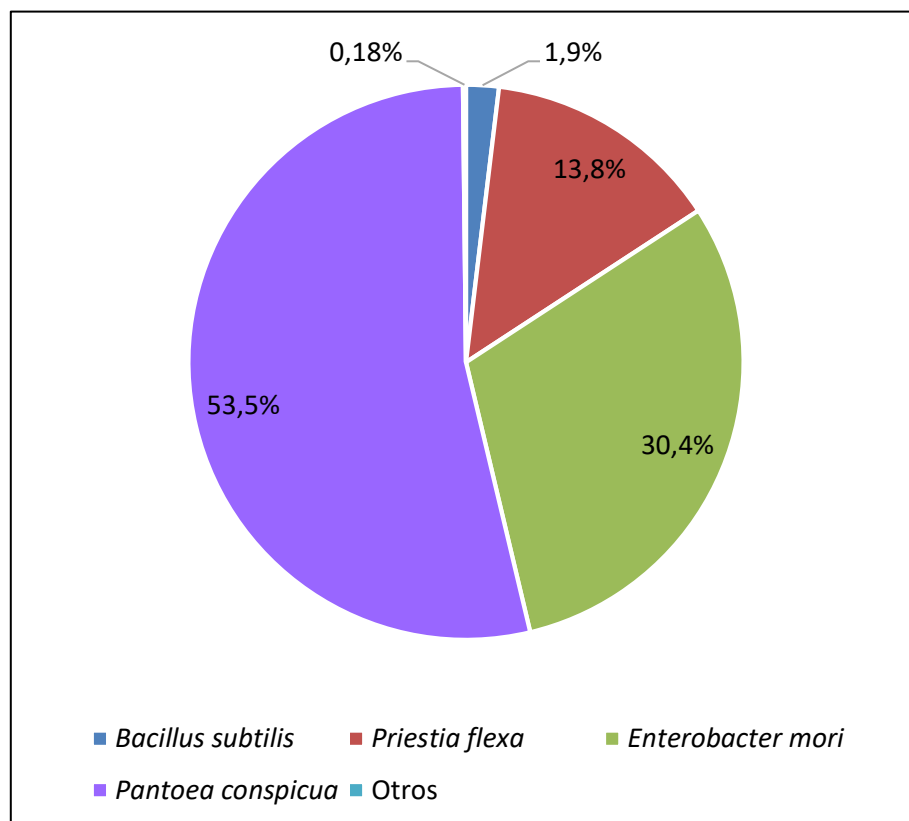
Representación de las especies bacterianas en la variedad Monterrey de fresa



En la figura 8 se observa que la variedad Monterrey está dominada mayormente por *Pantoea conspicua* (69,3%) y *Rosenbergiella epipactidis* (30,2%). Además, otras especies de la variedad Monterrey han tenido presencia menor al 1% (0,44%), como *Clostridium perfringens* (0,27%), *Tatumella pyseos* (0,07%), *Aerosakkonema uniforme* (0,05%), *Priestia flexa* (0,03%) y *Enterobacter mori* (0,03%).

Figura 9

Representación de las especies bacterianas en la variedad San Andreas de fresa



En la figura 9 se observa, que la variedad San Andreas parece tener una diversidad considerable, tiene una presencia significativa de *Pantoea conspicua* (53,5%) seguido de *Enterobacter mori* (30,4%), *Priestia flexa* (13,8%) y *Bacillus subtilis* (1,9%). Otras especies tienen un porcentaje menor al 1%, como, *Winslowiella toletana* (0,13%) y *Priestia flexa* (0,012%).

Estas figuras proporcionan una visión detallada de la composición de especies bacterianas en cada muestra y que serán útiles para comprender la diversidad y la distribución de especies en las diferentes variedades.

3.5 Estadísticas de Diversidad

La estadística de diversidad bacteriana se enfocó en el estudio de la diversidad de microorganismos en diferentes variedades. Los índices de biodiversidad sirvieron para medir la diversidad biológica de una comunidad microbiana. La riqueza comunitaria y diversidad se utilizaron para medir la diversidad de especies en una comunidad microbiana. La riqueza comunitaria se refirió al número total de especies presentes en una comunidad, mientras que la diversidad se refirió a la variabilidad de especies en una comunidad.

3.5.1 Riqueza y Diversidad de Comunidad

La evaluación de la diversidad y la abundancia de los microorganismos identificados se realizó mediante el análisis de la estructura de la comunidad microbiana. La diversidad microbiana se midió utilizando el índice de Shannon, el índice de Gini-Simpson, el índice de Chao1 y de Buena Cobertura. La abundancia microbiana se midió utilizando la frecuencia relativa de cada especie en la muestra. Además, el análisis de rarefacción permitió comparar la diversidad entre diferentes muestras que difieren en tamaño y extrapolar la diversidad calculando el número hipotético de especies presente en una muestra natural a través de estimadores de riqueza como Chao1.

Tabla 13*Riqueza y diversidad de la comunidad bacteriana*

Muestra	OTUs	Chao1	Shannon	Gini-Simpson	Buena Cobertura
Criolla	17	17	0,071398237	0,015886551	0,999
Monterrey	19	19	0,153382787	0,040704644	0,999
San Andreas	23	23	0,465470201	0,202032818	0,999

La tabla 13 muestra los resultados de un análisis de diversidad microbiana. Se observa en la tabla que, la variedad de San Andreas tiene el mayor número de OTUs, la mayor estimación de Chao1, y los índices de Shannon y Gini-Simpson son los más altos, lo que indica una mayor diversidad de especies microbianas en esa variedad. La variedad Criolla tiene la menor diversidad, con el menor número de OTUs, y los índices de Shannon y Gini-Simpson son los más bajos. La variedad Monterrey presenta valores intermedios para todos los índices de diversidad.

Las especies bacterianas obtenidas luego del análisis bioinformático realizado con las secuencias obtenidas y que han sido depuradas hasta tener como mínimo un valor de porcentaje de similitud de 97 %. En la tabla 14 nos muestran que las secuencias de consulta coinciden con las secuencias de referencia con un alto porcentaje de identidad y cobertura, y con valores de E muy bajos, lo que sugiere una alta significancia estadística en las coincidencias. Esto indica que las secuencias de consulta son altamente similares a las secuencias de referencia y pueden pertenecer a las especies bacterianas mencionadas.

Tabla 14

Especies bacterianas obtenidas y que fluctúan entre 78,62 % y 99,77 % de porcentaje de similitud.

Especies bacterianas	Cobertura de Consulta	Valor E	Porcentaje de identidad	Longitud de acceso	Nº de Acceso
<i>Flavobacterium acidificum</i>	100%	0.0	97,28	1432	NR_104962.1
<i>Aerosakkonema funiforme</i>	100%	4e-142	87,22	1338	NR_114306.1
<i>Bacillus subtilis</i>	100%	0.0	99,57	1550	NR_112116.2
<i>Bacillus xiamenensis</i>	100%	0.0	99,57	1513	NR_148244.1
<i>Bacillus zanthoxyli</i>	100%	0.0	96,83	1438	NR_164882.1
<i>Bacillus zanthoxyli</i>	100%	4e-157	89,44	1438	NR_164882.1
<i>Bacillus wiedmannii</i>	100%	0.0	99,77	1540	NR_152692.1
<i>Oceanobacillus chironomi</i>	100%	8e-164	90,29	1471	NR_043700.1
<i>Priestia flexa</i>	100%	0.0	99,79	1478	NR_113800.1
<i>Priestia flexa</i>	100%	0.0	93,20	1478	NR_113800.1
<i>Clostridium perfringens</i>	100%	0.0	99,55	1513	NR_121697.2
<i>Rhodoligotrophos jinshengii</i>	100%	7e-75	78.62	1454	NR_134155.1
<i>Tatumella ptyseos</i>	100%	0.0	99,77	1494	NR_116283.1
<i>Winslowiella toletana</i>	100%	2e-169	90,91	1508	NR_104828.1
<i>Enterobacter mori</i>	100%	0.0	99,36	1522	NR_146667.2
<i>Winslowiella toletana</i>	100%	5e-161	89.80	1508	NR_104828.1
<i>Rosenbergiella epipactidis</i>	100%	0.0	99,36	1501	NR_126303.1
<i>Pantoea conspicua</i>	100%	0.0	99,14	1344	NR_116247.1
<i>Winslowiella toletana</i>	100%	2e-164	90.25	1508	NR_104828.1
<i>Shimwellia blattae</i>	100%	8e-179	92,27	1544	NR_074908.1

En la tabla 15, podemos observar que los datos indican que la secuencia de consulta de las siguientes especies coincide completamente con la secuencia de referencia en la base de datos, con una alta significancia estadística y un alto porcentaje de identidad (mayor al 97%).

Tabla 15

Especies bacterianas aceptadas por ser superiores al 97 % de similitud.

Especies bacterianas	Cobertura de Consulta	Valor E	Porcentaje de identidad	Longitud de accesoión	Nº de Acceso
<i>Bacillus subtilis</i>	100%	0.0	99,57	1550	NR_112116.2
<i>Bacillus xiamenensis</i>	100%	0.0	99,57	1513	NR_148244.1
<i>Bacillus zanthoxyli</i>	100%	0.0	96,83	1438	NR_164882.1
<i>Bacillus wiedmannii</i>	100%	0.0	99,77	1540	NR_152692.1
<i>Priestia flexa</i>	100%	0.0	99,79	1478	NR_113800.1
<i>Clostridium perfringens</i>	100%	0.0	99,55	1513	NR_121697.2
<i>Tatumella tyseos</i>	100%	0.0	99,77	1494	NR_116283.1
<i>Enterobacter mori</i>	100%	0.0	99,36	1522	NR_146667.2
<i>Rosenbergiella epipactidis</i>	100%	0.0	99,36	1501	NR_126303.1
<i>Pantoea conspicua</i>	100%	0.0	99,14	1344	NR_116247.1

Antes se realiza una descripción general de las columnas presentes en la tabla:

Especies bacterianas: Es el nombre de la especie bacteriana analizada

Cobertura de Consulta: Indica el porcentaje de cobertura de la secuencia de consulta en comparación con la secuencia de referencia en la base de datos.

Valor E: Es una medida de la expectativa de encontrar una coincidencia entre la secuencia de consulta y la secuencia de referencia por casualidad. Un valor de E bajo indica una alta significancia estadística de la coincidencia.

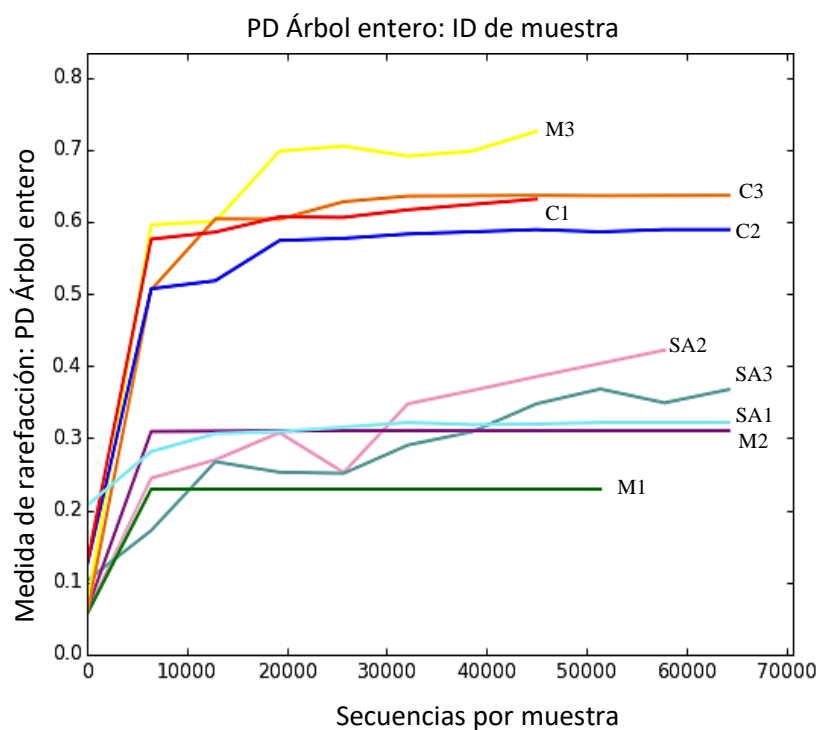
Porcentaje de identidad: Indica el porcentaje de similitud entre la secuencia de consulta y la secuencia de referencia.

Longitud de acceso: Es la longitud de la secuencia de referencia en la base de datos.

Nº de Acceso: Es el número de acceso de la secuencia de referencia en la base de datos.

3.5.2 Rarefacción

La rarefacción se utilizó para comparar la diversidad entre diferentes muestras que difieren en tamaño. Este método permitió estimar el número hipotético de especies presente en una muestra natural a través de estimadores de riqueza como Chao1.

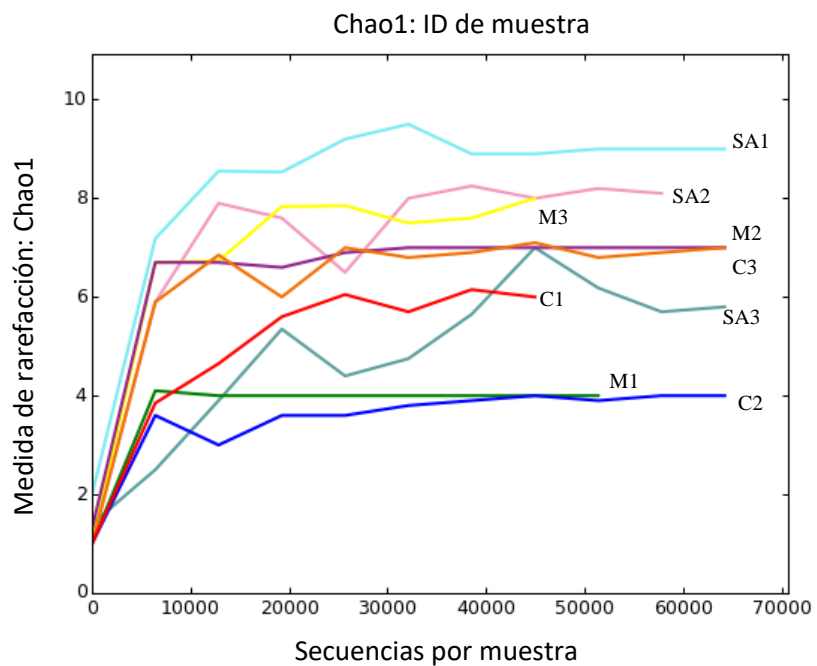
Figura 10*Curvas de rarefacción*

En la figura 10 se observa las curvas de rarefacción obtenidas para cada una de las muestras obtenidas. Estas curvas representan la diversidad de especies en nueve muestras diferentes, basadas en secuencias de de las regiones V3-V4 del ADN_r 16S. A medida que aumenta el número de secuencias por muestra, también lo hace la medida de rarefacción PD Árbol entero, indicando una mayor diversidad. En la imagen, hay nueve curvas coloreadas diferentes que representan las nueve

muestras individuales. Cada curva comienza cerca del origen y se eleva a medida que aumenta el número de secuencias por muestra, nivelándose hacia el final.

Figura 11

Curvas de rarefacción de nueve muestras de secuencias por muestras versus el índice de Chao1



Se observa en la figura 11 que, el índice de Chao1 es un estimador no paramétrico de la riqueza de especies que se basa en el número de especies raras (especies que se encuentran en una sola muestra) y especies comunes (especies que se encuentran en más de una muestra). El índice de Chao1 se calcula a partir de la curva de acumulación de especies y proporciona una estimación del número total de especies presentes en una muestra. En resumen, las curvas de rarefacción y el índice de Chao1 son herramientas útiles para evaluar la riqueza de especies en una

muestra y proporcionar una estimación del número total de especies presentes en una muestra, respectivamente. Las curvas de rarefacción muestran el número de especies observadas en función del número de secuencias muestreadas. Si las curvas de rarefacción se estabilizan, significa que se ha alcanzado la mayoría de la diversidad presente en la muestra. Si las curvas no se estabilizan, es posible que se necesite más secuenciación para obtener una imagen completa de la diversidad de la muestra.

3.5.3 Árbol Filogenético de Especies Bacterianas

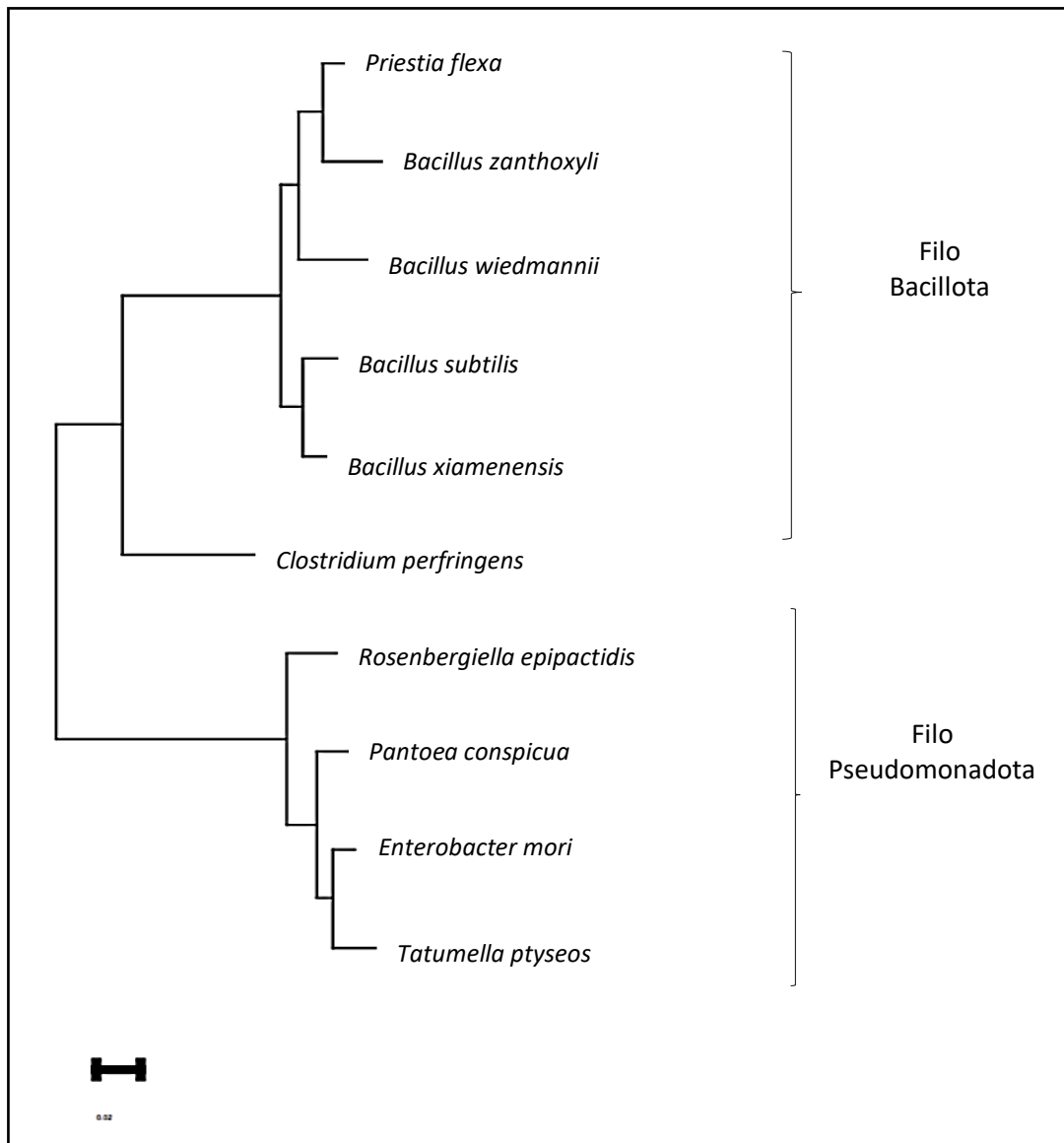
El árbol filogenético nos demuestra que hay relaciones evolutivas entre diferentes especies o grupos de organismo. Para el contexto de la comunidad bacteriana existente en el endopio de las tres variedades de fresa, el árbol filogenético se utilizó para visualizar cómo las bacterias presentes en estas variedades están relacionadas evolutivamente entre sí.

La comunidad bacteriana en este contexto se refiere a todas las bacterias presentes en el receptáculo, la capa intermedia (parte carnosa de la fresa), de las tres variedades de fresa que se están estudiando. La construcción de un árbol filogenético implica analizar la información genética de las bacterias, como secuencias de ADN o ARN ribosomal, para determinar la similitud genética entre ellas. Con base en estas similitudes, se pueden agrupar las bacterias en ramas del árbol que representan sus relaciones evolutivas.

Este tipo de análisis filogenético es útil para entender la diversidad bacteriana, la evolución y las posibles interacciones en la comunidad bacteriana de las fresas. Además, puede proporcionar información valiosa sobre la procedencia y las características genéticas de las bacterias presentes en las diferentes variedades de fresas.

Figura 12

Árbol filogenético del total de las especies obtenidas en el presente estudio



Se observa en la figura 12, la construcción de un árbol filogenético con el programa MEGA 11, que nos ayudó en la clasificación y taxonomía de las especies bacterianas, donde existe una relación de especies del filo Pseudomonadota, *Enterobacter mori*, *Tatumella tyseos*, *Rosenbergiella epipactidis*, *Pantoea conspicua* con el filo Bacillota, *Priestia flexa*, *Bacillus zanthoxyli*, *Bacillus wiedmannii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus xiamenensis* y *Clostridium perfringens*.

IV. DISCUSIÓN

4.1. Extracción y Cuantificación de ADN

En el presente trabajo, las técnicas moleculares como el secuenciamiento y análisis del gen 16S ARNr fueron técnicas ideales de elección para el análisis de comunidades bacterianas en el fruto de la fresa, debido a su eficiencia, novedad y rapidez en la obtención de metadata en comparación con las técnicas de cultivo tradicional (Mignard y Flandrois, 2006). La secuenciación de alto rendimiento del gen ARNr 16S mejora nuestra comprensión sobre la diversidad microbiana en muestras ambientales complejas. El gen ARNr 16S se utiliza actualmente en el estudio de la ecología y la evolución bacteriana, especialmente para determinar las relaciones filogenéticas entre taxones, explorar la diversidad bacteriana en un entorno determinado y cuantificar la abundancia relativa de taxones en diferentes niveles (Nakano, 2018). En el estudio de Moore et al., (2022), se utilizó la plataforma Illumina Next Generation Sequencing (NGS) dirigida a las regiones conservadas del ADN ribosómico de las bacterias (16S ARNr) para identificar y comparar la diversidad de las comunidades bacterianas presentes en la guanábana y manzana, este estudio ayudo a ampliar los conocimientos sobre la estructura de las comunidades bacterianas asociadas a los frutos de estudio.

Para la cuantificación de ADN, en la tabla 2, se observó que la muestra de la variedad Criolla obtuvo un DO entre 1,8 y 1,9; mientras tanto, la muestra San

Andreas obtuvo un DO entre 1,8 y 1,9 y finalmente, la muestra Monterrey con un DO entre 1,5 y 1,8. Estos resultados nos indicaron que son muestras puras y de buena calidad, libres de algún tipo de contaminación por proteínas, lo cual concuerda con el estudio del Programa de control de calidad de ácidos nucleicos (Banco Nacional de ADN, 2020), que menciona que un ADN de pureza aceptable debe tener al menos una relación $A_{260}/_{280} > 1,6$; mientras que, un valor de absorbancia $A_{260}/_{280} < 1,6$ indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas y un valor de absorbancia $A_{260}/_{280} > 2,0$ podría deberse a la presencia de ARN en la muestra.

De la misma forma, las investigaciones de Moura et al., (2021) y Fialova et al., (2020) presentaron datos de concentración (ng/ μ l) y pureza del ADN de muestras de fresa, satisfactorias con valores dentro del rango 1,7 – 2,0. Así como también, se aisló el ADN de las siguientes frutas: plátano, arándano, pera, manzana, fresa, frambuesa, albaricoque, ciruela, durazno y mango, mediante cinco métodos comerciales y un método interno (CTAB), donde indican que el valor 1,8 es un ADN puro, un valor más bajo indica contaminación de proteínas y un valor superior a 2,0 indica contaminación de ARN. Por lo tanto, se evaluó la pureza y la concentración del ADN, mostrando resultados de buena calidad y pureza aceptable como, por ejemplo, el plátano con un valor de absorbancia de $1,81 \pm 0,34$, el arándano, con un valor de $1,65 \pm 0,47$ y la pera con un valor de $1,73 \pm 0,31$.

4.2. Ensamblaje de Lecturas y Agrupamiento

El ensamblaje de lecturas (301 bp) de las regiones V3-V4 del gen ADNr 16S bacteriano sirvió para unir fragmentos de secuencias de ADN que se han obtenido a partir de la amplificación de la región V3-V4 del gen ADNr 16S bacteriano. La secuenciación de esta región permitió la identificación de especies bacterianas y la comparación de su diversidad y composición en diferentes muestras. En esta etapa se alineó y se unió las secuencias de ADN para generar una secuencia consenso más larga y precisa.

Según Shen et al., (2022) en su trabajo sobre comunidades microbianas de manzanas Fuji, donde se procesó las lecturas de ADN, guardando en formato FASTQ de doble extremo (R1 fastq y R2 fastq). Además, para realizar la selección de calidad de sus datos y la demarcación de la secuencia, los investigadores utilizaron los softwares FLASH y QIIME. El programa FLASH fue utilizado para descartar las secuencias inferiores que contenían bases ambiguas, considerando los parámetros siguientes: una calidad de base promedio \leq Q20 (precisión de secuenciación \leq 99%) o con menos de 150 pb. Por otro lado, se utilizó el QIIME, para seleccionar secuencias de baja calidad incluidas secuencias sin cebadores, con contenido de mas de 8 mononucleotidos, aquellas que contenían discrepancias y secuencias quiméricas. Las secuencias de alta calidad se demarcaron en unidades taxonómicas operativas (OTU) con un 97% de similitud mediante el flujo de trabajo de selección de OTU de QIIME-ucrust.

En la tabla 3, se observó en los resultados del ensamblaje, que las bases totales varían entre 272 y 296 millones (Figura 1). El porcentaje de bases ambiguas (N (%)) fue muy bajo en todas las muestras (0.0001%), lo cual fue positivo. El contenido de CG se presentó entre el 54,95% y el 55,48%, lo que se sugiere diferencias en la composición de las secuencias entre las muestras. Los porcentajes de Q20 y Q30 fueron altos en todas las muestras, indicando que la calidad de la secuencia fue generalmente alta. El ensamblaje realizado con el programa FLASH fue exitoso, con secuencias de alta calidad y longitudes de ensamblaje similares entre las muestras. La variación en el contenido de CG podría deberse a diferencias biológicas reales entre las muestras.

En la tabla 4 y 5, observamos que el pre-procesamiento eliminó las secuencias de baja calidad, adaptadores y secuencias cortas. El objetivo fue mejorar la calidad de los datos y reducir el ruido en los datos de secuenciación. El agrupamiento redujo la complejidad de los datos de secuenciación y simplificó el análisis posterior. Se realizó utilizando algoritmos de agrupamiento como el de UPARSE (Edgar, 2013)

Se indicó en los resultados (Tabla 5), la cantidad de secuencias agrupadas en OTUs para cada muestra después del proceso de agrupación con CD-HIT-OTU. La agrupación se realizó con un límite del 97%, lo que significa que las secuencias que comparten al menos el 97% de similitud se agrupan en la misma OTU. Este

método se utilizó en análisis de diversidad microbiana para agrupar secuencias similares en unidades taxonómicas operativas (Li y Chang, 2017).

4.3. Asignación Taxonómica

El presente estudio reportó la diversidad de la comunidad bacteriana endófitas, donde se observó la distribución por las diferentes variedades de fruto de la fresa. Según la distribución de los filos (Tabla 7), se mostró como el filo Pseudomonadota (72,9%), el más predominante en las tres variedades y con un mayor porcentaje en la variedad Monterrey (99,65%), mientras que el filo Bacteroidota (0,001%) fue el menos predominante, presente solo en la variedad San Andreas (0,003%). A comparación, con el estudio de Mauri (2023) se demostró la caracterización del microbiota en la manzana, uva y fresa en post-cosecha, donde se encontró el filo Pseudomonadota con más de un 95% en muestras de fresa y uva, mientras que en la muestra de manzana hubo presencia de los filos Pseudomonadota y Actinomycetota un 70%.

En las figuras 7, 8 y 9 se observó que la especie *Pantoea conspicua* es predominante en las tres variedades. En el estudio de Melo et al., (2012), sobre comunidades bacterianas endofíticas en frutos de fresa, se demostró la presencia de *Pantoea* sp., así como, en otros estudios se demostró en otros frutos, por ejemplo, en las grosellas negras, dominante junto *Tatumella* sp., como las más predominantes (Vepštaitė-Monstavičė et al., 2018).

Según Lorenzi et al., (2022), las cepas de *Pantoea* spp., en un entorno agrícola, pueden promover el crecimiento de las plantas a través de mecanismos directos o indirectos, como, aumentar el suministro de nitrógeno, solubilizar amoníaco y fosfato inorgánico y producir fitohormonas (ejemplo, auxinas). Así como, en el estudio de Qadir et al., (2023), indicaron que, *Pantoea conspicua* alivió el estrés por arseniato en las plantas de girasol, imponiendo una barrera física y mejorando la fisiología y bioquímica de la planta.

Mientras que en otros estudios se demostró que podría inferir tanto como patógenos vegetales potenciales o bacterias beneficiosas, por ejemplo, la especie *Pantoea agglomerans* es considerada un agente de control de plagas y fitopatógenos. Mientras que, *Pantoea punctata* (actualmente *Tatumella punctata*) (Brady et al., 2010) se aisló de la fruta de la fresa, obteniéndose en bajas proporciones, probablemente porque no se recuperó suficiente ADN en la extracción, por lo que representó <1% de la comunidad total (de Melo et al., 2012).

Pero también, se han encontrado estudios sobre *P. ananatis*, *P. agglomerans* y *P. stewartii*, que causan enfermedades destructivas en el arroz, como decoloración del grano, necrosis de tallo, tizon bacteriano foliar e inhibición de la germinación de las semillas en el arroz (Azizi et al., 2020).

En la figura 7, la muestra Criolla determinó 17 OTUs donde, predominó tres especies entre ellas, la especie *Pantoea conspicua* (40,2%), *Bacillus subtilis* (36,4%) y *Bacillus xiamenensis* (22,5%).

En un reciente estudio, *Bacillus* sp., demostró ser un agente biocontrol contra el marchitamiento por *Fusarium oxysporum* en tomates y demostró promoción del crecimiento vegetal en condiciones de invernadero (Pengproh et al., 2023).

También, se demostró que tiene defensa para prevenir una mayor infección de patógenos como hongos patógenos, *Magnaporthe oryzae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Coniothyrium diplodiella* y *Botrytis cinérea* (Wang et al., 2021). Por otro lado, *Bacillus xiamenensis* ha demostrado en un estudio tener efectos inhibidores contra las larvas de *Spodoptera litura* en hoja de ricino, considerándose una bacteria promotora del crecimiento vegetal (Wagh et al., 2024). Además, en el estudio de Sushma et al., (2020) obtuvieron *Bacillus xiamenensis*, *Bacillus aerius*, *Bacillus stratosphericus* y *Bacillus safensis* del tomate.

En la figura 8, la variedad Monterrey determinó 19 OTUs donde, predominó dos especies, *Pantoea conspicua* (69,3%) y *Rosenbergiella epipactidis* (30,2%). En un estudio reciente, se aisló *Rosenbergiella epipactidis* de la flor de *Lycoris radiata*, que ayudó en el aumento de biomasa de las plantas y en la promoción de crecimiento vegetal (Liu et al., 2020). Además, se descubrió que tiene actividad antagonista frente a *Erwinia amylovora* (agente causal del fuego bacteriano), donde se demostró la capacidad de reducir en gran medida los síntomas del fuego bacteriano en los frutos inmaduros de peral y níspero (Barbé et al., 2021). A comparación, con el estudio de diversidad de comunidades bacterianas en la

superficie de las bayas de goji chinas, se encontró que el género más abundante fue *Pantoea* (32,28%) seguido de *Massilia* (21,23%), *Pseudomonas* (10,38%), *Rosenbergiella* (6,3%) y *Curtobacterium* (6,29%) (Huang et al., 2022)

En la figura 9, la variedad San Andreas determinó 23 OTUs donde, predominó cuatro especies: *Pantoea conspicua* (53,5%), *Enterobacter mori* (30,4%), *Priestia flexa* (13,8%) y *Bacillus subtilis* (1,9%). A comparación con las investigaciones de Melo et al. (2012), se obtuvieron aislados en la fruta de la fresa, los géneros *Pantoea*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas* y *Curtobacterium*. Donde predominaron las especies de los géneros *Bacillus* y *Enterobacter*. Mientras que, en el estudio de Moore, Ataga y Ogbuji (2022) encontraron en la fruta de la guanábana y la manzana los siguientes géneros predominantes: *Methylobacterium* (12,13%), *Sphingomonas* (8,83%), *Hymenobacter* (7,27%), *Sphingobacterium* (4,23%), *Pseudomonas* (3,06%), *Ralstonia* (2,98%), *Bacillus* (2,27%), *Flavobacterium* (2,22%), *Brachybacterium* (1,79%), *Erwinia* (1,52%).

Además, Moura et al., (2021) en su estudio para controlar el hongo *Botrytis cinerea* L., demostró que *Bacillus* sp. y *Pantoea* sp., en dos variedades de fruta de la fresa (San Andreas y Monterrey) controlaron más de 90% el crecimiento del moho gris. También, se demostró en un estudio que *Enterobacter mori* presentó una inhibición contra el hongo patógeno *Colletotrichum* sp., en cítricos (Khalifa, A., 2020). Mientras que *Priestia flexa*, anteriormente conocida como *Bacillus flexus*,

en un estudio presentó la capacidad de reducir el arsénico en plantas de arroz cultivadas en macetas llenas de suelo contaminado (As(V) a As(III)) (Shukla et al., 2023)

4.4. Estadísticas de Diversidad: Riqueza y Diversidad de Comunidad

La riqueza, la estimación de la diversidad y la composición de la comunidad bacteriana se compararon mediante análisis de diversidad, Chao1, Shannon-Weaver, Simpson, buena cobertura y rarefacción. En la tabla 13, observamos que la variedad de San Andreas presentó el mayor número de OTUs (23), la mayor estimación de Chao1 (23), y el índice de Shannon (0,465) son los más altos, lo que indica una mayor diversidad de especies microbianas en esa variedad. La variedad Criolla tiene la menor diversidad de OTUs (17), la menor estimación de Chao1 (17) y los índices de Shannon (0,071) y Simpson (0,015), son los más bajos. Mientras que, la variedad Monterrey presentó valores intermedios para todos los índices de diversidad.

En las investigaciones de Vepškaitė-Monstavičė et al., (2018), indicaron que la diversidad y riqueza de comunidades microbianas de manzanas y grosellas negras, obtuvieron un total de 499 470 secuencias de alta calidad, 438 OTUs, número total de OTUs y donde el mayor número de OTUs fue de las grosellas negras (150 OTUs) y de acuerdo con los datos de OTUs, las estimaciones de diversidad de Shannon (5,4) y Chao1 (160) también, revelaron que las bayas de grosella negra tenían una mayor diversidad bacteriana que las manzanas. Además,

la relación entre el número de OTUs obtenidas, se utilizó para determinar la cobertura de las comunidades microbianas, dando un resultado superior al 90% en todos los casos, lo que indica que fue una buena cobertura. Mientras que, en el estudio de Lukša (2020), para determinar la comunidad bacteriana mediante un enfoque metagenómico, de los frutos de morera blanca (*Morus alba* L.) se obtuvieron 169 313 secuencias de buena calidad y, además, se utilizó un umbral del 97% de similitud de secuencia para agrupar en unidades taxonómicas operativas, obteniendo 365 OTUs. También, presentaron una buena cobertura de 99,9%. De acuerdo con los datos obtenidos de OTU, los índices Chao1 (370) y Shannon (4,56) demostraron que la morera blanca presenta una buena diversidad de comunidades bacterianas.

En la figura 10, observamos las curvas de rarefacción obtenidas para cada una de las muestras que presentan nueve curvas coloreadas diferentes que representan las nueve muestras individuales. Cada curva comienza cerca del origen y se eleva a medida que aumenta el número de secuencias por muestra, nivelándose hacia el final.

Varios estudios microbianos han utilizado índices de diversidad, han estimado la riqueza de especies y han comparado la diversidad de muestras con curvas de rarefacción (Hughes et al., 2001).

Dentro de las técnicas de identificación molecular basadas en identidad del gen ARNr 16S, el uso de árboles filogenéticos permitió obtener una mayor certeza

en los resultados de identificación de las bacterias endófitas. El análisis del árbol filogenético se realizó para comprender la relación de esta bacteria con especies bacterianas similares, proporcionando un marco para poder entender las relaciones evolutivas que hay entre ellas. Con la comparación mediante BLAST, se relacionó las especies de los diferentes filos Bacillota y Pseudomonadota.

CONCLUSIONES

En la presente investigación desarrollada se concluye que:

1. Se determinó las comunidades bacterianas existentes en el receptáculo de las tres variedades de fruto de la fresa (*Fragaria ananassa*) presentes en los cultivos orgánicos de Cerro Blanco - Calana, Tacna, considerando el porcentaje de similitud (mayor de 97%), a través de técnicas metagenómicas obteniendo las siguientes especies: *Pantoea conspicua*, *Bacillus subtilis*, *Rosenbergiella epipactidis*, *Bacillus xiamenensis*, *Enterobacter mori*, *Priestia flexa*, *Clostridium perfringens*, *Tatumella ptyseos*, *Bacillus zanthoxyli* y *Bacillus wiedmannii*, concluyendo que *Pantoea conspicua* fue predominante en las tres variedades.
2. Se realizó el análisis bioinformático de las regiones V3-V4 de las secuencias de los genes ARNr 16S en las tres variedades de fresa, donde se ha revelado la presencia de comunidades bacterianas de los filos Bacillota, Bacteroidota, Cyanobacteriota y Pseudomonadota.
3. La variedad San Andreas indicó una mayor riqueza y diversidad (23 OTUs) de especies microbianas a comparación con las demás variedades.

RECOMENDACIONES

Basado en los resultados, se sugiere realizar investigaciones adicionales para explorar las funciones metabólicas específicas de las bacterias identificadas y su impacto en las propiedades organolépticas en las fresas de Cerro Blanco-Calana, Tacna.

Además, se recomienda a los agricultores considerar la implementación de prácticas agrícolas que fomenten comunidades bacterianas beneficiosas para optimizar la calidad en diferentes variedades de fresa, en la región de Tacna.

Finalmente, este conocimiento, va servir para investigaciones futuras, desarrollar estrategias específicas para la agricultura sostenible a nivel nacional y/o regional y el manejo eficaz de enfermedades por diferentes hongos patógenos en la fresa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarez, M., Tucta, F., Quispe, E., y Meza, V. (2018). Incidencia de la inoculación de microorganismos benéficos en el cultivo de fresa (*Fragaria* sp.). *Scientia Agropecuaria*, 9(1), 33-42.

<https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.01.04>

Azizi, M.M.F, Ismail, S.I, Ina-Salwany, M.Y, Mohd Hata, E., y Zulperi, D., (2020). *The emergence of Pantoea species as a future threat to global rice production* [El surgimiento de las especies de *Pantoea* como una amenaza futura para la producción mundial de arroz.]. *Journal of Plant Protection Research*, 60(4), 327-335.

<https://doi.org/10.24425/jppr.2020.133958>

Barbé, S., Figàs-Segura, A., Benada, M., Navarro-Herrero, I., Sampaio, T. M., Biosca, E. G., y Marco-Noales, E., (2021). Selección y caracterización de bacterias asociadas a plantas con actividad antagonista frente a *Erwinia amylovora*. *IX Reunión del grupo Microbiología de Plantas-SEM (libro de resúmenes)*, 56.

<http://hdl.handle.net/20.500.11939/8135>

Barcelos Santiago, C. (2018). *Caracterización de las comunidades microbianas presentes en los sedimentos de Perdido y Coatzacoalcos del Golfo de*

México mediante análisis metagenómicos, [Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California].

<http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/2593>

Brady, C. L., Venter, S. N., Cleenwerck, I., Vandemeulebroecke, K., De Vos, P., y Coutinho, T. A. (2010). *Transfer of Pantoea citrea, Pantoea punctata and Pantoea terrea to the genus Tatumella emend. as Tatumella citrea comb. nov., Tatumella punctata comb. nov. and Tatumella terrea comb. nov. and description of Tatumella morbirosei sp. nov.* [Transferencia de *Pantoea citrea*, *Pantoea punctata* y *Pantoea terrea* al género *Tatumella* emend. como peine de *Tatumella citrea*. nov., peine de *Tatumella punctata*. nov. y peine de *Tatumella terrea*. nov. y descripción de *Tatumella morbirosei* sp. nov.]. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(3), 484–494.

<https://doi.org/10.1099/ijs.0.012070-0>

Chiqui Chiqui, F. A., y Lema Cumbe, M. L. (2010). *Evaluación del rendimiento en el cultivo de fresa (Fragaria sp.) variedad oso grande, bajo invernadero mediante dos tipos de fertilización (orgánica y química) en la parroquia Octavio Cordero Palacios, Cantón Cuenca*. Cuenca, Ecuador: [Tesis de Pregrado, Universidad Politécnica Salesiana].

<http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/4745>

- De Melo Pereira, G., Magalhães, K., Lorenzetti, E., Souza, T., y Schwan, R., (2012). Un enfoque multifásico para la identificación de bacterias endófitas en frutos de fresa y su potencial para la promoción del crecimiento vegetal. *Microbial Ecology*, 63(2), 405-417.
<https://doi.org/10.1007/s00248-011-9919-3>
- Del Campo-Moreno, R., Alarcón-Cavero, T., D'Auria, G., Delgado-Palacio, S. y Ferrer-Martínez, M., (2018). Microbiota en la salud humana: técnicas de caracterización y transferencia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 36 (4), 241-245.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.02.007>
- Dias, A. C., Costa, F. E., Andreote, F. D., Lacava, P. T., Teixeira, M. A., Assumpção, L. C., . . . Melo, I. S. (2009). *Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion*. [Aislamiento de bacterias endofíticas de fresa micropropagadas y evaluación de su potencial para promover el crecimiento vegetal.]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(2) 189-195.
<https://doi.org/10.1007/s11274-008-9878-0>
- Edgar, R. (2013) *UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads*. [UPARSE: secuencias OTU de alta precisión a partir de lecturas de amplicones microbianos]. *Nat Methods*, 10, 996-998.

<https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>

Eurosemillas. (2020). Fresas. San Andreas.

<http://www.eurosemillas.com/es/variedades/fresa/item/27-san-andreas.html>

Fialova, L., Romanovska, D., y Marova, I. (2020). *A Comparative Study of Some Procedures for Isolation of Fruit DNA of Sufficient Quality for PCR-Based Assays*. [Un estudio comparativo de algunos procedimientos para el aislamiento de ADN de fruta de calidad suficiente para ensayos basados en PCR]. *Molecules*, 25 (18).

<https://doi.org/10.3390/molecules25184317>

Huang, T., Qin, K., Yan, Y., Zhao, J., Liu, J., Duan, L., Dai, G., Zhang, B., y He, X (2022). *Bacterial community diversity on the surface of Chinese wolfberry fruit and its potential for biological control*. [Diversidad de comunidades bacterianas en la superficie de la fruta de goji china y su potencial para el control biológico.]. *Food Science and Technology*, 42.

<https://doi.org/10.1590/fst.93422>

Hughes, J. B., Hellmann, J. J., Ricketts, T. H., y Bohannan, B. J. (2001). *Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity*. [Contando lo incontable: enfoques estadísticos para estimar la diversidad microbiana.]. *Applied and environmental microbiology*, 67(10), 4399–4406.

<https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4399-4406.2001>

Khalifa, A., (2020). *Chapter 14 - Enterobacter*, [Capítulo 4- Enterobacteria], *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*, 259-270.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00014-9>.

Li, W., y Chang, Y., (2017). *CD-HIT-OTU-MiSeq, an Improved Approach for Clustering and Analyzing Paired End MiSeq 16S rRNA Sequences* [CD-HIT-OTU-MiSeq, un enfoque mejorado para agrupar y analizar secuencias de ARNr MiSeq 16S de extremos emparejados.] *J. Craig Venter Institute, California*.

<https://doi.org/10.1101/153783>

Liu, Z., Zhou, J., Li, Y., Wen, J., Wang, R., (2020). *Bacterial endophytes from Lycoris radiata promote the accumulation of Amaryllidaceae alkaloids*, [Los endófitos bacterianos de *Lycoris radiata* promueven la acumulación de alcaloides de Amaryllidaceae.]. *Microbiological Research*, 239,

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126501>.

López-Valencia, D., Sánchez-Gómez, M., Acuña-Caita, J. F., y Fische, G. (2018). *Propiedades fisicoquímicas de siete variedades destacadas de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivadas en Cundinamarca (Colombia), durante su maduración*. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 19(1), 147-162.

https://doi.org/10.21930/rcta.vol19_num1_art:528

- Lorenzi, A.S., Bonatelli, M.L., Chia, M.A., Peressim, L, y Quecine, M.C., (2022). *Opposite Sides of Pantoea agglomerans and Its Associated Commercial Outlook*. [Lados opuestos de *Pantoea agglomerans* y su perspectiva comercial asociada]. *Microorganisms*, 10(10):2072.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10102072>
- Lorenzo, F., Torres, P., Bertó, R., Orihuel, E., y Sanz-Puig, M. (2018). Metagenómica aplicada a la industria alimentaria. en A. Bordons, J. Bautista-Gallego, M. Portillo, y A. Mas, *Nuevas tendencias en Microbiología de alimentos*, 150-151. Tarragona: XXI Congreso Nacional de Microbiología de Alimentos.
- Lukša, J., y Servienė, E., (2020). *White mulberry (Morus alba L.) fruit-associated bacterial and fungal microbiota*. [Microbiota bacteriana y fúngica asociada al fruto de morera blanca (*Morus alba* L.)]. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, 28 (4), 183-191.
<https://doi.org/10.3846/jeelm.2020.13735>
- Mancilla, J. L., (2019). Análisis del metagenoma bacteriano de la rizosfera de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) en suelos de alta fertilidad y degradado en huando, Huancavelica. [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional de Huancavelica].
<https://apirepositorio.unh.edu.pe/server/api/core/bitstreams/c502f962-254e-4b04-bb11-58bd0c5c2f37/content>

- Mangui, J. (2006). Evaluación de la aplicación de tardigrados para reducir el desarrollo de bacterias fitopatógenas cultivadas *in vitro*. [Tesis de Maestría, Universidad Técnica de Ambato], 11-15.
<https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/22065>
- Marcano, D., (2008). El lado positivo de las bacterias. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 39(2), 63-65.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772008000200009&lng=es&tyng=es.
- Mauri, G., (2023). *Caratterizzazione del microbioma su mela, uva e fragola in postraccolta per l'individuazione di taxa microbici*. [Caracterización del microbioma en manzana, uva y fresa en poscosecha para la identificación de taxones microbianos] *Università Politecnica delle Marche*.
<https://hdl.handle.net/20.500.12075/14251>
- Mercado, J., (2015). Potencial agrobiotecnológico de endófitos bacterianos. *Avances en Microbiología*, 83-85.
<http://hdl.handle.net/10261/161238>
- Mignard, S., y Flandrois J.P., (2006). *16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment* [Secuenciación de ARNr 16S en la identificación bacteriana de rutina: un experimento de 30 meses] *Journal of Microbiological Methods*, 67 (3), 574-581.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.05.009>.

Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. (2008). *Estudio de la fresa en el Perú y el Mundo*. Lima: Dirección General de Información Agraria.

Moore, O., Ataga, A., y Ogbuji, N. (2022). *Comparative Bacterial Metagenomics of Soursop (*Annona muricata* L.) and Apple (*Malus domestica* B.)*. [Metagenómica bacteriana comparada de guanábana (*Annona muricata* L.) y manzano (*Malus domestica* B.)]. *Plant Science Today*, 9(4): 891–899.
<https://doi.org/10.14719/pst.1749>

de Moura, G., Barros, A., Machado, F., Martins, A., Silva, C., Durango, L., . . . Doria, J. (2021). *Endophytic bacteria from strawberry plants control gray mold in fruits via production of antifungal compounds against *Botrytis cinerea* L.* [Las bacterias endofíticas de las plantas de fresa controlan el moho gris en las frutas mediante la producción de compuestos antifúngicos contra *Botrytis cinerea* L.]. *Microbiological Research*, 251 .
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126793>

Mutiana, T. (2018). *Isolasi dan seleksi bakteri endofit pada akar dan batang tanaman strawberry (*Fragaria x ananassa*) Yang berpotensi sebagai agen antimikroba.* [Aislamiento y selección de bacterias endófitas en raíces y tallos de plantas de fresa (*Fragaria x ananassa*) que tienen potencial como agentes antimicrobianos.]. Purwokerto: [Tesis de Pregrado, Universitas Muhammadiyah Purwokerto].
<http://repositorio.ump.ac.id/id/eprint/7482>

- Nakano, M., (2018). 16S rRNA Gene Primer Validation for Bacterial Diversity Analysis of Vegetable Products [Validación del cebador del gen 16S ARNr para el análisis de la diversidad bacteriana de productos vegetales] *Journal of Food Protection*, 81(5), 848-859.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-346>.
- Olivera Gamero, S. (2016). *Evaluación de aversión al riesgo de los productores de Cerro Blanco en Calana-Tacna*. [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.]
<http://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/UNJBG/3037>
- Olivera Soto, J. (2012). Cultivo de Fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Programa nacional de innovación agraria en hortalizas – PNIH*.
<http://repositorio.inia.gob.pe/handle/20.500.12955/752>
- Perez, A. C., y Chamorro, L. (2013). Bacterias endofitas: un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario. *Revista Colombiana De Ciencia Animal - RECIA*, 5(2), 439-462.
<https://doi.org/10.24188/recia.v5.n2.2013.457>
- Pengroh, R., Thanyasiriwat, T., Sangdee, K., Saengprajak, J., Kawicha, P., y Sangdee, A. (2023). *Evaluation and Genome Mining of Bacillus stercoris Isolate B.PNR1 as Potential Agent for Fusarium Wilt Control and Growth Promotion of Tomato*. [Evaluación y extracción del genoma del aislado B.PNR1 de *Bacillus stercoris* como agente potencial para el control del

marchitamiento por *Fusarium* y la promoción del crecimiento del tomate.].

The plant pathology journal, 39(5), 430–448.

<https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.01.2023.0018>

Prüsse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B., Ludwig, W., Peplies, J., y Glockner,

F., (2007). *SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and*

aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. [SILVA: un

recurso integral en línea para datos de secuencias de ARN ribosomal

alineados y verificados de calidad compatibles con ARB.]. *Nucleic Acids*

Research, 35(21), 7188–7196.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkm864>

Purahong W., Orrú L., Donati I., Perpetuini G., Cellini A., Lamontanara A.,

Michelotti V., Tacconi G., y Spinelli F. (2018). *Plant Microbiome and Its*

Link to Plant Health: Host Species, Organs and Pseudomonas syringae pv.

actinidiae Infection Shaping Bacterial Phyllosphere Communities of

Kiwifruit Plants. [Microbioma vegetal y su vínculo con la sanidad vegetal:

especies hospedantes, órganos y Pseudomonas syringae pv. La infección por

actinidiae da forma a las comunidades de filosfera bacteriana de las plantas

de kiwi.]. *Frontiers in Plant Science*, 9.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01563>

Qadir, M., Hussain, A., Shah M., Hamayun M., Iqbal A., Irshad M., Khan Z., Islam

B., Elansary, H., Mahmoud E., y Lee, I., (2023) *Pantoea conspicua*

promoted sunflower growth and engulfed rhizospheric arsenate by secreting exopolysaccharide. [Pantoea conspicua promovió el crecimiento del girasol y envolvió el arseniato rizosférico mediante la secreción de exopolisacárido.]. Plant Physiology and Biochemistry, 201
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107826>.

Quispe Perez, J. I., y Orellana Trucios, J. L. (2017). *Influencia de dos abonos orgánicos inoculados con Trichocastle (Trichoderma harzianum, Trichoderma viride y Trichoderma virens) en el cultivo de fresa (Fragaria spp.) variedad Camarosa en el distrito de Oxapampa*. La Merced, Perú: [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión].
<http://repositorio.undac.edu.pe/handle/undac/689>

Ramírez Rodríguez, D. (2012). *Bacterias endofíticas aisladas de fresa (Fragaria x ananassa Dutch.) y su impacto sobre plantas de interes agrícola*. México, D.F: [Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional].
<http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/10613>

Ryan, R., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D y Dowling, D. (2008). *Bacterial endophytes: recent developments and applications* [Endófitos bacterianos: desarrollos y aplicaciones recientes.]. *FEMS Microbiology Letters*, 278 (1), 1-9.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00918.x>

- Rivera- Urbalejo, A., Vasquez, D., Fernández- Vásquez, J., Rosete-Enríquez, M., Cesa-Luna, C., Morales- García, Y., Muñoz Rojas, J., y Quintero- Hernández, V. (2021). Aportes y dificultades de la metagenómica de suelos y su impacto en la agricultura. *Acta Biológica Colombiana*, 26(3), 449-461. <https://doi.org/10.15446/abc.v26n3.85760>
- Sangiorgio, D., Cellini, A., Donati, I., Ferrari, E., Tanunchai, B., Sadubsarn, D., . . . Purahong, W. (2022). *Taxonomical and functional composition of strawberry microbiome in genotype-dependent*. [La composición taxonómica y funcional del microbioma de la fresa depende del genotipo.]. *Journal of Advanced Research*, 42, 189-204 <https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.02.009>
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., . . . Weber, C. F. (2009). *Introducing Mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities*. [Presentamos Mothur: software de código abierto, independiente de la plataforma y respaldado por la comunidad para describir y comparar comunidades microbianas.]. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7537- 7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Shen, Y., Zhang J., Nie, J., Zhang H., y Bacha, S. A. S., (2022). *Apple microbial communities and differences between two main Chinese producing regions*

[Comunidades microbianas de manzana y diferencias entre dos principales regiones productoras de China.]. *Food Quality and Safety*, 6

<https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyab033>

Shukla, A., Gupta, A., y Srivastava, S. (2023). *Bacterial consortium (Priestia endophytica NDAS01F, Bacillus licheniformis NDSA24R, and Priestia flexa NDAS28R) and thiourea mediated amelioration of arsenic stress and growth improvement of Oryza sativa L.* [El consorcio bacteriano (*Priestia endophytica* NDAS01F, *Bacillus licheniformis* NDSA24R y *Priestia flexa* NDAS28R) y la tiourea mediaron la mejora del estrés por arsénico y la mejora del crecimiento de *Oryza sativa* L.]. *Plant physiology and biochemistry*, 195, 14–24.

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.12.022>

Supo, J. (2014). Seminarios de Investigación Científica: Metodología de la Investigación para las Ciencias de la Salud. Vol. 2, Bioestadístico EIRL.

Sushma, B., Sagar, B., Triveni, S., y Devi, U.,(2020). *Isolation, Biochemical and Molecular Characterization of Endophytic Bacteria from Tomato (Lycopersicon esculentum Mill.)*. [Aislamiento, Caracterización Bioquímica y Molecular de Bacterias Endofíticas del Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)]. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 9(11), 2261-2271.

<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.911.271>

- Wang, B., Peng, H., Wu, W., Yang, B., Chen, Y., Xu, F., Peng, Y., Qin, Y., Fu, P., y Lu, J., (2021). *Genomic insights into biocontrol potential of Bacillus stercoris LJBS06*. [Conocimientos genómicos sobre el potencial de biocontrol de *Bacillus stercoris* LJBS06.]. *3 Biotech 11*, 458.
<https://doi.org/10.1007/s13205-021-03000-6>
- Wagh, M., Osborne, W., Sivarajan, S., y Benjamin, L., (2024). *Repurposing lead, nickel and cadmium resistant Bacillus xiamenensis VITMSJ3 in the effective inhibition of Spodoptera litura larvae: A mechanistic perspective*. [Reutilización de *Bacillus xiamenensis* VITMSJ3 resistente al plomo, níquel y cadmio en la inhibición efectiva de larvas de *Spodoptera litura* : una perspectiva mecanicista.]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 55.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102991>.
- Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., y Vargas-Albores, F. (2015). El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias marinas*. *41*(4), 297-313.
<https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>
- Vepškaitė-Monstavičė, I., Lukša, J., Stanevičienė, R., Strazdaitė-Žielienė, Ž., Yurchenko, V., Serva, S., y Servienė, E. (2018). *Distribution of apple and blackcurrant microbiota in Lithuania and the Czech Republic*. [Distribución de la microbiota de manzanas y grosellas negras en Lituania y la República

Checa.]. *Microbiological research*, 206, 1–8.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.004>

Zapata, C. G., Paladines, A., León, A. y Ramírez, D. X., (2022). Caracterización del microbioma de plantas de banano (*Musa × paradisiaca* L.) bajo sistemas de producción orgánico y convencional. *Sección B: Ciencias Biológicas y Ambientales*, 14 (2).

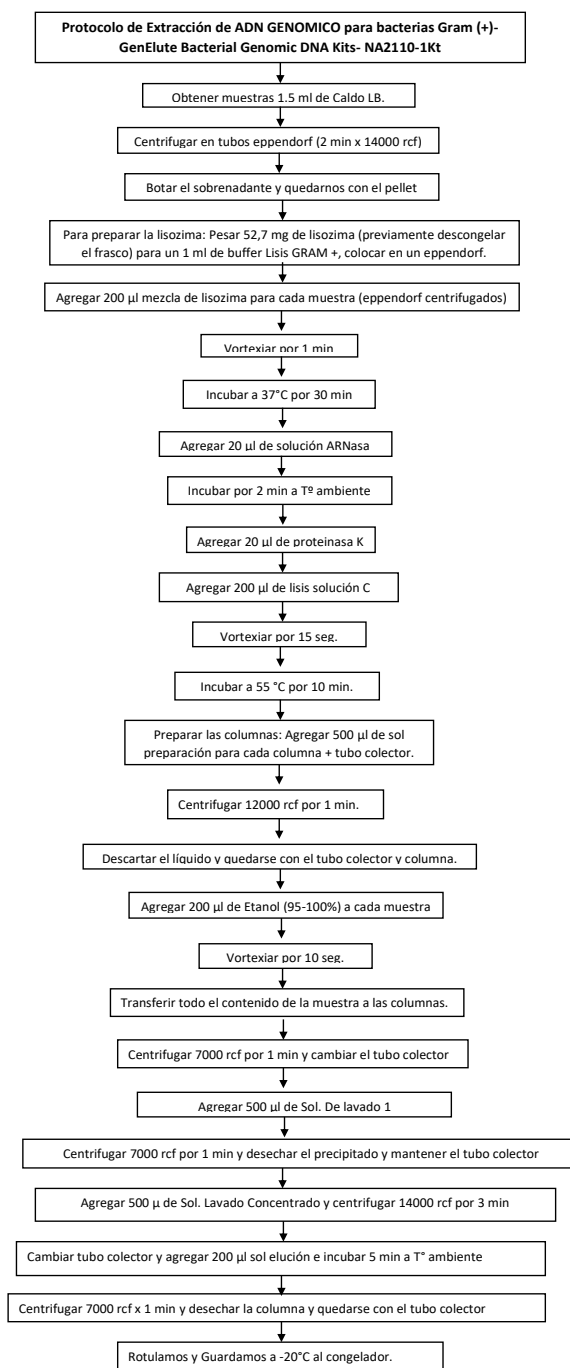
<https://doi.org/10.18272/aci.v14i2.2298>

ANEXOS

Anexo 1. *Geolocalización de la zona de muestreo, Cerro Blanco, Calana-Tacna.*



Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN genómico para bacterias Gram (+).



Anexo 3. Vista a la parcela de cultivos de fresa, donde se hizo el muestreo.



Anexo 4. Muestras de las tres variedades de fruto de fresa.



Anexo 5. *Proceso de trituración de muestras de cada variedad de fresa.*



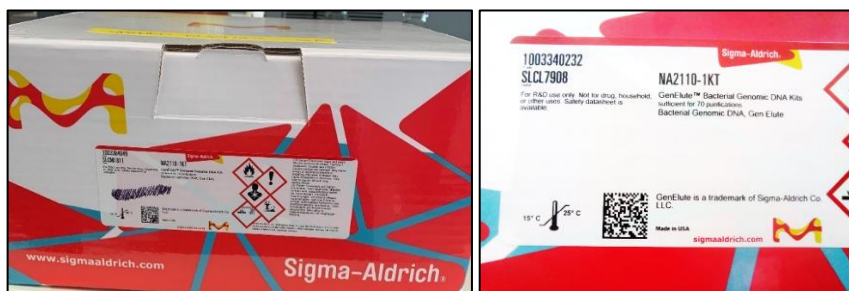
Anexo 6. *Sembrado de las nueve muestras de las tres variedades de fresa en Caldo BHI.*



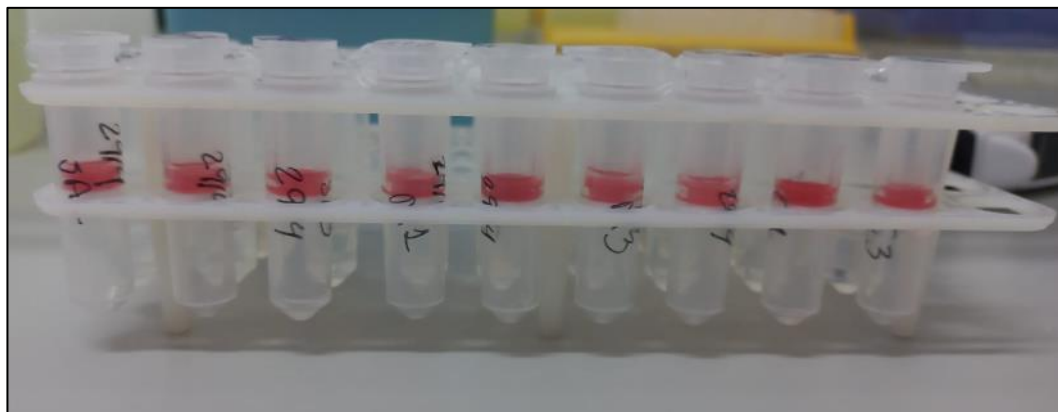
Anexo 7. Filtrado de los caldos BHI, después de 48 horas de incubación.



Anexo 8. Kit de ADN genómico bacteriano de 70 purificaciones, GenElute Bacterial Genomic DNA Kits- NA2110-1Kt.



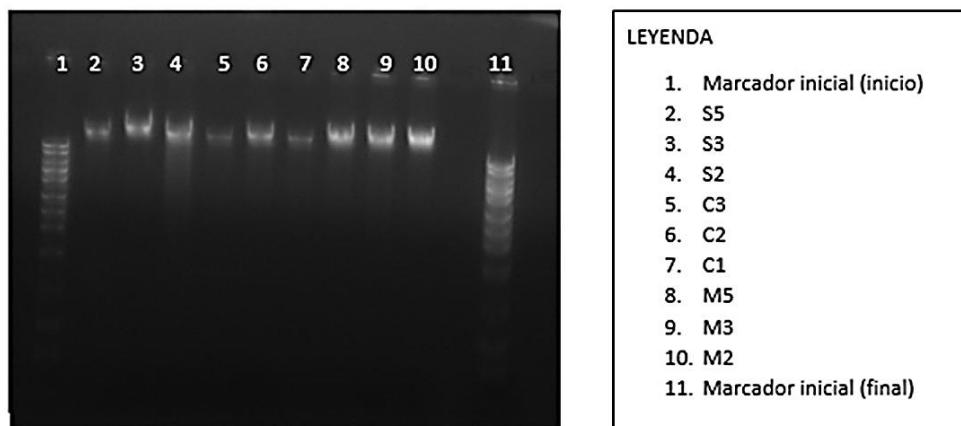
Anexo 9. Preparación de las nueve muestras para la extracción de ADN genómico.



Anexo 10. Electroforesis de las nueve muestras y una de control.



Anexo 11. *Observación de las nueve muestras en el fotodocumentador.*



Anexo 12. Secuencias Representativas (OTUs).

>denovo0 M2_8862
 CCTACGGGGGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGC
 AGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCG
 GGGAGGAAGGCGATGTGGTTAATAACCGCGTTCGATTGACGTTACCCGCAGAA
 GAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAG
 CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTAAAGTCA
 GATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAGGCT
 TGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 GATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACG
 CTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCGAGTAGTCC
Pantoea conspicua 839 839 100% 0.0 99.14% 1344 NR_116247.1

>denovo1 C2_8686
 CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
 AGCAACGCCGCGTGTAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTA
 GGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCA
 GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
 GCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCT
 GATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGA
 TGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
 AGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACG
 CTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCGAGTAGTC
Bacillus subtilis 850 850 100% 0.0 99.57% 1455 NR_181952.1

>denovo2 M2_100559
 CCTACGGGGGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGC
 AGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGTC
 AGGAGGAAGGGTGTGAAATTAATACTTTCATGCATTGACGTTACTGACAGAA
 GAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAG
 CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCA
 GATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCT
 TGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 GATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACG
 CTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCGAGTAGTCC
Rosenbergiella epipactidis 845 845 100% 0.0 99.36% 1501 NR_126303.1

>denovo3 C1_32579
 CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
 AGCAACGCCGCGTGTAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTA
 GGAAGAACAAGTGAAGAGTAACTGCTTGCACCATGACGGTACCTAACCCAG
 AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
 CGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTG
 ATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTT

GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 GATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACTGACGC
 TGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCGAGTAGTCC
Bacillus xiamenensis 850 850 100% 0.0 99.57% 1513 NR_148244.1

>denovo4 SA2_30037
 CCTACGGGGGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGC
 AGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCG
 GGGAGGAAGGTGTTGAGGTTAATAACCTCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAA
 GAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAG
 CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCG
 GATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCT
 AGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 GATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACG
 CTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCGAGTAGTCC
Enterobacter mori 845 845 100% 0.0 99.36% 1522 NR_146667.2

>denovo5 SA1_51088
 CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
 AGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTA
 GGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCCAG
 AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
 CGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTG
 ATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCT
 GAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 GATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAAGTACTGACGC
 TGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCGGTAGTCC
Priestia flexa 856 856 100% 0.0 99.79% 1529 NR_024691.1

>denovo6 C1_151540
 CCTACGGGGGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGG
 AGCAATGCCGCGTGGAGGTAGAAGGCCTACGGGTCGTGAACTTCTTTTCCCG
 GAGAAGAAGCAATGACGGTATCTGGGGAATAAGCATCGGCTAACTCTGTGCC
 AGCAGCCGCGGTAATACAGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGT
 AAAGCGTCTGTAGGTGGCTTTTTAAGTCCGCCGTCAAATCCCAGGGCTCAACC
 CTGGACAGGCGGTGGAAACTACCAAGCTGGAGTACGGTAGGGGCAGAGGGA
 ATTTCCGGTGGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGAAAGAACACCAACGGC
 GAAAGCACTCTGCTGGGCCGACACTGACACTGAGAGACGAAAGCTAGGGGA
 GCAAATGGGATTAGATACCCGAGTAGTCC
Potamosiphon australiensis 525 525 100% 1e-148 88.14% 1464 NR_177904.1

>denovo7 M2_1864
 CCTACGGGGGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGC
 AGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTCTTTGG
 GGAAGATAATGACGGTACCCAAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
 CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTATCCGGATTTACTGGGCGTAA
 AGGGAGCGTAGGCGGATGATTAAGTGGGATGTGAAATACCCGGGCTCAACTT
 GGGTGCTGCATTCCAAACTGGTTATCTAGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGGAAT
 TCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACACCAGTGGCGAA
 GGCGACTCTCTGGACTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAA
 ACAGGATTAGATACCCGGGTAGTC
Clostridium perfringens ATCC 13124 802 802 100% 0.0 99.55% 1513
 NR_121697.2

>denovo8 SA1_28238
 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGC
 AGCCATGCCGCGTGATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCG
 GGGAGGAAGGCGATGTGGTTAATAACCGCGTCGATTGACGTTACCCGCAGAA
 GAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
 CGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTG
 ATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTT
 GAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 GATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACG
 CTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA
Winslowiella toletana 593 593 100% 3e-169 90.91% 1508 NR_104828.1

>denovo9 M2_60000
 CCTACGGGGGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGC
 AGCCATGCCGCGTGATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCG
 GGGAGGAAGGCAGTCGTGTTAATAGCACGATTGATTGACGTTACCCGCAGAA
 GAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAG
 CGTTAATCGGAATTAAGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCG
 GATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCCGGGAAGTGCATTCGAAACTGGCAGACT
 AGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 GATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACG
 CTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA
Tatumella ptyseos ATCC 33301 808 808 100% 0.0 99.77% 1494
 NR_116283.1

>denovo10 C1_45042
 CCTACGGGGGGCAGCAGTGGGGAATCTTGGACAATGGGCGAAAGCCCGATCC
 AGCAATATCGCGTGAGTGAAGAAGGGCAATGCCGCTTGTAAGCTCTTTCGT
 CGAGTGCGCGATCATGACAGGACTCGAGGAAGAAGCCCCGGCTAACTCCGTG
 CCAGCAGCCGCGTAAGACGGGGGGGGCAAGTGTTCTTCGGAATGACTGGGC
 GTAAAGGGCACGTAGGCGGTGAATCGGGTTGAAAGTGAAAGTCGCCAAAAA
 GTGGTGGAATGCTCTCGAAACCAATCACTTGAGTGAGACAGAGGAGAGTGG
 AATTTTCGTGTGTAGGGGTGAAATCCGAAGATCTACGAAGGAAGGCCAAAAGC
 GAAGGCAGCTCTCTGGGTCCCTACCGACGCTGGAGTGCGAAAGCATGGGGAG
 CGAACGGGATTAGATACCCGGGTAG
Pseudorhodobacter turbinis 279 279 100% 9e-75 78.62% 1407
 NR_180364.1

>denovo11 SA1_39759
 CCTACGGGGGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
 AGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTA
 GGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAG
 AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
 CGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTGTTAAGTCA
 GATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAGGCT
 TGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 GATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAAGTACGCG
 TGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCA
Priestia megaterium 647 647 100% 0.0 93.20% 1495 NR_117473.1

>denovo12 SA1_47013
 CCTACGGGGGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGC
 AGCCATGCCGCGTGATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTCAGCG
 GGGAGGAAGGCGATGTGGTTAATAACCGCGTCGATTGACGTTACCCGCAGAA
 GAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAG
 CGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCT
 GATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGA
 ACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
 AGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAAGTACGCG
 CTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA
Winslowiella toletana 577 577 100% 3e-164 90.25% 1508 NR_104828.1

>denovo13 SA1_93349
 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGACGAAAGTCTGACG
 GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAAGTCTGTTGTT
 AGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAAGTCTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCA
 GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
 GCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCT
 GATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAGT
 TGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
 AGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGAC
 GCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA
Bacillus zanthoxyli 736 736 100% 0.0 96.83% 1438 NR_164882.1

>denovo14 SA1_16959
 CCTACGGGCGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
 AGCAACGCCGCGTGATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCG
 GGGAGGAAGGCGATGTGGTTAATAACCGCATTGATTGACGTTACCCGCAGAA
 GAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAG
 CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCT
 GATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAGT
 TGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
 AGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAAGTACG
 CTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCA
Peribacillus acanthi 553 553 100% 5e-157 89.46% 1434 NR_181206.1

>denovo15 SA2_48341
 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGC
 AGCCATGCCGCGTGATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCG
 GGGAGGAAGGTGCTGAGGTTAATAACCTCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAA
 GAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAG
 CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCT
 GATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAGT
 TGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
 AGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGAC
 GCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA
Enterobacter chuandaensis 625 625 100% 1e-178 92.27% 1528
 NR_180237.1

>denovo16 SA1_144490
 CCTACGGGCGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGC
 AGCCATGCCGCGTGATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCG
 GGGAGGAAGGCGATGTGGTTAATAACCGCATTGATTGACGTTACCCGCAGAA
 GAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAG
 CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTCTGTTAAGTCA
 GATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAGGCT
 TGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA

GATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAAGTACGACGC
 TGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCA

Flavobacterium acidificum 747 747 100% 0.0 97.28% 1432
 NR_104962.1

>denovo17 SA3_62117

CCTACGGGTGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGC
 AGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCG
 GGGAGGAAGGCGATGTGGTTAATAACCGCGTTCGATTGACGTTACCCGCAGAA
 GAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
 CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTG
 ATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTT
 GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 GATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGACGC
 TCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA

Winslowiella toletana strain A37 566 566 100% 6e-161 89.80% 1508
 NR_104828.1

>denovo18 C3_170787

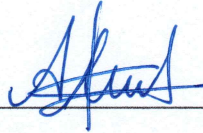
CCTACGGGGGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
 AGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAAGTCTGTTGTTA
 GGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCA
 GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
 GCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCT
 GATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACT
 TGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 GATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGAC
 TGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC

Bacillus tropicus 808 808 100% 0.0 99.77% 1509 NR_157736.1


>denovo19 SA1_161612

CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
 AGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAAGTCTGTTGTTA
 GGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCA
 AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
 CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCA
 GATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTAGGAACTGCATTTGAAACTGGCAGGCT
 TGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 GATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACG
 CTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA

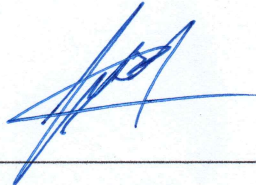
Oceanobacillus chironomi 575 575 100% 1e-163 90.29% 1471 NR_043700.1



Firma de Tesista
Alexandra Alferez Manrique



Firma de Asesor
Dr. Roberto Castellanos Cabrera



Firma de Co-Asesor
Dr. Alonso Roberto Poma Ticona