



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

IDENTIFICACIÓN DE *Pseudomonas* spp., CAUSANTES DEL “DESORDEN DEL PERIDERMO”  
(PINK EYE) EN *Solanum tuberosum*,  
EN TRES PROVINCIAS DEL TERRITORIO ECUATORIANO.

Autora

Analhí Diamela Viteri Jaramillo

Año  
2020



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

IDENTIFICACIÓN DE *Pseudomonas* spp., CAUSANTES DEL “DESORDEN DEL PERIDERMÓ” (PINK EYE) EN *Solanum tuberosum*, EN TRES PROVINCIAS DEL TERRITORIO ECUATORIANO.

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

Profesor guía

MSc Wilson David Tapia López

Autora

Analhí Diamela Viteri Jaramillo

Año

2020

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Identificación de *Pseudomonas* spp., causantes del “Desorden del peridermo” (Pink eye) en *Solanum tuberosum*, en tres provincias del territorio ecuatoriano, a través de reuniones periódicas con la estudiante Analhí Diamela Viteri Jaramillo, en el semestre 202010, 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”.



Wilson David Tapia López

Máster en Gestión y Planificación Ambiental

CI: 1714205081

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Identificación de *Pseudomonas* spp., causantes del “Desorden del peridermo” (Pink eye) en *Solanum tuberosum*, en tres provincias del territorio ecuatoriano, de la estudiante Analhí Diamela Viteri Jaramillo, en el semestre 202010, 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 Toza 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”.



Analhí Diamela Viteri Jaramillo

CI: 1724073352

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios. A mi madre por ser la mujer, la imagen y el apoyo más importante que he tenido en mi vida.

A mi padre por su dedicación y amor constante. A mi abuelita por siempre creer en mí y por estar presente.

A los técnicos y amigos de AGROCALIDAD, en especial a quienes conforman el laboratorio de Fitopatología: Hernando, Alex y Jairo, por su sabiduría, entrega incondicional y el apoyo para la realización del presente trabajo.

## **DEDICATORIA**

Le dedico a la persona más importante de mi vida, cuyo apoyo me ha ayudado a culminar este proceso, que por su esfuerzo y perseverancia incondicional me ha motivado a cumplir todas mis metas y sueños. Te amo mami.

A mi padre, por su ejemplo e inteligencia que me permite crecer todos los días a imagen de él, a mi abuelita por ser como mi segunda madre y darme el más puro y tierno amor. A mis tíos y primos y por creer en mí y ser mi fuente de inspiración cada día.



## RESUMEN

El desorden del peridermo, “*Pink eye*” o conjuntivitis de la papa, es una alteración conocida por producir un deterioro en el tubérculo en su estadio de precosecha, cosecha y postcosecha. La sintomatología visual que se presentó específicamente en las superficies de *Solanum tuberosum*, fue una coloración rosada en forma de manchas, pudrición extrema y áreas hinchadas o ásperas en la planta. La enfermedad ha sido relacionada con *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas marginalis* y poseen la capacidad de producir naturalmente sideróforos, conocidos como piocianinas y pioverdinas. La fluoresceína puede ser detectada bajo luz UV y natural. Bioquímicamente se caracterizaron por ser catalasa y oxidasa positiva y Gram negativas. Se realizó un muestreo basándose en sintomatología en las tres principales provincias productoras de papa del Ecuador; Pichincha, Carchi y Chimborazo. Posterior a ello, se cultivó las muestras en el medio selectivo de *Pseudomonas*; *B King Agar*. Mediante reconocimiento visual a través de luz UV, pruebas bioquímicas tradicionales y la tecnología *BIOLOG*, se seleccionó las bacterias de interés. Adicionalmente, se llevó a cabo la extracción del ADN de las bacterias mediante lisis térmica de las cepas puras. Para la amplificación se utilizaron las muestras con una absorbancia entre 300 a 1000 nm. Se empleó el *primer* universal 16S con sus cebadores 27F y 149R, adicionalmente, la enzima fue *Taq* polimerasa. Finalmente, se realizó un gel de 1.5% de agarosa en buffer *TBEX* al 0.5% e *Invitrogen™ SYBR™ Safe™ DNA Gel Stain* y se empleó el marcador molecular *Low Mass Ladder* de *Invitrogen™*. Los resultados positivos se mandaron a Macrogen para su secuenciación y las secuencias obtenidas, se las analizó mediante programas bioinformáticos y bases de datos; *Geneious*, *Blast N* y *Mega*. Los resultados conseguidos a partir de la amplificación, electroforesis y secuenciación de las cepas aisladas afirmaron la presencia de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas marginalis* obteniendo 2 y 5 cepas respectivamente, específicamente en las muestras que presentaban sintomatología relacionadas con el desorden del peridermo, con mayor

incidencia en la provincia de Carchi. Los postulados de Koch afirmaron la patogenicidad que producen las dos bacterias en tubérculos inoculados y mediante secuenciación se verificó nuevamente.

**Palabras claves:** *Solanum tuberosum*, *Pink eye*, El Desorden del Peridermo, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas marginalis*, Postulados de Koch.

## ABSTRACT

The periderm disorder, "pink eye" or potato conjunctivitis, is an alteration known to cause damage to the tuber in its pre-harvest, harvest and post-harvest stage. The visual symptomatology specifically shows on the surfaces of *Solanum tuberosum*, a pink coloration in the form of spots, extreme rot and swollen or rough areas in the plant. The disease has been related to *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas marginalis* and affected the ability to naturally produce siderophores, known as pyocyanins and pyoverdins. Fluorescein can be detected under UV and natural light. Biochemically it is characterized by being catalase and oxidase positive and Gram negative. A determined sampling in symptomatology was performed in the three main potato producing provinces of Ecuador; Pichincha, Carchi and Chimborazo. Subsequently, the samples were cultured in the *Pseudomonas* selective medium; B King Agar. Through visual recognition by UV means of light, traditional biochemical tests and BIOLOG technology, selecting the bacteria of interest. In addition, the DNA extraction of the bacteria was carried out by thermal lysis of the pure strains. For amplification, samples with absorption between 300 to 1000 nm will be used. The first universal 16S with its primers 27F and 149R was used, in addition, the enzyme was Taq polymerase. Finally, a 1.5% agarose gel was made in 0.5% TBEX buffer and Invitrogen™ SYBR™ Safe™ DNA Gel Stain and the Invitrogen™ Low Mass Ladder molecular marker was used. The positive results were sent to Macrogen for sequencing and the sequences obtained were analyzed using bioinformatics programs and databases; GenBank, Blast N and Mega. The results obtained from the amplification, electrophoresis and sequencing of the determined strains affirmed the presence of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas marginalis* obtaining two and five strains respectively, specific in the samples that present symptomatology related to the periderm disorder, with greater incidence in the province of Carchi. Koch's postulates affirm the pathogenicity produced by the two bacteria in inoculated tubers and by sequencing they are verified again.

**Key words:** *Solanum tuberosum*, Pink eye, the periderm disorder, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas marginalis*, Koch's postulates.

## ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema.....	2
1.3. Objetivo general.....	3
1.4. Objetivos específicos.....	3
1.5. Justificación de la investigación.....	4
2. Marco teórico.....	5
2.1. Cultivo de papa.....	5
2.1.1. Provincias productoras de papa.....	5
2.1.2. Factores de pérdida en el cultivo de papa.....	7
2.2. Género <i>Pseudomonas</i> .....	7
2.3. Agentes fitopatógenos.....	8
2.3.1. <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	8
2.3.2. <i>Pseudomonas marginalis</i> .....	10
2.4. Desorden del peridermo; “Pink eye”.....	11
3. Diseño del plan experimental.....	12
4. Procedimientos.....	13
4.1. Población, muestra y permisos.....	13
4.2. Materiales y métodos para la obtención de datos.....	14
4.2.1. Medios de Cultivo.....	14
4.2.2. Cultivo.....	14
4.2.3. Identificación del microorganismo.....	15
4.2.4. Conservación del microorganismo.....	17
4.2.5. Extracción de ADN.....	18
4.2.6. Amplificación y electroforesis.....	18
4.2.7. Secuenciación.....	19

4.2.8. Postulados de Koch.....	19
5. Resultados y Discusión .....	21
5.1. Género <i>Pseudomonas</i> en <i>Solanum tuberosum</i> .....	21
5.1.1. Sintomatología.....	21
5.1.2. Crecimiento y visualización mediante luz UV .....	25
5.1.3. Pruebas Bioquímicas.....	29
5.1.4. Electroforesis.....	32
5.1.5. Secuenciación .....	35
6. Conclusiones y Recomendaciones .....	48
6.1. Conclusiones .....	48
6.2. Recomendaciones.....	49
REFERENCIAS.....	50
ANEXOS .....	59

## 1. Introducción

### 1.1. Antecedentes

Estudios afirman que *Pseudomonas fluorescens* es un microorganismo que habita en la familia de solanáceas y puede desencadenar grandes enfermedades, no obstante otras investigaciones demuestran que es un biocontrolador muy eficiente (Al-Mughrabi, 2010). En 1959, los investigadores Folsom y Friedman descubrieron que *Pseudomonas fluorescens* podía generar alteraciones graves en la planta como una pudrición en el tallo y tubérculo, manchas de color café, rosadas, negras y verdes en la superficie del bulbo y lesiones aguachentas (establece un sinónimo que hace referencia a consistencias aguadas, húmedas o viscosas) (Folsom & Friedman, 1959). *Pseudomonas fluorescens* se evidencia cuando el xilema de la planta presenta características incoloras o a su vez un color rojo a marrón (Lulai, Weiland, Suttle, Sabba, & Bussan, 2006). Adicionalmente, se la ha podido aislar del parénquima de algunas solanáceas enfermas (*Solanum lycopersicum* o *Solanum melongena*) (Hernández-León et al., 2015). Además, es conocida como la alteración principal de la enfermedad “Pink eye”, que se encuentra involucrada con el desorden del peridermo (CABI, 2018).

El desorden del peridermo o su nombre común “Pink eye” o conjuntivitis de la papa (*Solanum tuberosum*) es una alteración conocida por producir un deterioro del tubérculo en su estadio de precosecha, cosecha y postcosecha. Esta enfermedad es generada por la apoptosis o muerte meristemática de las células que pertenecen al felógeno o peridermo del tubérculo. La evidencia física que presenta el desorden es una destrucción en el peridermo y a su vez una coloración rosada en la superficie, además de áreas hinchadas o ásperas en el planta y pudrición o lesiones aguachentas. La enfermedad ha sido relacionada con *Pseudomonas fluorescens* desde el año 1959 por los investigadores Folsom y Friedman (Folsom & Friedman, 1959).

En el año 2000, el Departamento de Protección de Plantas en Riyadh Abha, Arabia Saudita analizó las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con síntomas relacionados a lesiones en los tallos, raíces adventicias y pudrición en el fruto. La bacteria que se aisló de las plantas infectadas, se identificó como *Pseudomonas fluorescens* (biotipo I). Esta identificación fue confirmada mediante análisis biológicos y moleculares (Nefzi et al., 2018). Su primer descubrimiento fue en Maine, Estados Unidos, y se demostró la patogenicidad que desencadena *Pseudomonas fluorescens* en la papa (*Solanum tuberosum*) (Pérez Álvarez et al., 2015).

En los años 1999 y 2000 en Corea del Sur se descubrió una alteración relacionada con lesiones ocasionadas en raíces, tales como podredumbres blandas, oxidación y marchitamiento en *Lily bulbs*. La bacteria que fue aislada y confirmada por secuenciación con un análisis basado en 16S rRNA fue *Pseudomonas marginalis* en conjunto con *Pectovacterium* (W. Li, Ten, Kim, Lee, & Jung, 2018). En Nepal realizaron una evaluación biológica y económica de patógenos que afectan al cultivo de papa. *Pseudomonas marginalis* es considerada como un fitopatógeno altamente potencial en la planta, además, es reconocida como una plaga que se encuentra alrededor del mundo, por lo cual ingresa en la lista de patógenos cuarentenarios (Mahto, 2017).

## 1.2. Planteamiento del problema

El estudio se enfoca en la escasez de información acerca del tema expuesto en Ecuador, debido a que *Pseudomonas fluorescens* es utilizada como agente biológico certificado en varios países y se usa principalmente para regular la invasión de fitopatógenos (Gao et al., 2012). Adicionalmente, investigaciones acerca de la patogenicidad de la bacteria aún se encuentran en debate (Lulai, Sabba, Nolte, Gudmestad, & Secor, 2018), se consideran estudios arcaicos (Folsom & Friedman, 1959) o a su vez no demuestran el grado de patogenicidad que posee el microorganismo en solanáceas, solo demuestran que podría ser el agente causante (Huether & McIntyre, 1969). Asimismo, la



enfermedad mencionada, solo ha sido identificada y certificada en Arabia Saudita y en Estados Unidos (Goth, 1993). Sin embargo, según el Centro de Biociencia Agrícola Internacional (Por sus siglas en inglés CABI), que es el encargado de investigar problemas relacionados al medio ambiente y la agricultura para el conocimiento de plagas, diagnóstico, control y manejo de las mismas, establece que la enfermedad se ha estado distribuyendo en varios países de Latinoamérica (CABI, 2018).

Finalmente, este patógeno puede afectar a los cultivos de papa en el aspecto económico con relación a la agricultura dado que la tierra queda afectada y la misma aún con tratamientos previos o posteriores no se podría reutilizar, adicionalmente, la preservación del suelo presenta un elevado uso de sustancias químicas las cuales además de ser realmente costosas, son consideradas nocivas para el medio ambiente y por último también afectaría a la viabilidad del próximo cultivo (KIBRIA, 2016). En cuanto a *Pseudomonas marginalis*, es considerada una bacteria de control inmediato dado que es cuarentenaria (establece un patógeno de importancia para un zona de peligro y que puede eliminar o acabar con el cultivo si no existe control ejercido sobre la plaga) y su crecimiento ocasionaría la pérdida completa de la plantación, por lo cual, su identificación temprana es necesaria (W. Li et al., 2018).

### **1.3. Objetivo general**

- Identificar especies del género *Pseudomonas* spp., causantes del “desorden del peridermo” (Pink eye) en *Solanum tuberosum*, en tres provincias del territorio ecuatoriano.

### **1.4 Objetivos específicos:**

- Establecer la presencia de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas marginalis* en *Solanum tuberosum* mediante sintomatología, crecimiento en medios de cultivo y pruebas bioquímicas.

- Comprobar si las cepas aisladas pertenecen a *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas marginalis* mediante técnicas moleculares.
- Determinar la patogenicidad de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas marginalis* mediante Postulados de Koch.

### 1.5. Justificación de la investigación

Se debe considerar como un tema investigación debido a la escasa información que existe acerca de *Pseudomonas fluorescens* y su reciente conocimiento como causante principal de la enfermedad “Pink eye” además, del grado de incidencia /severidad que posee sobre el cultivo de papa en específico.

*Pseudomonas fluorescens* por las cualidades que presenta como la infección hacia los tejidos vegetales, la producción de sideróforos (elementos quelantes del hierro) y el aumento excesivo de polifenoles en tubérculos, determinan que sí puede generar una enfermedad con sintomatología relacionada a lesiones aguachentas, manchas negras, puntos rosados en la superficie y desórdenes en el peridermo (Muturi et al., 2018), desviando su función como control biológico.

En el caso de *Pseudomonas marginalis* dado su característica principal como microorganismo de alto impacto, es fundamental conocer si es el causante principal de la enfermedad en conjunto con *Pseudomonas fluorescens* para poder prevenir o manejar el cultivo mediante un protocolo establecido.

Además, aún las secuencias de referencia identificadas como *Pseudomonas fluorescens* o *Pseudomonas marginalis*, en base de datos, como NCBI en Estados Unidos, *The European Molecular Biology Laboratory* (EMBL), y el *DNA Data Bank of Japan* (DDBJ), se encuentran en etapa de investigación más no han sido publicadas y verificadas (Pérez Álvarez et al., 2015). A partir de las investigaciones realizadas por Muturi e investigadores (Muturi et al., 2018) las publicaciones acerca de los microorganismos mencionados han estado en

incremento sin embargo, la información es escasa en el país y en Latinoamérica.

Actualmente el país consume grandes cantidades de papa al año lo que genera una demanda mayor; por lo cual, es necesario conocer, controlar y manejar correctamente los cultivos evitando plagas o patógenos, especialmente en las principales provincias de producción como lo son Pichincha, Carchi y Chimborazo (Mancero, 2018). Adicionalmente, los agricultores realizan un diagnóstico visual o interpretaciones subjetivas e infieren que existe algún tipo de patógeno que está evitando el crecimiento regular del cultivo y sin tener una certeza objetiva, exponen a niveles altos de pesticidas causando así daños ambientales y a la salud humana.

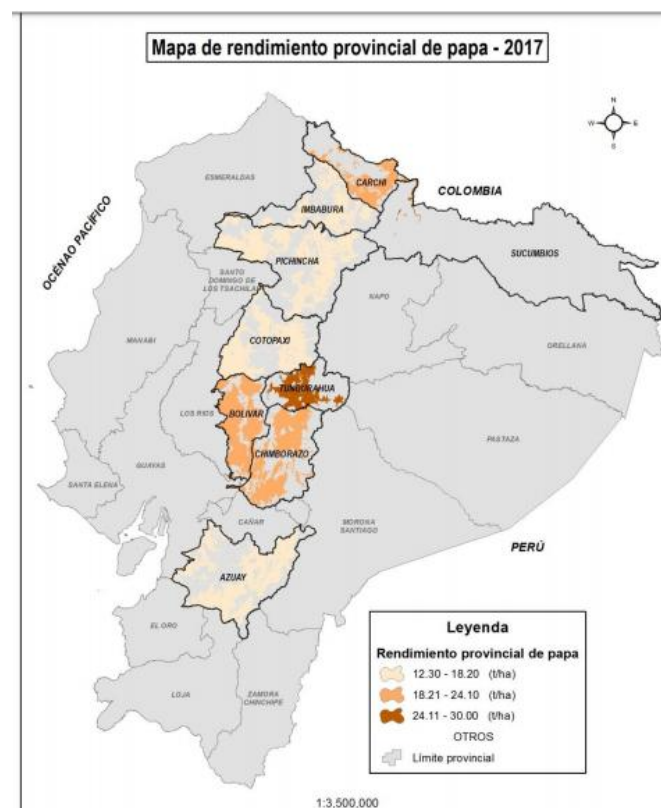
## **2. Marco teórico**

### **2.1. Cultivo de papa**

El cultivo de papa se considera como uno de los principales y más importantes a nivel agrícola en el país y en especial en la región sierra. Esto se debe a su importancia en la generación de ingresos y a la demanda del tubérculo en la dieta diaria de la población (Alonso, 2015). El informe de “Rendimientos de papa en el Ecuador 2017” realizado por el Ministerio de Agricultura y Ganadería refleja el nivel de productividad del cultivo a nivel nacional. Los principales resultados obtenidos en el informe expuesto anteriormente indican que el rendimiento alcanza un valor de 18.9 t ha<sup>-1</sup> (toneladas por hectárea). Este resultado se basa en el uso mayoritario de la semilla Superchola y el empleo de una densidad de 20062 plantas por hectárea (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2018).

#### **2.1.1. Provincias productoras de papa**

Las provincias con un rendimiento superior a la media nacional basado en el informe mencionado previamente fueron: Tungurahua con  $25.7 \text{ t ha}^{-1}$ , Carchi con  $21.9 \text{ t ha}^{-1}$ , Chimborazo con  $19.2 \text{ t ha}^{-1}$  y Pichincha con  $\text{t ha}^{-1}$  (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2018). La superficie que emplea el Ecuador para cultivos en general relacionado al último dato investigado en el 2017 mediante el INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos), da como resultado un área de 904224 ha que son dirigidas para dicho uso donde en la sierra se emplean 244789 ha, de las cuales el 13.87% es destinado al cultivo de papa. Las principales provincias con superficies cosechadas son Carchi, Chimborazo y Pichincha, con rendimientos por ha de 69%, 29% y 95%, respectivamente (Salazar, Cuichán, Ballesteros, Márquez, & Orbe, 2017). Los rendimientos de las provincias citadas se pueden observar en la Figura 1.



*Figura 1.* Mapa de rendimiento de las provincias de producción de papa en 2017.

Tomado de (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2018).

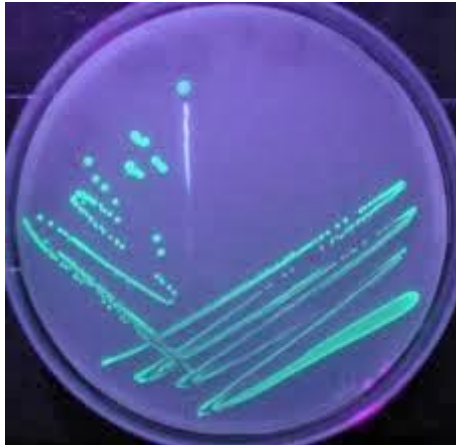


### 2.1.2. Factores de pérdida en el cultivo de papa

Los factores que varios agricultores observan como la principal causa de pérdida en los cultivos son las plagas o patógenos, otorgando el 54% del total a dicha problemática mientras que la humedad y el clima obtuvieron un 20% y 30% respectivamente. La plaga con mayor incidencia en el cultivo de papa se considera al tizón tardío o lancha (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2018).

## 2.2. Género *Pseudomonas*

Son bacilos, aerobios, Gram negativos. Las pruebas bioquímicas tradicionales dan como resultado que son oxidasa y catalasa positiva. La mayoría de especies de *Pseudomonas* poseen pioverdina, el cual, es un sideróforo que provoca fluorescencia en medios específicos y pueden ser observadas mediante luz UV (Figura 2) y se encuentra integrado propiamente en su genoma (Garrido-Sanz et al., 2016). La taxonomía de *Pseudomonas* es muy extensa y la relación filogenética con otras especies es muy cercana y cada una de ella puede ser identificada mediante el uso del primer 16S *rDNA*. En el caso del linaje de *Pseudomonas fluorescens* está dividida en seis grupos y *Pseudomonas marginalis* se encuentra integrada en uno de ellos por su casualidad de presentar pigmentos, dado ello, se recomienda usar otros tipos de genes *housekeeping* como *gyrB*, *rpoB* y *rpoD* para su identificación correcta y más específica (Santos & Ochman, 2016).



*Figura 2:* Producción de pioverdinas en B King Agar.  
Tomado de (AGROTEKNO LAB, 2017).

## **2.3. Agentes fitopatógenos**

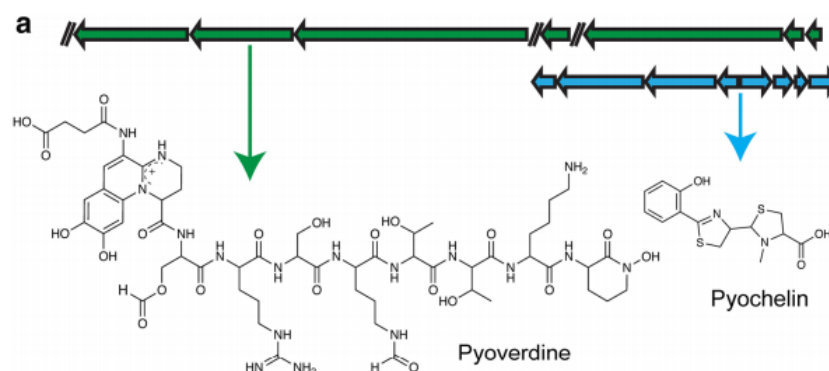
### **2.3.1. *Pseudomonas fluorescens***

*Pseudomonas fluorescens* es un microorganismo Gram negativo, aerobio, que se encuentra principalmente en suelo y agua. Su principal característica es la producción natural de sideróforos (elementos quelantes de hierro), conocidos como piocianinas y pioverdinas (Figura 3) las cuales en medios de cultivo tales como B King Agar o Agar *Pseudomonas* F generan colonias brillantes, confluentes y fluorescentes (McRose, Seyedsayamdost, & Morel, 2018). *Pseudomonas fluorescens* tiene la capacidad de formar esporas y su temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 33°C. La fluoresceína puede ser detectada bajo luz UV siempre y cuando el medio sea reciente o que el operador no haya realizado pases por diferentes medios de cultivo. Posee la capacidad de estimular el crecimiento de las plantas, además es utilizada como control biológico y varios estudios plantean su uso en tratamientos antimicóticos y antibacterianos contra *Rastonia solanacearum*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*, como algunos ejemplos (Gao et al., 2012). En condiciones de laboratorio pueden crecer rápidamente en medios enriquecidos

con minerales como agar nutritivo o caldo nutritivo (Pascual, Moreno, Ros, & Vargas, 2015).

Existen cuatro casos de mayor interés al hablar de la patogenicidad que posee *Pseudomonas fluorescens*. El primer caso es en Argentina en *Cichorium endivia*, la cual, presentaba lesiones oscuras y pudrición blanda en las hojas (Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (Cuba), Coto Arbelo, Echemendía Pérez, & Ávila Quezada, 1986). El segundo caso fue en Arabia Saudita en plantas de tomate, donde se observó pudrición en tallo (Pérez Álvarez et al., 2015). El tercero en China en frutos de brócoli donde, se apreció una pudrición blanda de color negro o marrón y humedad. Y el cuarto caso en Jiangsu en ajo, donde los síntomas eran lesiones húmedas en el tejido interior del tallo y manchas amarillas en las hojas.

Todos los casos fueron comprobados por pruebas bioquímicas y moleculares y dieron como resultado que su causante principal era *Pseudomonas fluorescens* (Pérez Álvarez et al., 2015).



*Figura 3:* Mecanismo de formación de sideróforos por genes asociados al género *Pseudomonas* spp.

Tomado de (McRose et al., 2018).

### 2.3.2. *Pseudomonas marginalis*

*Pseudomonas marginalis* es una bacteria Gram negativa, aerobia, que se encuentra en suelo y causa lesiones húmedas y consecuentemente raíces blandas provocando la muerte de la planta. Bioquímicamente se caracteriza por ser catalasa y oxidasa positiva. Está ubicada en el grupo de *Pseudomonas fluorescens*, por su actividad infecciosa similar y la producción de fluoresceína en medios específicos. Fue aislada por primera vez de bulbos de cebolla y comprobada por el análisis de 16S ARNr mediante secuenciación y posteriormente, por medio, de postulados de Koch su patogenicidad fue verificada en plantas de tabaco. Se considera que su acción fitopatógena es en asociación con *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens* y *Klebsiella oxytoca*. Se encuentra distribuida a lo largo del mundo y la Asociación de Protección Agrícola la considera una bacteria de alto impacto. Los puntos amarillos que se observan en la Figura 4, son los lugares de ubicación del microorganismo mencionado (Achbani, Sadik, El Kahkahi, Benbouazza, & Mazouz, 2014).



Figura 4: Distribución de *Pseudomonas marginalis* en el mundo  
Tomado de (Discovery Life, 2017).



#### 2.4. Desorden del peridermo; “Pink eye”

La enfermedad “Pink eye”, o también conocida como síndrome del desorden del peridermo, se considera una perturbación fisiológica de las plantas causada por la apoptosis de las células meristemáticas del felógeno y consecuentemente la degeneración del tejido. En su mayoría ocurre en regiones que se encuentran en América del Norte y es una enfermedad específica para *Solanum tuberosum*. Se considera que el síndrome es generado por una combinación de microorganismos y del clima al cual están expuestos los cultivos. La enfermedad se encuentra relacionada cuando las temperaturas son altas y existe un porcentaje alto de humedad (Lulai et al., 2018). El deterioro en el peridermo causa un aumento en la producción de polifenoles de suberina, el cual es un polímero encontrado en las paredes vegetales de todas las plantas. Dicha pérdida de la integridad del tejido y la acumulación excesiva de los polifenoles permiten que microorganismos puedan ingresar al tejido del tubérculo, causar lesiones y producir un deterioro en la sección cortical, además de afectar todo el tejido y afectar visiblemente a toda la planta (Lulai et al., 2006).

La sintomatología visual que se presenta específicamente en las superficies de *Solanum tuberosum*, son una coloración rosada en forma de manchas que se encuentran alrededor y en el interior del tubérculo y estas a su vez desarrollan una necrosis o pudrición extrema (Figura 5) (Lulai et al., 2018). Además, dicho desorden está asociado con la pérdida de agua en el tubérculo y por consiguiente, el volumen, adicionalmente, la planta se vuelve susceptible a más infecciones bacterianas (Lulai, Neubauer, Huckle, & Suttle, 2014). Lulai e investigadores sugieren que la coloración rosada es provocada por el resultado de una formación de un intermediario relacionado en la biosíntesis de melanina y que aparece cuando el tubérculo ha sufrido una herida y se realiza un proceso natural de la oxidación de tirosina para proteger la planta (Lulai et al., 2018). Se involucra directamente a *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas marginalis* como principales agentes fitopatógenos (Zitter, 2011).

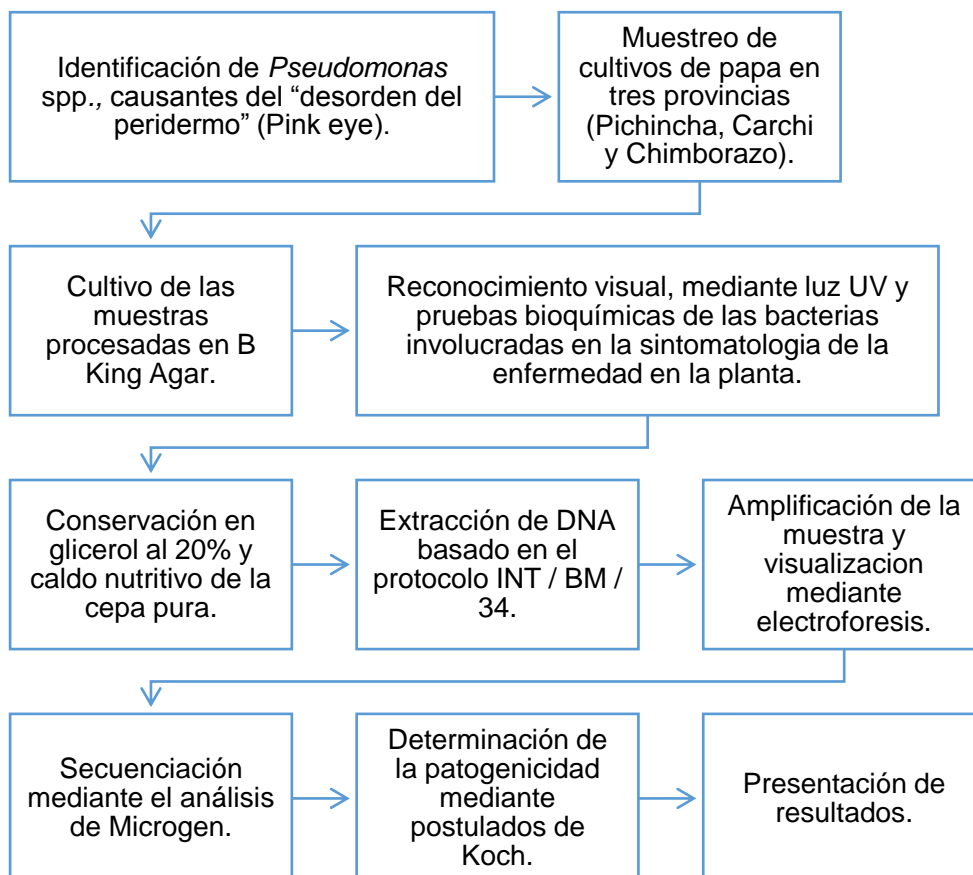


*Figura 5:* Sintomatología del desorden del peridermo (Pink eye).  
Tomado de (Wang & Gevens, 2018).

### 3. Diseño del plan experimental

Tabla 1

*Diseño experimental; Diagrama de flujo*



## 4. Procedimientos

### 4.1. Población, muestra y permisos

La población estuvo conformada por unidades de producción agrícola dedicadas a la siembra del cultivo de papa. Los cultivos muestreados se encontraban en fases de pre cosecha o cosecha. Las provincias donde se obtuvieron las muestras fueron: Pichincha, Chimborazo y Carchi, con 18, 30 y 11 muestras, respectivamente, y su determinación de tamaño se basó a la superficie de plantación por provincia. Cada muestra se receptó bajo el código otorgado por el laboratorio de fitopatología de la Agencia Agrocalidad, FP-19- en adelante y el dígito fue diferente dependiendo de las coordenadas y puntos de recolección. Para el muestreo se tomó en cuenta el número total de cantones de cada provincia que producen papa, procurando cubrir más del 50% de la población de la provincia (ESPAC, 2016).

El muestreo fue aleatorio en todos los predios del cultivo. La característica principal en la que se basó el muestreo fue identificar la sintomatología provocada por el género *Pseudomonas* spp. que presentaba la planta, tal como una pudrición acelerada, puntos rosados y una suavidad notable en la superficie del tubérculo, lesiones aguachentas y manchas negras en el tallo o una afección en el peridermo. Las muestras se transportaron en *coolers* con envases congelados para establecer una cadena de frío y garantizar la conservación de las mismas hasta su llegada al laboratorio para el análisis.

En cuanto a los permisos para la recolección de muestras, Agrocalidad tiene como objetivo encontrar algún patógeno que afecte en cuanto a la sanidad vegetal, animal y la inocuidad de alimentos del país, por lo cual, la metodología realizada es válida basada en el protocolo NIMF N°31, que por sus siglas en inglés; Metodologías para muestreo de envíos (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación [FAO], 2008) y no requiere de un Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos si tiene como objetivo cumplir con los

principios institucionales determinados por la Ley Orgánica de Seguridad Agropecuaria, como se determina en el Oficio Nro. MAE-DNB-2019-0451-O emitido por el Ministerio del Ambiente (Anexo 1). Además, en el Manual General de Cuarentena Vegetal de la dirección de Vigilancia Fitosanitaria de Agrocalidad, se establecen los procedimientos y protocolos para la prevención de plagas (Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario [AGROCALIDAD], 2015).

## **4.2. Materiales y métodos para la obtención de datos**

### **4.2.1. Medios de Cultivo**

El medio de cultivo que se utilizó fue B King Agar, selectivo del género *Pseudomonas*, el mismo fue empleado para identificar la producción naturalmente de sideróforos como piocianinas, pioverdinas, las cuales, por su nombre producen colonias brillantes, confluentes y fluorescentes en los diferentes medios de cultivo, además de ser visibles mediante una observación mediante luz UV (Park, Dutta, Ann, Raaijmakers, & Park, 2015). Por lo tanto, esta técnica permitió descartar colonias que no eran del género *Pseudomonas* y a su vez purificar las que se seleccionaron para realizar los análisis posteriores.

### **4.2.2. Cultivo**

Se realizó primero una maceración de las secciones con sintomatología de las muestras de tubérculo y tallo con agua peptona autoclavada para generar una solución. Luego, se efectuaron tres diluciones seriadas en agua peptona y mediante observación de la turbidez de la solución, se eligió la dilución  $10^{-3}$  en todas las muestras, debido a que la concentración bacteriana fue menor para que el aislamiento posterior fuera de fácil acceso. Posteriormente, todas las muestras fueron cultivadas en cada medio mencionado en tres repeticiones. Con respecto al suelo se realizó una solución  $10/90 \text{ g ml}^{-1}$  y tres diluciones

seriadas y se eligió la dilución  $10^{-2}$  para su cultivo. Posteriormente a las 24 a 48 horas de incubación a  $26^{\circ}\text{C}$ , se identificaron las colonias fluorescentes mediante una lámpara UV para su aislamiento y obtención de colonias puras. La purificación se realizó mediante la técnica de estriado por agotamiento (Ramírez et al., 2016).

#### **4.2.3. Identificación del microorganismo**

Posterior a que la cepa ha sido purificada, se procedió a realizar pruebas bioquímicas tradicionales como catalasa, oxidasa, tinción Gram y además se empleó el procedimiento de identificación de microorganismos Biolog Inc mediante la base de datos MicroLog™ basado en el instructivo de “GEN III Microplate” (BIOLOG, 2016) . Este protocolo se fundamenta en el empleo de los reactivos e implementos GEN III e IF-A específicos para bacterias aerobias (BIOLOG, 2016). La técnica consistió en medir la transmitancia del reactivo en presencia de las colonias seleccionadas previamente y colocadas en incubación por 24 horas. La medida debe estar entre 92 a 94.5 (longitud de onda), debido a que la concentración de las bacterias debe ser suficiente para que pueda oxidar correctamente los 96 pocillos cargados de azúcares y generar una respuesta e identificación del microorganismo (Xu, Ge, & Poudel, 2015). La tecnología Biolog Inc. se basó en pruebas bioquímicas (Tabla 2) y el procedimiento seguido fue el que se observa a continuación (Tabla 3) (BIOLOG, 2016).

Tabla 2

Pruebas bioquímicas para bacterias aerobias basadas en la tecnología Biolog.

<b>GEN III MicroPlate</b>																							
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12												
Negative Control	Dextrin	D-Maltose	D-Trehalose	D-Cellobiose	Gentiobiose	Sucrose	D-Turanose	Stachyose	Positive Control	pH 6	pH 5												
B1	D-Raffinose	B3	D-Melibiose	B5	D-Salicin	B6	N-Acetyl-D-Glucosamine	B7	N-Acetyl-β-D-Mannosamine	B8	N-Acetyl-D-Galactosamine	B9	N-Acetyl Neuraminic Acid	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-PO4	D7	D-Fructose-6-PO4	D8	D-Aspartic Acid	D9	D-Serine	D10	Troleandomycin	D11	Rifamycin SV	D12	Minocycline
E1	Gelatin	E2	Glycyl-L-Proline	E3	L-Alanine	E4	L-Arginine	E5	L-Aspartic Acid	E6	L-Glutamic Acid	E7	L-Histidine	E8	L-Pyroglutamic Acid	E9	L-Serine	E10	Lincomycin	E11	Guanidine HCl	E12	Niaproof 4
F1	Pectin	F2	D-Galacturonic Acid	F3	L-Galactonic Acid Lactone	F4	D-Gluconic Acid	F5	D-Gluconic Acid	F6	Glucuronamide	F7	Mucic Acid	F8	Quinic Acid	F9	D-Saccharic Acid	F10	Vancomycin	F11	Tetrazolium Violet	F12	Tetrazolium Blue
G1	p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	G2	Methyl Pyruvate	G3	D-Lactic Acid Methyl Ester	G4	L-Lactic Acid	G5	Citric Acid	G6	α-Keto-Glutaric Acid	G7	D-Malic Acid	G8	L-Malic Acid	G9	Bromo-Succinic Acid	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,L-Butyric Acid	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

Tomado de (BIOLOG, 2016)

Tabla 3

*Procedimiento BIOLOG*

<b>Procedimiento tecnología Biolog</b>	
A.	Medio de cultivo con el microorganismo de interés.
B.	Recolección del microorganismo mediante un hisopo.
C.	Introducción del hisopo en el reactivo GEN III y agitación.
D.	Medición de la transmitancia 92 a 94.5 nm.
E.	Colocación del reactivo con una micropipeta multicanal.
F.	Incubación por 24 horas.
G.	Observación de la oxidación.
H.	Lectura mediante el equipo Biolog.

**4.2.4. Conservación del microorganismo**

Cuando el microorganismo fue identificado mediante el procedimiento Biolog, se procedió a conservar la cepa. Posteriormente, se recogió una muestra de las colonias con un palillo autoclavado del medio de cultivo y se inoculó en caldo nutritivo. Luego de su crecimiento, se conservó en glicerol al 20% para garantizar que la temperatura no pueda romper o destruir las paredes celulares y/o la envoltura celular bacteriana. Finalmente, se criopreservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior extracción de ADN (Parra et al., 2006).

#### **4.2.5. Extracción de ADN**

Previamente a la extracción de ADN, se activó de nuevo la cepa seleccionada en caldo nutritivo, posterior a 24 h se recolectó 2 mL y se centrifugó a 14000 rpm por 10 min y se retiró el sobrenadante. El precipitado de la muestra fue resuspendida en 100  $\mu$ L en agua libre de DNasa y RNasa. Se calentó la muestra a 95 °C con agitación por 10 min y se centrifugó nuevamente. Se tomaron 2  $\mu$ L y se midió la calidad del DNA extraído en Nanodrop, el cual fue mayor de 1000 nm, por lo cual se realizaron diluciones para su amplificación (Cercenado & Cantón, 2005).

#### **4.2.6. Amplificación y electroforesis**

Para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se utilizaron las muestras con una absorbancia entre 300 a 1000nm. Los reactivos empleados en la PCR fueron el primer universal 16S y sus respectivos cebadores 27F y 142R, haciendo referencia a las secuencias forward (F) y reverse (R). Adicionalmente se utilizó, la enzima Taq polimerasa, el templado de DNA y un master mix, el cual contiene los reactivos pertenecientes al kit de Invitrogen™. El volumen total para la PCR fue de 50  $\mu$ L, 48  $\mu$ L de los reactivos empleados y 2  $\mu$ L del templado de DNA. Los reactivos de la PCR se realizaron en una cabina de flujo separada de las muestras de DNA para evitar contaminación (Ramírez et al., 2016).

Al inicio del procedimiento se realizó una multiplicación, que partía del stock del reactivo por el número de muestras que se iba a realizar, por ejemplo, de Pichincha fue por 4, Carchi y Chimborazo por 10, dado que dichos compuestos químicos no pueden estar mucho tiempo sin preservación en frío, por lo cual, se realiza una alícuota y posterior a ello se distribuyó en cada tubo.

Más adelante, a los tubos se los condujo en un cooler específico de muestras de PCR a otra cabina de ensamblaje para colocar el 2  $\mu$ L adicional del DNA.



Posteriormente se colocaron las muestras en un termociclador a 95°C a 10 min con agitación para la desnaturalización de las muestras, la temperatura luego descendió a 50°C para el Anillaje (Annealing) de los primers, subió a 72°C para la Extensión y finalmente subió a 94°C nuevamente para la desnaturalización continua de todas las muestras y que permitan la hibridación, esto se realizó por 30 ciclos en un tiempo aproximado de 2 horas y 30 minutos (Ramírez et al., 2016).

Finalmente, se realizó un gel de 1.5% de agarosa en 65 mL de buffer TBEX al 0.5% con 3 µL de Invitrogen™ SYBR™ Safe™ DNA Gel Stain. Se colocaron 4 µL de muestra y 1 µL del buffer de Invitrogen llamado DNA Gel Loading Dye (6X) y se empleó el marcador molecular Low Mass Ladder de Invitrogen™. Se distribuyeron las muestras en cada pocillo del gel y finalmente los electrodos se encontraban ubicados del polo negativo al positivo y el voltaje empleado fue de 110 V por 40 min (Ramírez et al., 2016).

#### **4.2.7. Secuenciación**

Cuando el tiempo de la electroforesis finalizó, se colocó el gel en una cámara que permite la visualización de la fluorescencia de las bandas que amplificaron correctamente en relación al marcador molecular empleado. Se observaron las bandas generadas por la técnica y las muestras que daban un resultado positivo de la PCR, se enviaron a MacroGen para su secuenciación y su análisis se realizó en NCBI Blast, Ezo Bio Cloud, Mega y Genious, que son programas considerados eficaces para la identificación de microorganismos. Los permisos para el envío de muestras biológicas se basan en la solicitud de autorización emitida por la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARSCA) (Anexo 2).

#### **4.2.8. Postulados de Koch**

Se empleó el protocolo del Departamento de Fitopatología de la Escuela Superior de Agricultura de la Universidad Sao Paulo-Brasil (Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz," 2015). El procedimiento se basó en la ejecución de la escala de Mcfarland (Bragami, 2015), para generar una curva de calibración y con los datos obtenidos, se extrapoló con la medición de la absorbancia del microorganismo para su inoculación en la planta. La escala de Mcfarland se realizó con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y cloruro de bario (BaCl<sub>2</sub>) a diferentes concentraciones y medidas a 600 nm (Tabla 4). Se eligió una absorbancia promedio entre el punto 3 y 4 de la curva (transmitancia del 32%), debido a que el número de células considerada para que el género *Pseudomonas* produzca un tipo de reacción en la planta se encuentra entre 9 a 12\*10<sup>8</sup> u.f.c (Anexo 3). El protocolo para llegar a dicha concentración fue activar la cepa de interés, autoclavar agua tipo I y con un hisopo autoclavado previamente, se recogieron las colonias e inocularon con agua hasta llegar al porcentaje de transmitancia anteriormente señalado medido en un turbidímetro. A continuación, se procedió a realizar una cámara húmeda, que consiste en un envase cerrado con algodones empapados de agua en los costados y en el centro se dispuso los tubérculos para su tratamiento. Se realizaron 12 incisiones en cada muestra, la primera se consideró como testigo, la cual no fue inoculada, la segunda fue inyectada con agua destilada y las ocho adicionales con el cultivo de *Pseudomonas* donde se depositó 1ml del inóculo en cada incisión. Posteriormente, se observó la sintomatología generada por la introducción de los microorganismos.

Tabla 4

*Escala de McFarland*

<b>Núm.</b>	<b>BaCl<sub>2</sub> 0,048M</b> <b>ml</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,36M</b> <b>ml</b>	<b>Vf</b> <b>ml</b>	<b>Núm. de</b> <b>Células</b>
0.5	0.05	9.95	10	1.5 * 10 <sup>8</sup>
1	0.1	9.9	10	3 * 10 <sup>8</sup>
2	0.2	9.8	10	6 * 10 <sup>8</sup>

3	0.3	9.7	10	$9 * 10^8$
4	0.4	9.6	10	$12 * 10^8$
5	0.5	9.5	10	$15 * 10^8$
6	0.6	9.4	10	$18 * 10^8$
7	0.7	9.3	10	$21 * 10^8$
8	0.8	9.2	10	$24 * 10^8$
9	0.9	9.1	10	$27 * 10^8$
10	1	9	10	$30 * 10^8$

## 5. Resultados y Discusión

### 5.1. Presencia del género *Pseudomonas* en *Solanum tuberosum* en Pichincha, Carchi y Chimborazo

#### 5.1.1. Sintomatología

El primer resultado obtenido fue la visualización de la sintomatología en las muestras recolectadas. Se identificaron características como pudrición acelerada, manchas negras y lesiones aguachentas en el tallo (Figura 7 A, B, C). Adicionalmente, el tallo puede llegar a secarse con el tiempo conforme la infección sea más severa y si esto se produce en estadios importantes de la planta como la floración o precosecha, los tubérculos no podrían absorber los nutrientes importantes para su desarrollo (Figura 7 D, E, F).



*Figura 7:* Muestras de tallo que presentan sintomatología relacionada con el desorden del peridermo.

- a) Pudrición acelerada.
- b) Manchas negras.
- c) Lesiones aguachentas en el tallo.
- d) Tallos secos en primer estadio de la enfermedad.
- e) Tallos secos en segundo estadio de la enfermedad.
- f) Tallos secos en estadio final de la enfermedad.

La sintomatología del tubérculo encontrada fueron manchas rosadas, negras y verdes en la superficie del tubérculo (Figura 8 A, B, C, respectivamente), además de malformaciones por el mal funcionamiento que existe en el peridermo (Figura 8 B, C). Se apreció una suavidad notable en el tubérculo por la coloración negra o marrón, dado que cuando presenta este tipo de coloraciones es porque la papa se está empezando a podrir y empieza a perder dureza en el peridermo y superficie (Figura 8 C, D).

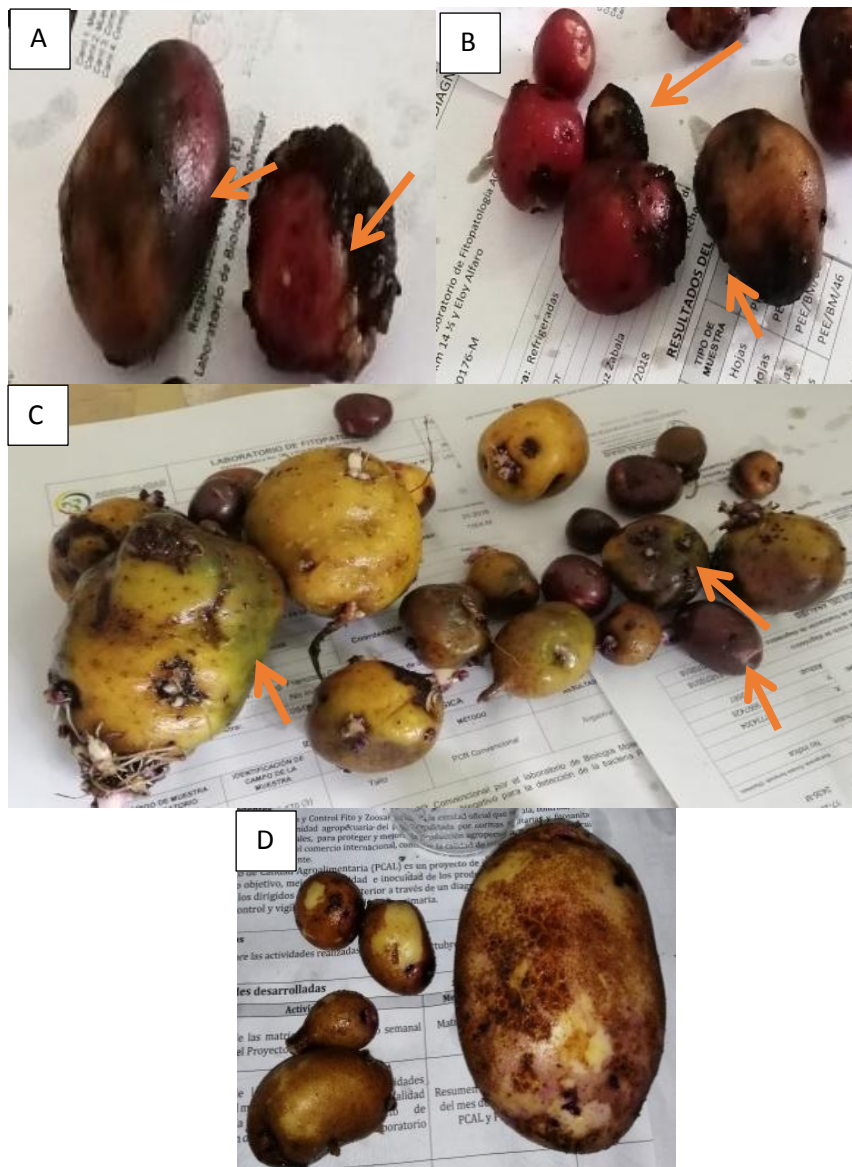


Figura 8: Muestras de tubérculo de las diferentes provincias con la sintomatología visible.

- a) Manchas rosadas en la superficie del tubérculo.
- b) Manchas negras y malformaciones en la superficie del tubérculo.
- c) Manchas verdes y malformaciones en la superficie del tubérculo.
- d) Pérdida de estabilidad en la superficie.

La visualización de la sintomatología relacionada con la afección “Pink eye” es realmente importante, debido a que se puede identificar fisiológicamente las anomalías generadas por *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas marginalis* en la superficie del tubérculo, planteado este concepto, en 1959 los

investigadores Folsom y Friedman evidenciaron alteraciones en el cultivo de papa, como manchas negras, verdes, puntos rosados, pudrición interna y tallos con lesiones aguachentas y secos (Folsom & Friedman, 1959).

Los mismos síntomas fueron encontrados en esta investigación en las diferentes provincias muestreadas del Ecuador y como resultado de un análisis molecular se comprobó que la causa principal era la patogenicidad que desencadena *Pseudomonas fluorescens*. Adicional a ello, (Alippi, López, Rollan, Ronco, & Aguilar, 2002; B. Li et al., 2009; Molan & Ibrahim, 2007), demuestran que la enfermedad comenzó con sintomatología similar en hojas y tallos a medida del paso por los diferentes estadios de la planta, lo cual si se evidenció en las muestras correspondientes a este trabajo de titulación, sin embargo la enfermedad se desarrolló con mayor gravedad en los tubérculos aislando todas las bacterias de ese tipo de muestra y como resultado final dichos investigadores relacionan la patogenicidad con *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas marginalis*, sin embargo no se puede enlazar a dos diferentes microorganismos como uno mismo, dado que por separado pueden ejercer síntomas diferentes, no obstante, en todas las muestras que se aisló las bacterias correspondientes, se verificó que dichos microorganismos mencionados anteriormente pueden trabajar en simbiosis y desarrollar patogenicidad en la papa, adicional a ello, los síntomas de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas marginalis* por separado son similares y varían tan solo en el nivel de pérdida del almidón.

Del mismo modo un estudio realizado por Muturi y colegas en el 2018, encontraron la misma afección al tallo, tubérculo y raíz de *Solanum tuberosum* y presentaba síntomas similares al desorden del peridermo (manchas negras, pérdida del almidón, suavidad en el tubérculo) por lo cual se observa que hay estudios tanto antiguos como actuales que aseguran que la causa principal de esta infección bacteriana en general es *Pseudomonas fluorescens*, y le dan un énfasis a esta bacteria en solitario debido a que sus características universales son las de controlar a otros patógenos sin embargo, esta investigación

comparada y analizada con los diferentes estudios aseguran que genera patogenicidad en la papa.

### **5.1.2. Crecimiento en medios de cultivo y visualización mediante luz UV**

El medio B King Agar posee la capacidad de permitir que el género *Pseudomonas* pueda generar naturalmente sideróforos (pioverdinas y piocianinas), elementos que son claramente visibles en colonias de color verde, amarillo intenso y en ciertos casos unos colores anaranjados y/o marrones y fluorescentes. En la Figura 9A se puede visualizar las colonias que produjeron fluorescencia (color verde) a diferencia de las que presentan un color blanco y anaranjado. En la Figura 9B no se observa fluorescencia y en la 9C sí, lo que permitió seleccionar las cepas que solo produjeron sideróforos en varios pases. Este proceso se realizó con todas las muestras que demostraban las características deseadas de fluorescencia como se visualiza en la Figura 9D.

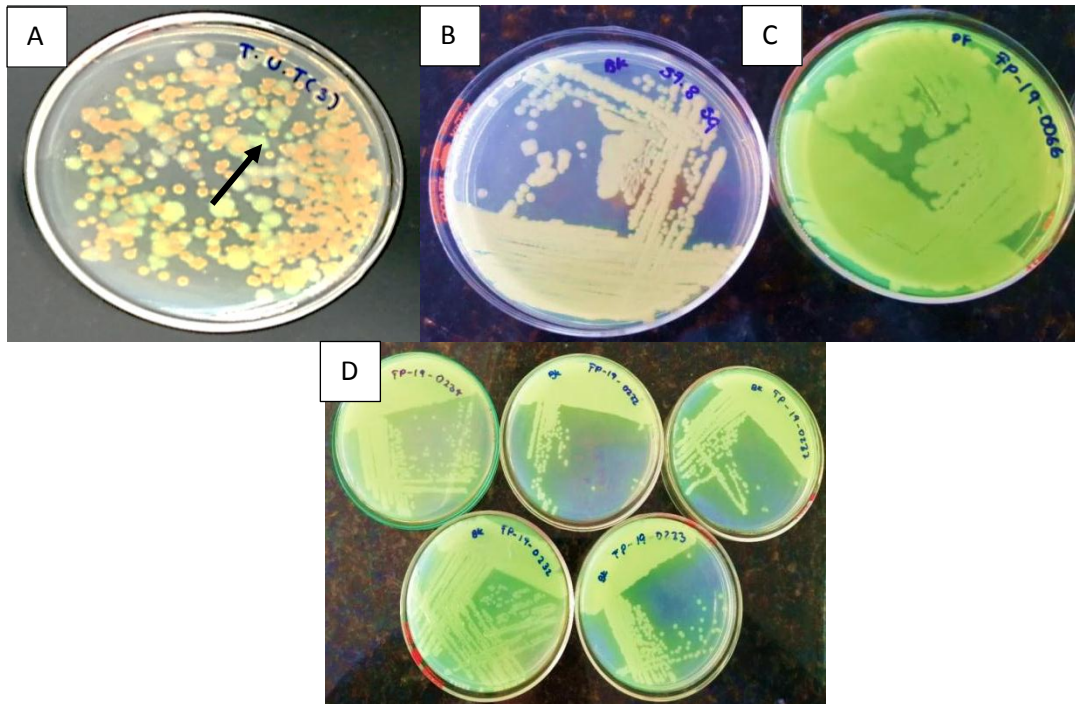


Figura 9: Crecimiento bacteriano en el medio B King.

- a) Crecimiento bacteriano.
- b) Crecimiento bacteriano sin presencia de fluorescencia.
- c) Crecimiento bacteriano con presencia de fluorescencia.
- d) Crecimiento bacteriano con presencia de fluorescencia en diferentes cepas.

La visualización a través de luz UV permitió que la detección y aislamiento fuera parte de la selección y purificación correcta de una sola colonia, además, que solo las bacterias que produjeron fluorescencia tanto en luz natural como luz UV llegaron a ser del género *Pseudomonas* spp. La luz UV permite que los sideróforos de los microorganismos en especial de *Pseudomonas fluorescens* se visualicen a pesar de que las colonias se encuentren en otro tipo de medio que no tenga propiedades como B King (Figura 10 A, B).



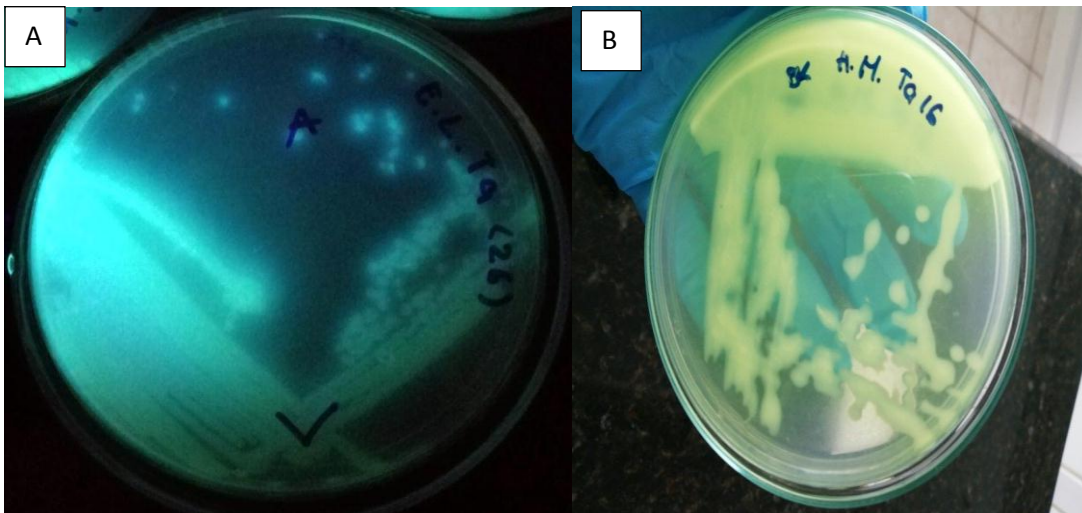


Figura 10: Identificación de las colonias fluorescentes.

- a) Identificación mediante luz UV.
- b) Visualización del medio en luz natural.

Finalmente, se evidenciaron diferencias bajo luz UV como de varios tipos de fluorescencia entre las colonias, las cuales presentaban un color verde o azul (Figura 11). Esto es debido a que los sideróforos presentan diferentes colores dependiendo que tipo de elemento quelante produce el microorganismo. También se observó que la diferencia de colores generados se debe a que son especies distintas de *Pseudomonas*, por lo cual se aislaron y purificaron para su análisis posterior con pruebas bioquímicas.



Figura 11: Colonias detectadas bajo luz UV.

Completando los resultados de la producción de fluorescencia como primer mecanismo de selección de las cepas, en el 2006 Lulai e investigadores plantean que el desorden del peridermo está involucrado con una fluorescencia interna que presenta una sección de la papa al ser cortada y vista bajo luz UV, por lo cual, aseguran que la causa de esta característica visual de pigmentos en un explante debe ser una especie de microorganismo que tenga la capacidad de producir sideróforos bajo estas mismas condiciones.

Ellos realizan a su vez pruebas que permitan la visualización de dichas características, sin embargo, no se ejecutan en medios de cultivo si no mediante el corte natural del tubérculo, lo cual no se realizó en la investigación pero demuestra que si existe una fluorescencia ejercida por un microorganismo como la que se observó en el presente estudio (Lulai et al., 2006).

No obstante, en el 2018 Lulai junto con nuevos analistas vegetales y microbiólogos plantean la posibilidad de que existan diferentes colores de sideróforos excitados mediante luz UV y que estos pertenezcan a distintos tipos de microorganismos relacionados con el subgrupo de *Pseudomonas fluorescens* (Lulai et al., 2018) de la misma manera como se evidencio en la presente investigación, ya que se observó colores verdes y azules.

Finalmente, McRose y colaboradores en el 2018 establecen que las diferencias entre los sideróforos o pigmentos pueden deberse al grado de patogenicidad y consecuentemente al subgrupo que pertenezcan los microorganismos, debido a ello al ser *Pseudomonas marginalis* del mismo subgrupo de *Pseudomonas fluorescens* pueden poseer características similares al infectar a una planta pero se pueden diferenciar en el tiempo de acción, en genes que produzcan este tipo de color o a su vez (McRose et al., 2018) y como se evidenció en los resultados siguientes el nivel de pérdida de almidón.

Además, en la Figura 9, se visualiza cepas que no presentan fluorescencia a diferencia de las otras, aunque estas hayan sido aisladas en el medio selectivo

del género (B King), es debido a que existen cepas que pertenecen al género *Pseudomonas* sin embargo, no generan fluorescencia porque no poseen los genes particulares como *rob* que tienen integrado en su genoma dicha cualidad, pero todas las cepas incluidas en el subgrupo de *Pseudomonas fluorescens* específicamente *Pseudomonas marginalis*, poseen dicha característica.

Adicional a ello, por su capacidad de producir pigmentos se observó mediante luz UV diferentes tonalidades que otras especies no producen o colonias que producían fluorescencia al natural, pero no en la luz ultravioleta, dado dicho caso, solo se seleccionó y purificó las colonias que producían sideróforos en los dos ámbitos.

### 5.1.3. Pruebas Bioquímicas

Se procedió con el empleo de pruebas bioquímicas tradicionales para la identificación del microorganismo, entre ellas catalasa, oxidasa y tinción Gram. El género *Pseudomonas*, en especial para las especies de interés que fueron *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas marginalis*, son catalasa y oxidasa positiva, esto quiere decir, que cuando la bacteria hizo contacto con agua oxigenada en el caso de la prueba catalasa, se produjo una reacción de gasificación o formación de burbujas (Figura 12A) y en el caso de la oxidasa, la tirilla de control se tornó de un color morado o azul (Figura 12B).

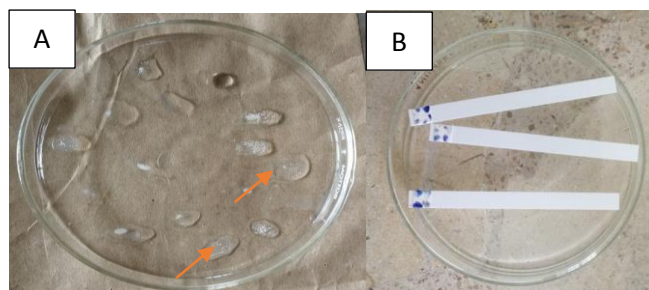
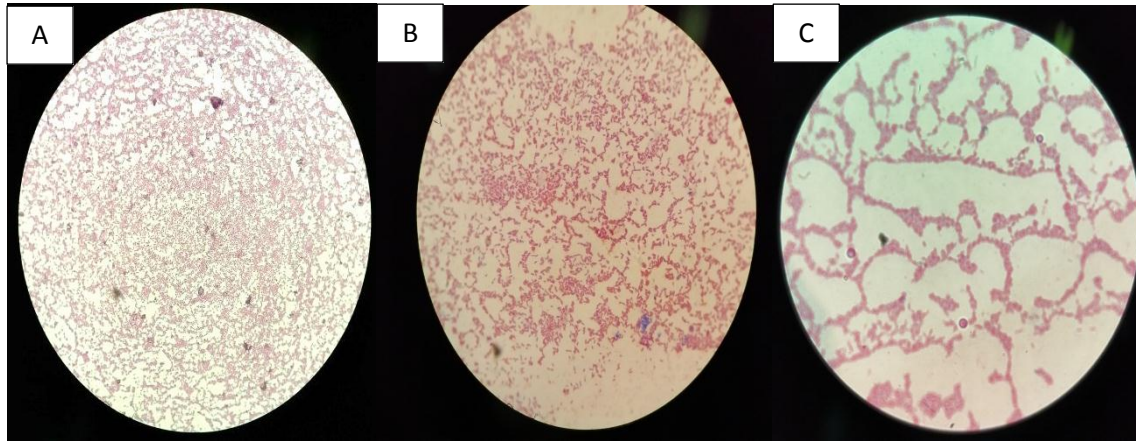


Figura 12: Pruebas bioquímicas.

- a) Catalasa positiva.
- b) Oxidasa positiva.

En cuanto a la tinción Gram, el género *Pseudomonas* es Gram negativo, por lo cual, se visualizó un color rosado en los bacilos mediante observación microscópica en 10x, 40x y 100x (Figura 13 A, B, C, respectivamente).



*Figura 13:* Tinción gram de las muestras observadas mediante microscopía.

- a) 10x.
- b) 40x.
- c) 100x.

Finalmente, empleando la tecnología Biolog, que se basó en la oxidación de azúcares revestidos en 96 pocillos (Tabla 2) y dependiendo el cambio de color que presenta (Figura 14), se logró mediante la base de datos Microlog perteneciente a la tecnología usada, identificar el género y especie del microorganismo (Figura 15). Este procedimiento se fundamentó en introducir la placa en el equipo Biolog y observar el resultado que lanzó el programa; cabe recalcar que dicha tecnología puede garantizar un correcto resultado en relación al género pero en cuanto a la especie puede variar en la secuenciación, pero fue de gran ayuda para eliminar cepas que no pertenecían al género *Pseudomonas*.

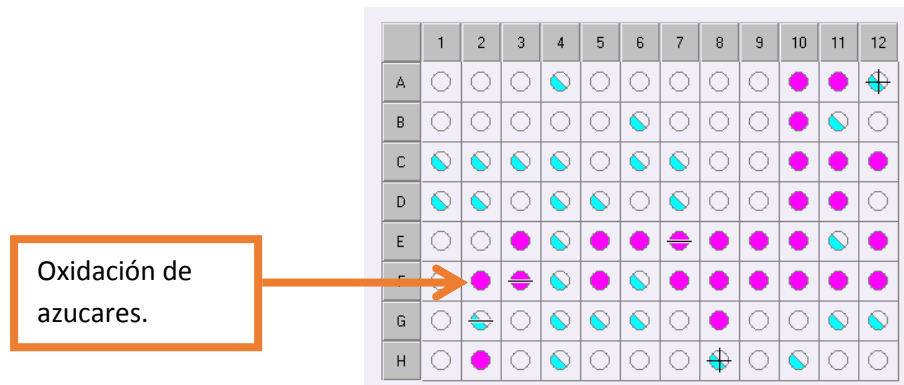


Figura 14: Placa BIOLOG con sus diferentes azúcares oxidados.

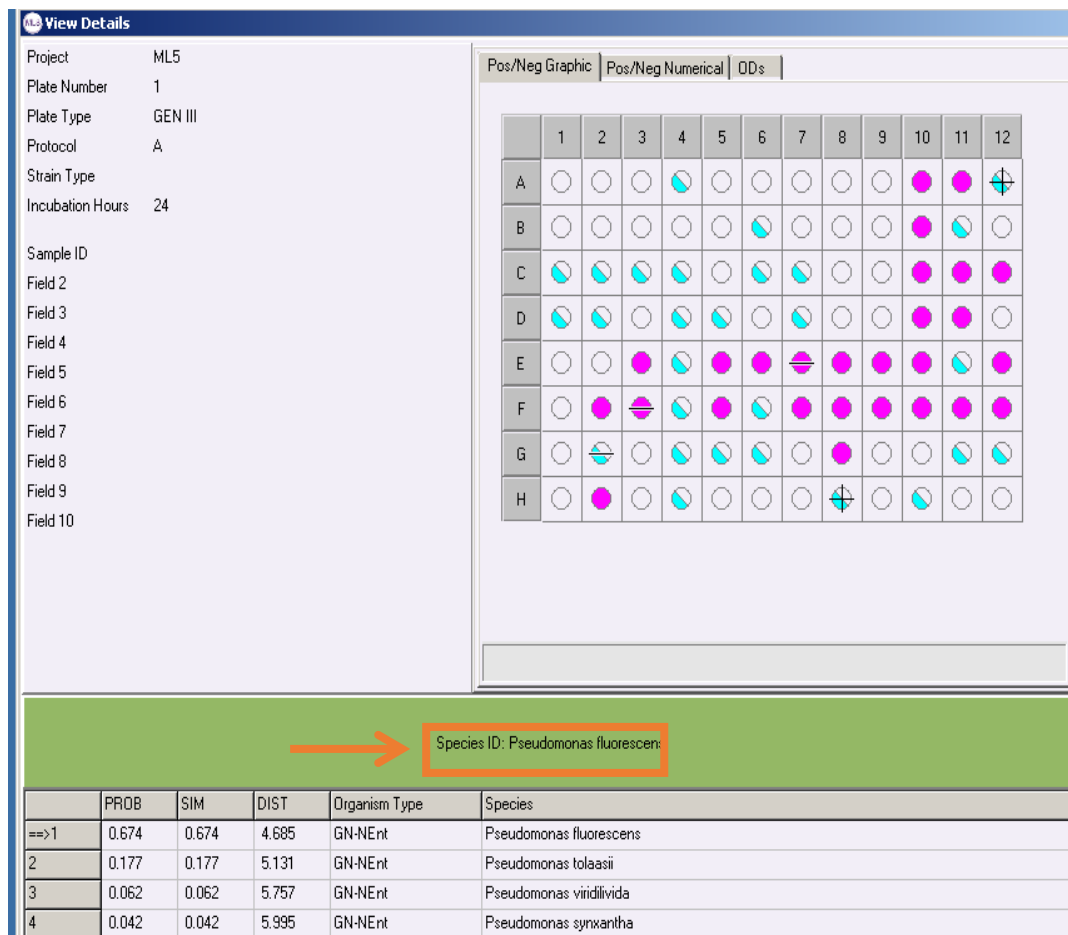


Figura 15: Lectura de la placa Biolog mediante su programa específico.

Las pruebas bioquímicas adicional a la parte microbiológica, permiten descartar aún más las especies que no son de interés, por ejemplo, estos dos estudios (Nepali, Bhattarai, & Shrestha, 2018; W. Li et al., 2018) plantean que

*Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas marginalis*, son Gram negativas y a su vez, oxidasa y catalasa positivas. Por esta razón se realizó estrictamente las pruebas mencionadas dado que otras especies como *Pseudomonas japónica* igual produce fluorescencia y presenta la misma característica de excitación de los sideróforos mediante luz UV no obstante, es catalasa negativa, por lo cual, es un método de selección más exacto.

Tomando en cuenta el protocolo Biolog, se conoce que la base de datos que maneja la tecnología llamada Microlog, reconoce mediante las diferencias al oxidar los azúcares de cada pocillo del microplato exactamente el género del microorganismo, con lo cual se puede garantizar que en la secuenciación que la especie podría variar, pero que el género se conserva. Así mismo, (Muturi et al., 2018) y colaboradores en el 2018, realizaron un aislamiento bacteriano de papas enfermas con síntomas de Pink eye, y en la identificación utilizaron el sistema Biolog, obteniendo como resultado que la mayoría de muestras con afección eran ocasionadas por *Pseudomonas fluorescens* y cuando se realizaba la secuenciación utilizando el primer 16S, el resultado obtenido fue igual al de la presente estudio.

Adicional a ello, (Al-Dhabaan & Bakhali, 2017) realiza un aislamiento de bacterias y su único método de identificación fue con la técnica Biolog y obteniendo como resultado un porcentaje con mayor exactitud en el género *Pseudomonas*.

#### **5.1.4. Electroforesis**

Al momento de realizar cada gel de electroforesis para las diferentes provincias, cada muestra fue ingresada e identificada mediante el código del Laboratorio de Fitopatología (FP-18/19-). Se realizaron dos geles de electroforesis para las muestras recolectadas en la provincia de Pichincha. Se utilizó el marcador molecular Low Mass Ladder de Invitrogen™ con Loading Buffer en el primer pocillo como estándar y en los restantes cada muestra

obtenida de la reacción de PCR en conjunto con el mismo buffer mencionado anteriormente (Loading Buffer).

En las Figuras 16A y B se aprecian las muestras amplificadas de Pichincha, adicionalmente el marcador molecular el cual permitió conocer el tamaño de cada muestra de ADN medido en pares de bases (pb) de las bandas (primera banda), las cuales se encontraron alrededor de 800 pb. Se puede observar de igual manera que existió un barrido o un “smear” en los carriles 2 y 3 de la Figura 16A, pero igualmente las muestras amplificaron, lo cual también se constató por la fluorescencia observada en el gel, los carriles 4 y 6 de la Figura 16A y 2 y 3 de la Figura 16B corresponden a las muestras corridas.

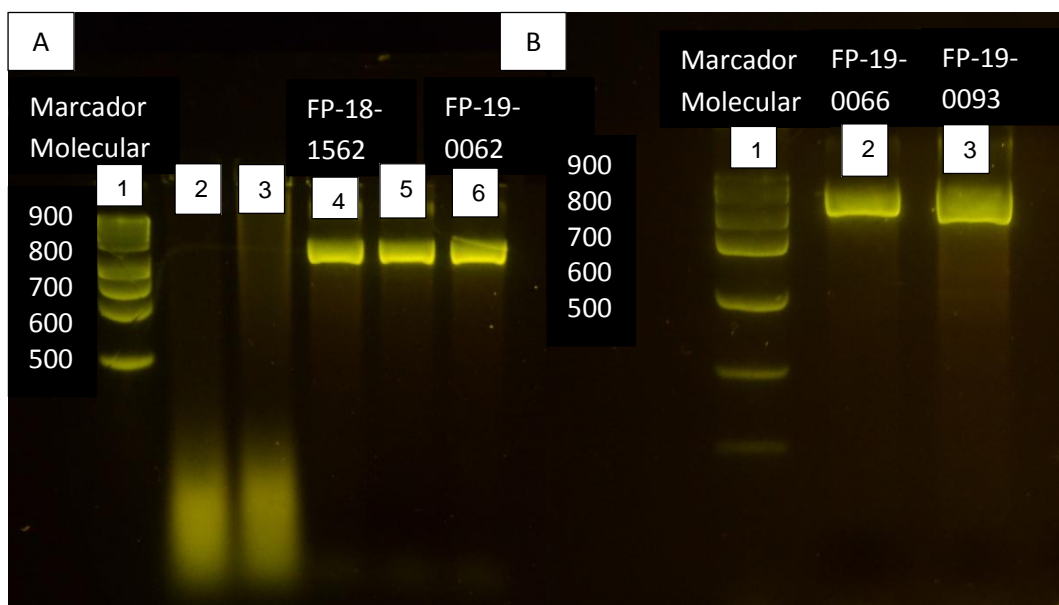
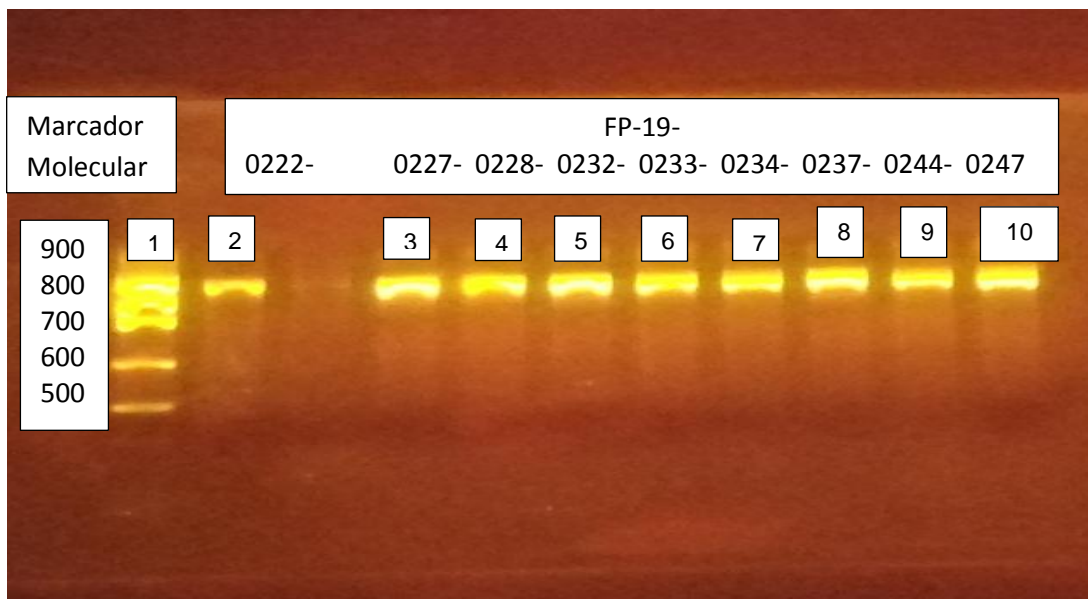


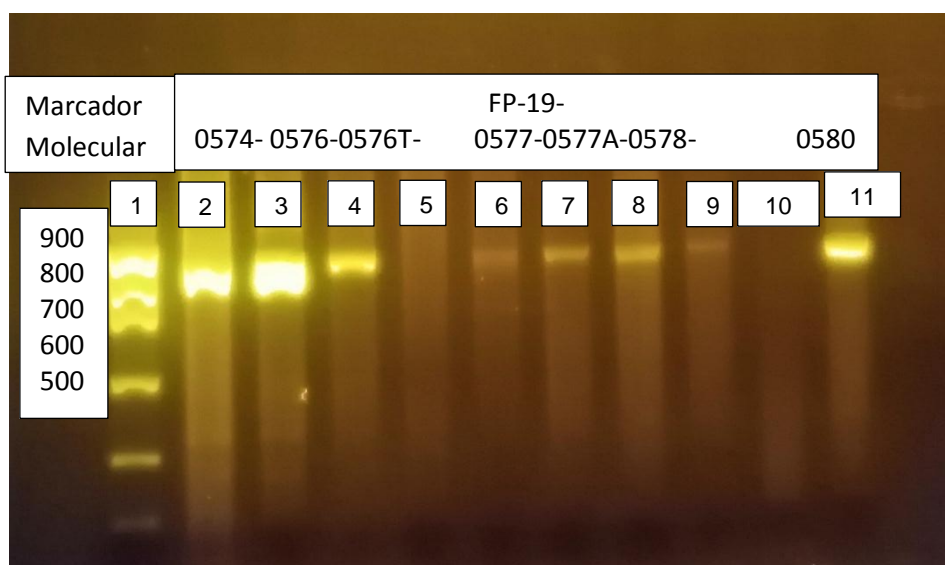
Figura 16: Gel de electroforesis de las muestras de Pichincha.

En la Figura 17 se presenta el gel obtenido de la provincia de Carchi; 9 de 10 muestras amplificaron correctamente con el empleo del mismo marcador molecular Low Mass Ladder en el primer carril. Del segundo al décimo carril, excepto el tercero son las bandas amplificadas las cuales demuestran un tamaño exacto de 800 pb. No existió un “smear”, ni contaminación externa.



*Figura 17:* Gel de electroforesis de las muestras de Carchi.

Finalmente, la Figura 18 representa al gel de electroforesis de las muestras obtenidas de la provincia de Chimborazo. A diferencia de las otras muestras, las bandas del gel observado no son tan claras ni fluorescentes. Esto se pudo deber al empleo del primer 16S, dado que para este ensayo se utilizó reactivos de un nuevo kit de un lote diferente ingresado al Laboratorio de Biología Molecular de Agrocalidad. El primer carril corresponde al marcador molecular y del segundo al onceavo carril omitiendo el quinto, noveno y décimo, son las muestras amplificadas cuyo tamaño varió de 700 a 800 pb.



*Figura 18:* Gel de electroforesis de las muestras de Chimborazo.



La electroforesis permite la visualización de las muestras que hibridaron con la ayuda del primer y por lo cual son óptimas para su secuenciación. El manejo y el empleo de marcadores moleculares es para conocer en este caso el tamaño del amplicon, es decir de la muestra de ADN aislada en un rango de 100 a 2000 pb, además de ello permite que las bandas sean claras en su visualización y con la combinación del Loading buffer logran que la migración del DNA entre los polos sea precisa y exacta.

Sin embargo, como se puede observar en la Figura 17 en relación a la Figura 16, la primera se encuentra desproporcional en la nitidez del gel con sus respectivas bandas, debido a que hubo menor cantidad de muestra para el aislamiento y por consiguiente se extrajo una pequeña proporción de ADN, lo cual hizo que las bandas al tiempo de amplificar fueran de diferentes tamaños. Los “smear” o barridos en los geles como la Figura 15 en los carriles 2 y 3 se deben a la ausencia de la amplificación o que el peso era menor del que posee el marcador molecular (no existe la cantidad suficiente de DNA) y en la Figura 17 en los carriles 2 y 3 igualmente se evidencia pero no es un smear lo que se refleja si no es por la fluorescencia de las primeras bandas a comparación a las posteriores que provoca un contraste de luz que visualmente se puede observar como un barrido pero es un desbalance de la fluorescencia emitida.

#### **5.1.5. Secuenciación**

La mayoría de bandas y/o amplicones que se lograron fueron de la provincia del Carchi como se puede observar en el apartado de electroforesis. Las muestras se enviaron a Macrogen para su secuenciación, y se obtuvieron varias especies del género *Pseudomonas*, sin embargo tomando en cuenta el objetivo del trabajo se buscaron las especies que tengan relación con la enfermedad “Pink eye”, por lo cual los resultados alcanzados y requeridos fueron cinco secuencias de *Pseudomonas marginalis* y tres de *Pseudomonas fluorescens*. La Tabla 5 indicará las diferentes especies de *Pseudomonas* obtenidas.

Tabla 5

Resultados de las especies de *Pseudomonas* obtenidas en las diferentes provincias muestreadas.

<b>Pichincha</b>	<b>Código</b>	<b>Especie</b>	<b>Acceso al Blast</b>
	FP-18-1562	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	<a href="#">NR_114481.1</a>
	FP-19-0062	<i>Pseudomonas reineki</i>	<a href="#">NR_042541.1</a>
	FP-19-0066	<b><i>Pseudomonas fluorescens</i></b>	<a href="#">NR_113647.1</a>
	FP-19-0093	<i>Pseudomonas japonica</i>	<a href="#">NR_114192.1</a>
<b>Carchi</b>	FP-19-0222	<b><i>Pseudomonas marginalis</i></b>	<a href="#">NR_117821.1</a>
	FP-19-0227	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	<a href="#">NR_113600.1</a>
	FP-19-0228	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	<a href="#">NR_024911.1</a>
	FP-19-0232	<b><i>Pseudomonas marginalis</i></b>	<a href="#">NR_117821.1</a>
	FP-19-0233	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	<a href="#">NR_114481.1</a>
	FP-19-0234	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	<a href="#">NR_024911.1</a>
	FP-19-0237	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	<a href="#">NR_114481.1</a>
	FP-19-0244	<b><i>Pseudomonas marginalis</i></b>	<a href="#">NR_117821.1</a>
	FP-19-0247	<i>Pseudomonas paralactis</i>	<a href="#">NR_156987.1</a>
<b>Chimborazo</b>	FP-19-0574	<i>Pseudomonas putida</i>	<a href="#">NR_113651.1</a>

	FP-19-0576	<i>Pseudomonas lactis</i>	<a href="#">NR_156986.1</a>
	FP-19-0576T	<i>Pseudomonas lactis</i>	<a href="#">NR_156986.1</a>
	FP-19-0577	<b><i>Pseudomonas marginalis</i></b>	<a href="#">NR_112072.1</a>
	FP-19-0577A	<b><i>Pseudomonas marginalis</i></b>	<a href="#">NR_027230.1</a>
	FP-19-0578	<i>Pseudomonas alcaliphia</i>	<a href="#">NR_114072.1</a>
	FP-19-0580	<b><i>Pseudomonas fluorescens</i></b>	<a href="#">NR_113647.1</a>

La utilidad del primer 16S como cebador en la amplificación es de gran importancia debido, que a pesar de que sea un cebador universal y que pueda amplificar otro tipo de especie, la garantía es que su secuencia es altamente conservada especialmente entre bacterias.

También existen regiones hipervariables que son eficaces para la identificación de procariotas, según lo plantea (Reichler, Trmčić, Martin, Boor, & Wiedmann, 2018) en la amplificación y secuenciación de *Pseudomonas fluorescens* en su investigación y que obtuvo los mismos resultados de secuenciación al usar un primer específico fundamento en el gen *rob*, por lo cual garantiza que el uso universal si demuestra correctos resultados lo que se respalda en la Tabla 5, donde las todas las muestras fueron del género *Pseudomonas*.

Sin embargo, aunque varios artículos de los autores aún están en proceso de depositar sus secuencias de referencia en alguna base de datos, como el NCBI en Estados Unidos, The European Molecular Biology Laboratory (EMBL), y el DNA Data Bank of Japan (DDBJ), dichos investigadores afirman que las cepas aisladas de las afecciones encontradas en *Solanum tuberosum* son causadas por *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas marginalis*.

#### 5.1.6. Postulados de Koch

En la Figura 18 y 19 se puede observar los tubérculos ubicados en una cámara húmeda previamente de ser inoculados con *Pseudomonas marginalis* y *Pseudomonas fluorescens* respectivamente.



Figura 18: Cámara húmeda con *Pseudomonas marginalis*.



Figura 19: Cámara húmeda con *Pseudomonas fluorescens*.

Los primeros síntomas se empezaron a observar en el día cuarto de la exposición a la bacteria. Se puede visualizar claramente seis puntos negros en

la cámara húmeda de *Pseudomonas marginalis* (Figura 20A), esto puede ser indicio de las manchas negras que son las características básicas del desorden del peridermo. Adicionalmente, se observa dos puntos negros con la cepa *Pseudomonas fluorescens* (Figura 20B).

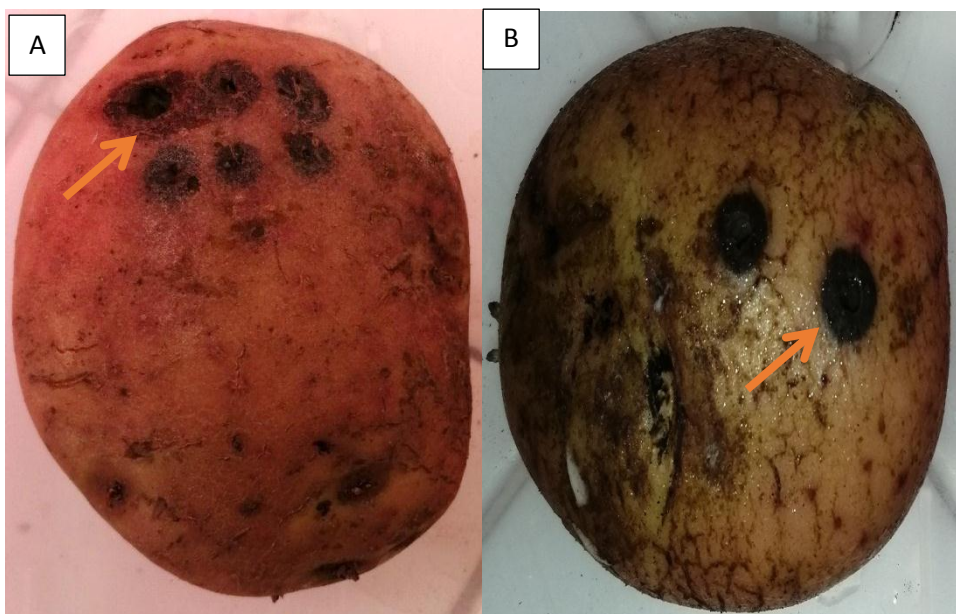


Figura 20: Primeros síntomas relacionados con el desorden del peridermo.

- a) *Pseudomonas marginalis*.
- b) *Pseudomonas fluorescens*.

En el décimo día se evidenciaron aún más los síntomas relacionados con el síndrome del peridermo. En primer lugar se desarrolló una pudrición interna en el tubérculo, con la pérdida total del almidón de la papa en las muestras inoculadas con *Pseudomonas fluorescens* como se observa en la Figura 21.



Figura 21: Síntomas al décimo día de exposición con *Pseudomonas fluorescens*.

En las muestras inoculadas con *Pseudomonas marginalis* se visualizó una pudrición en la zona externa del tubérculo, manchas negras y una suavidad en la superficie, a su vez, cuando la papa fue cortada se evidenciaba una afección, sin embargo, no existía una pérdida total del almidón a diferencia de la afección generada por el anterior microorganismo (Figura 22).



Figura 22: Síntomas al décimo día de exposición con *Pseudomonas marginalis*.

Al realizar cortes transversales en la papa se observaron lesiones negras exactamente en la sección donde fueron inoculados los dos microorganismos mencionados anteriormente, además, alrededor del tubérculo se empezó a generar pudrición, lo cual se puede observar en la Figura 23A que representa a la infección ocasionada por *Pseudomonas marginalis* y la Figura 23B a *Pseudomonas fluorescens*. Como se visualiza las características son similares en los dos casos, por lo cual se identifica que la enfermedad Pink eye es generada por dichas bacterias.



*Figura 23: Cortes transversales en la papa.*

- a) *Pseudomonas marginalis*.
- b) *Pseudomonas fluorescens*.

Los procedimientos realizados (Medios de cultivo, pruebas bioquímicas, electroforesis y secuenciación) en la primera sección de la investigación fueron necesarios de ejecutarlos en los postulados de Koch, debido a que la metodología basada de la investigación de Brasil, prevé que las bacterias aisladas pueden ser diferentes o no ser las causantes, debido a ello aunque las cepas antes por secuenciación verifican que son las deseadas, por metodología y como mecanismo de reproducción posterior se realizó nuevamente. Los ensayos de patogenicidad se pueden observar en la sintomatología visible en las Figuras 20, 21, 22 y 23 y su confirmación mediante secuenciación en la Tabla 6.

En la Figura 24 A y B, se evidenció fluorescencia y la producción de pioverdinas y piocianinas o llamados sideróforos en el medio por lo cual afirmó las características de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas marginalis*.

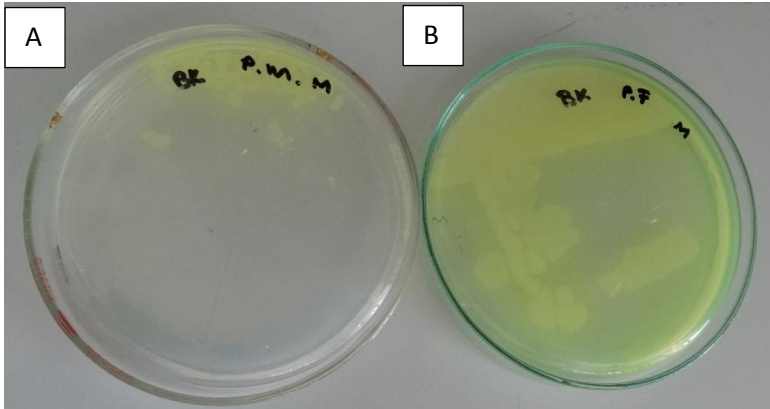


Figura 24: Crecimiento en medio de cultivo B King.

- a) *Pseudomonas marginalis*.
- b) *Pseudomonas fluorescens*.

Posterior a ellos se realizaron las pruebas bioquímicas pertinentes para confirmar que afirmativamente eran catalasa positiva (Figura 25 A) y oxidasa positiva (Figura 25 B). La formación de “burbujas” o precipitaciones al contacto de la bacteria con agua oxigenada significa que es catalasa positiva y el cambio coloración a morado establece a oxidasa positiva.

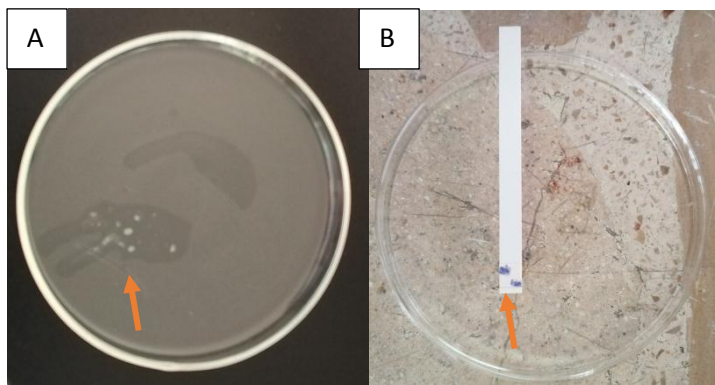


Figura 25: Pruebas bioquímicas tradicionales.

- a) Catalasa positiva.
- b) Oxidasa positiva.

Para identificar que pertenecen al género de *Pseudomonas* se partió de que si cumplen las características principales como ser Gram negativos, es decir que los bacilos mediante tinción gram se tornen de color rosado, como se observa en la siguiente Figura 26 A (*Pseudomonas marginalis*) y B (*Pseudomonas*



*fluorescens*), bajo microscopía a 40x se pudo visualizar este color en las dos cepas utilizadas para el procedimiento de Postulados de Koch.

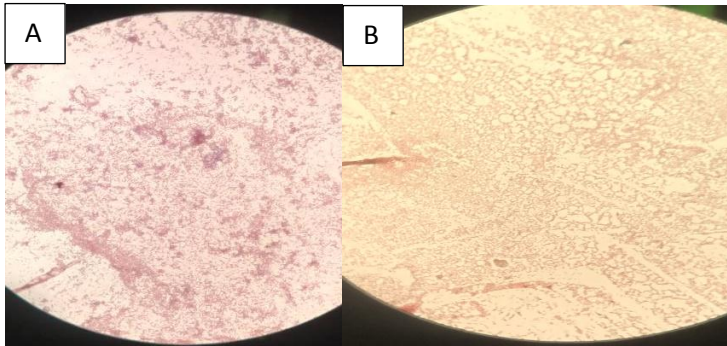
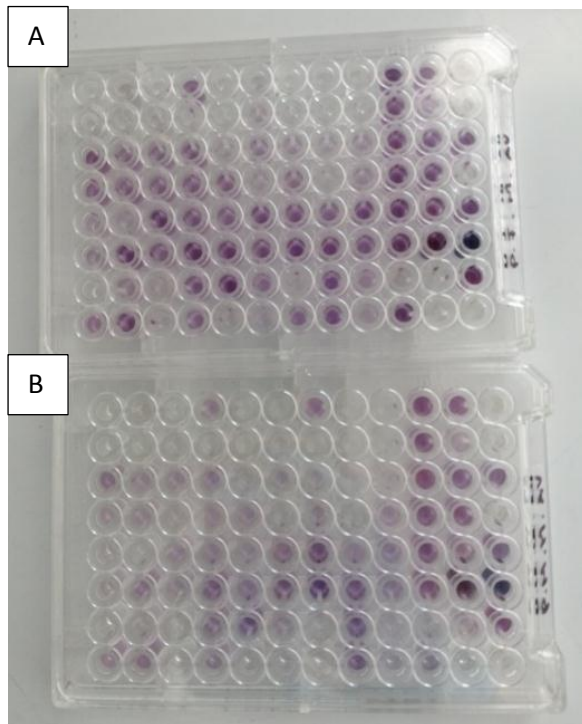


Figura 26: Visualización bajo microscopía a 40x.

- a) *Pseudomonas marginalis*.
- b) *Pseudomonas fluorescens*.

Adicional a las pruebas bioquímicas tradicionales, se realizó a las muestras aisladas y purificadas el procedimiento Biolog para la identificación del microorganismo mediante la oxidación de azúcares, como se observa la Figura 27 A (*Pseudomonas marginalis*) y B (*Pseudomonas fluorescens*), su tornación distinta establece las diferencias que poseen entre especies aunque pertenezcan al mismo género y al *Pseudomonas marginalis* al mismo supgrupo de *Pseudomonas fluorescens*, sin embargo, 56 pocilos de los 96 existentes tienen similitud, por lo cual estas cepas pertenecen a los patógenos relacionados específicamente al desorden el peridermo.



*Figura 27:* Microplatos del Biolog.

- a) *Pseudomonas marginalis*.
- b) *Pseudomonas fluorescens*.

Su lectura bajo la base de datos Microlog, estableció como en los resultados de las muestras que se recogieron de las provincias que existió la probabilidad del 67% de que la cepa fuese *Pseudomonas fluorescens* como se evidencia en la Figura 28, lo cual fue confirmado más adelante en la secuenciación (Tabla 6).

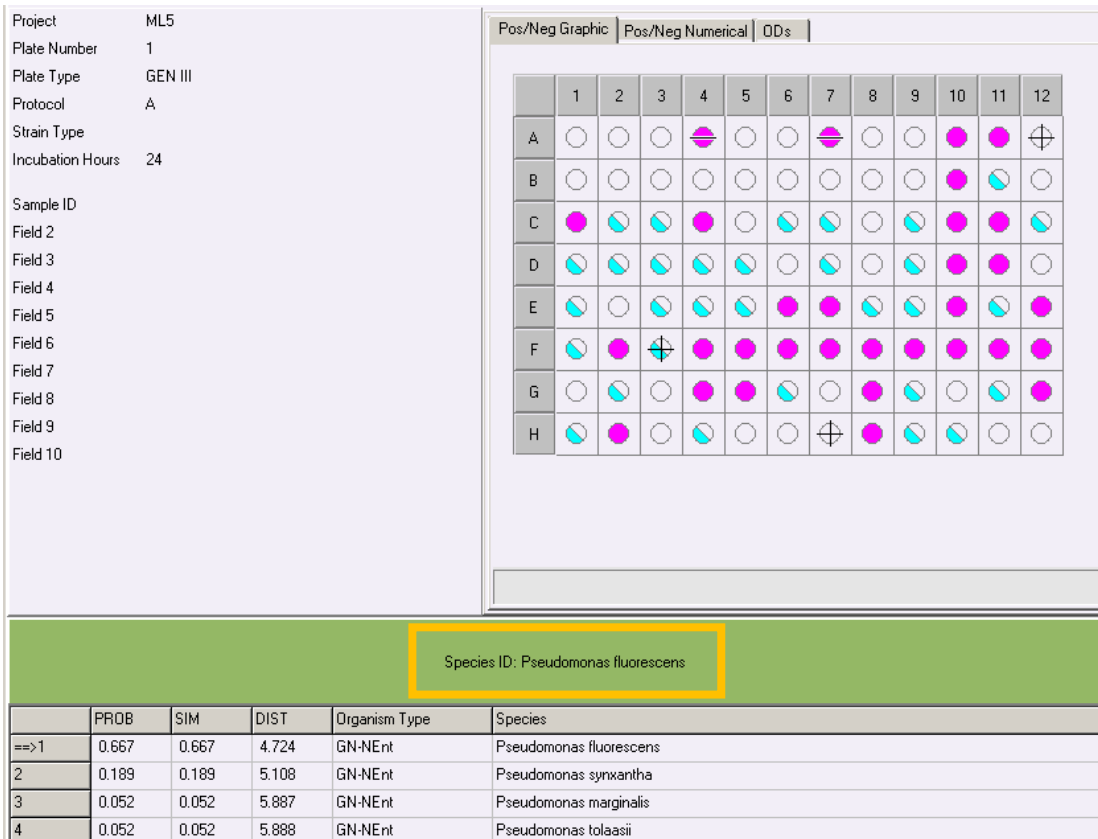


Figura 28: Lectura de las placas Biolog bajo la base de datos Microlog.

Se realizó la amplificación de la misma manera que la metodología citada anteriormente de las dos cepas aisladas y posteriormente se corrió un gel de electroforesis con el cebador universal 16S, como se evidencia en la Figura 29, en el primer carril corresponde al marcador molecular Low Mass Ladder con Loading Buffer y en el carril dos y tres las cepas de *Pseudomonas marginalis* (P.M) y *Pseudomonas fluorescens* (P.F) respectivamente.

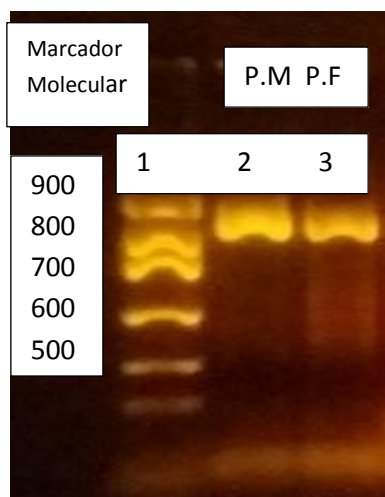


Figura 29: Gel de electroforesis de las cepas aisladas de los Postulados de Koch,  
 P.M) *Pseudomonas marginalis*.  
 P.F) *Pseudomonas fluorescens*.

Finalmente la secuenciación realizada por MacroGen observada en la Tabla 6, afirmó que las cepas eran *Pseudomonas marginalis* y *Pseudomonas fluorescens* mediante los análisis respectivos y accesos a la base de datos de Blast - NCBI.

Tabla 6

Secuencias de *Pseudomonas marginalis* y *Pseudomonas fluorescens* obtenidas de los Postulados de Koch.

Secuencias	
Especie	Aceso al Blast
<i>Pseudomonas marginalis</i>	<a href="#">NR_112072.1</a>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<a href="#">NR_113647.1</a>

Por lo cual, este ensayo de patogenicidad o los Postulados de Koch afirmaron primeramente que los síntomas hallados en las diferentes provincias del Ecuador primeramente solo basado en bibliografía fueron los mismos cuando los tubérculos fueron inoculados con las bacterias *Pseudomonas marginalis* y *Pseudomonas fluorescens*, y en las dos secciones de la investigación; las muestreadas en relación a las de los Postulados de Koch se evidenció la mismas características fenotípicas como químicas y finalmente la

secuenciación lo confirmó. Además se evidencia que el tubérculo al ser inoculado directamente con las cepas a una transmitancia del 32% o en un rango de 9 a 12 \*10<sup>8</sup> células la patogenicidad es aún más alta dado que una sola bacteria actúa y no en conjunto debido a condiciones externas como la tierra en el muestreo.

Además la pérdida del almidón en los dos casos fueron claramente visibles, el tubérculo se convirtió en una sola masa húmeda y con pudrición y no había secciones las cuales no generaran sintomatología, es decir pérdida total.

Se cree adicionalmente que la patogenicidad es mayor en *Pseudomonas marginalis* por lo cual un desequilibrio con el control de esta cepa puede generar devastación de cultivos, es por ello que dicha bacteria se encuentra en el grupo de microorganismos cuarentenarios.

Se puede afirmar entonces que los microorganismos citados son las causantes del desorden del peridermo o el nombre común de la enfermedad Pink eye. Comparando con el estudio realizado en Kenia (Muturi et al., 2018), los investigadores de dicha publicación también realizaron ensayos de patogenicidad en papas cortadas transversalmente y en tubérculos normales y los síntomas fueron los mismos que se evidenció en este protocolo y/o investigación y en los resultados moleculares afirman que la principal causa es *Pseudomonas fluorescens*.

## 6. Conclusiones y Recomendaciones

### 6.1. Conclusiones

La principal conclusión obtenida del trabajo fue que el desorden del peridermo o comúnmente conocida Pink eye en *Solanum tuberosum* está relacionado específicamente con las especies *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas marginalis*.

Se evidenció que hubo mayor incidencia de *Pseudomonas marginalis* en las provincias de Carchi y Chimborazo esto se pudo deber a que las zonas de muestreo fueron altas a comparación a Pichincha por la superficie de cultivo que poseen estas Provincias, además al ser un cultivo con mayor área es más difícil poder controlar todos los agentes externos, por lo cual la planta puede tender a enfermarse con rapidez y severidad.

Los medios de cultivo y pruebas bioquímicas ayudaron a determinar y seleccionar especies que tuvieran las características del género de *Pseudomonas* como fue la generación de pigmentos verdes y amarillos bajo luz natural y fluorescencias azul y verde bajo luz UV, sin embargo, al ser del mismo subgrupo las dos cepas estas podían ser confundidas con otras especies que poseían las mismas funciones, además de ello *Pseudomonas fluorescens* crecía más rápido que *Pseudomonas marginalis*.

Mediante las técnicas molecular se comprobó que las cepas pertenecían a *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas marginalis* como ya ha sido mencionado en resultados, cabe destacar que el peso de los ADN de cada una de estos microorganismos son diferentes y en el momento de la amplificación había muestras que realizaban una extensión correcta y otras que no hibridaban con el primer o producían un “smear” visual en el gel de electroforesis.

Los Postulados de Koch son una prueba de patogenicidad donde se comprobó que las cepas asiladas anteriormente y transmitidas de nuevo en un huésped sano si produjo la enfermedad de Pink eye y fue corroborada con estudios y con el análisis anterior tanto empírico visualizando síntomas como molecular en la secuenciación.

Por lo cual, se concluye que *Pseudomonas marginalis* y *Pseudomonas fluorescens* son patógenas para *Solanum tuberosum* y producen un desorden del peridermo con la pérdida total del tubérculo, además de ello *Pseudomonas fluorescens* es considerada por varios autores como control biológico lo que establece que al ser bacteria si tiene un grado de patogenicidad al ser manejada de otra manera.

## **6.2. Recomendaciones**

Como principal recomendación para el trabajo es que el muestreo sea más amplio es decir que conste con todas las provincias productoras de papa en el Ecuador como Tungurahua o Sucumbíos y que el número de muestras sea mayor.

Se recomienda que se haga el mismo estudio en relación con otro tipo o todas las variedades de papa que se conocen y no solo Super chola como en el estudio.

Finalmente, que los Postulados de Koch se realicen en diferentes secciones de las plantas como tallo, hojas, entre otras.

## REFERENCIAS

- Achbani, E. H., Sadik, S., El Kahkahi, R., Benbouazza, A., & Mazouz, H. (2014). *First Report on Pseudomonas marginalis Bacterium Causing Soft Rot of Onion in Morocco. Atlas Journal of Biology*, 3(2), 218–223. Recuperado el 25 de abril del 2019 de <https://doi.org/10.5147/ajb.2014.0136>
- 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>
- AGROTEKNO LAB. (2017). *Pseudomonas fluorescens - AGROTEKNO LAB*. Recuperado el 27 de Mayo de 2019 de <http://microbe-culture.blogspot.com/2017/06/pseudomonas-fluorescens.html>
- Al-Dhabaan, F. A. M., & Bakhali, A. H. (2017). *Analysis of the bacterial strains using Biolog plates in the contaminated soil from Riyadh community. Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(4), 901–906. Recuperado el 27 de Mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.043>
- Al-Mughrabi, K. I. (2010). *Biological control of Fusarium dry rot and other potato tuber diseases using Pseudomonas fluorescens and Enterobacter cloacae. Biological Control*, 53(3), 280–284. Recuperado el 27 de Mayo de 2019 de <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.01.010>
- Alippi, A. M., López, A. C., Rollan, M. C., Ronco, L., & Aguilar, O. M. (2002). *Fluorescent Pseudomonas species causing post-harvest decay of endives in Argentina. Revista Argentina de Microbiología*, 34(4), 193–198. Recuperado el 27 de Mayo de 2019 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600002>
- Alonso, J. (2015). Ecuador: La productividad de la papa aumentó en nueve toneladas – Redepapa. Recuperado el 26 de Octubre de 2018 de <https://redepapa.org/2015/05/13/ecuador-la-productividad-de-la-papa->



aumento-en-nueve-toneladas/

- BIOLOG, I. (2016). *GEN III MicroPlate™ Instructions for Use Not for human in vitro diagnostic use*. Recuperado el 27 de Mayo de 2019 de [www.biolog.com](http://www.biolog.com)
- Bragami, T. (2015). ESCALA DE MCFARLAND FUNDAMENTO PDF. Recuperado el 6 de Diciembre de 2019 de <https://ric357.ru/escala-de-mcfarland-fundamento->
- CABI. (2018). *Pseudomonas fluorescens (pink eye: potato)*. Recuperado el 26 de Octubre de 2018 de <https://www.cabi.org/isc/datasheet/44956>
- Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (Cuba), S., Coto Arbelo, O., Echemendía Pérez, M., & Ávila Quezada, G. (1986). Revista de protección vegetal. In *Revista de Protección Vegetal* (Vol. 30). Recuperado el 6 de Julio de 2019 de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522015000300008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522015000300008)
- Cercenado, E., & Cantón, R. (2005). Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. Recuperado el 14 de mayo de 2019, de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia18.pdf>
- Discovery Life. (2017). *Pseudomonas marginalis - Marginal leaf spot -- Discover Life*. Recuperado el 27 de Mayo de 2019 de <https://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Pseudomonas+marginalis&flags=glean:>
- ESPAC. (2016). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC 2016 Contenido*. Rcuperado el 14 de Septiembre de [http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas\\_agropecuarias/espac/espac-2016/Presentacion ESPAC 2016.pdf](http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2016/Presentacion_ESPAC_2016.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/83e31cc55bce3f9dfe0deeeffb3197c8.pdf>

- Folsom, D., & Friedman, B. A. (1959). *Pseudomonas fluorescens in relation to certain diseases of potato tubers in Maine*. *American Potato Journal*, 36(3), 90–97. Recuperado el 27 de Mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1007/BF02851647>
- Gao, G., Yin, D., Chen, S., Xia, F., Yang, J., Li, Q., & Wang, W. (2012). *Effect of Biocontrol Agent Pseudomonas fluorescens 2P24 on Soil Fungal Community in Cucumber Rhizosphere Using T-RFLP and DGGE*. *PLoS ONE*, 7(2), e31806. Recuperado 13 de Octubre de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031806>
- Garrido-Sanz, D., Meier-Kolthoff, J. P., Göker, M., Martín, M., Rivilla, R., & Redondo-Nieto, M. (2016). *Genomic and genetic diversity within the Pseudomonas fluorescens complex*. *PLoS ONE*, 11(2). Recuperado el 14 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150183>
- Goth, R. W. (1993). *Relationship of Verticillium Wilt with Pink-Eye of Potato in Maine*. *Plant Disease*, 77(4), 402. Recuperado el 27 de Mayo de 2019 <https://doi.org/10.1094/PD-77-0402>
- Grado | Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. (2015). Recuperado el 4 de Diciembre de 2019 de <http://www.en.esalq.usp.br/es/estudios/grado>
- Hernández-León, R., Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M., Orozco-Mosqueda, M. del C., Macías-Rodríguez, L. I., Reyes-de la Cruz, H., ... Santoyo, G. (2015). *Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by Pseudomonas fluorescens strains*. *Biological Control*, 81, 83–92. Recuperado el 27 de Mayo de 2019 de <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.11.011>
- Huether, J. P., & McIntyre, G. A. (1969). *Pectic enzyme production by two strains of pseudomonas fluorescens associated with the pinkeye disease of potato tubers*. *American Potato Journal*, 46(11), 414–423. Recuperado el 12 de Noviembre de 2019 de <https://doi.org/10.1007/BF02868750>
- KIBRIA, G. (2016). *Pesticides and Its Impact on Environment, Biodiversity and Human Health- A Short Review*. Recuperado el 12 de Noviembre de 2019 de

[https://www.academia.edu/27550948/Pesticides\\_and\\_Its\\_Impact\\_on\\_Environment\\_Biodiversity\\_and\\_Human\\_Health-\\_A\\_Short\\_Review](https://www.academia.edu/27550948/Pesticides_and_Its_Impact_on_Environment_Biodiversity_and_Human_Health-_A_Short_Review)

- Li, B., Wang, G. L., Wu, Z. Y., Qiu, W., Tang, Q. M., & Xie, G. L. (2009, November). *First report of bacterial head rot of broccoli caused by pseudomonas fluorescens in China. Plant Disease*, Vol. 93, p. 1219. Recuperado el 14 de Julio de 2019 de <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-11-1219A>
- Li, W., Ten, L. N., Kim, S.-H., Lee, S.-Y., & Jung, H.-Y. (2018). *Occurrence of Bacterial Stem Rot of Ranunculus asiaticus Caused by Pseudomonas marginalis in Korea. Research in Plant Disease*, 24(2), 138–144. Recuperado el 12 de Noviembre de 2019 de <https://doi.org/10.5423/RPD.2018.24.2.138>
- Lulai, E. C., Neubauer, J. D., Huckle, L. L., & Suttle, J. C. (2014). *The Pink Eye Syndrome Does Not Impair Tuber Fresh Cut Wound-Related Responses. American Journal of Potato Research*, 91(5), 467–475. Recuperado el 12 de Noviembre de 2019 de <https://doi.org/10.1007/s12230-014-9376-x>
- Lulai, E. C., Sabba, R. P., Nolte, P., Gudmestad, N. C., & Secor, G. A. (2018). *“Periderm Disorder Syndrome”: a New Name for the Syndrome Formerly Referred to as Pink Eye. American Journal of Potato Research*. Recuperado el 12 de Noviembre de 2019 de <https://doi.org/10.1007/s12230-018-9634-4>
- Lulai, E. C., Weiland, J. J., Suttle, J. C., Sabba, R. P., & Bussan, A. J. (2006). *Pink Eye Is an Unusual Periderm Disorder Characterized by Aberrant Suberization: A Cytological Analysis. In Amer J of Potato Res (Vol. 83)*. Recuperado el 12 de Noviembre de 2019 de <https://doi.org/10.1007/BF02872017>
- Mahto, B. N. (2017). *Generic Pest Risk Analysis for Potato in Nepal. Journal of Nepal Agricultural Research Council*, 3, 32–37. Recuperado el 30 de Noviembre de 2019 de <https://doi.org/10.3126/jnarc.v3i1.17273>
- Mancero, L. (2018). *Estudio de la Cadena de la Papa en Ecuador FAO-ESA / CIP Contenido*. Recuperado el 24 de Marzo de 2019 de <http://www.fao.org/fileadmin/templates/esa/LISFAME/Documents/Ecuador/>

cadena\_papa.pdf

- McRose, D. L., Seyedsayamdost, M. R., & Morel, F. M. M. (2018). *Multiple siderophores: bug or feature? JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 23(7), 983–993. Recuperado el 20 de Diciembre de 2019 de <https://doi.org/10.1007/s00775-018-1617-x>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2018). *INFORME DE RENDIMIENTOS DE PAPA EN EL ECUADOR 2017*. Recuperado el 24 de Marzo de 2019 de [http://sipa.agricultura.gob.ec/descargas/estudios/rendimientos/papa/rendimiento\\_papa\\_2017.pdf](http://sipa.agricultura.gob.ec/descargas/estudios/rendimientos/papa/rendimiento_papa_2017.pdf)
- Molan, Y., & Ibrahim, Y. (2007). *First Report of Tomato ( Lycopersicon esculentum ) Pith Necrosis Caused by Pseudomonas fluorescens and P. corrugata in the Kingdom of Saudi Arabia . Plant Disease*, 91(1), 110–110. Recuperado el 24 de Marzo de 2019 de <https://doi.org/10.1094/pd-91-0110b>
- Muturi, P., Yu, J., Li, J., Jiang, M., Maina, A. N., Kariuki, S., ... Wei, H. (2018). Isolation and characterization of pectolytic bacterial pathogens infecting potatoes in Nakuru County, Kenya. *Journal of Applied Microbiology*, 124(6), 1580–1588. Recuperado el 20 de Diciembre de 2019 de <https://doi.org/10.1111/jam.13730>
- Nefzi, A., Aydi Ben Abdallah, R., Jabnoun-Khiareddine, H., Ammar, N., Medimagh-Saïdana, S., Haouala, R., & Daami-Remadi, M. (2018). Management of Fusarium Crown and Root Rot of tomato by Solanum linnaeanum L. extracts. *Scientia Horticulturae*, 238, 204–214. Recuperado el 27 de Mayo de 2019 de <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.050>
- Nepali, B., Bhattarai, S., & Shrestha, J. (2018). *Identification of Pseudomonas fluorescens using different biochemical tests*. Recuperado el 24 de Marzo de 2019 de <http://dx.doi.org/10.20956/ijab.v2i2.5260>
- 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>
- Park, Y.-S., Dutta, S., Ann, M., Raaijmakers, J. M., & Park, K. (2015). *Promotion of plant growth by Pseudomonas fluorescens strain SS101 via novel volatile organic compounds. Biochemical and Biophysical Research Communications*, 461(2), 361–365. Recuperado el 21 de enero de 2019 de <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2015.04.039>
- Pascual, J. A., Moreno, J., Ros, M., & Vargas, M. del C. (2015). *Aspectos biológicos de la estabilización aeróbica II. 1*. Mundi-Prensa. Recuperado el 21 de enero de 2019 de **RESIDUO A RECURSO, EL CAMINO HACIA LA SOSTENIBILIDAD**
- Pérez Álvarez, S., Coto, O., Ii, A., Echemendía, M., Iii, P., Ávila, G., & Iv, Q. (2015). *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno? *Rev. Protección Veg*, 30(3), 225–234. Recuperado el 27 de Mayo de 2019 de [https://www.researchgate.net/publication/303486666\\_Pseudomonas\\_fluorescens\\_control\\_biologico\\_o\\_patogeno](https://www.researchgate.net/publication/303486666_Pseudomonas_fluorescens_control_biologico_o_patogeno)
- 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>
- Reichler, S. J., Trmčić, A., Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2018). *Pseudomonas fluorescens* group bacterial strains are responsible for repeat and sporadic postpasteurization contamination and reduced fluid milk shelf life. *Journal of Dairy Science*, 101(9), 7780–7800. Recuperado el 24 de enero de 2019 de <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14438>
- Salazar, D., Cuichán, M., Ballesteros, C., Márquez, J., & Orbe, D. (2017). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua*. Recuperado el 13 de marzo de 2019 de

[http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas\\_agropecuarias/espac/espac\\_2017/Informe\\_Ejecutivo\\_ESPAC\\_2017.pdf](http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2017/Informe_Ejecutivo_ESPAC_2017.pdf)

- Santos, S. R., & Ochman, H. (2016). *Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins*. *Environmental Microbiology*, 6(7), 754–759. Recuperado el 30 de Abril de 2019 de <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00617.x>
- Wang, Y., & Gevens, A. (2018). Top 5: *Understanding Pink Eye of Potato | Potato Grower Magazine*. Recuperado el 21 de Mayo de 2019 de <https://www.potatogrower.com/2018/08/top-5-understanding-pink-eye>
- Xu, W., Ge, Z., & Poudel, D. R. (2015). *Application and Optimization of Biolog EcoPlates in Functional Diversity Studies of Soil Microbial Communities*. *MATEC Web of Conferences*, 22, 04015. Recuperado el 21 de enero de 2020 de <https://doi.org/10.1051/matecconf/20152204015>
- Zitter, T. A. (n.d.). *Pinkeye of Potato in 2011-The Most Significant Appearance of This Disorder in 4 years*. Recuperado el 9 de Diciembre de 2018 de [http://nrcc.cornell.edu/climate/ithaca/moncrt\\_04-11.html](http://nrcc.cornell.edu/climate/ithaca/moncrt_04-11.html)

## **ANEXOS**

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 Zoosanitario, realice un Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos con Fines de Investigación Científica, con el MAE, recalando 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 Zoosanitario, 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 Zoosanitario con la finalidad de proteger la vida, salud y bienestar de los animales, y asegurar su estatus zoosanitario 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 Zoosanitario - 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*



MINISTERIO DEL AMBIENTE



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 Zoonosanitario – 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 Alava  
**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

---

Dirección: Calle Madrid 1159 y Andalucía • Código Postal: 170525 / Quito • Ecuador . Teléfono: 593-2 398-7600

Anexo 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.

Ciudad..... de.....del 2020

Sr.  
**DIRECTOR TÉCNICO DE REGISTRO SANITARIO, NOTIFICACIÓN SANITARIA  
OBLIGATORIA Y AUTORIZACIONES.  
AGENCIA NACIONAL DE REGULACIÓN, CONTROL Y VIGILANCIA  
SANITARIA – ARCSA.**

De mi consideración.-

Yo.....con cédula de ciudadanía.....código dactilar  
nº.....me dirijo a usted para solicitar la autorización de exportación del  
producto.....(muestra biológica) en la cantidad de.....requerido para el  
propósito de.....(investigación, tratamiento, etc.) la exportación se realizará de la  
siguiente manera.....(proceso, envase y demás especificaciones).

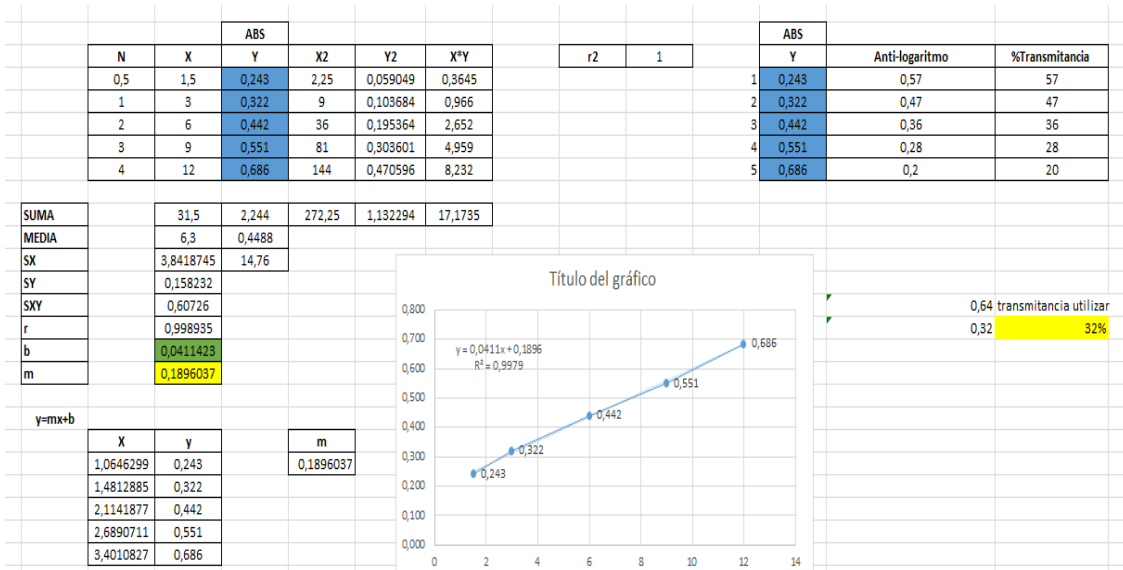
Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

---

Correo electrónico:  
Dirección:  
Teléfono de contacto:

Anexo 2: Solicitud autorizada para el envío de muestras biológicas emitido por ARCSA.



Anexo 3: Procedimiento para e calculo final de la transmitancia.

