



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE *Pantoea* spp.
CAUSANTE DE LA FORMACIÓN DE AGALLAS EN RAÍCES DE *Gypsophila*
EN LA PROVINCIA DE PICHINCHA.

Autora

Valeria Dennisse Vaca Jaramillo

Año
2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE *Pantoea* spp.
CAUSANTE DE LA FORMACIÓN DE AGALLAS EN RAÍCES DE
Gypsophila EN LA PROVINCIA DE PICHINCHA.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología.

Profesor guía

M.Sc Carlos Andrés Bastidas Caldes

Autora

Valeria Dennisse Vaca Jaramillo

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Identificación bioquímica y molecular de *Pantoea* spp. causante de la formación de agallas en raíces de *Gypsophila* en la provincia de Pichincha, a través de reuniones periódicas con la estudiante Valeria Dennisse Vaca Jaramillo, en el semestre 201920, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Carlos Andrés Bastidas Caldes
Magíster en Microbiología Ambiental
CI: 0201619806

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Identificación bioquímica y molecular de *Pantoea* spp. causante de la formación de agallas en raíces de *Gypsophila* en la provincia de Pichincha, de la estudiante Valeria Dennisse Vaca Jaramillo, en el semestre 201920, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

María Alejandra Cruz Salazar

Magíster en Ingeniería de Bioprocesos y Biotecnología

CI: 1719928572

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

Alexander Javier Toaza Mora
Ingeniero en Biotecnología
CI: 1716389489

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

Valeria Dennisse Vaca Jaramillo

CI: 1723229934

AGRADECIMIENTOS

En especial, a mi madre por apoyarme en cada decisión y por su esfuerzo para ayudarme a alcanzar este sueño. A mis hermanos y a mi padre por apoyarme, guiarme, darme aliento siempre y por ese amor incondicional.

A los técnicos y amigos de AGROCALIDAD, especialmente a quienes conforman el laboratorio de Fitopatología: Hernando, Alex y Jairo, por su entera confianza, sabiduría y permitir la realización del presente trabajo.

DEDICATORIA

Se la dedico a la mujer más valiente, fuerte e inteligente que conozco, mi madre, por todo su esfuerzo y por estar siempre para mí apoyándome y ayudándome a conseguir mis sueños sin dejarme caer. Este y todos mis logros te los dedico a ti.

A mi padre, mis hermanos y mi sobrino Juan Diego, por su amor, ayuda e inspiración para luchar por mis sueños y mejorar día a día. Y porque me han enseñado que la distancia se vuelve corta cuando se ama.

RESUMEN

El cultivo de *Gypsophila* en el Ecuador ha crecido en los últimos años debido a la alta demanda de estas plantas ornamentales que son exportadas a diversos países generando ingresos económicos importantes ocupando el segundo lugar después de la rosa. Esta especie vegetal es atacada por varios organismos, una de las principales alteraciones es el apareamiento de agallas en la corona de su raíz lo que dificulta la absorción de nutrientes y un desarrollo normal. La bacteria *Pantoea agglomerans* ha sido identificada como la causante de esta enfermedad. Sin embargo, en el Ecuador no hay investigaciones sobre esta patología en estos cultivos por lo que se desconoce la o las especies de bacterias que la causan, por ende, no se posee tratamientos de control o preventivos por lo que existen pérdidas de este tipo de plantas en las florícolas del país. El objetivo del presente estudio es la identificación bioquímica y molecular de especies de *Pantoea* spp. presentes en las agallas de estas plantas para aportar información del estado fitosanitario de estos cultivos. Para esto se recolectaron ejemplares de *Gypsophila* que presentaban agallas y se aislaron bacterias de la zona afectada. La identificación bioquímica de las bacterias de *Pantoea* spp. se realizó por métodos tradicionales y mediante el sistema semiautomatizado BIOLOG. Se emplearon técnicas moleculares como PCR y secuenciación del gen 16S rRNA para la identificación molecular de especies. El análisis de secuencias permitió la identificación de *Pantoea ananatis*, *Pantoea hericii* y *Pantoea* sp. además de otras enterobacterias. Se compararon los resultados obtenidos con BIOLOG versus secuenciación y se concluyó que el sistema BIOLOG identificó correctamente hasta nivel de género en la mayoría de los casos. La secuenciación del gen 16S rRNA resultó más eficaz y preciso para la identificación de especies.

ABSTRACT

The cultivation of *Gypsophila* in Ecuador has grown in recent years due to the high demand of these ornamental plants that are exported to several countries, which generates a significant economic income that occupies the second place after the rose. This species of plant is attacked by several organisms, one of the main alterations is the appearance of galls in the crown of its root that hinders the absorption of nutrients and normal development. The bacterium *Pantoea agglomerans* has been identified as the cause of this disease. However, in Ecuador there is no research on this pathology in these crops, so there are no known species or bacteria that cause it, therefore, there are no control or preventive treatments, so there are losses of this type of plants in the floriculture of the country. The objective of the present study is the biochemical and molecular identification of *Pantoea* spp. present in the galls of these plants to provide information on the phytosanitary status of these crops. For this, samples of *Gypsophila* were collected with galls and bacteria were isolated from the affected area. The biochemical identification of *Pantoea* spp. was carried out by traditional methods and by means of the semi-automated BIOLOG system. Molecular techniques were used, such as PCR and the sequencing of the 16S rRNA gene for the molecular identification of species. The sequence analysis allowed the identification of *Pantoea ananatis*, *Pantoea hericii* and *Pantoea* sp. in addition to other enterobacteria. The results obtained were compared with BIOLOG versus sequencing and it was concluded that the BIOLOG system correctly identified up to the genus level in most cases. Sequencing of the 16S rRNA gene was more efficient and accurate for the identification of species.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema.....	6
1.3 Objetivo general:	7
1.4 Objetivos específicos:.....	7
1.5 Justificación	7
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1 Características de <i>Gypsophila</i>	8
2.2 Etapas de crecimiento	10
2.3 Enfermedades y plagas.....	12
2.4 Género <i>Pantoea</i>	13
2.5 Identificación de infecciones por <i>Pantoea</i> spp por sintomatología de la planta	14
2.5.1 Identificación de especies de <i>Pantoea</i>	15
2.5.2 Identificación bacteriana por métodos bioquímicos tradicionales .	16
2.5.3 Identificación por métodos moleculares.....	18
2.5.4 Sistema BIOLOG	19
2.6 Situación de <i>Gypsophila</i> en Ecuador.....	20
3 CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....	21
3.1 Diseño experimental.....	21
3.2 Implicaciones éticas y permisos.....	22
3.3 Población y área de estudio	23
3.4 Muestreo e identificación bacteriana.....	24
3.4.1 Toma de muestra.....	24
3.4.2 Aislamiento bacteriano	25
3.4.3 Purificación	25
3.4.4 Identificación por sistema BIOLOG.....	25
3.4.5 Identificación bioquímica por métodos tradicionales.....	26

3.4.6	Conservación bacteriana	26
3.4.7	Identificación molecular	27
3.4.8	Análisis estadístico y árboles filogenéticos	29
4	CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1	Identificación de síntomas de infección en <i>Gypsophila</i>	29
4.2	Aislamiento y purificación bacteriana	32
4.3	Identificación bioquímica por BIOLOG	33
4.4	Identificación por métodos bioquímicos tradicionales	36
4.5	Resultados de PCR y electroforesis	36
4.6	Análisis de secuencias rRNA 16S.....	39
4.7	Comparación y construcción de árboles filogenéticos.....	40
4.8	Especies de <i>Pantoea</i> identificadas	42
4.9	Comparación de resultados entre BIOLOG y secuenciación	43
5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	45
5.1	Conclusiones	45
5.2	Recomendaciones.....	45
	REFERENCIAS	47
	ANEXOS	59

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes.

El género *Gypsophila* es una especie vegetal perteneciente a la familia Cariofilaceae que crece adecuadamente en zonas cálidas y con exposición prolongada al sol debido a que requiere de 12 a 18 horas de fotoperiodo. Estas plantas requieren de un suelo calizo y bien drenado (Casierra, 2010). Son resistentes y de larga vida además de presentar floración perenne por lo que son muy usadas en arreglos florales y ocupan el segundo lugar, luego de la rosa, en exportaciones del país (Moreta, 2012).

En el Ecuador, se destinan varias hectáreas para su cultivo, 320 aproximadamente. En la provincia de Pichincha se encuentran 12 fincas productoras de *Gypsophila*, en Azuay se encuentran 3 y en Imbabura 3. Del total de la cantidad florícola exportada del Ecuador, el 8 % pertenece a las plantas de *Gypsophila*, lo que representa alrededor de 11200 cajas producidas semanalmente (Naranjo, 2010). Según Peñaherrera, director de ProEcuador, en el año 2018 la exportación hacia China de rosa y *Gypsophila* se elevó hasta 1700 toneladas, por lo que Ecuador pretende consolidarse como el principal país exportador y diversificar los mercados a los que se exporta (Yáñez, 2017).

Sin embargo, para la exportación, deben cumplirse ciertos requisitos dependiendo el país de arribo. Para países como Perú, Colombia, Argentina, Turquía, Corea del Sur, China, Australia, y Costa Rica es necesario contar con un certificado fitosanitario del país de origen, que, en el caso de Ecuador, la institución encargada de este proceso es la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario (AGROCALIDAD) (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca [MAGAP], 2014).

En 1930 se reportó por primera vez alteraciones en las plantas de *Gypsophila* por Brown (1934). Esta planta es atacada por una gran variedad de fitopatógenos que la infectan e impiden su normal desarrollo, como hongos, insectos, nemátodos y bacterias. Las principales afectaciones ocasionadas son

la pudrición de la corona (*Rhizoctonia solani*) y la generación de agallas en las raíces y corona (*Pantoea agglomerans*) (Chalupowicz, 2008). El primer microorganismo identificado por Brown como causante de las agallas fue *Bacterium gypsophilae* (Brown, 1934). Después se la clasificó como perteneciente al género *Agrobacterium* por su capacidad de generar agallas y se la denominó como *Agrobacterium gypsophilae*. Sin embargo, estudios posteriores descartaron que perteneciera a este género, mediante pruebas bioquímicas y estudios fenotípicos, se la reconoció como miembro de la familia Enterobacteriaceae (De Ley, 1966). En la década de 1974, Graham y Quinn identificaron al patógeno como *Erwinia herbicola*, bacteria que tiempo después, se la denominó *Pantoea agglomerans* (Manulis & Barash, 2003).

Algunas especies de *Pantoea* son patógenos oportunistas para humanos. En la década de 1970 existió un brote de septicemia por *Pantoea agglomerans* y *Enterobacter cloacae* en Estados Unidos y Canadá, en 378 pacientes que recibían productos intravenosos fabricados, contribuyendo a la muerte de 40 pacientes que tenían enfermedades mortales subyacentes. La causa fue cierres de botellas de líquidos de infusión contaminados (Maki, 1976). Desde entonces varios estudios han asociado la bacteriemia de *Pantoea agglomerans* con la contaminación de líquido intravenoso. De 53 casos pediátricos se aisló la bacteria de fluidos articulares, torrente sanguíneo, abscesos, tracto urinario y del peritoneo y tórax, siendo *P. agglomerans* una causa infrecuente de infección en niños. La infección generalmente ocurre al producirse lesiones con espigas o astillas de plantas infectadas (Cruz, 2007). Otros casos se ha reportado peritonitis causada por la misma bacteria en pacientes de diálisis peritoneal (Yang, 2017). También es responsable de infecciones urinarias (Collado, 2017).

Las relaciones filogenéticas de *Pantoea* son indispensables para la correcta identificación de especies, mediante análisis con el gen que codifica para 16S rRNA se demostró que *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis* y *Pantoea stewartii* están estrechamente relacionadas (Young & Park, 2007).

La tipificación y estudios de genética de poblaciones son precisos para fines epidemiológicos e identificar cepas con fenotipos sustanciales, por ello, es necesario determinar si las cepas de *Pantoea* difieren su capacidad de infectar a humanos o provocar patologías específicas en plantas (Delétoile, 2009). La tipificación de secuencias multilocus (MLST) es un método aceptado para el estudio de relaciones de tensión, que consiste en la secuenciación de varios genes codificantes de proteínas y permite comparar datos de todo el mundo (Maiden, 1998). Mediante este método se determinó las relaciones filogenéticas de *Pantoea*, de un total de 36 cepas, se mostró a 8 cepas altamente divergentes, las mismas que están estrechamente relacionadas con *Pantoea agglomerans*. Además, se evidencia la cercanía de especies de *Pantoea* con especies patógenas vegetales como lo son: *Erwinia amylovora*, y especies patógenas o patógenas oportunistas humanas como: *Yersinia pestis/pseudotuberculosis*, *Serratia liquefaciens*, *Hafnia alvei* (Figura 1) (Delétoile, 2009).

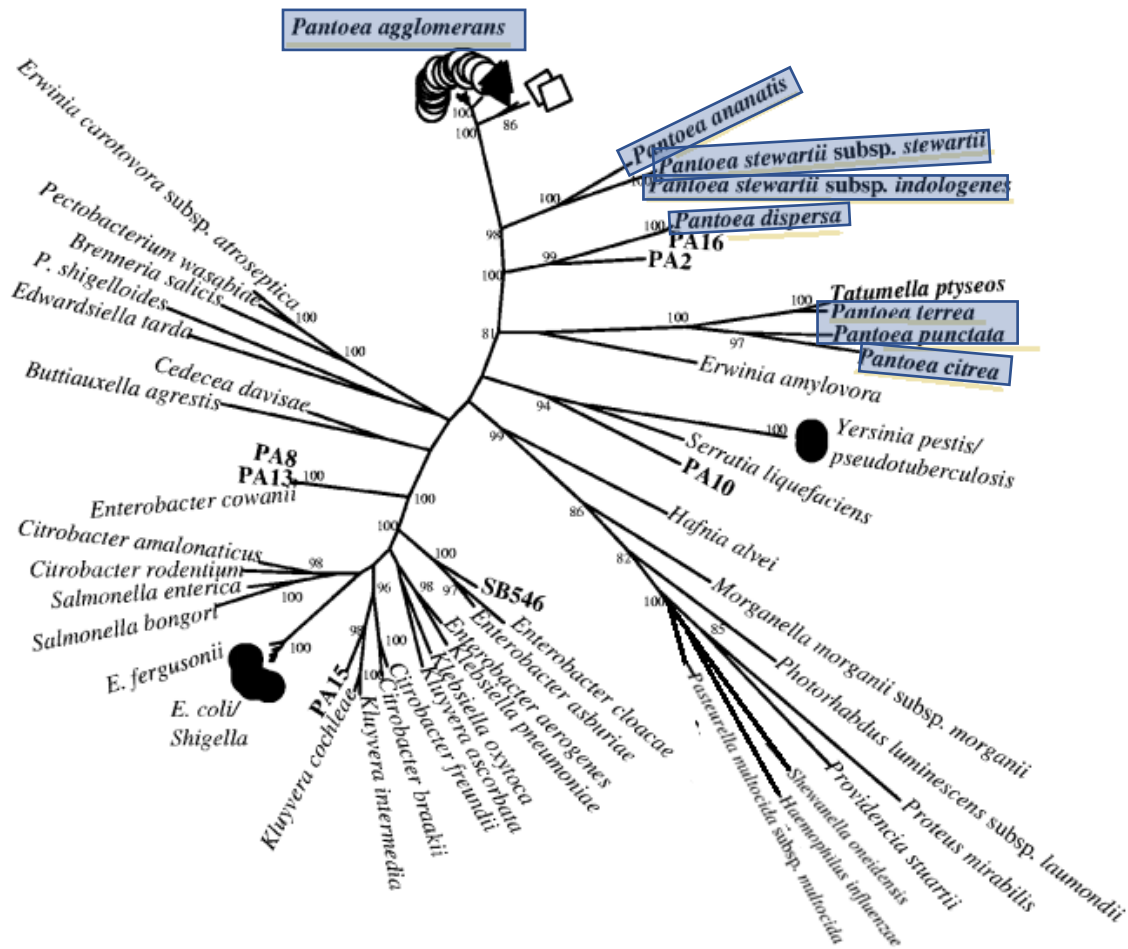


Figura 1. Árbol de máxima probabilidad de *Pantoea* y gamma proteobacterias.

Tomado de Delétoilel, (2009)

Construido con secuencias concatenadas de seis loci. Números en los nodos representan valores Bootstrap mayores al 80%. 1000 repeticiones. Encerrado en color azul se muestran las especies de *Pantoea*.

El género bacteriano *Pantoea* está conformado por 20 especies pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos Gram negativos anaerobios facultativos, forman colonias lisas enteras que pueden presentar color amarillento o dorado (Walterson & Stavrinides, 2015). Estas bacterias se encuentran en suelos, semillas, frutos, aguas, heces humanas o animales y en heridas infectadas y son patógenos oportunistas que pueden atacar a humanos y plantas (Cunningham & Leber, 2018). Algunas de las especies son

consideradas como fitopatógenas, sin embargo, otras son agentes de control biológico por su buena capacidad de solubilizar fósforo e incrementar el crecimiento vegetal (Cabrera & Zuaznábar, 2010).

Las agallas, signo predominante de la alteración de la planta, son acumulaciones o prominencias semejantes a tumores que presentan forma redondeada y se encuentran generalmente en la corona de la raíz (Kado, 2002). Son de color marrón y no presentan una consistencia resistente, al contrario, son frágiles. Esta agalla impide la normal absorción de nutrientes y agua, lo que causa déficit en su desarrollo, clorosis en hojas y son más propensas a infecciones por patógenos. Dentro de la agalla se produce necrosis y pudrición que avanzan por la planta, la cual se marchita y finalmente muere (Wolcan, 2007; Coronel, 2014).

En el Ecuador no existen reportes sobre especies de *Pantoea* que estén atacando a este cultivo. La aparición de agallas en las raíces de plantas de *Gypsophila* es relativamente nueva, por lo que se desconoce el causante y no se aplica tratamientos adecuados para su erradicación. A causa de las pérdidas las florícolas han mostrado interés en determinar que ataca a las plantas y se ha identificado a bacterias pertenecientes al género de *Pantoea*, sin embargo, se desconoce la especie. Este nuevo reporte de *Pantoea* en cultivo de *Gypsophila* alerta al país debido a que se desconoce el origen de la aparición de estas bacterias (Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario [AGROCALIDAD], 2018).

El Ecuador importa una gran cantidad de bulbos de esta planta para su cultivo y propagación. En el año 2016 las importaciones alcanzaron \$7.698,94 dólares de diversos países proveedores (Servicio Nacional de Aduana del Ecuador [SENAE], 2016). El principal país que exporta los bulbos o semillas al Ecuador es Holanda, seguido por Chile y Bélgica (Banco Central del Ecuador [BCE], 2016). Dado la gran cantidad de bulbos importados, el control fitosanitario antes de ingresar al país puede verse afectado, por lo que cabe la posibilidad de que la plaga bacteriana haya sido introducida al país, pese a los permisos

fitosanitarios de importación con los que se debe contar y ser tramitado (PROCHILE ECUADOR, 2017).

1.2 Planteamiento del problema.

Debido al incremento de la demanda de esta planta en los últimos años y el deseo de diversificar los mercados a los que se exporta, el cultivo de *Gypsophila* en el Ecuador ha crecido en diversas provincias al igual que el número de hectáreas cultivadas. Sin embargo, el índice de infecciones de los cultivos también se ha elevado. Una de las alteraciones más comunes que presentan las plantas son la presencia de agallas en sus raíces (Nissan, 2012). El porcentaje de pérdidas vegetales ocasionadas por las agallas antes mencionadas, puede llegar hasta el 90 % del cultivo, dependiendo de las condiciones de la florícola (Noreña, 2002). En otros casos este número puede ser menor, alrededor de 30 % de plantas infectadas (Barahona, 2012). El problema es que se desconoce el fitopatógeno que causa esto y no se ha establecido algún tratamiento, por ende, se pierden miles de plantas.

En el Ecuador no se han realizado las investigaciones necesarias, por lo que se desconoce los microorganismos pertenecientes a *Pantoea* spp. que puedan ser los causantes de las afecciones a este tipo de cultivo. Por tal razón, no se han desarrollado métodos de control y tratamientos preventivos, lo que deriva en el incumplimiento de las normas internacionales para medidas fitosanitarias que son un requerimiento de la Organización Mundial de Comercio, dificultando la exportación de estas flores (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación [FAO], 2018). Adicionalmente, ante la falta de información e investigaciones, AGROCALIDAD no cuenta con un registro actual de los microorganismos patógenos que atacan a este cultivo por lo que se dificulta la elaboración de un certificado fitosanitario, que es un requerimiento de varios países para exportar esta especie vegetal. Dentro de las Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias están establecidas disposiciones para análisis de riesgo de plagas y enfermedades, normas: NIMF N° 02 (Marco para el análisis de riesgo de plagas) , NIMF N°11 (Análisis de riesgo de plagas

para plagas cuarentenarias, incluido el análisis de riesgos ambientales y organismos vivos modificados) y NIMF N°21 (Análisis de riesgo de plagas para plagas no cuarentenarias reglamentadas), y certificados de exportación, norma NIMF N° 7 (Sistema de certificación para la exportación), mismas que se requieren para plantas de *Gypsophila* (Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias [NIMF], 2010).

1.3 Objetivo general:

- Identificar especies de la bacteria *Pantoea* spp. aisladas de agallas formadas en raíces de plantas infectadas de *Gypsophila* en la provincia de Pichincha.

1.4 Objetivos específicos:

- Aislar las bacterias presentes en las agallas de *Gypsophila* en medios de cultivo.
- Aplicar pruebas bioquímicas y moleculares para la identificación de especies de *Pantoea* spp.
- Comparar las secuencias y obtener una visión actual de la composición filogenética del género *Pantoea* descrito como patógeno de *Gypsophila*.

1.5 Justificación

La identificación de especies de *Pantoea* presentes en los cultivos de *Gypsophila* es de importancia para la implementación de medidas preventivas o tratamientos efectivos ante los fitopatógenos encontrados en este tipo de planta y de esta manera evitar pérdidas económicas importantes.

El presente estudio ayudará a comprender el estado actual de las infecciones del género *Gypsophila* ocasionadas por *Pantoea* spp. en el Ecuador. Pretende además, aportar a la creación de un certificado fitosanitario, elaborado por AGROCALIDAD, con el propósito de cumplir con los requerimientos establecidos por la OMC y NIMF para la factibilidad de exportar estas flores que representan un importante ingreso económico para el país.

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Características de *Gypsophila*.

Las flores de *Gypsophila* pueden ser simples o dobles y se encuentran en varios colores. Son plantas perennes que tienen un tallo principal que presenta aproximadamente ocho ramificaciones laterales, las cuales, según la variedad, posee varias flores pequeñas de color blanco generalmente. Tienen crecimiento rígido y elevado lo que facilita su corte (Gallardo, 2011). Alcanzan una altura de 1 metro aproximadamente. Sus hojas son de color verde grisáceo y de forma alargada. Su sistema radicular está compuesto por una raíz principal de la que se derivan secundarias (Armitage & Laushman, 2003).

La planta de *Gypsophila* es originaria de Asia y Europa, y se ha extendido a varios países, principalmente en el hemisferio sur, se ha incrementado su cultivo por la alta demanda, principalmente como complemento de arreglos florales y por su bajo costo de producción (Vélez, 2018). Esta especie vegetal crece adecuadamente en suelos alcalinos o sutilmente ácidos y requiere de un adecuado sistema de drenado para evitar la pudrición de su raíz por exceso de agua. Adicionalmente, debe contener materia orgánica, y alto contenido de magnesio y calcio. No requiere de altas cantidades de fertilizantes debido a sus bajas necesidades nutricionales (Avila & Pereyra, 2015).

Este cultivo requiere de varias horas de luz, entre 12 a 14 horas, y la temperatura óptima oscila entre los 11 °C (Gallardo, 2011). El riego depende de la edad del cultivo, en plantaciones nuevas se debe regar diariamente, en plantaciones maduras, dependiendo del clima, se puede regar cada dos o hasta tres días. Y es recomendable dejar secar entre riego y riego para evitar la aparición de agentes fúngicos (Orbe, 2012).

Para su propagación se parte de una planta madre; esta especie se reproduce asexualmente mediante estacas herbáceas. Para su plantación se requiere amplio espacio y debe dejarse un espacio de 30 cm entre planta y planta (Avila & Pereyra, 2015).

La especie más común es *Gypsophila paniculata*, alcanza 1 a 1,2 m de altura y florece frecuentemente, permitiendo alrededor de tres cortes al año. Presenta un sistema radicular completo con raíces principales que son carnosas y alcanzan hasta 3 cm de diámetro y raíces secundarias más delgadas. En su corona presenta varias yemas vegetativas, las cuales son usadas posteriormente para propagación y dar lugar a futuras varas florales (Armitage & Laushman, 2003). Otras especies de *Gypsophila* más cultivadas son: *G. elegans*, *G. repens* y *G. muralis*. Dentro de la especie *G. paniculata* se encuentran subvariedades como:

- Bristol Fairy, son de vida corta con floración doble. Son de color blanco y son usadas como flor cortada y para flores secas (Figura 2.A).
- Flamingo, presenta color rosa tenue. Son de doble floración y en veranos florece libremente. Se ve afectada fácilmente por condiciones climáticas adversas (Figura 2.C).
- Pink Fairy, flores dobles que presentan color rosa, crecen de 30 a 45 cm de altura formando montículos tupidos verticales (Figura 2.D).
- Golan, son de doble flor de color blanco brillante. Alta producción (Figura 2.F).

Gypsophila elegans, presenta grandes inflorescencias por lo que es utilizada como flor de corte, como complemento para ramos secos y se cultiva en otoño y primavera (Figura 2.B).

Gypsophila repens, son de color rosa o blanco que posee tallos de 20 cm, es una planta herbácea cespitosa, como su nombre lo indica, son rastreras por lo que se usan para tapizar murales o superficies (Figura 2.E).

Gypsophila muralis, de 5 a 15 cm de altura, con tallos abundantemente ramificados y flores de 5 pétalos enteros, presentan color rosa pálido.

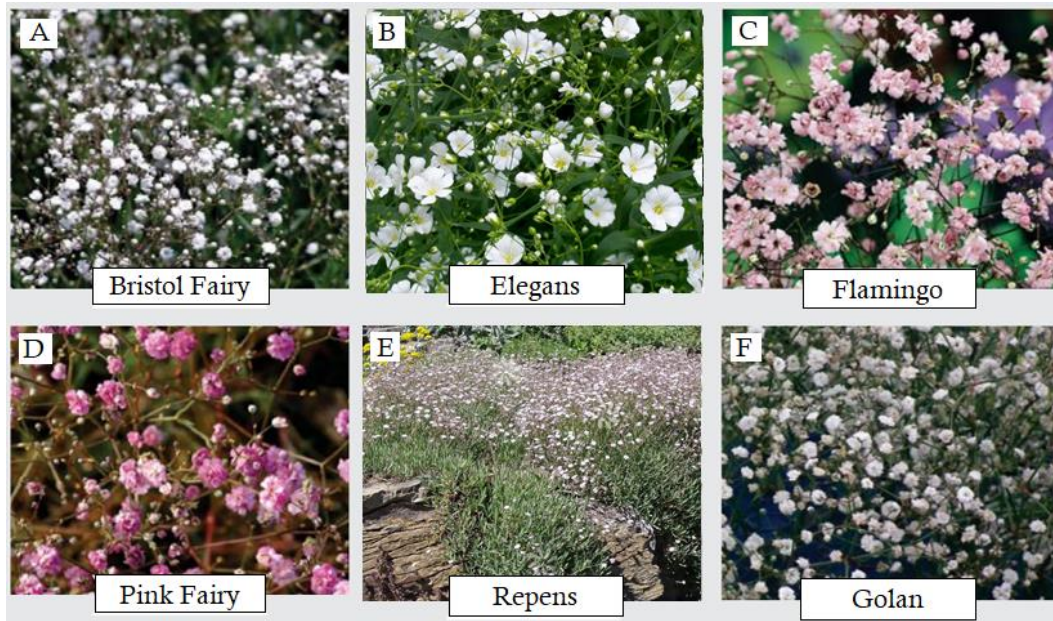


Figura 2. Variedades de *Gypsophila*.

Adaptado de Avila & Pereyra (2015).

- A. Muy productiva de precoz floración, pequeñas flores blancas semidobles.
- B. Flores de pétalo redondeado, ramas delgadas.
- C. Baja producción, de crecimiento débil presenta flores pequeñas de color rosa.
- D. Flores dobles de color rosado, tolerantes a sequías.
- E. Plantas rastreras con tallos de hasta 20 cm, presenta flores blancas o rosadas.
- F. Flores dobles brillantes de color blanco, muy productivas.

2.2 Etapas de crecimiento

Dentro del proceso de crecimiento de la *Gypsophila* se diferencian cuatro etapas (Figura 3):

1. Etapa vegetativa

En esta etapa brotan numerosas yemas con débil dominancia apical, ocurre en condiciones de bajas temperaturas y de días cortos, menos de 12 horas de luz. Es importante no estimular a la planta hasta que haya alcanzado un desarrollo vegetativo adecuado, entre 20 a 30 cm, ya que se producen varas de mala calidad (Figura 3.1).

2. Inducción floral

Cuando se estimula a la planta con más horas de luz, más de 13 horas, se induce la floración, la planta crece de manera horizontal para dar paso a los tallos que contendrán las flores (Figura 3.2).

3. Elongación

Empieza el crecimiento vertical y la elongación de los escapos florales. En otoño es la mejor época para obtener varas de buena calidad ya que los días son cortos por lo que los brotes se desarrollan adecuadamente en el estado vegetativo (Figura 3.3).

4. Floración

Los escapos finalmente florecen dando gran cantidad de flores, dependiendo la variedad. La floración se da a fines de primavera a otoño, permitiendo hasta tres cortes al año para su comercialización (Figura 3.4) (Avila & Pereyra, 2015).

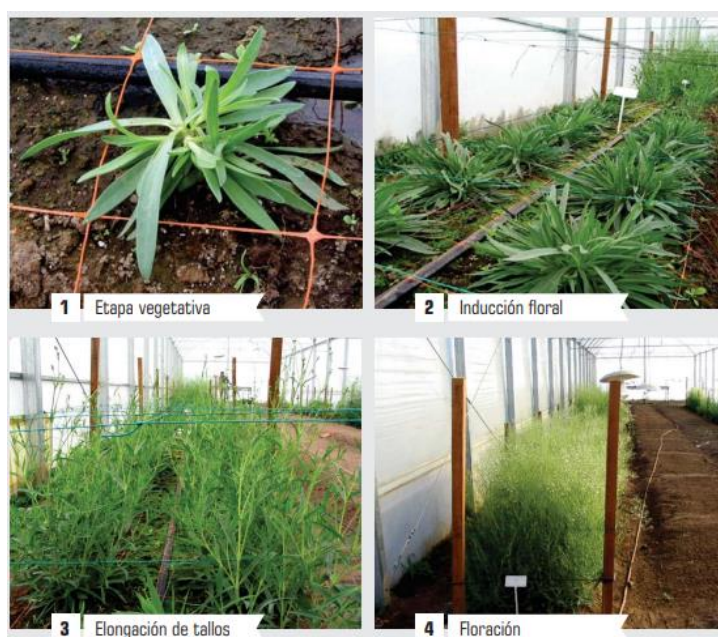


Figura 3. Etapas de crecimiento de Gypsophila.

Tomado de Avila & Pereyra, (2015).

1. Brotación de yemas con débil dominancia apical, en condiciones de días cortos.
2. Estimulación e inducción en condiciones de días largos, más de 13 h.
3. Crecimiento de escapos florales, de 60 a 120 varas/m².
4. Floración de numerosos botones florales, dobles o simples dependiendo la variedad.

2.3 Enfermedades y plagas

Las enfermedades más comunes en este tipo de planta son la generación de agallas en la raíz y corona y la pudrición de la corona (Chalupowicz, 2008). En el primer caso, se ha identificado a *Pantoea agglomerans* como agente causal en varios estudios previos. La agalla se presenta en la corona de la raíz y es de color marrón o amarillento, a diferencia de las agallas de *Agrobacterium* que presentan un color blanquecino (Manulis & Barash, 2003). Estas agallas causan podredumbre y marchitez de toda la planta. Las hojas de las plantas infectadas presentan etiolación o clorosis (Figura 4).

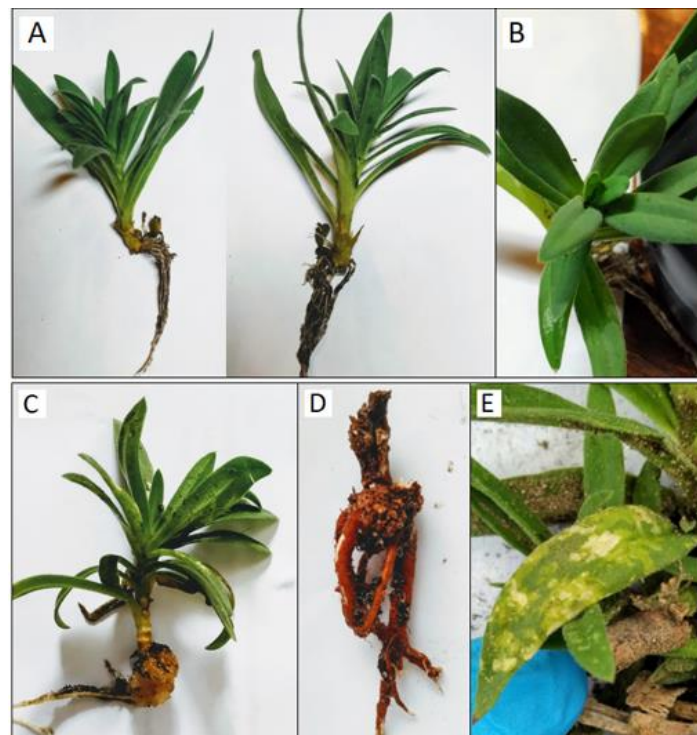


Figura 4. Sintomatología de la enfermedad de agallas en raíces de *Gypsophila*.

- A:** Planta sana sin la presencia de agallas en sus raíces,
- B:** Hojas sanas,
- C:** Planta enferma que presenta agalla café en la corona de su raíz,
- D:** Agalla color marrón en la corona de la raíz,
- E:** Hojas que presentan etiolación.

El exceso de agua es perjudicial para el cultivo ya que propicia el adecuado crecimiento de agentes fúngicos como *Rhizoctonia solani*, *Brotritys* sp., *Erysiphe* sp. los que ocasionan podredumbres y marchitamiento.

En cuanto a plagas como insectos, los depredadores más comunes de este cultivo son orugas, larvas de *Lyriomisa trifolii*, arañuelas rojas, saltamontes, gusanos de suelo, trips o áfidos y moscas blancas (Vélez, 2018). Estos organismos comen hojas, brotes, raíces y flores, ocasionando problemas de crecimiento debido a que reducen la superficie fotosintética de las hojas o infectando con virus a la planta (Avila & Pereyra, 2015).

2.4 Género *Pantoea*

Este género bacteriano abarca aproximadamente 20 especies con singulares características. Son bacilos Gram negativos no capsulados, son motiles, anaerobios facultativos y no forman esporas. Se encuentran en ambientes terrestres y acuáticos (Walterson & Stavrinides, 2015). Presentan una pigmentación amarillenta o dorada en sus colonias. Pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y sus especies se clasifican como patógenas o como agentes de control biológico (Nadarasah & Stavrinides, 2014). En plantas son capaces de generar marchitamiento, podredumbre, etiolación, antocianescencia, agallas y necrosis (Völksch, 2009). Por otra parte, algunas especies solubilizan adecuadamente el fósforo lo que estimula el crecimiento vegetal, también ayudan a controlar plagas en perales y manzanos, tienen alto potencial para biorremediación por su capacidad de degradar herbicidas, por estas razones, algunas de estas especies son usadas como control biológico en productos comerciales (Pileggi, 2012).

Las especies fitopatógenas han sido aisladas de diversos cultivos. Entre las más destacadas tenemos a:

- *Pantoea agglomerans*, considerada patógena en cultivos de: maíz, caña de azúcar, bambú, trigo, algodón, eucalipto, *Gypsophila*, arroz, remolacha; causando podredumbre, tizón bacteriano, agallas, raya roja, necrosis, tumores.

- *Pantoea allii*, aislada de cebolla que causa varios síntomas.
- *Pantoea ananatis*, infecta a cultivos de bambú, arroz, melón, cebolla, eucalipto, pasto, maíz y agave, ocasiona también necrosis, podredumbre, mancha foliar, tizón, entre otros.
- *Pantoea stewartii* se ha encontrado en cultivos de algodón, pasto, eucalipto y maíz, de la misma forma causa alteraciones similares a las especies anteriores.

A las especies bacterianas, se las clasifica como plagas cuarentenarias o no cuarentenarias, presentes o no. Una plaga cuarentenaria es aquella de importancia ambiental o económica que provoca efectos negativos sobre los cultivos y que ha sido introducida recientemente en el país o que tiene distribución limitada (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación [FAO], 2001). Dentro del género *Pantoea* la especie *Pantoea ananatis* es considerada plaga cuarentenaria no presente en el país hasta el año 2013 (Vizcaíno, 2013).

2.5 Identificación de infecciones por *Pantoea* spp por sintomatología de la planta

Las muestras vegetales infectadas deben presentar sintomatología en sus hojas, como etiolación o marchitez, una vez identificadas se revisa sus raíces las cuales deben presentar agallas color marrón, síntoma clave para su análisis (Figura 5).



Figura 5. Sintomatología de la planta de *Gypsophila* infectada.

- A. Marchitez general de la planta.
- B. Hojas con manchas blancas.
- C. Hojas con etiolación y marchitez en las hojas y tallos inferiores.
- D. Agallas marrones en las raíces dentro de los círculos rojos marcados.


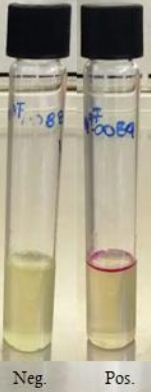
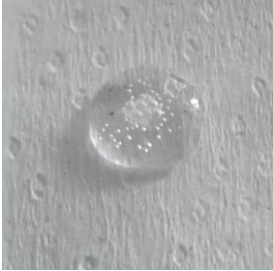

2.5.1 Identificación de especies de *Pantoea*





Para la identificación bacteriana de las posibles especies causantes de las alteraciones en la planta se requiere el aislamiento de las mismas en medios de cultivo. Las bacterias pertenecientes al género *Pantoea* crecen adecuadamente en agar nutritivo o en medios ricos en glucosa, su incubación debe ser a 30 °C por 24 h (Jain, 2012). Sus colonias son lisas con márgenes enteros y heterogéneos y presentan color translúcido amarillento al verlas a contraluz (Nadarasah & Stavrínides, 2014). No hay medios diferenciales o selectivos que sean específicos para las bacterias de este género y que permitan la identificación fenotípica directa, sin embargo, pueden crecer en medios selectivos de *Erwinia*, en medio Kado y Heskett D3, cambiando la coloración de verde a anaranjado/rojizo (Jiménez, 2007).

2.5.2 Identificación bacteriana por métodos bioquímicos tradicionales

Para la identificación bioquímica de estas bacterias se parte desde el cultivo del cual se seleccionan las colonias que presentan el color amarillento. Estas bacterias presentan las siguientes características bioquímicas (Tabla 1):

Tabla 1.
Características bioquímicas del género *Pantoea*.

Prueba	Reacción	Imagen
Gram	Negativa	
Indol	Negativa <i>Pantoea ananatis</i> : positiva (Delétoile, 2009)	
Catalasa	Positiva	
Lactasa	Positiva	

Oxidasa	Negativa	
Ureasa	Negativa	
TSI	Fermentan glucosa, sacarosa y lactosa No produce H ₂ S No produce gas	
Reducción de Nitratos	Positiva	

Adaptado de Mallaupoma, (2007)

2.5.3 Identificación por métodos moleculares

2.5.3.1 PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica molecular utilizada para amplificar una región de ADN específico. En este proceso intervienen enzimas como endonucleasas y ADN polimerasas, que cortan el ADN en secuencias específicas y catalizan la producción de ADN, respectivamente. También intervienen cofactores de la polimerasa como el cloruro de magnesio. El proceso requiere de cebadores, que son indispensables para determinar la región o fragmento de ADN que se va a amplificar y dar inicio a la reacción (Pérez, 2011).

La reacción de PCR para bacterias del género *Pantoea* consta de tres etapas:

- Desnaturalización, el objetivo es separar las cadenas de ADN, esto se lleva a cabo a 94°C por 5 minutos
- Templado, consta de 35 ciclos, 15 s a 94 °C, 15 s a 55 °C y 15 s a 72 °C. En esta etapa los cebadores se unen a la secuencia complementaria.
- Extensión, se mantiene los 72 °C por 5 minutos para que la Taq polimerasa amplíe los cebadores y se sintetice las nuevas cadenas de ADN (Ramírez, 2016).

Esta técnica permite la detección rápida y eficaz de microorganismos patógenos de animales, plantas, hongos, virus y bacterias (Delétoile, 2009).

2.5.3.2 Secuenciación

Esta técnica permite conocer el orden de los nucleótidos que componen la molécula de ADN, con el fin de conocer procesos biológicos, mutaciones o para la identificación de especies (Necochea & Canul, 2004). La pirosecuenciación es un método que permite conocer la secuencia de una molécula de ADN, esta técnica ha sido usada para ampliar la biblioteca de los genomas bacterianos secuenciados incluyendo cepas patógenas, además de identificar agentes potenciales, virales, protozoarios o bacterianos (Palomino & González, 2014).

Para secuenciación de cepas bacterianas primero se cuantifica el ADN en un Nanodrop (Ramírez, 2016).

2.5.4 Sistema BIOLOG

Otro método para la identificación bacteriana o fúngica es el sistema BIOLOG. Esta tecnología proporciona identificación a nivel de especie e información sobre las propiedades de la cepa ya que implementa diferentes fuentes de carbono, creando un patrón característico conocido como “huella dactilar metabólica”. La base de datos del sistema cuenta con más de 2900 especies entre bacterias, hongos y levaduras. Este sistema emplea distintas pruebas bioquímicas, con un total de 96 pocillos, entre los cuales se encuentra un control y varios sustratos (Ver anexo 1). El cambio de coloración de cada pocillo es proporcional al consumo de sustrato. Las placas GEN III son específicas para bacterias, las YT para levaduras y las placas FF para hongos. Para la inoculación se requiere del 93 al 95 % de bacteria, que se debe medir en un turbidímetro previamente calibrado. Una vez inoculados los 96 pocillos se incuban por 24 h y se coloca en el equipo para su lectura. El patrón de la “huella dactilar metabólica” se compara con la base de datos del sistema y provee la probabilidad y el nombre de la bacteria hasta especie, seguido de otras posibles especies con menor probabilidad (Newman, 2014).

El sistema detecta la coloración como positiva en color morado, intermedio en color celeste y la cantidad de consumo del sustrato y negativo como color blanco (Figura 6,B) (BIOLOG, 2018).

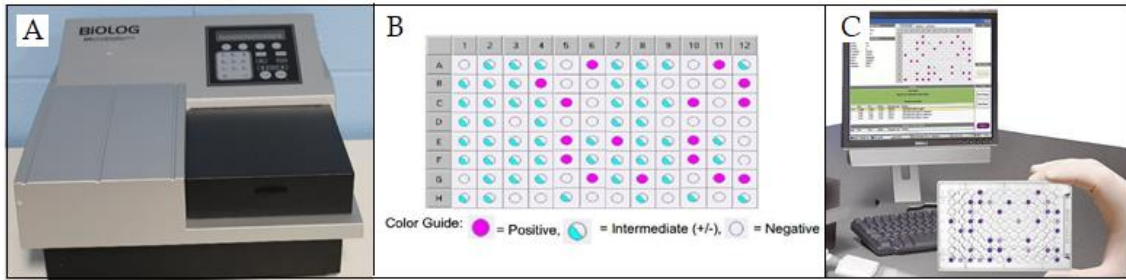


Figura 6. Sistema semiautomatizado de identificación microbiana.

- A.** Equipo BIOLOG para la identificación semiautomática de bacterias, hongos y levaduras.
- B.** Consumo de sustrato positivo en morado, intermedio en celeste y negativo en blanco, identificado por el equipo mediante absorbancia.
- C.** Comparación de la placa con la base de datos para la identificación de la especie mediante la huella dactilar metabólica.

La identificación de especies de *Pantoea* es indispensable, ya que afecta no solo a plantas si no a humanos, provocando fuertes bacteriemias. Asimismo, dentro del género se encuentra una especie cuarentenaria la cual se debe controlar y tomar las medidas establecidas en caso de estar presente en un cultivo (Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación [FAO], 2001). La identificación temprana de *Pantoea*, previene la propagación de la misma desde una planta madre a varios esquejes que luego son sembrados, evitando pérdidas y diseminación de plagas. Finalmente, alerta al país sobre la aparición de especies bacterianas antes no presentes y la implementación de medidas fitosanitarias tanto al ingreso de semillas y bulbos como también en los cultivos ya existentes en el Ecuador los que representan una fuente de ingreso para el país por las exportaciones a varios países (Orbe, 2012).

2.6 Situación de *Gypsophila* en Ecuador

Las flores de *Gypsophila* son la segunda planta más exportadas del país, luego de las rosas, que ha incrementado su número y países de destino en los últimos años. En el año 2017 la tasa aumentó en un 14 % lo que representa 186 millones de dólares de ingreso al país (Vélez, 2018). En el caso de China, en el año 2013 su demanda era de 1.29 millones pero en el año 2017 aumentó

esta cifra a 24 millones de dólares por lo que el Ecuador busca ser el principal exportador de este país por su alta demanda y potencialidad (Yáñez, 2017).

El porcentaje de pérdida de plantas por fitopatógenos o condiciones externas varía dependiendo la florícola, por sus condiciones de operación del sitio. En términos generales, en cada ciclo del cultivo la tasa de mortandad es aproximadamente del 2 % (Gallardo, 2011). Sin embargo, la aparición de nuevos patógenos en los cultivos eleva significativamente esta cifra. La enfermedad de agallas en la corona aumenta el porcentaje desde el 5 al 90 % lo que representa miles de plantas perdidas al igual que desperdicio de recursos como agua, fertilizantes, espacio y tiempo (Noreña, 2002).

3 CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1 Diseño experimental

Se realizó el esquema del diseño experimental de la presente investigación (Figura 7).

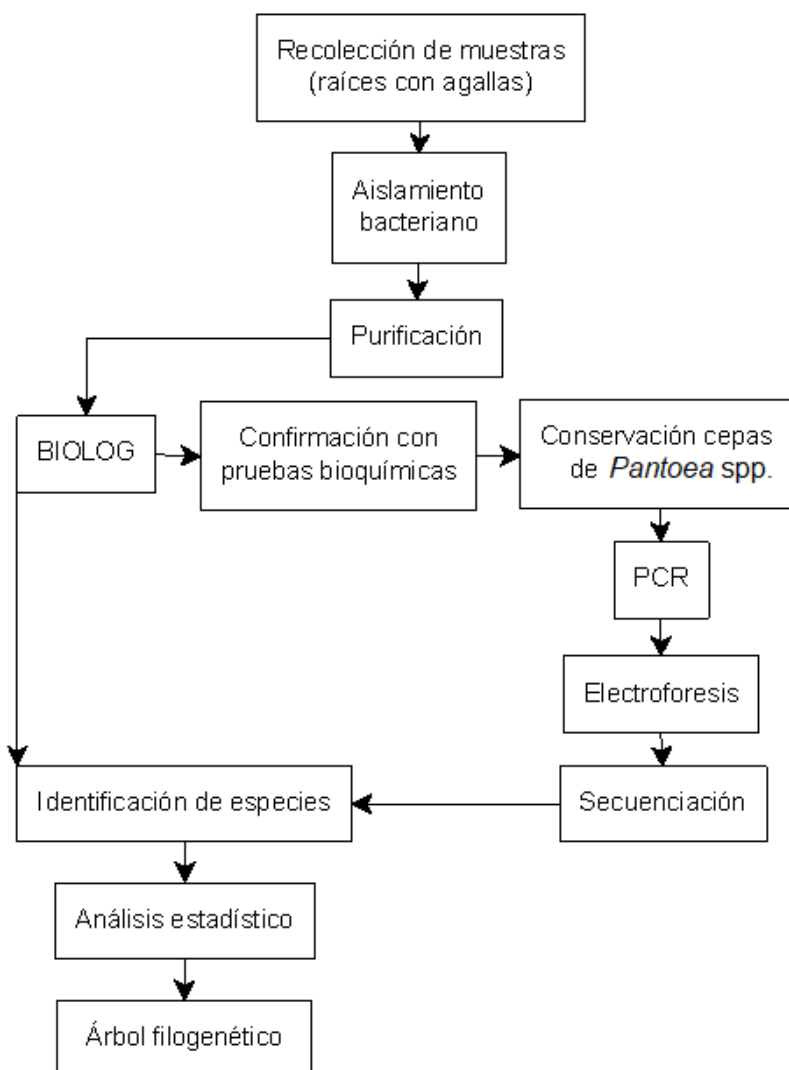


Figura 7. Esquema del diseño experimental del presente estudio.

3.2 Implicaciones éticas y permisos

La agencia de Agrocalidad por ser una entidad pública dedicada a la vigilancia e investigación epidemiológica y que busca impulsar, promover y orientar procesos de innovación tecnológica e investigación en el área de sanidad animal y vegetal, no requiere la suscripción de un Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos con el fin de cumplir con los objetivos institucionales determinados por la Ley Orgánica de Seguridad Agropecuaria, como se

establece en el Oficio Nro. MAE-DNB-2019-0451-O emitido por el Ministerio del Ambiente (Ver Anexo 2).

3.3 Población y área de estudio

Se empleó un muestreo no estadístico debido a que el objetivo de la investigación es la detección de especies pertenecientes al género *Pantoea* en cultivos de *Gypsophila*. El muestreo selectivo o dirigido que se utilizó en este estudio proporciona resultados válidos para establecer la presencia o ausencia del patógeno. Este método de muestreo consiste en seleccionar plantas infestadas que aumenten la probabilidad de detectar la bacteria en estudio. La muestra es dirigida y estadísticamente sesgada, por ende, no es posible hacer una afirmación probabilística sobre el nivel de infestación en el lote ya que el muestreo se enfoca en puntos donde la posibilidad de encontrar plagas es mayor que en el resto del lote. Este método es válido para investigaciones cuyo objetivo sea encontrar una plaga o fitopatógeno con repercusiones económicamente inaceptables también conocidos como plagas reglamentadas, y está establecido en NIMF N°31 (Metodologías para muestreo de envíos) (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación [FAO], 2008).

Dentro de la agencia AGROCALIDAD existe la dirección de Vigilancia Fitosanitaria que se encarga de vigilar y analizar los riesgos fitosanitarios y diseñar planes de contingencia para el control y prevención de problemas. Esta dirección realiza monitoreos a lo largo del año en varios cultivos y atiende denuncias de propietarios con problemas fitosanitarios. Dentro del Manual General de Cuarentena Vegetal se encuentran los procedimientos y principios destinados a la prevención y control de plagas (Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario [AGROCALIDAD], 2015). Las muestras recolectadas en esta investigación forman parte del tiempo establecido para su realización, desde enero hasta abril del presente año.

Las florícolas participantes son fincas tecnificadas que controlan diariamente el cultivo, por lo que el grado de incidencia de la plaga en estudio es baja. Cabe

recalcar que, se requiere del permiso de el o los propietarios para el muestreo dentro de la finca.

Se muestrearon cuatro florícolas ubicadas en la provincia de Pichincha, la primera finca fue Florsani que cuenta con 60 ha de cultivo destinado a *Gypsophila*, está ubicada en el cantón Pedro Moncayo en la parroquia Malchinguí; en el cantón Quito se muestrearon 3 fincas, 2 en parroquia El Quinche, la primera florícola fue Violeta Flowers con 12 ha y la segunda fue Savisa con 15 ha de cultivo. Finalmente, en Puéllaro se muestreó la florícola Piangoflor con 7 ha.

Muestra: De la parroquia Malchinguí se recolectaron 10 muestras de raíz que presentaban agallas, de plantas de *Gypsophila*. De la parroquia el Quinche se recolectaron 3 muestras de la primera florícola, tomando como muestra raíces de plantas marchitas pero que carecían de agallas en sus raíces; y 7 muestras de la segunda, raíces con agallas. De Puéllaro se recolectaron 10 muestras, 2 de plántulas usadas para propagación que presentaban agallas en la corona de la raíz, 2 muestras de plantas “nuevas” o en su primer ciclo de corte y 6 muestras de plantas “viejas” o en su segundo o tercer ciclo de corte, todas con la sintomatología estudiada.

3.4 Muestreo e identificación bacteriana

3.4.1 Toma de muestra

Se identificó en el cultivo, plantas que presenten marchitez o etiolación en sus hojas. Una vez identificadas se procedió a quitarlas del suelo con cuidado de no estropear sus raíces y se verificó la presencia de agallas marrones en ella. En caso de tenerlas, se quita parte de la planta que no sea necesaria como hojas y tallo y se envuelve en papel toalla. Se guardó la muestra en fundas ziploc selladas herméticamente, se etiquetó la muestra y finalmente se guardó dentro de un contenedor frío para su transporte a 4 °C. Las muestras fueron enviadas hacia el laboratorio de fitopatología en Tumbaco – AGROCALIDAD, para su posterior análisis (Agencia de Regulación y Control Flto y Zoosanitario [AGROCALIDAD], 2015).

3.4.2 Aislamiento bacteriano

De la muestra recolectada se identificó las zonas afectadas y las agallas presentes y se cortó esas secciones con una tijera anteriormente desinfectada, se colocó en un vaso de precipitación. Se realizó la desinfección de la muestra para eliminar saprófitos o microorganismos epífitos, se colocó hipoclorito de sodio al 2 % hasta cubrir la muestra y se agitó homogéneamente durante 1 minuto, después se realizaron 3 lavados con agua estéril para eliminar el hipoclorito sobrante, cada uno con agitación durante 1 minuto cada lavado según lo descrito por Ramírez-Rojas (2016) con modificaciones. Este proceso se repitió para cada muestra.

Se preparó la cámara de flujo laminar con todos los materiales necesarios para el aislamiento y las cajas con agar nutritivo, se esterilizó la cabina con UV por 5 minutos. Para el aislamiento se colocó 1 g de la muestra ya desinfectada en un mortero y se adicionó 18 mL de agua peptona, se maceró homogéneamente para permitir la liberación de las bacterias. Se realizó diluciones a la 1^{10} y 1^{100} tomando 1 mL de la muestra madre en tubos con 9 mL de caldo peptona. Posteriormente se colocó 100 μ L de muestra de cada dilución en el agar nutritivo, se realizó la siembra en superficie con asa de Drigalsky y se incubó por 24 h a 30 °C (Ramírez, 2016).

3.4.3 Purificación

Se identificó las colonias que presenten las características descritas del género *Pantoea* (Nadarasah & Stavrinides, 2014). Se realizó la purificación por estriado por agotamiento en nuevos medios de agar nutritivo y se incubó nuevamente por 24 h. La purificación es importante para la posterior identificación ya que, si no se encuentra en un cultivo axénico, en el sistema BIOLOG, PCR y secuenciación no es posible la identificación.

3.4.4 Identificación por sistema BIOLOG

Primero se calibró el turbidímetro para determinar la cantidad de bacteria con la que se trabajó. De un cultivo axénico se tomó una colonia y se inoculó en un

fluido gelificante IF específico para bacterias, se verificó en el turbidímetro que la densidad esté dentro de 93 al 95 %. Se inoculó la solución en MicroPlate® GENIII, 100 µL en cada pocillo. Se incubó por 24 h y se leyó en resultado en el equipo BIOLOG que proporcionó la especie con mayor probabilidad (BIOLOG, 2018).

3.4.5 Identificación bioquímica por métodos tradicionales

De cultivos purificados se realizaron diferentes pruebas bioquímicas. La tinción Gram se llevó a cabo según lo descrito por López (2014).

Para la prueba de indol se preparó el caldo compuesto por cloruro de sodio (5 g en 1000 mL) y triptófano (15 g en 1000 mL) se autoclavó el medio y una vez frío se inoculó una colonia con un asa. Se incubó por 24 h y luego se adicionó 5 gotas de reactivo de Kovac (Bou, 2011).

La prueba de catalasa se realizó en un portaobjetos donde se colocó una gota de peróxido de hidrógeno o agua oxigenada, con un asa se colocó una colonia y se mezcló suavemente observando la presencia o no de burbujas. Para el test de oxidasa se utilizó tiras impregnadas con reactivo para-amino-N-dimetil-anilina a las que se colocó una pequeña cantidad de bacteria con un asa y se observó el color generado (Mallaupoma, 2007).

Se inoculó la bacteria en el medio de cultivo Agar urea Christensen para la prueba de la ureasa y se observó la coloración después de su incubación. De igual manera se realizó para la prueba de TSI en medio S/D se inoculó y dejó incubar. Posteriormente se anotaron los resultados. Finalmente para la prueba de reducción de nitratos se inoculó el medio líquido y se dejó incubar por 24 h, posteriormente se colocó dos gotas de reactivo A y B y se observó la reacción (Bailón, 2003).

3.4.6 Conservación bacteriana

Una vez que se identificó las bacterias por métodos bioquímicos se conservó las cepas de *Pantoea* encontradas. Se tomó de un cultivo puro una cantidad de

bacteria con un palillo estéril y se inoculó en caldo nutritivo, se homogenizó la solución y se incubó por 24 h. Después se verificó el crecimiento bacteriano al ver turbidez en el medio y se colocó 1 mL del cultivo en viales estériles, se adicionó 1 mL de glicerol previamente autoclavado y se etiquetó con el código del laboratorio (Parra, 2006). Finalmente se conservó a -20 °C para su posterior análisis molecular.

3.4.7 Identificación molecular

La identificación molecular de especies de *Pantoea* se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de AGROCALIDAD.

3.4.7.1 Extracción ADN bacteriano

Se realizó la extracción del ADN bacteriano por lisis térmica. De las cepas conservadas se reactivó 1 mL en caldo nutritivo y se incubó por 24 h. Se colocó 2 mL del cultivo en tubos eppendorf y se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se selló con Parafilm el tubo según lo descrito por Cercenado (2005) con modificaciones. Se envió las muestras al laboratorio de biología molecular.

Para la extracción del ADN se resuspendió el pellet con 100 µL de agua libre de DNasa y RNasa, se homogenizó con vórtex y se colocó los tubos en un termobloque a 95 °C por 10 minutos con agitación. Se dio un toque con la centrifuga, se extrajo el sobrenadante y se eliminó el pellet. Posteriormente, se cuantificó el ADN extraído en un NanoDrop (Cercenado & Cantón, 2005). En caso de alta concentración se diluyó la muestra en relación 1:100 o 2:100.

3.4.7.2 PCR

Se usó un kit comercial de DNA de Invitrogen™, la enzima Taq Platinum y los cebadores F27 y R1492 para la amplificación de un fragmento del gen 16S rRNA. La reacción se realizó en un termociclador con un volumen final de 50 uL, siguiendo el protocolo del fabricante. La PCR se programó según Ramírez (2016) con modificaciones (Tabla 2). Se empleó agua ultrapura libre de

DNASas y RNAsas como control negativo y como control positivo el templado del genoma de *Clavibacter* sp y *Enterobacter* sp.

Tabla 2.
Perfil térmico de amplificación.

N° de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo min:seg
1	94	03:00
35 veces	94	00:45
	55	01:00
	72	01:30
1	72	08:00
1	10	∞

3.4.7.3 Electroforesis

Se preparó gel de agarosa al 1.5 % en 65 mL de buffer TBE 0,5X y se añadió 3 µL de SYBR Safe™, se calentó hasta la ebullición para homogenizar la solución. Se preparó la cámara de electroforesis, se vertió y se dejó solidificar el gel evitando la formación de burbujas. Después se dispensó el marcador molecular Low Mass Ladder™ y las muestras a analizar con Gel Loading Dye (6X)™ en cada pocillo. Finalmente se conectó de polo negativo al positivo a 110 voltios por 40 minutos según lo expuesto por Ramírez (2016) con modificaciones.

La visualización del gel amplificado se realizó en un transiluminador.

3.4.7.4 Secuenciación

Las bandas amplificadas fueron enviadas para su secuenciación a Macrogen y se analizó las secuencias obtenidas en Geneious Blast y MEGA para la identificación de especie.

3.4.8 Análisis estadístico y árboles filogenéticos

No se empleó un análisis estadístico ya que los resultados son cualitativos, sin embargo, se comparó los resultados obtenidos en el sistema BIOLOG con los resultados de secuenciación y se calculó el porcentaje de identificaciones correctas de cada uno.

Para la elaboración de árboles filogenéticos de las especies encontradas, se utilizaron las secuencias obtenidas y se eliminaron gaps. Se realizó el alineamiento de las mismas en el software *MEGA 7.0* con el algoritmo (*MUSCLE*), posteriormente se empleó el algoritmo *Neighbor-joining (NJ)* con 1000 repeticiones de Bootstrap y se generó un consenso de todos los árboles generados.

4 CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Identificación de síntomas de infección en *Gypsophila*

Las muestras recolectadas presentaron agallas en la corona de la raíz o en raíces principales. Éstas presentaban color marrón y consistencia frágil. Dentro de las mismas se observó pudrición que avanzaba por el tallo. Además, sus hojas mostraban etiolación o marchitamiento (Figura 8).

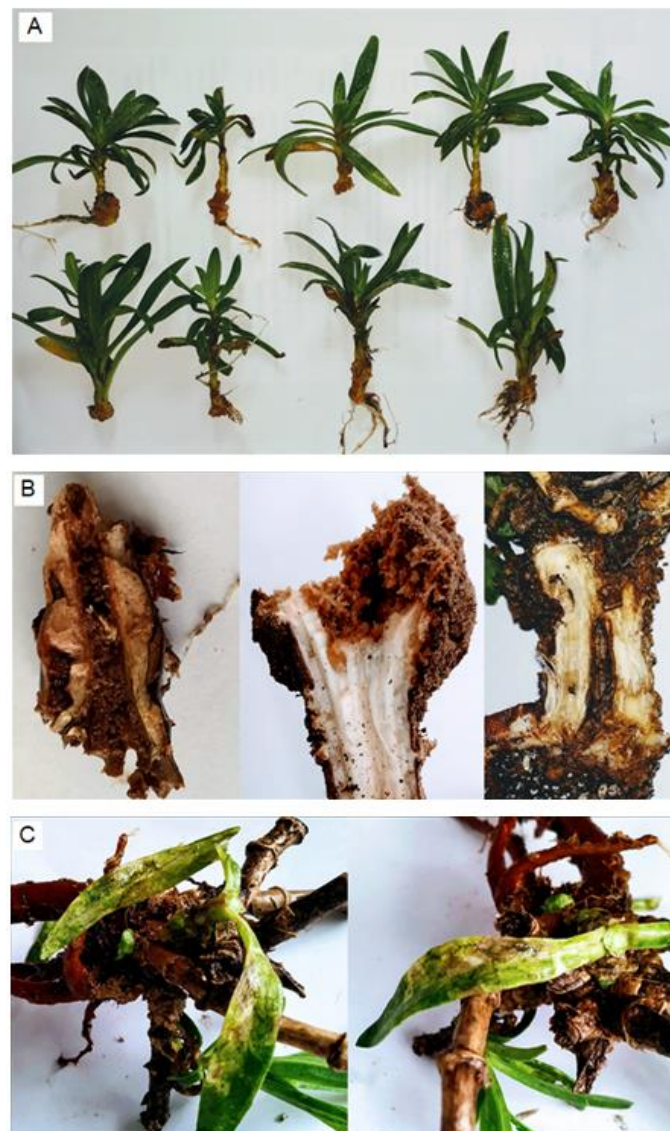


Figura 8. Sintomatología de las muestras recolectadas.

A: agallas presentes en la corona de la raíz de plantas para propagación.

B: necrosamiento interior de las agallas.

C: hojas con etiolación.

En la florícola Violeta Flowers no se encontró plantas con la sintomatología en estudio, sin embargo, se recolectaron plantas marchitas para su análisis y comparación de las bacterias aisladas con las que se encuentran en plantas que presentan agallas. La marchitez también es ocasionada por especies de *Pantoea* en cultivos como arroz, bambú, maíz y cebolla, donde se ha

identificado a *Pantoea agglomerans* y *Pantoea ananatis* como causantes y en cultivo de *Gypsophila* a *P. agglomerans* (Walterson & Stavrinides, 2015). En cuanto a la incidencia de esta patología en las florícolas muestreadas, se observó que varía dependiendo del control *in situ* y manejo interno de cada florícola. Según lo observado en el muestreo y lo determinado por la dirección de Vigilancia Fitosanitaria de Agrocalidad, la incidencia de la florícola Florsani es de 7 % y tiene un buen manejo del sitio de operación. La finca Violeta Flowers 1 % y buen manejo del sitio, las plantas son tratadas con soluciones fúngicas, según Cano (2011) hongos como *Trichoderma* spp. estimulan el crecimiento de la planta además de la supresión de enfermedades y brindan protección contra patógenos. Los hongos micorrícicos también mejoran el desarrollo y protegen a las plantas de susceptibilidad ante patógenos (Jaizme & Rodríguez, 2008). El antagonismo entre especies benéficas y patógenas es una alternativa en cuanto a tratamientos fitosanitarios en cultivos de interés (León, 2015). La florícola Savisa tiene incidencia de 8 % y su manejo del sitio es regular. Finalmente, la florícola Piangoflor fue la más afectada con 10 % de incidencia, su manejo del sitio es regular pues se observó amontonamientos de plantas muertas en varias zonas, lo que supondría un foco de infección (Figura 9). En general la incidencia no supera el 10 % debido al actuar oportuno de los técnicos de campo que implementan control cultural o ecológico y que eliminan las plantas afectadas.



Figura 9. Plantas de *Gypsophila* desechadas y amontonadas en la florícola Piangoflor.

4.2 Aislamiento y purificación bacteriana

Se aislaron bacterias desde las agallas presentes en las raíces de *Gypsophila* a agar nutriente, después de su incubación por 24 h, se observó el crecimiento de distintas cepas y se obtuvo >300 UFC en dilución 1:100. Se purificó las colonias que presentaron color dorado visto a contraluz y tamaño pequeño en agar nutriente mediante estriado por agotamiento obteniendo cultivos axénicos (Figura 10).

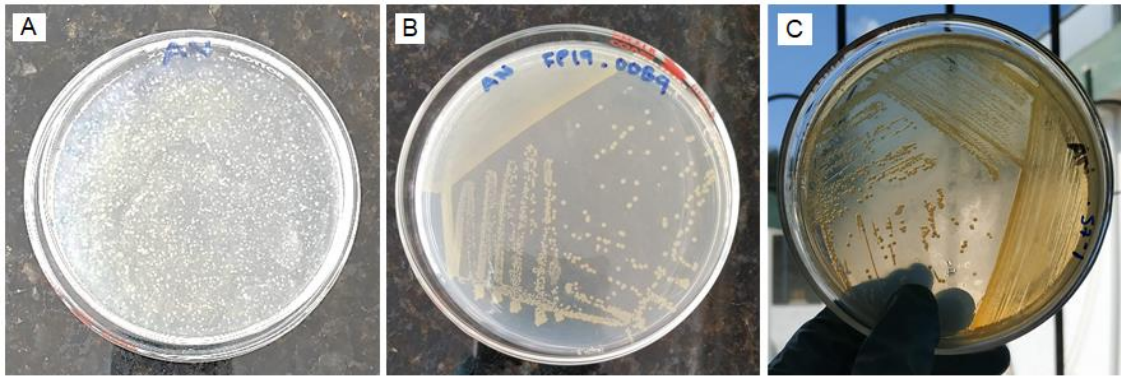


Figura 10. Aislamiento y purificación.

A: Dilución 1:100, >300 UFC,

B: purificación de posibles cepas de *Pantoea* spp.

C: vista de las colonias a contraluz que presentan color dorado o amarillento.

Puesto que en agar nutriente crecen todo tipo de microorganismos por su alto contenido de glucosa y nutrientes, la elección de la colonia a ser purificada puede confundirse con otra enterobacteria. La morfología de las cepas de *Pantoea* y *Enterobacterias* es bastante similar (Puerta & Mateos, 2010). Al no haber medios selectivos, la elección de la colonia por criterio del operador puede no ser acertada para especies de *Pantoea* (Jiménez, 2007).

4.3 Identificación bioquímica por BIOLOG

Después del tiempo de incubación de las placas GEN III inoculadas se visualizó cambio de coloración en los pocillos en relación con el consumo de sustrato (Figura 11). El sistema identificó la “huella metabólica” de cada muestra y la comparó con la base de datos dando un resultado (Ver anexo 3).

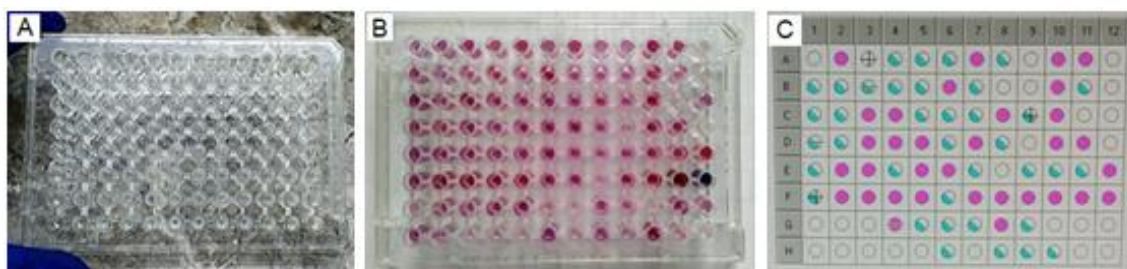


Figura 11. Placa GEN III.

A: placa inoculada con una cepa bacteriana al 93 %.

B: cambio de coloración de los sustratos después de 24 h de incubación.

C: patrón de la “huella dactilar metabólica” determinada por el equipo BIOLOG.

El sistema identificó especies de *Pantoea*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Kluyvera* y proporcionó la probabilidad de cada microorganismo al comparar la huella metabólica con la base de datos. Todas las especies identificadas tuvieron una probabilidad mayor al 50 % y la más alta alcanzó el 81 % de probabilidad de ser *Pantoea dispersa* (Tabla 3).

Tabla 3.

Especies obtenidas por el sistema BIOLOG y porcentaje de similitud.

Especie	No. Individuos	Probabilidad
<i>Pantoea agglomerans</i>	6	67%
		62%
		55%
		65%
		67%
		59%
<i>Pantoea dispersa</i>	2	81%
		52%

		65%
		59%
		56%
<i>Enterobacter cloacae</i>	7	67%
		64%
		55%
		65%
<i>Enterobacter amnigenus</i>	2	70%
		73%
<i>Enterobacter cowanii</i>	1	66%
<i>Kluyvera georgiana</i>	1	65%
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	1	55%

La precisión de identificación del sistema BIOLOG ha sido comparada en varios estudios contra diferentes metodologías. Bacterias atípicas de origen clínico fueron identificadas mediante BIOLOG y secuenciación del gen 16S rRNA, dónde la precisión de las identificaciones correctas fue de 68,3 % y 90,6 % respectivamente, determinando que la secuenciación del gen 16S rRNA es más eficiente en la identificación de organismos (Morgan, 2009). Otro estudio comparó el sistema BIOLOG y el sistema Vitek, para la identificación bacteriana de muestras de agua. Se evaluaron 41 aislamientos y se identificaron correctamente el 98 % para género y 59 % para especie con el sistema BIOLOG. En cuanto a Vitek se obtuvo una correcta identificación del 88 % para género y 78 % para especie. La identificación de algunas cepas de *Enterobacter*, *Serratia* y *Klebsiella* no fue confiable por lo que las identificaciones deben verse con cautela (Klingler, 1992). En otra investigación se utilizaron cepas de la familia *Enterobacteriaceae* y otras Gram negativas, de las 352 se identificaron 266 entre correctas e incorrectas. BIOLOG identificó correctamente el 79 % hasta género y 68,2 % hasta especie. Se requiere de mejoras en el software para que la identificación hasta especie sea más precisa (Miller & Rhoden, 1991).

Los resultados de esta investigación demuestran una correcta identificación a nivel de género del 80 %. Sin embargo, ninguna de las especies fue

identificada correctamente por BIOLOG. Esto se debe a la limitada cantidad de especies de *Pantoea* en la base de datos del sistema ya que cuenta con dos especies: *Pantoea agglomerans* y *Pantoea dispersa*. El bajo porcentaje de probabilidad proporciona una pauta para la necesidad de otro ensayo con el fin de obtener un resultado correcto para especies.

4.4 Identificación por métodos bioquímicos tradicionales

Todas las bacterias aisladas fueron bacilos Gram negativos, indol negativo a excepción de 10 cepas que dieron reacción positiva. Todas fueron catalasa y lactasa positiva, catalasa y ureasa negativa. Fueron fermentadoras de glucosa, no productoras de H₂S ni de gas y reductoras de nitrato.

Todas las bacterias presentaron los resultados esperados de su familia Enterobacteriaceae y género *Pantoea*, a excepción de las cepas que presentaron indol positivo. Sin embargo, la especie *Pantoea ananatis* es la única especie del género que es indol positivo, lo que concuerda con su identificación molecular (Delétoile, 2009).

4.5 Resultados de PCR y electroforesis

La reacción de PCR se realizó adecuadamente para la mayoría de las cepas bacterianas; en la electroforesis hubo la amplificación de las regiones deseadas.

Se obtuvo la amplificación de las muestras bacterianas aisladas de plantas de la florícola Florsani (muestras FP-19-0088 y FP-19-0089) y Piangoflor (FP-19-0382), alineadas al fragmento de 1500 pb según la escalera de pesos moleculares utilizada (Figura 12). El último carril (control) fue negativo lo que demuestra la correcta manipulación en el proceso.

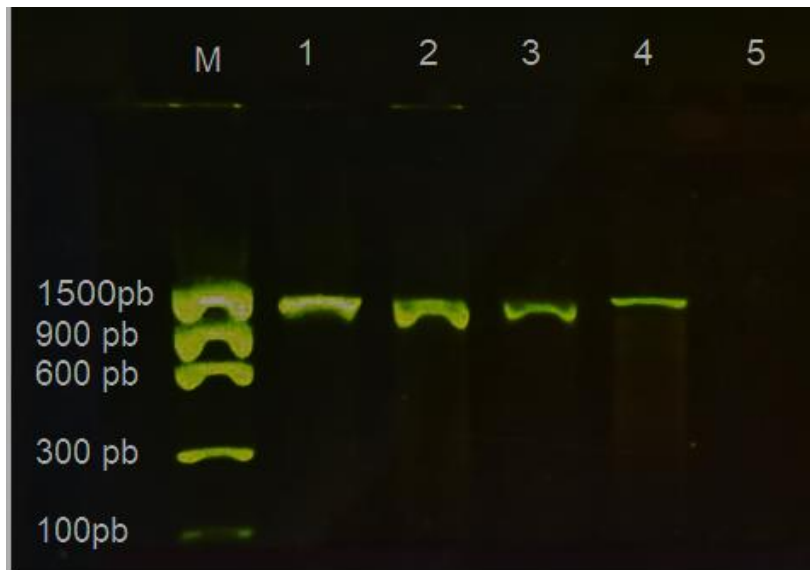


Figura 12. Electroforesis. Amplificación del gen 16S rRNA.

Distribución de los carriles:

M. marcador de peso molecular.

1. Control positivo (*Clavibacter* sp.).

2. muestra FP-19-0088.

3. muestra FP-19-0089.

4. muestra FP-19-0382.

5. Control negativo.

Otras muestras de la florícola Florsani amplificaron correctamente en los carriles 2-5. El carril 1 fue positivo y el carril 6 negativo lo que demuestra la correcta unión de los cebadores con el fragmento de ADN utilizado y la adecuada manipulación, debido a que eran los controles positivo y negativo respectivamente (Figura 13).

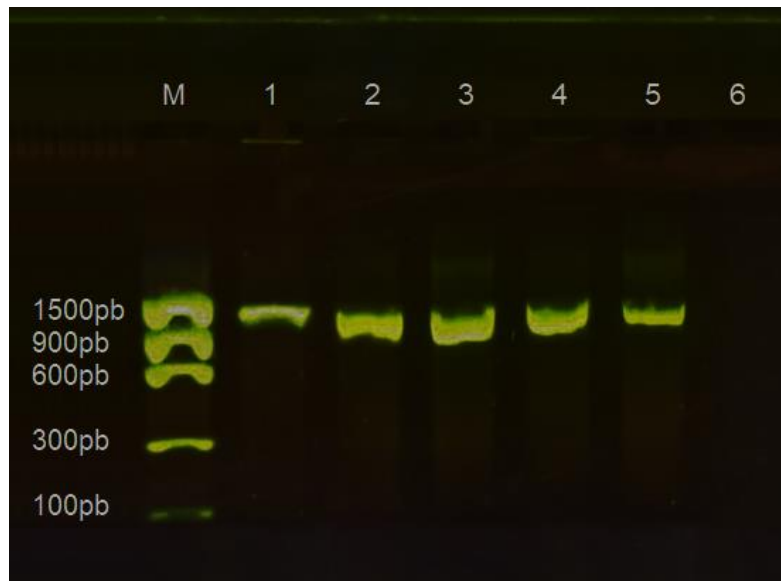


Figura 13. Electroforesis. Amplificación del gen 16S rRNA.

Distribución de los carriles:

M. marcador de peso molecular.

1. Control positivo (*Clavibacter* sp.).

2. muestra FP-19-1388(A).

3. muestra FP-19-1388(B).

4. muestra FP-19-0091.

5. Muestra FP-19-0092.

6. Control negativo.

Las cepas aisladas de plantas de la finca Savisa (FP-19-0195 y FP-19-0196) y de Florsani (FP-19-0086) amplificaron entre el fragmento 2072 pb y 1500 pb (Figura 14). Aquí se utilizó el templado del genoma de *Enterobacter* sp. como control positivo y el carril 5 fue negativo como se esperaba.

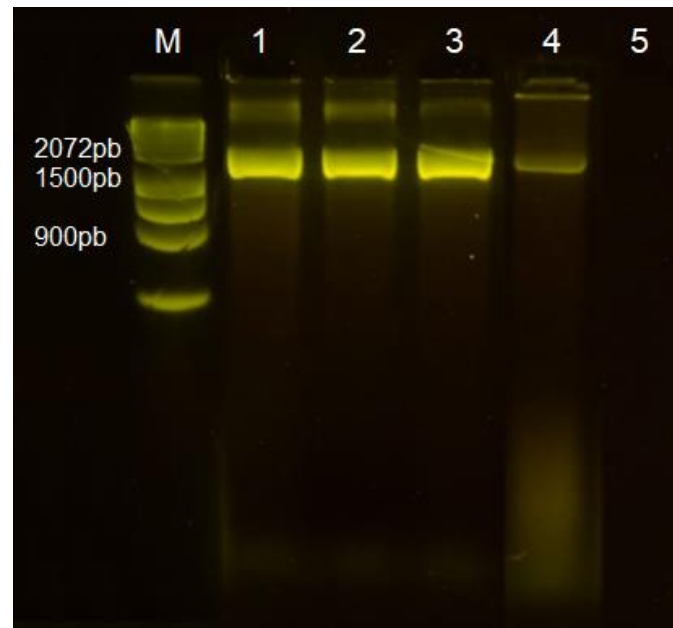


Figura 14. Electroforesis. Amplificación del gen 16S rRNA.

Distribución de los carriles:

M. marcador de peso molecular.

1. Control positivo.

2. muestra FP-19-0086.

3. muestra FP-19-0196.

4. muestra FP-19-0195.

5. Control negativo.

4.6 Análisis de secuencias rRNA 16S

Las muestras secuenciadas se analizaron con NCBI y se depuraron con el programa Geneious 9.0.2. Se identificaron 3 especies del género *Pantoea* con identidad mayor al 99 %, en todos los casos, con los organismos reportados. Las especies encontradas fueron: *Pantoea ananatis*, *Pantoea hericii* y *Pantoea* sp. Además, se identificaron especies de *Enterobacter*, *Lelliottia*, *Klebsiella* y *Atlantibacter* (Ver Anexo 4).

Todas las especies identificadas pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, que contiene varios géneros bacterianos que son patógenos de importancia para plantas, animales y humanos. De igual manera, en un estudio sobre

bacterias asociadas a plantas ornamentales identificaron especies patógenas que causan necrosis; la mayoría de las especies identificadas pertenecían a géneros de la familia de enterobacterias (Ramírez, 2016).

La eficiencia de la secuenciación del gen 16S rRNA representa un método rápido y confiable en la identificación de especies bacterianas con un porcentaje de precisión significativamente mayor que otros métodos convencionales como BIOLOG (Morgan, 2009).

4.7 Comparación y construcción de árboles filogenéticos

Se alinearon las secuencias en el programa MEGA. Se realizó un árbol filogenético de las especies de *Pantoea* identificadas (Figura 15). Se evaluó la cercanía entre especies y se determinó que entre las cepas de *Pantoea ananatis* identificadas, existe distancia genética entre algunas de ellas.

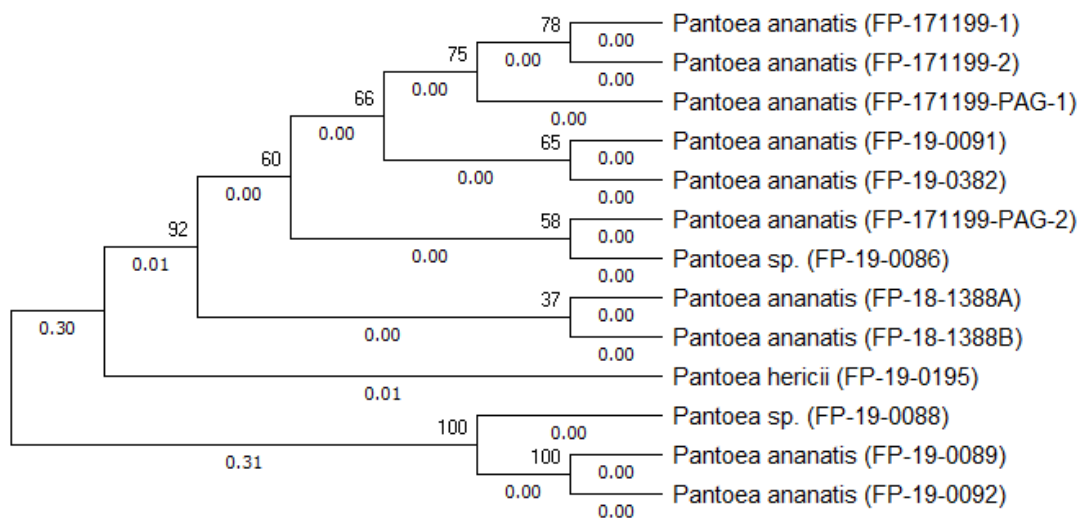


Figura 15. Árbol filogenético de *Pantoea*

Realizado con el programa MEGA con el algoritmo Neighbor-joining (NJ) con 1000 repeticiones de Bootstrap. Dentro del paréntesis se encuentra el código del laboratorio de cada muestra.

Se obtuvo un árbol filogenético de todas las especies identificadas mediante la secuenciación del gen 16S rRNA y se observó la distancia genética entre especies de *Pantoea* y la cercanía de algunas de estas especies con otras Enterobacteriaceae (Figura 16).

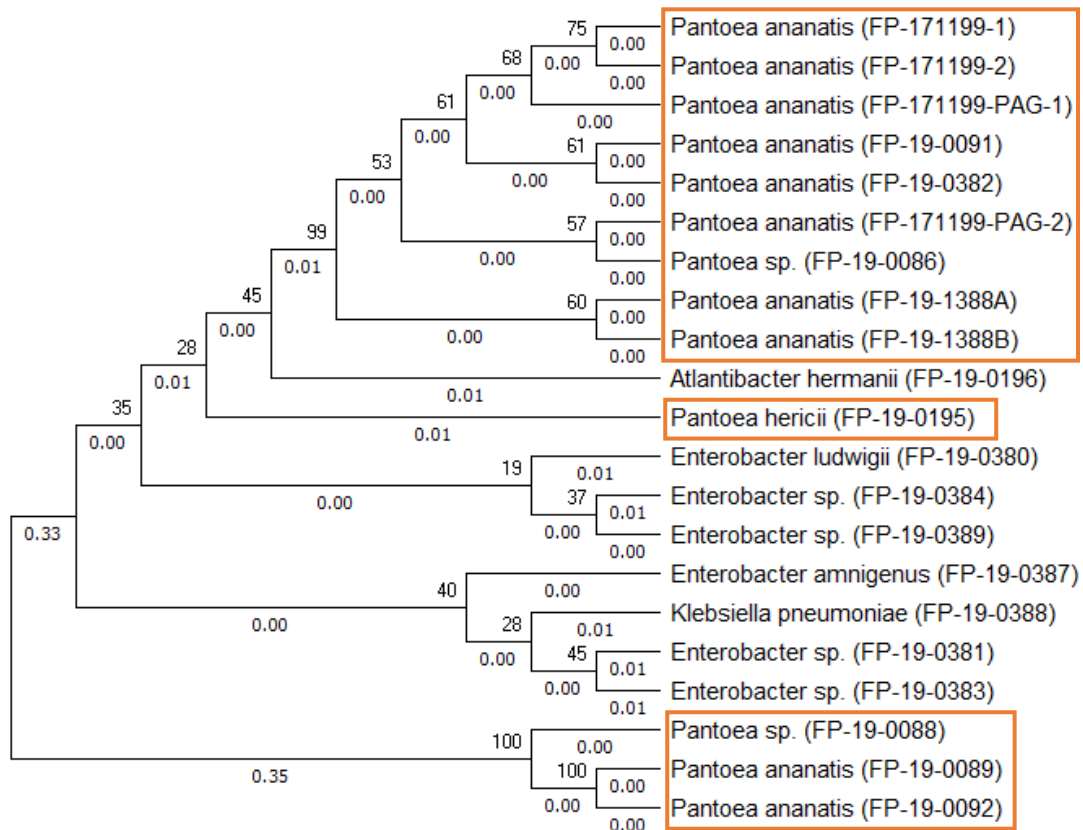


Figura 16. Árbol filogenético de las especies identificadas.

Realizado con el programa MEGA con el algoritmo Neighbor-joining (NJ) con 1000 repeticiones de Bootstrap. Las especies de *Pantoea* se encuentran encerradas dentro de un rectángulo naranja. Dentro del paréntesis se encuentra el código del laboratorio de cada muestra.

Varios estudios determinaron que el gen 16S rRNA no es confiable para el estudio filogenético para Enterobacteriaceae debido a que los análisis filogenéticos de patógenos de plantas variaron al incluir patógenos de animales donde los taxones cambiaron de ubicación. Varios bloques de las alineaciones del gen 16S rRNA eran altamente variables puntuados por regiones

conservadas. Concluyeron que el gen 16S rRNA es efectivo en la filogenia a nivel de familias. Sin embargo, a nivel de género de la familia Enterobacteriaceae la sensibilidad de las secuencias 16S rRNA tiene un desempeño menor (Naum, 2008). A pesar de estas desventajas la secuenciación del gen 16S rRNA es una herramienta importante para entender las comunidades bacterianas de diversos ambientes (Ortíz, 2017).

Las especies del género *Pantoea* pueden ser muy similares a especies de *Enterobacter* y *Kluyvera*. La cantidad de sitios filogenéticamente informativos es significativamente mayor con un análisis multilocus (MLST) de genes concatenados y conservados que únicamente con el gen 16S rRNA, por lo que el último no es muy preciso para determinación a nivel de especies (Delétoile, 2009).

4.8 Especies de *Pantoea* identificadas

La especie del género *Pantoea* identificada en la mayoría de las muestras fue *Pantoea ananatis* (Figura 17), esta especie causa podredumbre y ataca a cultivos como arroz, melón, cebolla, eucalipto y maíz entre los más destacados (Walterson & Stavrinides, 2015). Sin embargo, no hay reportes donde se haya aislado esta especie de cultivos de *Gypsophila*, si no a *Pantoea agglomerans* como la causante de agallas. Sin embargo, en un estudio filogenético de este género bacteriano, se determinó que *Pantoea* es un género heterogéneo y que las especies *P. agglomerans*, *P. ananatis* y *P. stewartii* están estrechamente relacionadas entre sí y que no parece haber ambigüedad en la diferenciación de estas especies. Adicionalmente compararon la identificación con el gen 16S rRNA y la secuenciación de los genes *fusA*, *gyrB*, *leuS*, *pyrG*, *rplB* y *rpoB*, y se observaron diferencias en cuanto a la posición de *Pantoea ananatis* con relación a *Pantoea agglomerans*. *P. ananatis* mostró una similitud de 16S rRNA atípicamente alta lo que llevó a pensar que el gen 16S rRNA experimentó transferencia horizontal entre estas dos especies. Estos resultados mostraron la importancia de utilizar múltiples secuencias de genes independientes para obtener información filogenética mejorada que con el gen 16S rRNA (Delétoile, 2009).

Especies de *Pantoea* identificadas

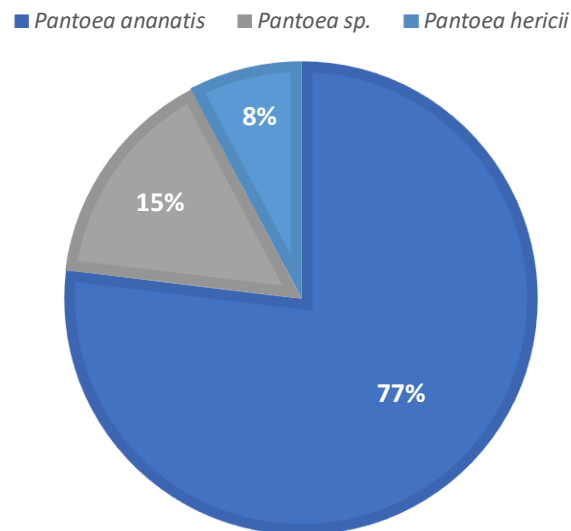


Figura 17. Porcentaje de especies de *Pantoea* identificadas.

Un estudio de aislamientos bacterianos de cuerpos fructíferos del hongo *Hericium erinaceus*, implementaron secuenciación del gen de 16S rRNA y un análisis multilocus en secuencias parciales de *gyrB*, *atpD*, *rpoB* y *infB* e identificaron que *Pantoea eucalypti* y *Pantoea anthophila* son los parientes filogenéticos más cercanos y podrían constituir una especie nueva, *Pantoea hericii*. Estudios de hibridación ADN-ADN permitieron la diferenciación filogenética y confirmaron la clasificación como una especie novedosa (Rong, 2016).

4.9 Comparación de resultados entre BIOLOG y secuenciación

Se comparó los resultados obtenidos por el sistema de identificación BIOLOG con los resultados obtenidos por secuenciación y se determinó que la identificación de especies fue más eficiente y precisa con la secuenciación para el gen 16S rRNA que proporcionó resultados confiables con identidad máxima mayor a 99 % en cepas de *Pantoea*. El sistema BIOLOG identificó correctamente el género de la mayoría de las cepas, lo que sirvió como un

screening para la elección de las cepas que fueron secuenciadas con el fin de determinar la especie (Tabla 4).

Tabla 4.
Resultados obtenidos con BIOLOG y secuenciación.

Muestra	Resultado BIOLOG	Probabilidad	Resultado Secuenciación	Similitud
FP-19-0086	<i>Pantoea agglomerans</i>	67%	<i>Pantoea</i> sp.	99,9%
FP-19-0088	<i>Pantoea agglomerans</i>	62%	<i>Pantoea</i> sp.	99,9%
FP-19-0089	<i>Pantoea agglomerans</i> <i>bgp7</i>	55%	<i>Pantoea ananatis</i>	99,6%
FP19-19-0091	<i>Pantoea agglomerans</i>	70%	<i>Pantoea ananatis</i>	99,9%
FP-19-0092	<i>Pantoea agglomerans</i>	67%	<i>Pantoea ananatis</i>	99,72%
FP-19-0195	<i>Pantoea dispersa</i>	81%	<i>Pantoea hericii</i>	99,9%
FP-19-0196	<i>Pantoea agglomerans</i>	59%	<i>Atlantibacter hermanii</i>	100%
FP-19-0382	<i>Pantoea dispersa</i>	52%	<i>Pantoea ananatis</i>	99,8%
FP-19-0381	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>ss cloacae</i>	65%	<i>Enterobacter</i> sp.	99,7%
FP-19-0388	<i>Enterobacter cowanii</i>	66%	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	98,7%

El bajo porcentaje de probabilidad de BIOLOG demostró la necesidad de aplicar otro método para confirmar la identificación de especies. Del total de muestras analizadas por BIOLOG el sistema identificó correctamente el 80% a nivel de género, pero ninguna a nivel de especie. La identidad máxima de las

especies identificadas por parte de la secuenciación de 16S rRNA son muy cercanas al 100 % en la mayoría de los casos, lo que proporcionó un resultado confiable.

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Se identificaron 3 especies del género *Pantoea* que fueron aisladas de plantas de *Gypsophila* que presentaban agallas en la corona de su raíz. La especie identificada en mayor proporción fue *Pantoea ananatis*, esta bacteria es considerada una plaga cuarentenaria y hasta el año 2013 constaba como no presente en Ecuador.

La identificación de especies bacterianas por el sistema semiautomatizado BIOLOG no es precisa por lo que es necesario la implementación de otros métodos para corroborar el resultado. La secuenciación del gen 16S rRNA para el género *Pantoea* es eficaz para la identificación de especies.

La filogenia de las especies de *Pantoea* identificadas demuestra la distancia evolutiva entre algunas bacterias de *Pantoea ananatis* lo que sugiere la baja precisión de la secuenciación del gen 16rRNA al identificar especies de *Pantoea* debido a la cercanía entre especies.

La cantidad de plantas de *Gypsophila* enfermas con agallas en su raíz está controlada en el país. Sin embargo, si no se implementan medidas preventivas o tratamientos la incidencia puede aumentar provocando pérdidas económicamente significativas.

5.2 Recomendaciones

Es importante fortalecer la regulación fitosanitaria de las plantas, bulbos, esquejes y semillas que ingresan al país con fin de evitar el ingreso de plagas y plagas reglamentadas que representen un problema para cultivos de importancia económica para el país.

La identificación de especies mediante el sistema BIOLOG debe comprobarse con otro método con el fin de obtener un resultado confiable. La secuenciación multilocus (MLST) proporciona mejores resultados que la secuenciación del gen 16S rRNA y permite un estudio filogenético más exacto.

El manejo del sitio de la florícola es importante para evitar la presencia de plagas por lo que es recomendable mantener en buenas condiciones y buena limpieza del lugar. Adicionalmente, es necesaria la identificación de patologías en las plantas de propagación con el fin de no diseminar los fitopatógenos a todo el cultivo.

La identificación de las especies de *Pantoea* que atacan a cultivos de *Gypsophila* es una pauta para futuras investigaciones acerca de métodos de tratamiento al evaluar el antagonismo de las especies patógenas identificadas contra otras bacterias y hongos benéficos.

REFERENCIAS

- ADUANA DEL ECUADOR SENA. (2016). Importaciones – Servicio Nacional de Aduana del Ecuador. Recuperado el 20 de febrero de 2019, de <https://www.aduana.gob.ec/>
- AGROCALIDAD. (2015). MANUAL GENERAL DE CUARENTENA VEGETAL. Recuperado el 25 de abril de 2019, de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/sanidad-vegetal/3-control-fitosanitario/1.Gestion-de-Control-y-seguimiento-cuarentenario-Vegetal/b.Permiso-Fitosanitario-de-Importacion-PFI/4.Normativa/Manual-General-de.Cuarentena-Vegetal-ACT.pdf>
- AGROCALIDAD. (2018). Dirección de Certificación Fitosanitaria – Agrocalidad. Recuperado el 13 de marzo de 2019, de <http://www.agrocalidad.gob.ec/direccion-de-certificacion-fitosanitaria/>
- Armitage, A., & Laushman, J. (2003). *Introduction to Floriculture*. Recuperado el 19 de marzo de 2019, de https://books.google.com.ec/books?id=RYDNCgAAQBAJ&pg=PA191&lpg=PA191&dq=Armitage+AM.+y+Laushman+JM.+&source=bl&ots=Q87Jk_r6Sq&sig=ACfU3U2vsSgU_0uQroAcvomwZawWgHQS8A&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjK052v1sbhAhUPtikKHSVSCs0Q6AEwAHoECAkQAQ#v=onepage&q=Armitage%252
- Avila, A., & Pereyra, S. (2015). *Gypsophila*. Documentos de Divulgación Científica. Córdoba. Recuperado el 25 de abril de 2019, de www.cba.gov.ar/wp-content/4p96humuzp/2016/05/GYPSOPHILA-cuadernillo.pdf
- Bailón, L. (2003). Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias. Recuperado el 16 de marzo de 2019, de https://www.academia.edu/4858992/Atlas_de_pruebas_bioquimicas_para_identificar_bacterias

- Barahona, S. (2012). Propuesta para la expansión en la producción de *Gypsophila* en la empresa Flodecol S.A., para la exportación al mercado Europeo y Estados Unidos. Recuperado el 20 de febrero de 2019, de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1298/3/T-UCE-0003-219.pdf>
- BCE. (2016). Tasa de crecimiento promedio anual estimada. 2016. Recuperado el 07 de febrero de 2019, de <https://www.bce.fin.ec/>
- BIOLOG. (2018). *GEN III MicroPlate TM Instructions for Use Not for human in vitro diagnostic use*. Recuperado el 12 de febrero de 2019, de www.biolog.com
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608. Recuperado el 12 de febrero de 2019, de <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Brown, N. A. (1934). *A GALL SIMILAR TO CROWN GALL, PRODUCED ON GYPSOPHILA BY A NEW BACTERIUM*. Recuperado el 22 de enero de 2019, de <https://naldc.nal.usda.gov/download/IND43968500/PDF>
- Cabrera, J., & Zuaznabar, R. (2010). Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. *Cultivos Tropicales* (1st ed.). Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Recuperado el 04 de marzo de 2019, de <https://ebookcentral.proquest.com/lib/udlasp/reader.action?docID=5350101&query=pantoea>
- Cano, M. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: *Micorrizas, Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. Recuperado el 06 de junio de 2019, de <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v14n2/v14n2a03.pdf>
- Casierra Posada, F., Posada, F. C., Olmos, J. E. P., & Villareal, A. R. (2010). Crecimiento y producción de *Gypsophila paniculata* en respuesta al

termoperiodo, confinamiento y despunte. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas (Vol. 4). Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Recuperado el 17 de febrero de 2019, de http://www.academia.edu/1397358/Crecimiento_y_producci3n_de_Gypsophila_paniculata_en_respuesta_al_termoperiodo_confinamiento_y_despunte

Cercenado, E., & Cant3n, R. (2005). M3todos moleculares de tipificaci3n epidemiol3gica en bacteriolog3a. Recuperado el 14 de mayo de 2019, de

<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia18.pdf>

Chalupowicz, L., Manulis-Sasson, S., Itkin, M., Sacher, A., Sessa, G., & Barash, I. (2008). *Quorum-Sensing System Affects Gall Development Incited by Pantoea agglomerans pv. gypsophilae*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 21(8), 1094–1105. Recuperado el 22 de enero de 2019, de <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-8-1094>

Collado, O., Barreto, H., Rodr3guez, H., Barreto, G., & Abreu, O. (2017). Especies bacterianas asociadas a infecciones del tracto urinario. Revista Archivo M3dico de Camagüey (Vol. 21). 1996, Editorial Ciencias M3dicas Camagüey. Recuperado el 14 de mayo de 2019, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552017000400006

Coronel, M. (2014). Alternativas al uso de bromuro de metilo en el cultivo de *Gypsophila paniculata* L. Var. Million star. en el cant3n Gualaceo. Universidad de Cuenca, Cuenca. Recuperado el 22 de febrero de 2019, de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/21060/1/TESIS.pdf>

Cruz, A. T., Cazacu, A. C., & Allen, C. H. (2007). *Pantoea agglomerans*, a plant

pathogen causing human disease. Journal of Clinical Microbiology, 45(6), 1989–1992. Recuperado el 22 de enero de 2019, de <https://doi.org/10.1128/JCM.00632-07>

Cunningham, D., & Leber, A. (2018). *Pantoea - an overview* | ScienceDirect. Recuperado el 31 de marzo de 2019, de <https://www.sciencedirect-com.bibliotecavirtual.udla.edu.ec/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/pantoea>

De Ley, J., Bernaerts, M., Rassel, A., Guilmot, J., & Berxaerts, M. (1966). *Approach to an Improved Taxonomy of the genus Agrobacterium*. *J. gen. Microbial* (Vol. 43). Recuperado el 14 de abril de 2019, de www.microbiologyresearch.org

Delétoile, A., Decré, D., Courant, S., Passet, V., Audo, J., Grimont, P., ... Brisse, S. (2009). *Phylogeny and identification of Pantoea species and typing of Pantoea agglomerans strains by multilocus gene sequencing*. Journal of Clinical Microbiology, 47(2), 300–310. Recuperado el 31 de marzo de 2019, de <https://doi.org/10.1128/JCM.01916-08>

FAO. (2001). Análisis de riesgo de plagas para plagas cuarentenarias. Recuperado el 10 de febrero de 2019, de <http://www.fao.org/3/a-y3240s.pdf>

FAO. (2008). Metodologías para muestreo de envíos NIMF n.º 31. Recuperado el 14 de mayo de 2019, de <http://www.cosave.org/sites/default/files/nimfs/83e31cc55bce3f9dfe0deefbb3197c8.pdf>

FAO. (2018). Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias (NIMF). Recuperado el 07 de abril de 2019, de <http://www.fao.org/3/i2080s/i2080s09.pdf>

Gallardo, C. (2011). GENERALIDADES DE LAS FLORES. CAPITULO I *Gypsophila*. Recuperado el 10 de febrero de 2019, de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/2157/6/QT02509.pdf>

- Jain, S., Bohra, I., Mahajan, R., Jain, S., & Chugh, T. (2012). *Pantoea agglomerans* infection behaving like a tumor after plant thorn injury: An unusual presentation. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 55(3), 386. Recuperado el 24 de enero de 2019, de <https://doi.org/10.4103/0377-4929.101754>
- Jaizme, M., & Rodríguez, A. (2008). Integración de microorganismos benéficos (hongos micorrícicos y bacterias rizosféricas) en agrosistemas de las Islas Canarias. Recuperado el 28 de mayo de 2019, de <http://revistas.um.es/agroecologia/article/view/95491/91801>
- Jiménez, O., Contreras, N., & Rodríguez, C. (2007). Identificación y caracterización de *Pantoea agglomerans* aislada en plantas de gloxinia (*Gloxinia alba*). *Bioagro* (Vol. 19). Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA). Recuperado el 25 de abril de 2019, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612007000100007
- Kado, C. (2002). *Crown gall*. APS. Recuperado el 10 de febrero de 2019, de <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/prokaryote/pdlessons/Pages/CrownGall.aspx>
- Klingler, J. M., Stowe, R. P., Obenhuber, D. C., Groves, T. O, Mishra, S. K., & Pierson, D. L. (1992). *Evaluation of the Biolog Automated Microbial Identification System*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 58). Recuperado el 31 de marzo de 2019, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC195731/pdf/aem00047-0303.pdf>
- León, A. (2015). Hongos benéficos que controlan plagas de cultivos. Recuperado el 28 de mayo de 2019, de <http://conexiones.usfq.edu.ec/index.php/342-hongos-beneficos-que-controlan-plagas-de-cultivos>
- López, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S., Cerón, G., & Franco, R. (2014).

Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Investigación en Discapacidad (Vol. 3). Recuperado el 12 de febrero de 2019, de www.medigraphic.org.mx

MAGAP. (2014). REQUISITOS FITOSANITARIOS Y DECLARACIONES ADICIONALES OFICIALES PARA PLANTAS Y PRODUCTOS VEGETALES QUE SE EXPORTAN DE ECUADOR. Recuperado el 10 de febrero de 2019, de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2014/09/Requisitos-Fitosanitarios-MATRIZ-24.09.2014.pdf>

Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., ... Spratt, B. G. (1998). *Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(6), 3140–3145. Recuperado el 06 de junio de 2019, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9501229>

Maki, D. G., Rhame, F. S., Mackel, D. C., & Bennett, J. V. (1976). *Nationwide epidemic of septicemia caused by contaminated intravenous products: I. Epidemiologic and clinical features*. The American Journal of Medicine, 60(4), 471–485. Recuperado el 28 de mayo de 2019, de [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(76\)90713-0](https://doi.org/10.1016/0002-9343(76)90713-0)

Mallaupoma, Z. (2007). Determinación y diferenciación de *Pantoea agglomerans* y patógenos por medio de perfiles de ácidos grasos a partir de aislamientos de 5 variedades de semillas de *Allium cepa* L. UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS. Recuperado el 17 de abril de 2019, de http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/826/Rafael_mz.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Manulis, S., & Barash, I. (2003). *Pantoea agglomerans* pvs. *gypsophilae* and *betae*, recently evolved pathogens? Molecular Plant Pathology, 4(5), 307–314. Recuperado el 24 de enero de 2019, de

<https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00178.x>

- Miller, J. M., & Rhoden, D. L. (1991). *Preliminary Evaluation of Biolog, a Carbon Source Utilization Method for Bacterial Identification*. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY (Vol. 29). Recuperado el 31 de marzo de 2019 de, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC269959/pdf/jcm00042-0069.pdf>
- Moreta, F. (2012). Plan de negocios: Creación de una finca exportadora de *Gypsophyllia* orgánica a Brasil. Universidad San Francisco de Quito. Recuperado el 22 de febrero de 2019, de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/1903/1/105954.pdf>
- Morgan, M. C., Boyette, M., Goforth, C., Sperry, K. V., & Greene, S. R. (2009). *Comparison of the Biolog OmniLog Identification System and 16S ribosomal RNA gene sequencing for accuracy in identification of atypical bacteria of clinical origin*. Journal of Microbiological Methods, 79(3), 336–343. Recuperado el 31 de marzo de 2019, de <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2009.10.005>
- Nadarasah, G., & Stavrinos, J. (2014). *Quantitative evaluation of the host-colonizing capabilities of the enteric bacterium Pantoea using plant and insect hosts*. Microbiology, 160(Pt_3), 602–615. Recuperado el 03 de marzo de 2019, de <https://doi.org/10.1099/mic.0.073452-0>
- Naranjo, M., Burgos, S., Gualavisí, M., Arghoti, A., & Sacoto, H. (2010). FLACSO-MIPRO Sector Florícola Boletín mensual de análisis sectorial de MIPYMES. Recuperado el 14 de abril de 2019, de <https://www.flacso.edu.ec/portal/pnTemp/PageMaster/k23wo5fko3cq1nhkc0mqf8bd8jutu5.pdf>
- Naum, M., Brown, E. W., & Mason-Gamer, R. J. (2008). *Is 16S rDNA a Reliable Phylogenetic Marker to Characterize Relationships Below the Family Level in the Enterobacteriaceae?* Journal of Molecular Evolution, 66(6), 630–642. Recuperado el 06 de junio de 2019, de

<https://doi.org/10.1007/s00239-008-9115-3>

- Necochea, R., & Canul, J. (2004). Secuenciación de ácidos nucleicos. Cuernavaca. Recuperado el 03 de marzo de 2019, de http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion_acidos_nucleicos.pdf
- Newman, J. (2014). *Microbiology Experiment-Biolog GEN III plates*. Recuperado el 10 de marzo de 2019, de http://208.106.130.253/pdf/teach_portal/MI/LycoMicro_Biolog_Experiment.pdf
- NIMF. (2010). Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias (NIMF). Recuperado el 22 de febrero de 2019, de www.ippc.int
- Nissan, G., Manulis-Sasson, S., Chalupowicz, L., Teper, D., Yeheskel, A., Pasmanik-Chor, M., ... Barash, I. (2012). *The Type III Effector HsvG of the Gall-Forming Pantoea agglomerans Mediates Expression of the Host Gene HSVGT*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(2), 231–240. Recuperado el 03 de marzo de 2019, de <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-11-0173>
- Noreña, C., Martínez, G., Cabra, J., & Gómez, T. (2002). Determinación de los mecanismos de diseminación de *Erwinia herbicola* en la propagación de *Gypsophila paniculata* L. para establecer métodos de manejo y control.pdf. Recuperado el 10 de marzo de 2019, de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6191576.pdf>
- Orbe, R. (2012). Ventajas comparativas de Ecuador en la producción de la flor gypsophila 2008 - 2011. PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR. Recuperado el 24 de enero de 2019, de <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/6815/7.36.001212.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- Ortíz, Á., Martínez, M., & Vargas, F. (2017). La secuencia completa del gen ARN ribosomal 16S, una promesa para mejorar la precisión en la asignación taxonómica microbiana. *Microbiología Ambiental En*

México., (Octubre), 50–62.

Palomino, C., & González, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* (Vol. 31). Instituto Nacional de Salud. Recuperado el 17 de abril de 2019, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000300020

Parra Huertas, S. L., Pérez Casas, M. M., Bernal Morales, M., Suárez Moreno, Z., & Montoya Castaño, D. (2006). Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). *Nova*, 4(5), 39. Recuperado el 24 de enero de 2019, de <https://doi.org/10.22490/24629448.346>

Pérez, A. (2011). *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. Recuperado el 18 de febrero de 2019, de [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci3n en cadena de la polimerasa.pdf](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf)

Pileggi, M., Alvim, S., Pileggi, V., Olchanheski, R., Garbugio Da Silva, P. A., Munoz Gonzalez, A. M., ... Sadowsky, M. J. (2012). *Isolation of mesotrione-degrading bacteria from aquatic environments in Brazil*. *Chemosphere*, 86, 1127–1132. Recuperado el 03 de marzo de 2019, de <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.041>

PROCHILE ECUADOR. (2017). FICHA DE MERCADO ▪ Situación actual de la industria florícola de Ecuador. Recuperado el 12 de enero de 2019, de www.aduana.gob.ec

Puerta, A., & Mateos, F. (2010). *Enterobacterias*. *Medicine*, 10(51), 3426–3431. Recuperado el 12 de enero de 2019, de <http://www.elsevierinsituciones.com>

Ramírez-Rojas, S., Osuna-Canizalez, F. D. J., García-Pérez, F., Canul-Ku, J.,

- Hernández-Romano, J., Ornelas-Ocampo, K., & Landa-Salgado, P. (2016). Identificación molecular de bacterias asociadas a plantas ornamentales producidas in vitro. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*. Recuperado el 13 de marzo de 2019, de <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1511-3>
- Rong, C., Ma, Y., Wang, S., Liu, Y., Chen, S., Huang, B., ... Xu, F. (2016). *Pantoea hericii* sp. nov., Isolated from the Fruiting Bodies of *Hericium erinaceus*. *Current Microbiology*, 72(6), 738–743. Recuperado el 11 de junio de 2019, de <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1011-2>
- Vélez, S. (2018). Estudio de factibilidad para la creación de una empresa dedicada a la producción y exportación de *Gypsophila*, desde la provincia del Azuay hasta el mercado Chino. Recuperado el 10 de marzo de 2019, de [http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/34563/1/VELEZ VERGARA.pdf](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/34563/1/VELEZ%20VERGARA.pdf)
- Vizcaíno, D. (2013). Plagas cuarentenarias no presentes en Ecuador. Recuperado el 22 de marzo de 2019, de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/sanidad-vegetal/01vigilancia-fitosanitaria/documentos/resolucion-82-plagas-cuarentenarias-adicionales-min.pdf>
- Völksch, B., Thon, S., Jacobsen, I. D., & Gube, M. (2009). *Polyphasic study of plant- and clinic-associated Pantoea agglomerans strains reveals indistinguishable virulence potential*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1381–1391. Recuperado el 04 de marzo de 2019, de <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.09.016>
- Walterson, A. M., & Stavrínides, J. (2015). *Pantoea*: información sobre un género altamente versátil y diverso dentro de las *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(6), 968–984. Recuperado el 06 de junio de 2019, de <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv027>
- Wang, H., Wang, J., Xia, H., Huang, Y., Wang, M., Jia, M., & Yu, Z. (2015).

Sensitivities of Ralstonia solanacearum to Streptomycin, Calcium Oxide, Mancozeb and Synthetic Fertilizer. Plant Pathology Journal, 14(1), 13–22. Recuperado el 11 de abril de 2019, de <https://doi.org/10.3923/ppj.2015.13.22>

Wolcan, S., Ronco, L., & Albina, G. (2007). Podredumbres basales de *Gypsophila paniculata* (Caryophyllaceae): Agentes causales y su patogenicidad potencial sobre *Dianthus caryophyllus* (Caryophyllaceae). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica (Vol. 42). Sociedad Argentina de Botánica. Recuperado de 11 de febrero de 2019, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-23722007000200002

Yáñez, S. (2017). *Gypsophila* ecuatoriana es muy bien recibida en China. PROECUADOR, (0086), 1–3. Recuperado el 13 de marzo de 2019, de <https://www.proecuador.gob.ec/gypsophila-ecuatoriana-es-muy-bien-recibida-en-china-noviembre-2017/>

Yang, S. (2017). Peritonitis causada por *Pantoea agglomerans* en diálisis peritoneal. *Neefrología*, 1(37), 93–113. Recuperado el 28 de mayo de 2019, de <https://www.revistanefrologia.com/es-pdf-S0211699516301369>

Young, J. M., & Park, D.-C. (2007). *Relationships of plant pathogenic enterobacteria based on partial atpD, carA, and recA as individual and concatenated nucleotide and peptide sequences.* Systematic and Applied Microbiology, 30(5), 343–354. Recuperado el 06 de junio de 2019, de <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2007.03.002>

ANEXOS

Anexo 1

A1 Negative control	A2 Dextrin	A3 D-maltose	A4 D-trehalose	A5 D-cellobios	A6 Gentiobiose	A7 Sucrose	A8 D-turanose	A9 Stachyose	A10 Positive control	A11 pH 6	A12 pH 5
B1 D-raffinose	B2 α -D-lactose	B3 α -D-lactose	B4 β -methyl-D-glucose	B5 D-salicin	B6 N-acetyl-D-glucosamin	B7 N-acetyl- β -D-mannosamin	B8 N-acetyl-D-galactosamin	B9 N-acetylneuraminic	B10 1% NaCl	B11 4% NaCl	B12 8% NaCl
C1 α -D-glucose	C2 D-mannose	C3 D-fructose	C4 D-galactose	C5 3-methyl glucose	C6 D-fucose	C7 L-fucose	C8 L-rhamnose	C9 Inosine	C10 1% sodium lactate	C11 Fusidic acid	C12 D-serine
D1 D-sorbitol	D2 D-mannitol	D3 D-arabitol	D4 Myo-inositol	D5 glycerol	D6 D-glucose 6-PO ₄	D7 D-fructose-6-PO ₄	D8 D-aspartic acid	D9 D-serine	D10 Troleandomycin	D11 Rifamycin sv	D12 Minocycline
E1 Gelatin	E2 Glycyl-L-prol	E3 L-alanine	E4 L-arginine	E5 L-aspartic acid	E6 L-glutamin acid	E7 L-histidine	E8 L-pyrogutamic acid	E9 L-serine	E10 Linocymcin	E11 guanidine Hcl	E12 Niaproof 4
F1 Pectin	F2 D-galaturonic	F3 D-galaturonic acid lactone	F4 D-gluconic acid	F5 D-gluconic acid	F6 Glucurona mide	F7 Mucic acid	F8 Quinic acid	F9 S-saccharic acid	F10 Vancomycin	F11 Tetrazolium violet	F12 Tetrazolium blue
G1 p-hydroxy-phenylatic acid	G2 Methyl pyruvate	G3 D-lactic acid	G4 L-lactic acid	G5 Citric acid	G6 α -keto-glutaric acid	G7 D-malic acid	G8 L-malic acid	G9 Bromo-succinic	G10 Nalidixic acid	G11 Lithium chloride	G12 Potassium tellurite
H1 Tween 40	H2 γ -amino-butyric acid	H3 α -hydroxy-butyric acid	H4 β -hydroxy-D-lybutyric	H5 α -keto-butyric acid	H6 Acetoacetic acid	H7 Propionic acid	H8 Acetic acid	H9 Formic acid	H10 Aztreonam	H11 Sodium butyrate	H12 Sodium bromate

Figura 1. Placa GEN III. Distribución de los tipos de sustrato empleados para la identificación microbiana.

Tomado de Wang, (2015)

Anexo 2

MINISTERIO DEL AMBIENTE



Oficio Nro. MAE-DNB-2019-0451-O

Quito, D.M., 07 de mayo de 2019

Asunto: Respuesta a la solicitud de pronunciamiento respecto a la necesidad de firmar "Contratos Marco de Acceso a los Recursos Genéticos con Fines de Investigación Científica" - AGROCALIDAD

Señor Ingeniero
Patricio Almeida Granja
Director Ejecutivo
AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO - AGROCALIDAD
En su Despacho

De mi consideración:

Con un cordial saludo y en respuesta al oficio AGR-AGROCALIDAD/DE-2019-000821-OF de 22 de abril de 2019 mediante el cual solicita: "... se emita un pronunciamiento jurídico con respecto de que si existe la necesidad de que la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario, realice un Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos con Fines de Investigación Científica, con el MAE, recalcando que las actividades de los laboratorios de la Agencia son de análisis y diagnóstico y su finalidad es la regulación y control en el ámbito agropecuario.", al respecto me permito indicar lo siguiente:

El literal b) del artículo 4 de la Ley Orgánica de Seguridad Agropecuaria publicado en el Registro Oficial Segundo Suplemento Nro. 27 de 3 de junio de 2017 determina que la presente Ley entre otras tiene la finalidad de: *"Impulsar procesos de investigación e innovación tecnológica en la producción de alimentos de origen vegetal y animal que cumplan las normas y desarrollo de estándares de bienestar animal, que mejoren el acceso a los mercados nacionales e internacionales."*

Por su parte el literal e) del artículo 7 de la misma ley establece que: *"En materia de sanidad agropecuaria corresponde a la Autoridad Agraria Nacional las siguientes competencias: e) Promover y orientar la investigación científica en el área de sanidad vegetal y animal; en coordinación con el ente rector de investigación."*

En lo que respecta a los laboratorios oficiales y acreditados, el artículo 20 de la Ley Orgánica de Sanidad Agropecuaria establece que: *"Para identificar y diagnosticar los patógenos que afectan a la producción primaria agropecuaria y a la calidad de los productos destinados al consumo humano y a la elaboración de alimentos, la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario, en coordinación con la autoridad rectora del sector de conocimiento, investigación e innovación, utilizará sus laboratorios y la red de laboratorios registrados o acreditados por el Organismo de Acreditación Ecuatoriana, así como también, de ser el caso, podrá utilizar los laboratorios de referencia internacional"*

El literal b) del artículo 30 de Ley Orgánica de Seguridad Agropecuaria establece que la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario con la finalidad de proteger la vida, salud y bienestar de los animales, y asegurar su estatus zoonosanitario implementará las siguientes medidas: *"Realizar vigilancia e investigación epidemiológica."*

Con base en lo señalado y considerando que la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario - AGROCALIDAD es la entidad pública encargada de impulsar procesos de investigación e innovación tecnológica en la producción de alimentos de origen vegetal y animal que cumplan las normas y desarrollo de estándares de bienestar animal, que mejoren el acceso a los mercados nacionales e internacionales; es el ente encargado de *promover y orientar la investigación científica en el área de sanidad vegetal y animal*; es la institución encargada de *realizar vigilancia e investigación*



Oficio Nro. MAE-DNB-2019-0451-O

Quito, D.M., 07 de mayo de 2019

epidemiológica, en tal virtud, la Agencia de Regulación y Control Fito y Zootecnario – AGROCALIDAD no requiere de la suscripción de un Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos para el envío de muestras para diagnóstico a laboratorios fuera del país, a fin de dar cumplimiento a los objetivos institucionales determinados en la Ley Orgánica de Seguridad Agropecuaria.

Cabe recalcar que en el caso de que AGROCALIDAD requiera enviar muestras con fines de investigación científica y acceso a los recursos genéticos, deberá aliarse con una Institución Nacional de Apoyo y suscribir un Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos para cada proyecto específico, conforme lo establece el Acuerdo Ministerial 034, publicado en el Registro Oficial 449 de 02 de marzo de 2015.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,

Documento firmado electrónicamente

Sr. Alfonso Wilson Rojas
DIRECTOR NACIONAL DE BIODIVERSIDAD, ENCARGADO

Referencias:
- MAE-DNB-2019-0072-E

Anexos:
- Ley Orgánica de Sanidad Agropecuaria

Copia:
Señora Abogada
Vanessa Patricia Solís Mora
Especialista en Políticas de Cambio Climático 1

Señora Tecnóloga
Janneth del Rocío Astudillo Cabezas
Secretaria de Dirección

Señor Doctor
José Ignacio Moreno Álava
Director General de Asesoría Jurídica (E)
AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO - AGROCALIDAD

Señorita Ingeniera
Carla Rebeca Moreno Valarezo
Coordinadora General de Laboratorios (E)
AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO - AGROCALIDAD

Señor Ingeniero
Christian Antonio Zambrano Pesantez
Coordinador General de Sanidad Animal (E)
AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO - AGROCALIDAD

vs/mm

Figura 1. Oficio Nro MAE-DNB-2019-0451-O. Respuesta a la solicitud de pronunciamiento respecto a la necesidad de firmar "Contratos Marco de Acceso a los Recursos Genéticos con Fines de Investigación Científica" – AGROCALIDAD.

Anexo 3

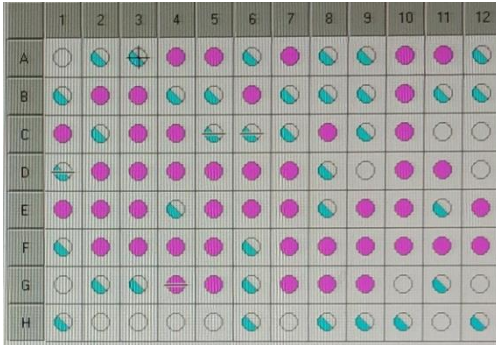


Figura 1. Muestra FP-19-0086
Resultado *Pantoea agglomerans*,
probabilidad 0,67

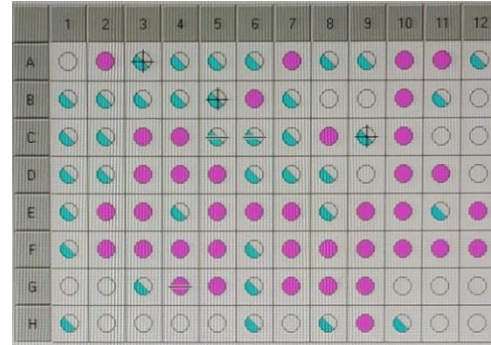


Figura 2. Muestra FP-19-0088 Resultado
Pantoea agglomerans, probabilidad 0,617

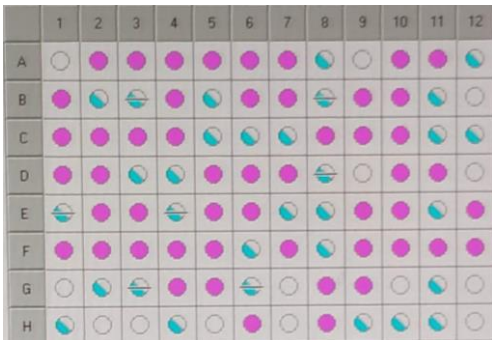


Figura 3. Muestra FP-19-0089
Resultado *Pantoea agglomerans* bgp7,
probabilidad 0,55

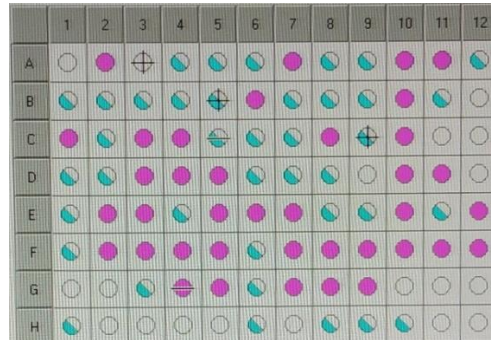


Figura 4. Muestra FP-19-0091 Resultado
Pantoea agglomerans, probabilidad 0,65

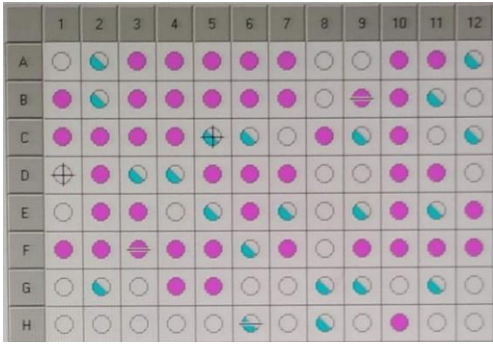


Figura 5. Muestra FP-19-0092
Resultado *Pantoea agglomerans*,
probabilidad 0,67



Figura 6. Muestra FP-19-0196 Resultado
Pantoea agglomerans, probabilidad 0,59

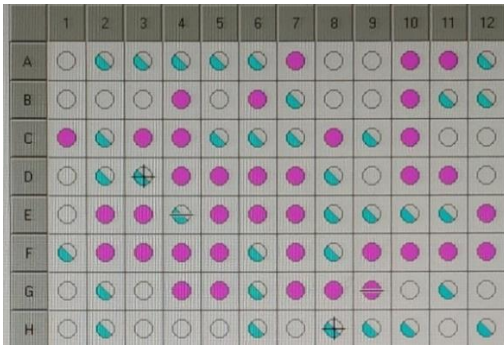


Figura 7. Muestra FP-19-0195
Resultado *Pantoea dispersa*, probabilidad
0,81

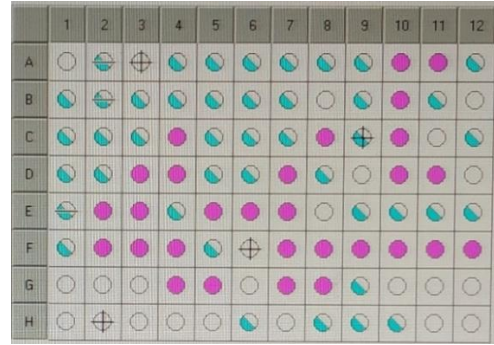


Figura 8. Muestra FP-19-0382 Resultado
Pantoea dispersa, probabilidad 0,52

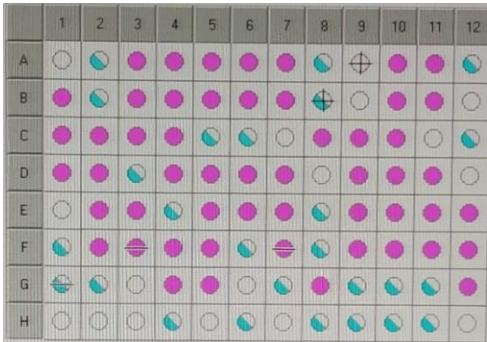


Figura 9. Muestra FP-19-0191
Resultado *Enterobacter cloacae* ss
cloacae, probabilidad 0,65

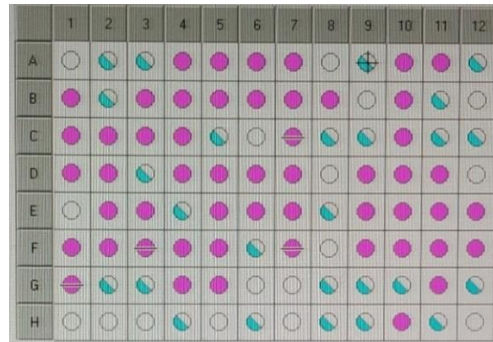


Figura 10. Muestra FP-19-0381
Resultado *Enterobacter cloacae* ss
cloacae, probabilidad 0,65

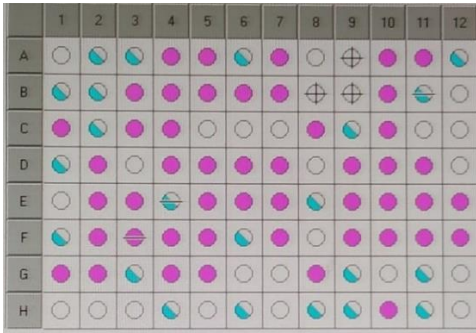


Figura 11. Muestra FP-19-0193
Resultado *Enterobacter cloacae* ss
dissolvens, probabilidad 0,59



Figura 12. Muestra FP-19-0199
Resultado *Enterobacter cloacae* ss
dissolvens, probabilidad 0,67

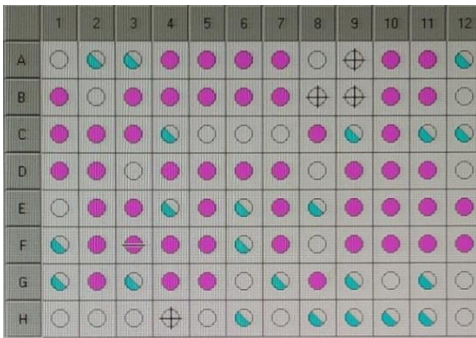


Figura 13. Muestra FP-19-0200
Resultado *Enterobacter cloacae* ss
dissolvens, probabilidad 0,64

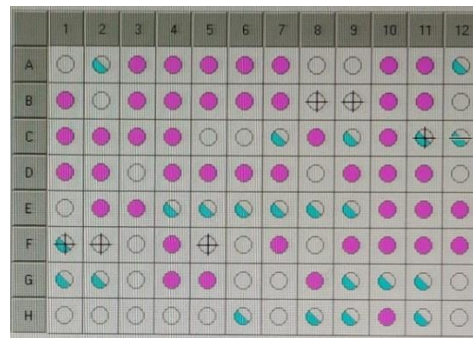


Figura 14. Muestra FP-19-0201
Resultado *Enterobacter cloacae* ss
dissolvens, probabilidad 0,55

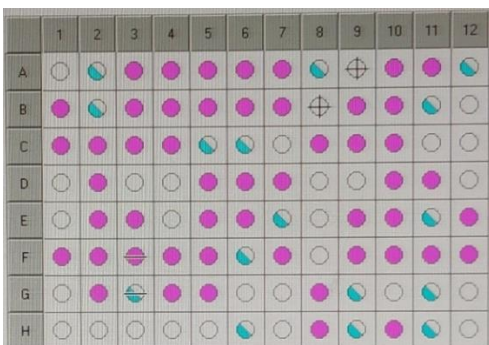


Figura 15. Muestra FP-19-0090
Resultado *Enterobacter amnigenus*,
probabilidad 0,70



Figura 16. Muestra FP-19-0197
Resultado *Enterobacter amnigenus*,
probabilidad 0,73

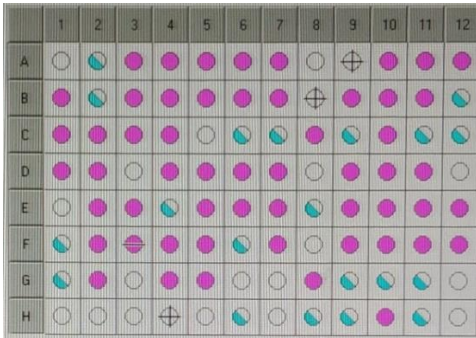


Figura 17. Muestra FP-19-0198
Resultado *Enterobacter cloacae*,
probabilidad 0,56

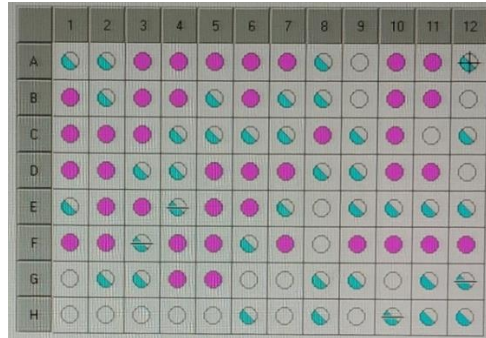


Figura 18. Muestra FP-19-0388 Resultado
Enterobacter cowanii, probabilidad 0,56



Figura 19. Muestra FP-19-0087
Resultado *Kluyvera georgiana*,
probabilidad 0,65

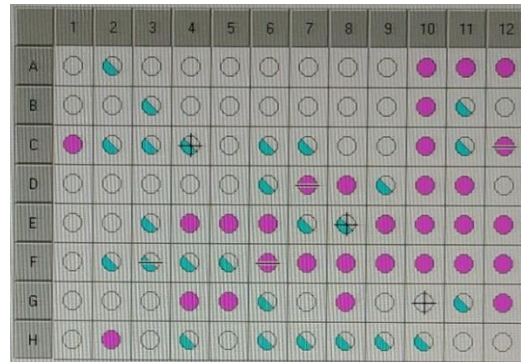


Figura 20. Muestra FP-19-0192
Resultado *Pseudomonas tolaasii*,
probabilidad 0,55

Anexo 4

Tabla 1.

Resultados de las secuencias analizadas en programa Geneious y Mega.

Muestra	Resultado	Similitud	Accesión
FP-19-0086	<i>Pantoea</i> sp.	99,9%	KX091843
FP-19-0088	<i>Pantoea</i> sp.	99,8%	KX091843
FP-19-0089	<i>Pantoea ananatis</i>	99,6%	KC139412
FP-19-0091	<i>Pantoea ananatis</i>	99,9%	KT41001
FP-19-0092	<i>Pantoea ananatis</i>	99,6%	KC139412
FP-19-0195	<i>Pantoea hericii</i>	99,9%	KU189725
FP-19-0196	<i>Atlantibacter hermanii</i>	100%	MK883098
FP-19-0380	<i>Enterobacter ludwigii</i>	99,45%	EU709754.1
FP-19-0381	<i>Enterobacter</i> sp.	99,7%	AB098582
FP-19-0382	<i>Pantoea ananatis</i>	100%	KY458565.1
FP-19-0384	<i>Enterobacter</i> sp.	99,9%	KT260458
FP-19-383	<i>Enterobacter</i> sp.	99,9%	KF805388
FP-19-0385	<i>Lelliottia amnigena</i>	96,79%	MK414956.1
FP-19-0387	<i>Enterobacter amnigenus</i>	99,5%	JQ062999
FP-19-0388	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	98,7%	KT260500
FP-19-0389	<i>Enterobacter</i> sp.	99,5%	CP034769
FP-19-1388 (A)	<i>Pantoea ananatis</i>	99,29%	NR026045.1
FP-19-1388 (B)	<i>Pantoea ananatis</i>	99,15%	NR026045.1
FP-171199-1	<i>Pantoea ananatis</i>	99,6%	MG574386
FP-171199-2	<i>Pantoea ananatis</i>	99,5%	MG574386
FP-171199- PAG-1	<i>Pantoea ananatis</i>	99,7%	MG574386
FP-171199- PAG-2	<i>Pantoea ananatis</i>	99,6%	MG733914

