

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Determinación de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* como causante de la enfermedad bacteriosis vascular en yuca (*Manihot esculenta*) en la región Oriental del Ecuador

Disertación previa a la obtención del título de Microbióloga

KATHERINE POLET FLORES CORELLA

Quito, 2020

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo en primer lugar a Dios quien me permitió llegar hasta aquí, a mi esposo y a mi hija que son el motor de mi vida y mi principal incentivo, y sobre todo a mis padres quienes siempre se han sacrificado por verme crecer como persona y profesional.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres quienes siempre estuvieron ahí para mí, incentivándome y apoyándome sin importar nada con el fin de que yo pueda recibir educación de calidad. Gracias mami porque muchas veces sin tu ayuda creo que no lo hubiese logrado, gracias por creer en mí. Gracias papi por siempre ser mi modelo a seguir, la persona que nunca quisiera defraudar, su apoyo siempre ha sido incondicional.

Agradezco a la Ingeniera Jeniffer Yánez quien confió en mí para colaborar en su proyecto de investigación. Gracias por confiar en mí, por brindarme su ayuda y más que nada brindarme su comprensión.

A la Microbióloga Anita Almeida por brindarme sus conocimientos abiertamente y ofrecer su tiempo para cada paso de la elaboración de mi tesis, de ti aprendí que el conocimiento no debe ser egoísta, que se debe ayudar mientras puedas.

Muchas gracias Anabeliza por brindarme tu colaboración de inicio a fin en el laboratorio. Quiero agradecer a Martín Marcial por brindarme puntos claves que permitirían el desarrollo de mi tesis de una manera adecuada y óptima. Quiero agradecer al Doctor Oscar Pérez, Que en Paz Descanse, por prestarme sus equipos de laboratorio para que yo pueda continuar con el desarrollo de mi proyecto. Agradezco a mi compañero Luchito por ayudarme y brindar tus conocimientos cuando los necesitaba.

Como no mencionar a grandes profesionales a lo largo de mi carrera que me incentivaron a amar la microbiología: Diana Ontaneda, Josefina Egas, Vismeli Santana, Jeniffer Yánez, Santiago Escalante y Verónica Luna, les agradezco mucho por transmitir su conocimiento para formarme como profesional.

A mis compañeros de curso y amigos en esta larga aventura universitaria quienes hicieron esta travesía divertida: Michelle, March y Marcelo muchas gracias por todos estos años compartidos y espero sean muchos más.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1. ANTECEDENTES.....	3
3.2. GENERALIDADES DEL CULTIVO DE YUCA.....	4
3.3. ENFERMEDADES EN EL CULTIVO DE YUCA.....	5
3.4. BACTERIOSIS VASCULAR.....	6
3.5. OBJETIVOS.....	7
3.5.1. OBJETIVO GENERAL.....	7
3.5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
4.1. MUESTREO EN CAMPO.....	9
4.2. AISLAMIENTO DEL AGENTE PATÓGENO.....	9
4.3. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LA BACTERIA.....	10
4.3.1. MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA.....	10
4.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	11
4.4.1. EXTRACCIÓN DE ADN.....	12
4.4.2. PCR CONVENCIONAL.....	12
4.4.3. ELECTROFORESIS.....	12
4.4.4. SECUENCIACIÓN	13
4.5. POSTULADOS DE KOCH	13
4.5.1. INSTALACION DEL EXPERIMENTO EN INVERNADERO.....	14
4.5.2. INOCULACIÓN DEL PATÓGENO EN LAS PLÁNTULAS	15
4.5.3. RECUPERACIÓN DEL AGENTE PATÓGENO A PARTIR DE LAS PLÁNTULAS.....	16
5. RESULTADOS Y DISCUSION.....	17
5.1. AISLAMIENTO DEL PATÓGENO	17
5.2. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA.....	19
5.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	21
5.4. POSTULADO DE KOCH EN PLÁNTULAS DE YUCA.....	25
5.4.1. RECUPERACIÓN DE LOS AGENTES PATÓGENOS A PARTIR DE	

PLÁNTULAS ENFERMAS.....	28
CONCLUSIONES.....	32
RECOMENDACIONES.....	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
ANEXOS.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sitios muestreados.....	8
Figura 2. Hojas con sintomatología.....	8
Figura 3. Aislamiento de la bacteria.....	10
Figura 4. Morfología macroscópica.....	11
Figura 5. Morfología microscópica	11
Figura 6. Plantas de yuca.....	13
Figura 7. Inoculación de plantas.....	15
Figura 8. Selección de hojas con la enfermedad.....	16
Figura 9. Descripción macroscópica del aislado DP5.	19
Figura 10. Descripción microscópica del aislado DP5.....	20
Figura 11. Electroforesis en Gel de agarosa.....	23
Figura 12. Plantas de yuca provenientes de la Costa.....	24
Figura 13. Plantas de yuca provenientes del Oriente	26
Figura 14. Síntomas de bacteriosis en plantas inoculadas.....	27
Figura 15. Aislados puros a partir de hojas enfermas.....	28
Figura 16. Tinción Gram de los aislados.....	30

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Codificación, fecha y lugar de muestreo.....	17
Tabla 2. Concentración y calidad de ADN de la muestra concordante con <i>Xanthomonas phaseoli pv. manihotis</i>	21
Tabla 3. Link de acceso al GenBank y porcentaje de cobertura de las muestras positivas para <i>Xanthomonas phaseoli pv. manihotis</i>	25

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo para extracción de ADN en bacterias Gram negativas	33
Anexo 2. Composición medio LPGA.....	34
Anexo 3. Secuencia consenso de la muestra DP5.....	35
Anexo 4. Secuencia consenso del control positivo.....	35

RESUMEN

En los últimos años, la yuca (*Manihot esculenta*) ha llegado a convertirse en uno de los cultivos más importantes en regiones tropicales del Ecuador, debido a su alto contenido proteico y energético, siendo este el cuarto cultivo más importante del mundo después del arroz, el maíz y el trigo. Sin embargo, este cultivo es susceptible a muchas enfermedades poco estudiadas en el país, especialmente, las ocasionadas por microorganismos como las bacterias. Por tanto, el presente estudio busca determinar la presencia de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, causante de la bacteriosis vascular en yuca, en el Ecuador. Para ello, se tomaron muestras al azar de dos localidades del Oriente ecuatoriano, donde se seleccionaron hojas que presentaban manchas angulares, sintomatología característica de esta enfermedad bacteriana. Las muestras fueron analizadas en el laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la PUCE, donde se realizó el aislamiento y purificación del patógeno mediante técnicas microbiológicas, utilizando medio LPGA e incubando a 28 °C. Las bacterias analizadas microscópicamente, mediante tinción Gram, mostraron ser bacilos Gram negativos, mientras que macroscópicamente, las colonias presentaron un color crema con apariencia mucóide. La técnica de PCR convencional fue utilizada para la identificación molecular utilizando los primers específicos *rpoB* y *Cterm*, los cuales producen amplicones de 944 pb y 577 pb respectivamente. Los productos de PCR resultantes fueron enviados a secuenciar a la empresa Macrogen, Corea del Sur y las secuencias consenso obtenidas, coincidieron con *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* al 98.70% de identidad, con un valor E de 0. Finalmente, se realizaron los postulados de Koch, donde se inoculó una suspensión bacteriana de 10⁸ UFC obtenidas a partir de la bacteria aislada del campo. Después de 15 días, las manchas angulares típicas de esta enfermedad aparecieron en las hojas, las cuales fueron nuevamente analizadas, logrando aislar la bacteria en medio LPGA. Lamentablemente, debido a la pandemia por Covid-19 y la consiguiente falta de seguridad para realizar la última identificación molecular, reportamos que, los resultados no son concluyentes, por tanto, este estudio no puede afirmar que, la bacteria encontrada en planta es la causante de bacteriosis vascular en el Ecuador.

Palabras claves: *Xanthomonas phaseoli* pv *manihotis*, LPGA, bacteriosis, PCR convencional.

1. ABSTRACT

In recent years, cassava (*Manihotis esculenta*) has become one of the most important crops in tropical regions of Ecuador, due to its high protein and energy content, making it the fourth most important crop in the world after rice, and corn. However, this crop is susceptible to many diseases that have been little studied in the country. Information on diseases caused by microorganisms, especially bacteria, is scarce, therefore, the present study seeks to determine the presence of *Xanthomonas phaseoli pv. manihotis* causing Cassava Bacterial Blight (CBB). To do this, random samples, were taken from two regions of eastern Ecuador, where leaves were taken that presented, the characteristic symptoms of bacteriosis (angular spots on the leaves, mildew, wilt, exudates and lesions on the stem) which were analyzed in the PUCE Plant Pathology laboratory, where the pathogen was isolated and purified by microbiological techniques, using LPGA medium and incubating at 28 °C. where the bacteria were micro and microscopically appreciated. The presence of the bacteria was confirmed by conventional PCR technique, using the specific primers rpoB and Cterm, which produce amplicons of 944 bp and 577 bp respectively. The resulting PCR products were sent to Macrogen in South Korea for sequencing obtained matched *Xanthomonas paseoli pv. manihotis* at 98.70% identity and with an E value of 0. The amplicons obtained were sent to sequence. After editing, they were identified as *Xanthomonas phaseoli pv manihotis*. Finally, Koch postulates were carried out, where a bacterial suspension of 10⁸ UFC, was inoculated, from the bacteria isolated from the field. After 15 days, the typical angular spots of this disease appeared on the leaves, which were again analyzed, managing to isolate the bacteria in LPGA medium. Unfortunately, due to the Covid-19 pandemic and the consequent lack of security to perform the last molecular analysis, we report that the results are not conclusive, therefore, in this study it cannot be stated that Xpm is the cause of vascular bacteriosis in the Ecuador.

Key words: *Xanthomonas phaseoli pv manihotis*, LPGA, bacteriosis, conventional PCR.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. ANTECEDENTES

Manihotis esculenta conocida comúnmente en el Ecuador como yuca, es una planta perenne y leñosa (Muñoz, Hinojosa y Mendoza, 2017). La planta presenta una raíz rica en hidratos de carbono, ideal dentro de una dieta equilibrada, además, es un alimento saludable debido a su alto contenido en vitaminas B6, vitamina C y minerales como el magnesio y el potasio (FAO, 2011).

En el Ecuador, la yuca es sembrada en el trópico, inclusive en las Islas Galápagos, generalmente cultivada por pequeños productores de escasos recursos económicos. En la mayoría de las ocasiones es producida sin ningún problema en suelos pobres que requieren de pocos fertilizantes, plaguicidas y agua (INIAP, 2014). Esta raíz es muy importante en el mercado porque constituye uno de los alimentos fundamentales en zonas con déficit alimentario, gracias a su importante contenido proteico y energético (InfoAgro, 2017).

La yuca, a nivel mundial, es considerada un producto de seguridad alimentaria y según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés) un aumento en la producción de yuca podría ayudar a solucionar el problema de hambre en las regiones tropicales pobres, convirtiéndola en presencia constante por su consumo diario (Fretes, 2010; Meza y Julca, 2015). El cultivo de yuca comprende el cuarto cultivo más importante del mundo después del arroz, el maíz y el trigo, porque más de 600 millones de personas en el mundo dependen del consumo de esta raíz (Folgueras, Rodríguez, Herrera y Sánchez, 2013; Pastrana, Heraldo y Salcedo, 2015). En los últimos años, el cultivo de *Manihotis esculenta*, especialmente en países tropicales incluido Ecuador, ha experimentado un incremento significativo, convirtiéndose en una de las bases principales de la dieta alimenticia de los habitantes de esta región (López, Restrepo y Verdier, 2014).

Según Álvarez y Llano (2017), la yuca es afectada por enfermedades fungosas y bacterianas en su mayoría, cuya importancia y distribución económica varían considerablemente. Las enfermedades que se presentan con mayor frecuencia son causantes de manchas foliares, necrosamiento y pudriciones, provocando bajo rendimiento, siendo la bacteriosis una de las enfermedades que más limita al cultivo (Verdier, 2011; Sandino, López, López y Marquínez, 2015). Lamentablemente, en el

Ecuador el esfuerzo en la investigación, detección e implementación de nuevas tecnologías de producción y manejo de enfermedades bacterianas dedicadas al cultivo de yuca resulta mínimo, si se compara con estudios realizados en países vecinos como Brasil y Colombia, donde esta enfermedad ya fue detectada y es considerada de alerta fitosanitaria, por lo que ya han implementado proyectos para controlar la enfermedad. (López, Restrepo y Verdier, 2006; ICA, 2018).

La escasa información sobre enfermedades en yuca en el Ecuador, así como, el desconocimiento de la existencia de la bacteriosis vascular puede provocar que los agricultores cometan errores al momento de aplicar distintos productos para el control de esta enfermedad, provocando así, la disminución en la producción y el incremento en la propagación de la bacteria a nivel nacional. Es por esto que surge la necesidad de determinar la presencia de este fitopatógeno en cultivos de yuca en el país, para encaminar alternativas de prevención, manejo y control de la enfermedad.

3.2. GENERALIDADES DEL CULTIVO DE YUCA

La yuca es una planta perteneciente al reino Vegetal, división Spermatophyta, subdivisión Angiospermae y clase Dicotiledoneae (Suárez y Mederos, 2011; Meza y Julca, 2015). Ubicada en el orden Euphorbiales, familia Euphorbiaceae, tribu Manihotae y género Manihot. Este género es muy importante y se lo encuentra en zonas con clima caliente. Se han descrito un aproximado de 98 especies, de las que únicamente la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) tiene relevancia económica y es cultivada (FAO, 2012).

La yuca presenta variaciones en cuanto a su altura, oscilando entre 1 y 5 m, por lo general su tamaño no excede de 3 m (Ospina y Leyva, 2019). El tallo posee nudos prominentes al nivel de las hojas, de 2-3 cm de diámetro. Sus hojas son alternas, pecioladas, de color verde, rojo o púrpura de acuerdo a la variedad. Tiene de 5-7 lóbulos de formas diferentes con venación que varía de color verde, amarilla o púrpura. Presenta inflorescencia en panículas, terminales o en axilas de las hojas. Las raíces pueden ser tuberosas, fusiformes, cilíndricas o ramificadas. Al momento de la cosecha a los 8 meses de edad con su mayor deficiencia hídrica, su tamaño varía entre 20 a 25 cm de largo y entre 5 y 15 cm de diámetro con 0,200 g a 3 kg de peso (Rojas, 2012; Pacheco et al, 2018).

El cultivo de yuca se extiende en regiones tropicales del Ecuador, en especial en suelos de mala calidad, ácidos e infértiles. Se adapta bastante bien a periodos prolongados de sequía con temperatura ideal de 28 °C; requiere altos niveles de humedad, y no encharcamiento (FAO, 2008).

3.3. ENFERMEDADES DEL CULTIVO DE YUCA

La yuca es afectada por varias enfermedades fungosas y bacterianas cuya importancia geográfica varía considerablemente. Las enfermedades más comunes causan, por lo general, necrosamiento del tallo, manchas foliares y pudriciones radicales, provocando pérdidas de rendimiento (Aguilar, 2017). Entre los patógenos más importantes están las bacterias (*Xanthomonas phaseoli*, *X. cassavae* y *Agrobacterium tumefaciens*), las mismas que causan manchas angulares acuosas, quemazón foliar, exudación gomosa en tallos y pudrición interna de tallo. Los virus, como el mosaico africano, causa áreas cloróticas y reducción del tamaño de las hojas. Los hongos de las especies *Cercospora vicosae* causa defoliaciones severas y *Oidium manihotis*, considerado el menos grave, induce necrosis únicamente en las hojas bajas de la planta. Una de las enfermedades de mayor importancia es la bacteriosis vascular o añublo bacteriano, que ocasiona la pérdida del 100 % del cultivo en especial en la estación lluviosa (Bellotti, 2013; ICA, 2018).

3.4. BACTERIOSIS VASCULAR

El agente responsable de la bacteriosis vascular es *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*. Su clasificación taxonómica: dominio: Bacteria, división: Proteobacteria, clase: Gammaproteobacteria, orden: Xanthomonadales y familia: Xanthomonadaceae (Nazario et al, 2013). Es una bacteria Gram negativa, en forma de bacilo, provista de un único flagelo polar, aerobio obligado, requiere una temperatura óptima para su crecimiento de 28 °C ± 1 °C, es oxidasa negativa, catalasa positiva, y es incapaz de reducir nitratos a nitritos (Canteros et al., 1995; Oropeza, 2015). Los síntomas de la bacteriosis vascular son principalmente manchas foliares angulares y producción de exudados, en la mayoría de los casos únicamente visible en hojas, pero en casos extremos sin control ni manejo adecuado, puede presentarse marchitamiento, exudados y lesiones en el tallo hasta llevar a la muerte total de la planta perdiendo así la mayoría

de los cultivos (López, Restrepo y Verdier, 2006; Sandino, López, López y Marquínez, 2015).

Las pérdidas causadas por bacteriosis en yuca, en países hermanos como Colombia o Brasil, han sido muy destructivas, logrando tener un impacto muy negativo en la economía de los agricultores. Es indispensable determinar la presencia de este fitopatógeno en el país, para alertar a las autoridades fitosanitarias y a los productores, tanto para prevención, control y tratamiento de esta enfermedad.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* como causante de la bacteriosis vascular en yuca (*Manihot esculenta*) en localidades del Oriente Ecuatoriano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obtener aislados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* a partir de hojas enfermas recolectadas, utilizando el medio de cultivo LPGA.

Identificar morfológicamente a *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* a partir de colonias bacterianas aisladas sospechosas.

Confirmar la presencia de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* por Biología Molecular mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional y secuenciación de los productos de amplificación obtenidos a partir del análisis de las bacterias aisladas.

Realizar los postulados de Koch para determinar si *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* es el agente causal de la bacteriosis vascular en plantas de yuca en Ecuador.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MUESTREO

La obtención de las muestras foliares se inició con la visita a dos fincas productoras de yuca de la provincia de Napo (Archidona y Misahuallí), una finca en la provincia de Morona Santiago (Palora), y tres fincas en la provincia de Orellana (Joya de los Sachas); provincia ubicadas en la región Oriental. En la Costa Ecuatoriana, se visitaron 10 fincas en diferentes sectores de las provincias de: Santo Domingo de los Tsáchilas (La Esperanza), Los Ríos (Estación Experimental Pichilingue de INIAP) y Cotopaxi (La Maná (Figura 1 y Tabla 1). Las hojas de las plantas de yuca fueron observadas detenidamente, y se escogieron únicamente aquellas hojas que presentaron manchas angulares, (J. Sánchez, Comunicación personal, 10 de octubre del 2018), síntomas típicos de la bacteriosis vascular, como se puede observar en la figura 2 (López, Restrepo y Verdier, 2006).

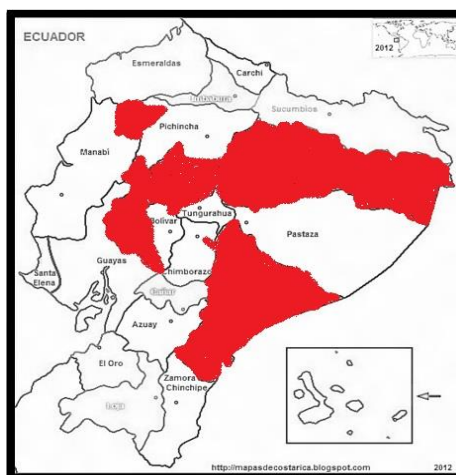


Figura 1. Sitios muestreados. Provincias visitadas durante el estudio.

Tabla 1. Codificación, fecha, lugares de muestreo y codificación de los aislados obtenidos.

FECHA DE MUESTREO	LUGAR	COORDENADAS	CÓDIGO
10/09/2019	San Carlos - Nueva Esperanza	S 00°22'34.8" W 076°54'14.7" 276 E	MP1
	- Joya de los Sachas –	S 00°22'34.8" W 076°54'14.5" 276 E	MP2
	Orellana Propietaria Martha Peñafiel	S 00°22'34.7" W 076°54'14.4" 276 E	MP3 y MP4
10/09/2019	San Carlos - Nueva Esperanza	S 00°22'35.9" W 076°53'45.7" 269 E	DP5
	- Joya de los Sachas Finca 1 –	S 00°22'36.0" W 076°53'45.5" 269 E	DP6
	Orellana	S 00°22'36.2" W 076°53'46.3" 268 E	DP7
	Propietario Darío Pazmiño	S 00°22'36.2" W 076°53'46.3" 268 E	DP8

		S 00°22'36.1" W 076°53'46.4" 269 E	DP10
		S 00°22'37.5" W 076°53'37.2" 269 E	DP11
	San Carlos - Nueva Esperanza	S 00°22'37.9" W 076°53'37.4" 271 E	DP12
	- Joya de los Sachas Finca 2-	S 00°22'37.7" W 076°53'37.1" 269 E	DP13
	Orellana	S 00°22'38.4" W 076°53'37.5" 269 E	DP14
	Propietario Darío Pazmiño	S 00°22'39.1" W 076°53'37.0" 270 E	DP15
		S 00°22'39.2" W 076°53'36.7" 271 E	DP16
18/10/2018	Napo-Archidona	-0.924823 -77.810592	NA1...NA3
18/10/2018	Napo- Misahuallí	-1.043544 -77.698985	NM1...NM1
18/10/2018	Morona Santiago-Palora	-1.711144 -77.969316	MS1...MS3
16/02/2018	Santa María del Toachi-	-0.948000 -79.300667	SMT1...SMT3
15/02/2018	El Esfuerzo-Sto. Domingo de los Tsáchilas	-0406133 -79.280183	SDT1...SDT3
15/02/2018	Estación INIAP-Los Ríos	-1.0711144,-77.488577	PEQ22



Figura 2. Hoja de yuca con síntomas de bacteriosis vascular causada por *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*. Clorosis y manchas angulares cerca de la nervadura de la hoja (Camacho, 2009).

En las localidades de Archidona, Misahuallí y Palora, se muestreó tres plantas, mientras que, en Joya de los Sachas, en la primera finca se recolectaron hojas de cuatro plantas, en la segunda finca se recolectaron hojas cinco plantas y en la tercera finca se recolectaron hojas de siete plantas (de acuerdo a la disponibilidad). Todas las hojas fueron envueltas en papel absorbente, almacenadas en bolsas de papel y codificadas (A. Bernal, comunicación personal, 20 noviembre de 2019), considerando cada finca como una muestra. En las fincas de la Costa se recolectaron hojas con síntomas no específicos, pero después de su análisis en laboratorio, ninguna reportó coincidencia con la bacteria buscada. Todas las muestras fueron etiquetadas y transportadas, en un cooler a 4 °C al laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la Escuela de Ciencias Biológicas de la PUCE para su análisis inmediato.

4.2. AISLAMIENTO DEL AGENTE PATÓGENO

Para el obtener las bacterias, se cortaron pequeños segmentos de tejido de hojas con manchas angulares junto con tejido sano adyacente. Los segmentos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2 % durante un minuto. A continuación, se enjuagaron tres veces con agua estéril por un minuto, los segmentos desinfectados fueron colocados en microtubos con agua estéril, posteriormente se maceraron y a partir de eso se realizaron diluciones. Finalmente, con una micropipeta se tomó 50 μ l de cada dilución para inocular en cajas Petri con medio de cultivo agar levadura peptona glucosa (LPGA por sus siglas en inglés), y se incubó por dos días a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Anexo 1). Este procedimiento se repitió para todas las hojas muestreadas. Los cultivos se revisaron cada 24 horas y las bacterias que presentaron morfología macroscópica similar a *Xanthomonas* se purificaron hasta obtener cultivos axénicos (Figura 3) (Bernal et al., 2018).



Figura 3. Aislamiento de la bacteria. Las colonias con morfología similar a *Xanthomonas phaseoli* fueron seleccionadas y purificadas.

4.3 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Los cultivos puros fueron revisados cada 24 horas a partir de su inoculación para registrar características macroscópicas superficiales propias del género *Xanthomonas* como: colonias mucoides, color crema y convexas con bordes definidos (Nazario *et al*, 2014; Corzo, Rivero, Zamora, Martínez y Martínez, 2015) (Figura 4). Las bacterias aisladas que concordaron con la descripción fueron seleccionadas, fotografiadas y conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las bacterias fueron depositadas en crioviales de 1,5 mL, en una solución de glicerol al 20% (p/v) y agua destilada. Los inóculos preparados en solución

salina más el crioprotectante fueron ajustados en una proporción 1:1 y luego congelados a -20°C (M. Marcial, comunicación personal, 02 de marzo, 2020).

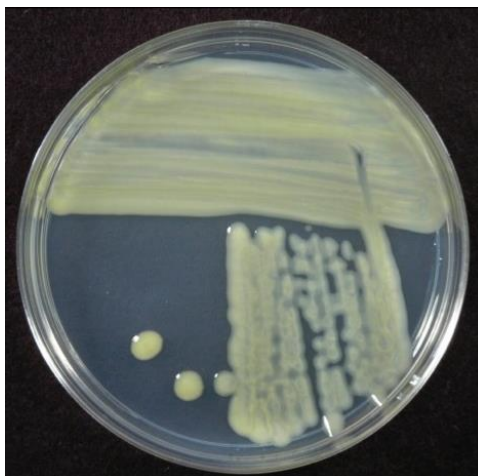


Figura 4. Morfología macroscópica. Colonias puras aisladas de las hojas con síntomas de bacteriosis (Belloti, 2013).

4.3.1 MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA

Se realizó tinción Gram para determinar la presencia de bacilos Gram negativos cortos típicos del género *Xanthomonas* (Carrillo, Sánchez, Estrada y Márquez, 2001; Dure, 2017) (Figura 5) (Anexo 3). Las colonias positivas a la identificación morfológica macro y microscópica fueron analizadas con técnicas moleculares.

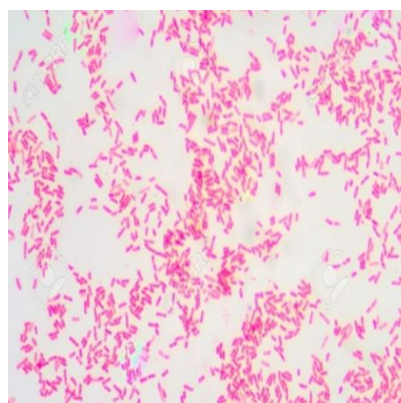


Figura 5. Morfología microscópica. Bacilos Gram negativos cortos en gran cantidad vistos a una resolución de 100X.

4.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

La extracción de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), fueron realizadas en el laboratorio de Fitopatología de la PUCE. Como control positivo se dispuso de ADN de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (Xpm), suministrado por la Universidad de los Andes de Bogotá (Uniandes, Colombia).

4.4.1 EXTRACCION DE ADN

El ADN de los aislados bacterianos sospechosos fue extraído antes y después de los postulados de Koch. El ADN se extrajo utilizando el kit *Wizart Genomic DNA Purification*, siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante (Promega, 2018) (Anexo 2). La pureza y concentración del ADN extraído fue cuantificado utilizando el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific). Este equipo reporta la relación 260/280, que indica la presencia de proteínas, el rango 1,7-2,0 revela que el ADN es de óptima calidad y cantidades menores a este valor indican contaminación por proteínas (Faria, Magalhães, Nunes, y Oliveira, 2013; Sambrook y Green, 2012; Simbolo et al., 2013). Así también, se presenta la relación 260/230, que indica la presencia de carbohidratos o compuestos fenólicos, el rango 2,0-2,2 reporta valores aceptables en una muestra y valores menores a esta cantidad indican contaminación por los compuestos mencionados anteriormente (Simbolo et al., 2013)

4.4.2 PCR CONVENCIONAL

Para lograr identificar a *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (Xpm) se utilizaron la pareja de cebadores específicos CtermF (5'-GCATGCGACGCAGTTCGGGATGAG-3') y CtermR (5'-ACTAGTTCACTGAGGAAATAGCTCCAT-3'), los cuales amplifican un fragmento de 577 pb correspondientes a la región del gen que codifica la porción C-terminal del TALE1 Xpm, el mismo que actúa como activador transcripcional de genes de la planta, y están presentes en el grupo de bacterias fitopatógenos *Xanthomonas* (Bernal et al., 2018). La función del TALE es dirigirse al núcleo de las células de la planta, para interactuar con secuencias específicas del ADN, una vez en el promotor de genes blanco, la bacteria induce la expresión de genes que favorezcan el crecimiento de la bacteria dentro de la planta. También se utilizaron los cebadores *rpoBRv* (5'-CTGCAGCCACGGGCTTGGCATTGAT-3') y *rpoB-Fw* (5'-GTTGCGTGCGCTTGGCTACAGCAATG-3'), los cuales amplifican un fragmento de

944 pb correspondientes al gen que codifica la subunidad B de la RNA polimerasa bacteriana.

Para la reacción de PCR se utilizó la premezcla GoTaq® *Green Master Mix* (Promega, 2016). El volumen final de la reacción fue de 50 µl, el cual contenía 25 µl de GoTaq® *Green Master Mix*, 1 µl de cada uno de los *primers*, 21 µl de agua libre de nucleasas y 2 µl de ADN bacteriano. Las condiciones de la PCR se basaron en el protocolo de Bernal *et al.*, (2018) que consistía de: desnaturalización inicial de tres minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, hibridación de cebadores por 30 segundos a 54 °C, elongación por 90 segundos a 72 °C y la elongación final de 10 minutos a 72 °C.

4.4.3. ELECTROFORESIS

Los amplicones obtenidos fueron observados en geles de agarosa UltraPure™ *Agarose* (Invitrogen, 2010) al 2 % en TAE. En los geles se colocó 2 µl de marcador de peso molecular 100 bp DNA *Ladder* (Promega, 2017) en el primer pocillo. En el segundo pocillo se colocó 2 µl de control positivo, en los pocillos siguientes se colocaron 2 µl de los amplicones obtenidos seguido de estas muestras se colocó el control negativo. La corrida en la cámara electroforética fue de 60 minutos a 95 voltios. Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV (Invitrogen). 1X y teñidos con GelStar™ *Nucleic Acid Gel Stain* (Lonza, 2012)

4.4.4. SECUENCIACIÓN

Los productos de amplificación por PCR fueron enviados para secuenciación Sanger a la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur) donde se utilizan equipos ABI 3730xl. Las secuencias forward y reverse obtenidas fueron editadas con el programa MEGA X (*Molecular evolutionary genetics analysis*) y alineadas con el programa Clustal W (*Multiple alignment of nucleic acid and protein sequences*) (Kumar, Stecher y Tamura, 2016). Las secuencias consenso obtenidas fueron comparadas con las disponibles en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) mediante la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul, Gish, Miller y Lipman, 2011). Las secuencias elegidas fueron las que obtuvieron un porcentaje de cobertura mayor o igual al 98%, un valor E igual a 0 y un porcentaje de identidad mayor o igual al 98 %.

4.5 POSTULADOS DE KOCH

Para determinar la identidad del agente causal de la bacteriosis en yuca se realizaron los postulados de Koch que establecen: 1) El microorganismo deberá aislarse de organismos enfermos. 2) Si el agente patógeno se inocula a otro ser vivo debe reproducirse la misma enfermedad con igual sintomatología. 3) El agente patógeno deberá aislarse, a partir del organismo vivo enfermo nuevamente en cultivo puro (Fuentes, 2007).

4.5.1 INSTALACIÓN DEL EXPERIMENTO EN INVERNADERO

Estacas de plantas de yuca fueron obtenidas de la provincia de Esmeraldas (cantón Esmeraldas) y de la provincia de Sucumbíos (cantón Lago Agrio). Las estacas fueron sembradas en sustrato que contenía sustrato estéril. Las plántulas que emergieron fueron regadas regularmente y recibieron luz natural. El ensayo se llevó a cabo en el invernadero de Agrocalidad (Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario del Ecuador) en Tumbaco (Figura 6).



Figura 6. Experimento en invernadero. A: Plantas de yuca provenientes de la Costa. B: Plantas de yuca provenientes del Oriente. Plántulas de las dos provincias de 15 días de crecimiento.

4.5.2 INOCULACIÓN DEL PATÓGENO EN LAS PLANTAS

Para la inoculación del patógeno se utilizaron 10 plantas sanas de yuca de cuatro semanas de edad, cinco de la Costa y cinco del Oriente, que no presentaban síntomas de alteraciones fisiológicas (Verdier, 2011). Las plantas obtenidas del Oriente y de la Costa fueron inoculadas con una suspensión bacteriana ajustada a 1×10^8 UFC/ml, medida obtenida por espectrofotometría. Con ayuda de una punta de pipeta estéril, se facilitó que 10ul del inóculo obtenido fluya por capilaridad hacia el sistema vascular de tallos y hojas (Figura 7). Adicional a este proceso, las hojas de las plantas fueron inoculadas realizando pequeñas incisiones y colocando gotas de la suspensión bacteriana. Después de 7, 14 y 28 días de incubación a $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ y con un fotoperíodo de 12 h, las hojas inoculadas fueron observadas para evaluar la presencia de manchas angulares características de la bacteriosis vascular (Wonni et al., 2015)



Figura 7. Inoculación de plántulas. Puntas de pipeta estériles insertadas en el tallo de plantas de yuca.

4.5.3. RECUPERACIÓN DEL AGENTE PATÓGENO

Pasadas cuatro semanas, desde el proceso de infección, fueron seleccionadas las hojas que presentaron manchas angulares. Éstas fueron trasladadas al laboratorio para recuperar las bacterias inoculadas. Para el reaislamiento e identificación se utilizaron los procesos mencionados en las secciones 4.3 y 4.4.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. AISLAMIENTO DE LA BACTERIA

Se muestrearon en total 18 plantas de *Manihotis esculenta* procedentes de la región Oriental del Ecuador (Tabla 1). Después de lo análisis preliminares, solamente las colonias pertenecientes a la muestra de codificación DP5 presentaron morfología macroscópica similar al género *Xanthomonas*, las cuales fueron aisladas, purificadas y replicadas para su almacenamiento a -20 °C. Según el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INIAP (2015), la única bacteria patogénica conocida en yuca es *Erwinia* spp., y no existen reportes a nivel nacional de la presencia de *Xanthomonas*. Sin embargo, en Colombia se ha reportado *Xanthomonas* en departamentos fronterizos con Ecuador (Garzón, 2019). En el país, el género *Xanthomonas* se reporta como causante de patologías en cultivos diferentes a la yuca como tomate riñón, melón, arroz, entre otros (Aguilar, 2017). Según los muestreos en campo y entrevistas a los agricultores de la Costa y parte central del Oriente, los síntomas típicos de la bacteriosis no se presentan en esas zonas, al menos durante las épocas del año visitadas (J. Yáñez, comunicación personal, 2019). Según Verdier (2005), el proceso de infección y el desarrollo de la enfermedad requieren de 12 horas con 90 %-100 % de humedad relativa y temperaturas óptimas de 22 °C - 30 °C.

5.2. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

A partir de la muestra DP5 se aislaron cinco colonias individuales, con un mismo morfotipo colonial: DP501, DP502, DP503, DP504 y DP505. Estos aislados presentaron, sobre el medio de cultivo LPGA, colonias mucoides convexas con bordes definidos y de color crema (Figura 9). Estas características concuerdan con *Xanthomonas phaseoli*, como las descritas por Coromoto (2015). Microscópicamente, se evidenciaron bacilos Gram negativos (Figura 10).



Figura 9. Morfología macroscópica del aislado DP5.
Colonias mucoides de 3 días de crecimiento convexas con bordes definidos y color crema sobre medio LPGA.

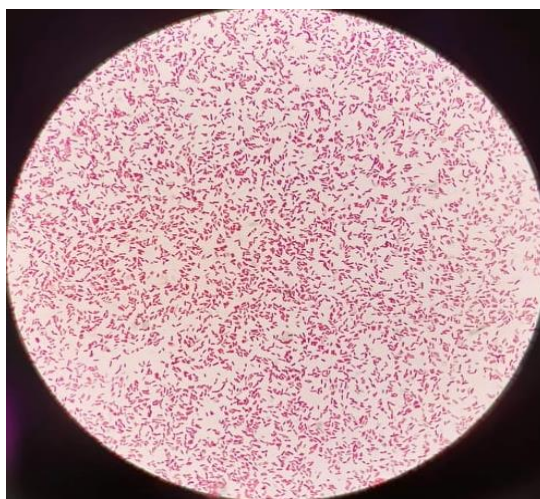


Figura 10. Morfología microscópica del aislado DP5.
Bacilos Gram negativos cortos (aumento 100X).

Es importante destacar que los cinco aislados que se obtuvieron a partir de la muestra DP5 presentaron la morfología macroscópica y microscópica que se detallan en los protocolos de diagnóstico del NIMF (Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias, 2014), permitiendo identificar a las bacterias hasta nivel de género. Los seis aislados presentaron colonias con morfología circular y convexa, con bordes lisos, y aspecto mucoide color crema, características similares a los que expone Corzo, Rivero, Zamora, Martínez y Martínez (2015). La investigación realizada por Álvarez y Grabowski (2013), reporta que, a las 48h de crecimiento se observó en el microscopio bacilos Gram negativos en masa. Además, las colonias se presentaron formando una

suspensión altamente viscosa debido a la presencia de un polisacárido extracelular llamado xantano. Esta característica es evidente cuando al levantar la colonia con un asa bacteriológica forma un hilo de aspecto mucoide característico del género *Xanthomonas* (Botero et al. 2008).

A pesar de todos los cuidados procurados al limpiar el material vegetal, bacterias contaminantes se presentaron, las mismas que fueron eliminadas paulatinamente, mediante el reaislamiento de colonias en medio LPGA que coincidían con las características de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, hasta obtener colonias puras. Cabe recalcar que, el medio LPGA utilizado no suprimió los microorganismos saprófitos. Diversos autores reportan inconvenientes al utilizar medios de cultivo para aislar *Xanthomonas*, el riesgo de contaminación es alto, pero, aun así, siguen utilizándolo debido al bajo costo comparado con pruebas moleculares (Tumelero, Dávila y Gómez, 2013).

5.3. ANÁLISIS MOLECULAR

El ADN total extraído de los aislados sospechosos presentó concentraciones en un rango de 79.4 ng/μl hasta 415.3 ng/μl (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración y calidad de ADN obtenido a partir de muestras sospechosas para *Xanthomonas*.

Aislados	Concentración (ng/μl*)	A**260/A280	A260/A230
DP501	79.4	1.58	0.82
DP502	120.8	1.62	0.81
DP503	41.4	1.80	0.82
DP504	415.3	1.39	0.41
DP505	82.7	1.87	1.25

ng/μl: nanogramos sobre microlitros; A: absorbancia

La concentración de material genético obtenido de cada una de las muestras fue óptima considerando que, para una reacción de amplificación por PCR se requieren de

10 a 200 ng como detalla Serrato, Flores, Apórtela y Sierra (2016). La pureza del ADN obtenido en la muestra DP504 no fue óptima, reportando en la relación 260/280 valores de 1.39. Esto evidenció una posible contaminación con compuestos aromáticos según Velázquez, Aragón y Romero (2017). En la segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos, la proporción 260/230, se esperan valores en el rango de 2.0 a 2.2, pero como se observa en la tabla 2, estos valores fueron inferiores al rango aceptable. Esto se explica por la presencia de contaminantes como carbohidratos o fenoles (Somma, 2011). Esta contaminación es observada en muestras bacterianas y se ha relacionado a la presencia del xantano producido por las bacterias del género *Xanthomonas* (Vojnov, 1996). Según Velázquez, Aragón y Romero (2017), estos componentes intervienen en la extracción del material genético. A pesar de que algunas muestras estuvieron por debajo de los rangos permitidos, no hubo ningún inconveniente en realizar los siguientes pasos en el proceso de identificación molecular.

5.3.2. PCR CONVENCIONAL

La reacción de PCR fue eficaz cuando se utilizaron los *primers* Cterm y permitió la amplificación de ADN de la región del gen que codifica la porción C-terminal de TALEIXam, de la muestra bacteriana aislada. El par de *primers* *rpoB* no amplificaron la región del gen analizado en las muestras, amplificando únicamente el control positivo proveniente de Colombia. Estos problemas pueden ser corregidos mediante la modificación o repetición de ciertos pasos del protocolo de extracción. Brindarle a la extracción un segundo proceso de lavado evitaría la contaminación de las muestras, tal modificación liberaría al ADN de polisacáridos y proteínas, produciendo ADN de muy buena calidad (Somma, 2007; Zavala, 2005; Zerda y Díaz, 2013). De igual manera, es posible que este par de cebadores no pudieran detectar la presencia de Xpm, porque puede tratarse de una variante emergente de este patógeno en nuestro país, debido a cambios naturales en poblaciones que tienden a ocurrir en diferentes regiones geográficas. Esto provocaría que estas cepas tengan ciertas modificaciones genéticas que evitaron que sean detectadas por el par de *primers* *rpoB*, como mencionan Restrepo et al. (2004) y Trujillo et al. (2014).

Los productos de PCR se visualizan en la Figura 11, se observan fragmentos de 500 y 600 pares de bases, para los *primers* Cterm y un fragmento de 950 pares de bases

para los *primers rpoB* correspondiente al control positivo, lo que concuerda con lo que describe Bernal *et al.* (2018). El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, el carril 2 corresponde al control positivo, los carriles 3, 4, 5, 6 y 7 presentan las muestras amplificadas, el carril 8 corresponde al control negativo, el carril 9 corresponde al control positivo utilizando los cebadores *rpoB* mientras que, en los carriles 10, 11, 12, 13 y 14 no se evidencia la presencia de bandas.

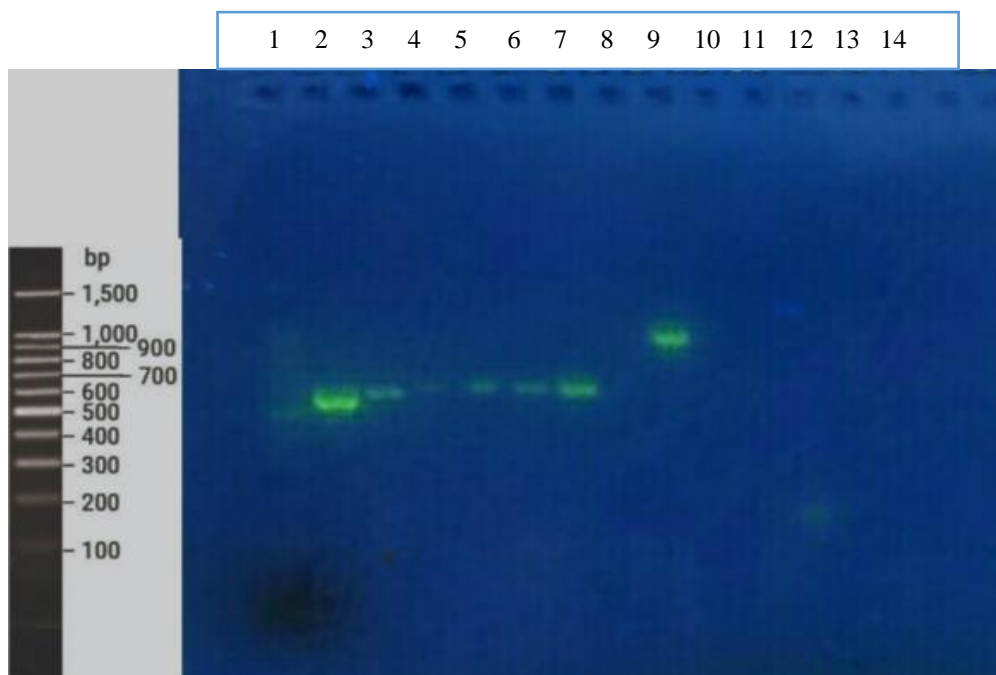
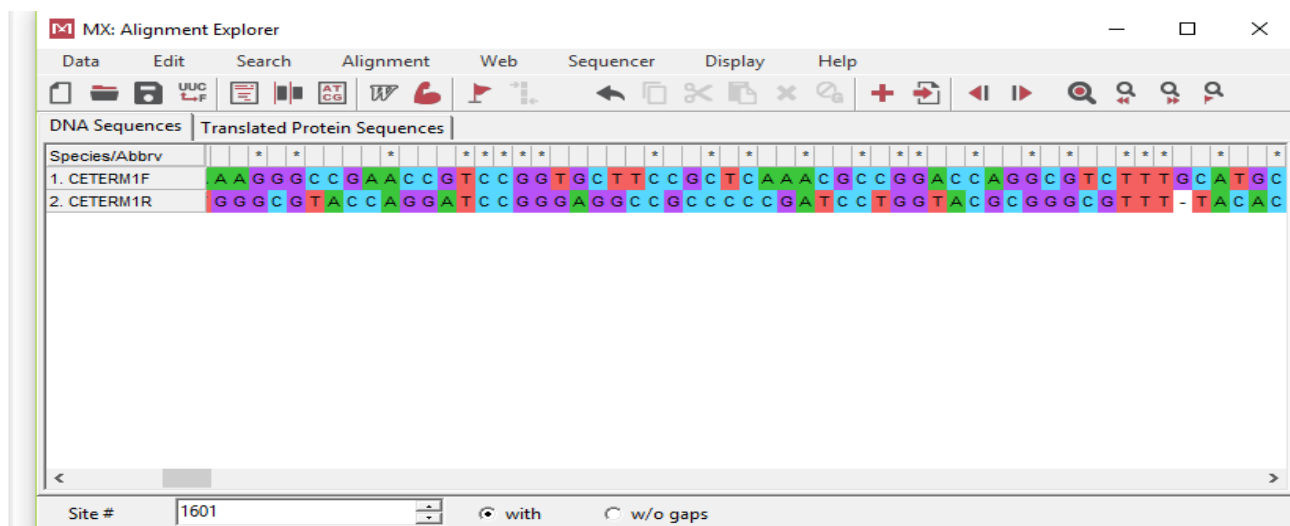


Figura 11. Electroforesis. Gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación obtenidos por PCR convencional.

5.3.3. SECUENCIACIÓN

Mediante la herramienta BLAST se buscó la homología de las secuencias consensos obtenidas (Figura 12) (Anexo 3 y 4). Las muestras DP501, DP502, DP503, DP504 y DP505 fueron identificadas como *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis*. El porcentaje de identidad fue de 98.70 % para cada una de las muestras, lo que indica un grado de coincidencia bastante alto entre dos secuencias en estudio (Tabla 3) (Santamaría, 2017). Constantin *et al.*, (2015), mencionan que, está claro que la clasificación y nomenclatura bacteriana formal basada en el Código Bacteriano entra en conflicto con la clasificación infraespecífica de patovar aplicada a la diversidad fitopatógena dentro de *Xanthomonas*. Así, su renombramiento se ha venido dando constantemente. El agente causal de la bacteriosis era conocido como *Xanthomonas*

axonopodis pv *manihotis* y no fue hasta el año 2016 cuando se renombró a esta bacteria fitopatógena como *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*.



	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Xanthomonas axonopodis pv. manihotis strain CFBP1851 TAL effector protein (pthBXam) and Tn3 family resolvase genes. complete sequence	990	990	34%	0.0	98.71%	gii306022298 HQ113297.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Xanthomonas citri pv. anacardii CFBP_2913 chromosome	985	1031	34%	0.0	98.52%	gii1269271239 CP024057.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii strain 1566 plasmid. complete sequence	979	979	34%	0.0	98.34%	gii1015427576 CP012003.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii strain FDC 1609 plasmid pXfc46. complete sequence	979	1958	34%	0.0	98.34%	gii1015423555 CP011166.1

Figura 12. Alineamiento y análisis BLAST. Secuencia consenso formada por las secuencias *forward* y *reverse* obtenidas a partir de aislados sospechosos. Coincidencia superior con *Xam* al analizar la identidad.

Tabla 3. Código de acceso a GenBank y porcentaje de identificación de las muestras positivas para *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*

Muestra	Porcentaje de Identificación	Valor E	GenBank
DP501	98.70 %	0.0	HQ113297.1
DP502	98.70 %	0.0	HQ113297.1
DP503	98.70 %	0.0	HQ113297.1
DP504	98.70 %	0.0	HQ113297.1
DP505	98.70 %	0.0	HQ113297.1
Control Positivo	99.45 %	0.0	HQ113297.1

Como se puede observar en la tabla 3, el valor E de cada muestra en estudio fue 0.0. Esto es alentador en esta investigación porque este valor permite definir qué alineamientos deseamos obtener de acuerdo a la significación estadística de cada secuencia problema. Cuanto menor sea el valor de E, más significativo es el alineamiento, y se puede asegurar que el resultado no fue al azar (Blázquez, 2013).

5.4 . POSTULADOS DE KOCH

Las plantas de yuca inoculadas con las diferentes cepas sospechosas y el control positivo fueron evaluadas a las tres semanas, pudiendo observarse el marchitamiento de hojas verdaderas en seis de las nueve plántulas de yuca (Figura 13). Estos síntomas se produjeron únicamente en las plantas provenientes del Oriente. Las plantas provenientes de la Costa Ecuatoriana no mostraron ninguna sintomatología de enfermedad. Según Berrueta, Giménez y Galván (2014), se ha identificado varios genes en las plantas que les confiere cierta resistencia a diferentes razas de forma específica. Probablemente estos genes de resistencia pueden estar presentes en las plantas provenientes de la Costa ecuatoriana lo que concuerda con el hecho de no haber encontrado plantas con sintomatología de bacteriosis en el muestreo inicial (Contreras y López, 2008).

Cabe recalcar que, la presente investigación únicamente realizó postulados de Koch para detectar a *Xanthomonas phaseoli*, como agente causal de la bacteriosis en yuca, mas no, para estudios de resistencia por parte de las plantas.

Después de tres semanas de infección, las hojas presentaron manchas angulares cerca de la nervadura y en algunos casos marchitamiento (Figura 15). Según Campoverde y Palmater (2013), la afectación de los tejidos cerca de la nervadura, es un síntoma característico de muchas especies del género *Xanthomonas*, especialmente de aquellas que causan manchas en las hojas. A medida que avanza la enfermedad, el fenol de la vacuola de la planta va a reaccionar con el citoplasma y la membrana celular de la bacteria, como resultado de la oxidación del fenol se desarrolla una pigmentación amarilla o café en los tejidos de la planta.



Figura 13. Síntomas de bacteriosis vascular por *Xanthomonas phaseoli* pv *manihotis*. Marchitamiento, manchas angulares y clorosis en las hojas de yuca.

Quiroz, Botero y Castaño (2011), reportan que el género *Xanthomonas*, no invade tejidos maduros e indican que la diseminación de la bacteria se da a partir de estacas o plántulas infectadas, con tejidos jóvenes, puesto que, la penetración a través de tejidos tiernos es mucho más efectiva que en tejidos vegetales. Esto pudo evidenciarse en el presente estudio, donde para la infección eficaz se utilizaron plantas de máximo de cuatro semanas de crecimiento.

Arellano (2018), menciona que realizar el experimento en un invernadero con condiciones de luz, temperatura y humedad controladas favorece a la infección de patógeno y la planta no sufre estrés por cambios bruscos, lo cual puede alterar los resultados.

El agente patógeno fue recuperado de cinco hojas que presentaron sintomatología concordante con *Xanthomonas phaseoli*. Los aislados obtenidos en

LPGA presentaron la misma morfología macroscópica y microscópica anteriormente descrita (Figura 14).

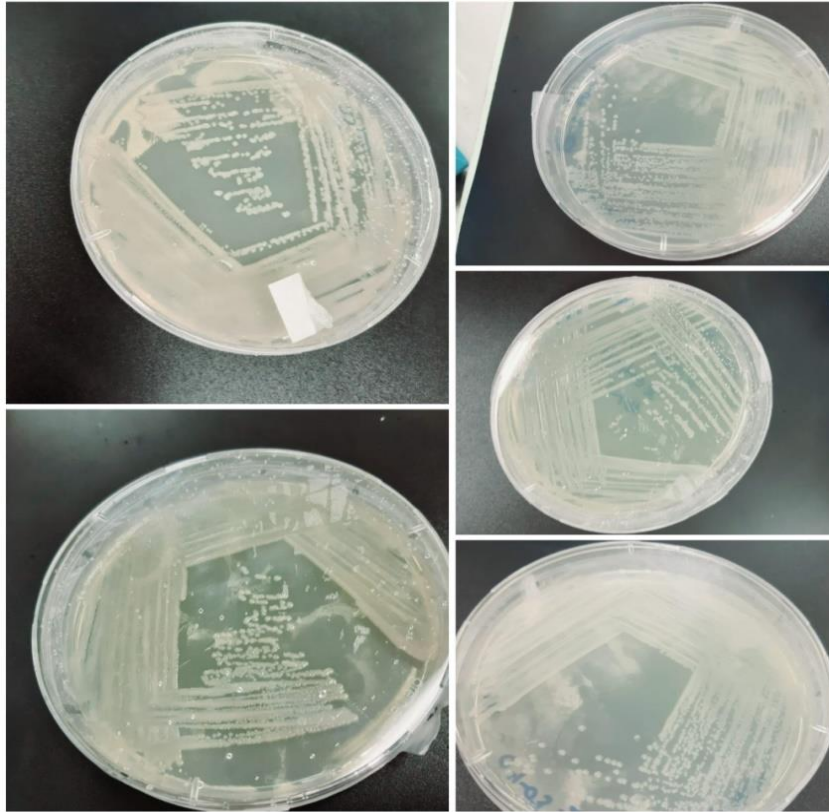


Figura 14. Aislados bacterianos puros obtenidos a partir de hojas inoculadas
Crecimiento bacteriano en medio LPGA.

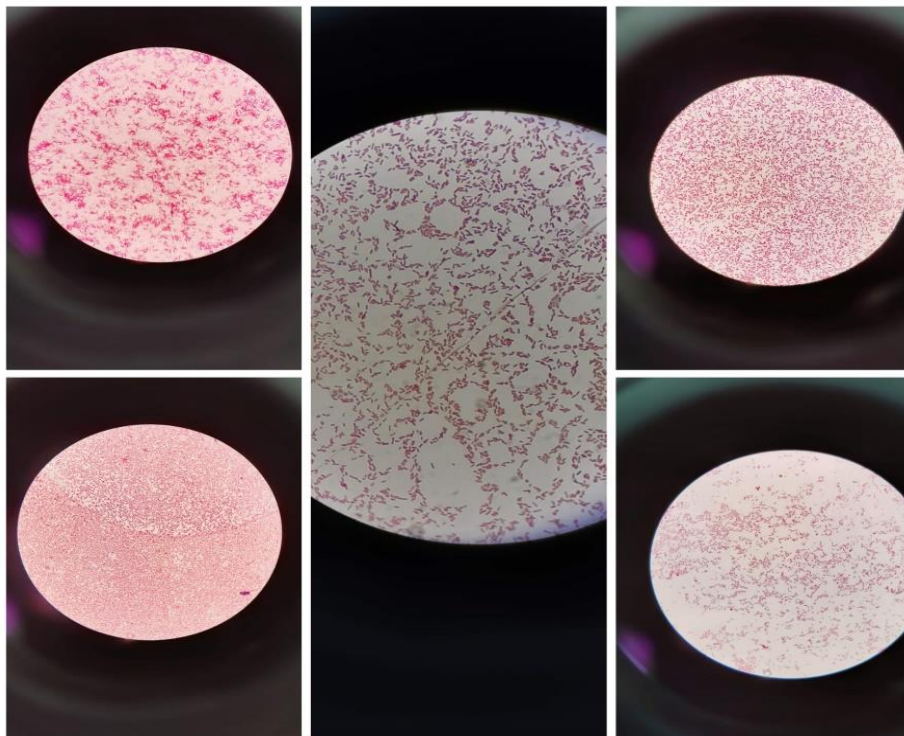


Figura 15. Tinción Gram de los aislados bacterianos obtenidos a partir de hojas con sintomatología relacionada a infección causada por *Xanthomonas*. Bacilos Gram negativos recuperados de hojas infectadas durante el desarrollo de los postulados de Koch.

El agente patógeno causante de la bacteriosis en yuca se recuperó a través del aislamiento en medio LPGA siguiendo el protocolo de Bernal et al., (2018). Las colonias aisladas presentaron aspecto mucoso con bordes definidos, convexas y de color crema, como las descritas por Coromoto (2015). El análisis microscópico de los aislados recuperados utilizando la tinción Gram mostraron que las bacterias obtenidas fueron bacilos cortos Gram negativos (Figura,15), lo que concuerda con estudios antes mencionados (Bernal et al., 2018).

Fredricks y Relman (1996), indican que los postulados de Koch son válidos si se cumple con cuatro elementos básicos en este proceso probatorio: 1) Asociación específica del microorganismo putativo con la enfermedad; 2) Concordancia científica entre las evidencias microbiológicas, patológicas y clínicas; 3) El aislamiento del microorganismo en medios de cultivo artificiales, y 4) La reproducción de la enfermedad por inoculación del organismo cultivado en un hospedero sano. Lamentablemente, la identificación molecular de las bacterias recuperadas no se llevó a cabo (Pandemia Covid 19) y el último requisito de los postulados de Koch no fue cumplido, dejando este objetivo inconcluso.

El presente estudio no fue concluyente, sin embargo, es de gran importancia debido a que contribuye con información valiosa y en un futuro cercano se espera que se finalicen los análisis moleculares y se establezca que *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* es el agente causal de la bacteriosis vascular de la yuca en Ecuador.

6. CONCLUSIONES

Xanthomonas phaseoli pv *manihotis* fue aislada de plantas de yuca (*Manihot esculenta*) con síntomas de bacteriosis vascular en muestras obtenidas en el Oriente ecuatoriano.

La bacteria *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* fue aislada de tejido foliar enfermo y cultivada en medio LPGA. Ésta se presentó como bacilos Gram negativos que formaron colonias mucoides de color crema.

La identificación molecular confirmó a *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* como la bacteria fitopatógena obtenida de hojas de yuca procedentes del Oriente ecuatoriano.

Los postulados de Koch se cumplieron en un 90%. A pesar de que los síntomas característicos de la bacteriosis en hojas de yuca se presentaron, y dicha similitud comprueba que la bacteria *Xanthomonas phaseoli* pv *manihotis* reaislada produce los síntomas, no se logró cumplir con los análisis moleculares finales que completarían los postulados.

7. RECOMENDACIONES

Realizar muestreos de estacas, plantas y suelos de cultivos de yuca en diversas épocas del año, para estudiar la presencia de *Xanthomonas phaseoli* pv *manihotis* en otras regiones del Ecuador y así determinar, las causas probables de la ausencia de esta bacteria fitopatógena en diversas zonas del país.

Analizar la posible existencia de genes de resistencia, de las variedades de yuca sembradas en el país, contra *Xanthomonas phaseoli* pv *manihotis*.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aguilar, E., (2017). Manual del cultivo de yuca. *Instituto Nacional de Renovación y Transferecia Agropecuaria*. Recuperado de: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10918.pdf>
- Álvarez, M. y Grabowski, O. (2013). Inducción de resistencia en plantas de sésamo (*Sesamum indicum* L.) a la mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *sesami*). *Investigación Agraria*, 15(2), 97-105. Recuperado de: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2305-06832013000200004&lng=en&tlng=es.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, E., y Lipman, D. (2011). BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.
- Álvarez, E. y Llano, G. (2017). Enfermedades del cultivo de la yuca y métodos de control. *Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia* *Google Scholar*. Recuperado de: <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/55242>
- Arismendi, L. (2001). Investigación sobre el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Krantz.) en el Oriente de Venezuela. *Revista UDO Agrícola*. 1(1): 1-10. Recuperado de: <http://www.bioline.org.br/pdf?cg01001>
- Barghouthi, S. (2011). A Universal Method for the Identification of Bacteria Based on General PCR Primers. *India Journal of Microbiology*, 51(4), 430-444. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23024404/>
- Berrueta, C., Giménez, G., Galván, G., y Borges, A. (2014). Componentes de resistencia a *Xanthomonas vesicatoria* raza T2 en genotipos de tomate en condiciones de invernadero y cámara de crecimiento. *Agrociencia Uruguay*, 18(1), 86-96. Recuperado de: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2301-15482014000100009&lng=es&tlng=es.
- Bernal, V., Ochoa, J., Trujillo., Rache, L., Bernal, A., y López, C. (2018). Development of a multiplex nested PCR method for detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Cassava. Universidad de los Andes, Bogota. Recuperado de: [file:///C:/Users/usuarios/Downloads/bernal-galeano2018%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/usuarios/Downloads/bernal-galeano2018%20(2).pdf)
- Belloti, A. (2013). Manejo integrado de plagas en el cultivo de yuca. Unidad de manejo CIAT Cali, Colombia. Recuperado de: http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos_ciat/ipm/pdfs/curso_corpoica_bellotti.pdf
- Boch, J. y Bonas, U. (2010). *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol*, 48, 419-436.
- Blázquez, R. (2013). Herramientas tecnológicas moleculares Blast. Recuperado de : <https://www.ugr.es/~rmblazquez/bioinformtica1.html>

- Campoverde E. V. y Palmateer A. J. 2013. Bacterial Blight of *Ficus elastica* Caused by *Xanthomonas*. EDIS publication, University of Florida, PP305, 3 pp. <http://edis.ifas.ufl.edu/pp305>
- Canteros, B., Minsavage, V., y Jones, B. (1995). *Diversity of Plasmids in Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*. *Phytopathology*. 1995; 85:1482-1486. Recuperado de Diversity of Plasmids in *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*. *Phytopathology*.
- Carillo, A., Sánchez, L., Estrada, S. y Márquez, L. (2001). Razas de *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* (Doidge) Dye. Presentes en el Estado de Sinaloa, México. *Redalyc*, 248(19),5-6. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/612/61219219.pdf>
- Contreras E., y López., C. (2008) Expresión de dos genes candidatos a resistencia contra la bacteriosis vascular en yuca. *Acta Biol Colom* 13:175–188. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/3190/319027881012.pdf>
- Constantin, E., Cleenwerck, I., Maes, M., Baeyen, S., VanMalderghem, C., y Vos, P. (2016). Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. *Plant Pathol.* 65, 792–806. doi: 10.1111/ppa.12461
- Corzo, M, Rivera, D., Zamora, L., Martínez, y Martínez, C. (2017). Detección e identificación de nuevos aislados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* en cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en la provincia Mayabeque, Cuba. *Rev. Protección Veg.* Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522015000200003&lng=pt.
- Chaparro, E. y Trujillo, G. (2003). Enfermedades virales en el cultivo de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en algunos estados de Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 20(4), 461-467. Recuperado de: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182003000400006&lng=es&tlng=es.
- Díaz, T., Zárate, C., Bernal, A., y López C. (2016). Infección de callo embriogénico friable de yuca con *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 66-73. <https://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61523>
- Duré, C. (2017). Utilidad diagnóstica de la coloración de Gram para las queratitis infecciosas. *Revista Científica de la UCSA*, 4(3), 12-19. [https://dx.doi.org/10.18004/ucsa/2409-8752/2017.004\(03\)012-019](https://dx.doi.org/10.18004/ucsa/2409-8752/2017.004(03)012-019)
- Fuentes, C. (2007). Los postulados de Koch: Revisión histórica y perspectiva actual. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 1(2), 262-266. Recuperado de <https://revistas.ucm.es/index.php/RCCV/article/download/.../22655>

- Frete, F. (2010). *Mandioca una opción industrial*. Recuperado de: <https://www.usaid.gov/sites/default/files/documents/1862/mandioca.pdf>
- Garzón, D. (2019). Tres lógicas de acción y reacción para la monopolización de los mercados de semillas en Colombia. *Revista Colombiana de Antropología*, 55(2), 9-37. <https://dx.doi.org/10.22380/2539472x.795>
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, C. (2014). *Metodología de la investigación. Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), (2018). Vigilancia Fitosanitaria en cultivos de yuca. Recuperado de: <https://www.ica.gov.co/noticias/inspeccion-fitosanitaria-cultivos-yuca-bolivar>
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias [INIAP]. (2014). *La yuca manejo y control*. Recuperado de: <http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mraiz/ryuca>
- Info Agro. (2017). *El cultivo de la yuca*. Recuperado de: <http://www.infoagro.com/hortalizas/yuca.htm>
- Invitrogen. (2010). UltraPure™ Agarose. Recuperado de: https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/ultrapure_agarose.pdf
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), (2011). *Cultivo de Yuca*. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/a1028s/a1028s01.pdf>
- Folgueras, M., Rodríguez, M., Herrera, L., y Sánchez, R. (2013). Influencia de Tipos de Estacas en la Incidencia de Pudriciones Radicales de Yuca (*Manihot esculenta*). *Revista mexicana de fitopatología*, 31(1), 60-64. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092013000100006&lng=es&tlng=es
- Francisco, N., Gallegos, G., Ochoa, Y., Hernández, D., Benavides, A., y Castillo, F. (2013). Aspectos Fundamentales del Tizón Común Bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): Características, Patogenicidad y Control. *Revista mexicana de fitopatología*, 31(2), 147-160. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092013000200006&lng=es&tlng=es
- Inga H. y López J. (2001). Diversidad de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en Jenaro Herrera, Loreto-Perú. Documento técnico nro. 28 IIAP. Iquitos, Perú. Recuperado de: <http://www.iiap.org.pe/upload/Publicacion/ST028.pdf>
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). (2016). Cultivo de yuca en el Ecuador. Recuperado de: <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/5214/1/INIAPEEPbd436.pdf>

- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870- 1874. DOI:10.1093/molbev/msw054
- Leyva, L. (2019), *Tubérculo yuca*. Tubérculos blog. Recuperado de: <https://www.tuberculos.org/yuca/>
- López. C., Restrepo, S., y Verdier V. (2006). *Limitaciones en la Bacteriosis Vasculare de la Yuca: Nuevos Avances*. Scielo, 15(27) ,27-28. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v11s1/v11s1a02.pdf>
- López, C., Rivero, M., González, D., Zamora, L., Martínez, Y., y Martínez, B. (2014). Detección e identificación de nuevos aislados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* en cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en la provincia Mayabeque, Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, 30(2), 97-103. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522015000200003&lng=es&tlng=es
- Lonza. (2012). GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain. Recuperado de: https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/EC/en/download/product/asset/29014#:~:text=GelStar%E2%84%A2%20Gel%20Stain%20represents,laser%20excitation%20can%20be%20used.
- Lozano, J., y Sequeira, L. (1974). Bacterial blight of cassava in Colombia: Etiology. *Phytopathology* 64:74-82.
- Meza, Y., y Julca, A. (2015). Sustentabilidad de los sistemas de cultivo con yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en la subcuenca de Santa Teresa, Cusco. *Ecología Aplicada*, 14(1), 55-63. Recuperado en 23 de octubre de 2020, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162015000100005&lng=es&tlng=es.
- Muñoz, X., Hinostroza, F., y Mendoza, M. (2017). La yuca en el Ecuador y su diversidad genética. Recuperado de: http://www.uagraria.edu.ec/publicaciones/revistas_cientificas/16/058-2017.pdf
- Nazario, F., Gallegos, G., Ochoa, M., Hernández, C., Benavides, M., y Castillo, R. (2013). *Aspectos fundamentales del tizón común bacteriano (Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): Características, patogenicidad y control. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2013; 31(2):147-160.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO]. (2011). La yuca *Manihotis esculenta crantz*. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/pdf/010/a1028s/a1028s01.pdf>
- Oropeza, M (2015). Caracterización morfológica, bioquímica y molecular de seis aislados venezolanos de *Xanthomonas* sp. Recuperado de: <http://saber.ucv.ve/bitstream/123456789/13456/1/Tesis%20Maybeling%2023.10.15.2b.pdf>

- Pastrana, F., Heraldo, A., y Salcedo, G. (2015). Respuesta de dos cultivares de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) (CM 3306-4 y MCOL 2215) a la aplicación de riego en condiciones hídricas diferentes. *Acta Agronómica*, 64(1), 48-53. <https://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n1.43935>
- Promega (2018). *Wizart Genomic DNA Purification*. Recuperado de <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol/>
- Promega. (2017). 100bp DNA Ladder. Recuperado de <https://worldwide.promega.com/products/cloning-and-dna-markers/molecular-weight-markers/100bp-dna-ladder/?catNum=G2101>
- Quiroz, O., Botero, O., y Castaño, J. (2011). Etiología de la necrosis de los brotes terminales de la higuera (*Ricinus communis* L.). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 35(135), 133-142. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-39082011000200002&lng=en&tlng=es.
- Restrepo S, Velez, C., Duque, M., y Verdier, V. (2004) Genetic structure and population dynamics of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia from 1995 to 1999. *Applied and Environmental Microbiology* 70:255–261
- Rojas, A. (2012). *Estudio de las características fisicoquímicas de la yuca (Manihot esculenta crantz) y sus efectos en la calidad de hojuelas fritas para su procesamiento en la empresa pronal s.a.* Universidad Tecnológica de Pereira. Recuperado de: <http://recursosbiblioteca.utp.edu.co/tesis/textoyanexos/633682R741.pdf>
- Sandino, T., López, L., López, C., y Marquínez, X. (2015). Caracterización de la respuesta morfológica de variedades susceptibles y resistentes de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) a la bacteriosis vascular causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Summa Phytopathologica*, 41(2), 94-100. Recuperado de: <https://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/2031>
- Santamaría, R. (2017). Alineamiento de secuencias en herramientas para la biología molecular. Recuperado de http://vis.usal.es/rodrigo/documentos/bioinfo/temas/3_Alineamientos%20de%20pares.pdf
- Serrato, A., Flores, L., Aportela, J. y Sierra, E. (2016). *Reacción en cadena de la Polimerasa*. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, colonia Vicentina. C. P. 09340. México, D. F. Recuperado de: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcr.pdf>
- Simbolo, M., Gottardi, M., Corbo, V., Fassan, M., Mafficini, A., Malpeli, G., Lawlor, R., y Scarpa, A. (2013). DNA qualification workflow for next generation sequencing of histopathological samples. *PLoS One*. 2013;8:e62692.
- Somma, M. (2007). Sesión No. 4: Extracción y purificación de ADN. En M. Querci, M. Jermini y G. Van den Eede (Eds.), *Análisis de la Presencia de Organismos*

Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos (pp. 1-18). Italia: Comunidades Europeas

Suárez, L., y Mederos, V. (2011). Apuntes sobre el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Tendencias actuales. *Cultivos Tropicales*, 32(3), 27-35. Recuperado en 23 de mayo de 2020, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362011000300004&lng=es&tlng=es.

Swings, J., y Civerolo, E. 1993. *Xanthomonas*. First ed. London: Chapman & Hall. 399 p.

Trujillo CA, Arias-Rojas N, Poulin L, Medina CA, Tapiero A, Restrepo S, y Bernal AJ (2014) Population typing of the causal agent of cassava bacterial blight in the Eastern Plains of Colombia using two types of molecular markers. *BMC Microbiology* 14:161

Universidad Agraria del Ecuador. (2017). El misionero del agro. *La yuca en el Ecuador su origen y Biodiversidad*. Recuperado de http://www.uagraria.edu.ec/publicaciones/revistas_cientificas/16/058-2017.pdf

Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., y Swings, J. (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45:472-489.

Verdier, V. (2011). Bacteriosis vascular (o añublo bacteriano) de la yuca causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*. En *CIAT eds La yuca en el Tercer Milenio Sistemas modernos de producción procesamiento utilización y comercialización*. 2002, 148-159. Recuperado de <https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/55243/capitulo09.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Wonni, I., Ouedraogo, L., Dao, S., Tekete, C., Koita, O., y Taghouti, G. (2015). First report of Cassava Bacterial Blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Burkina Faso. *Plant Disease*. 99:551. doi: 10.1094/PDIS-03-14-0302-PDN.

8. ANEXOS

Anexo 1. Composición del medio de cultivo LPGA (agar levadura peptona glucosa)

Components

Component	g/liter
Glucose	10
Peptone	5
Yeast Extract	5
Agar	16
	Total: 36g/Liter

Anexo 2 Protocolo para extracción de ADN en bacterias Gram negativas

3.G. Isolating Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria

Materials to Be Supplied by the User

- 1.5ml microcentrifuge tubes
 - water bath, 80°C
 - water bath, 37°C
 - isopropanol, room temperature
 - 70% ethanol, room temperature
 - water bath, 65°C (optional; for rapid DNA rehydration)
 - 50mM EDTA (pH 8.0) (for gram positive bacteria)
 - 10mg/ml lysozyme (Sigma Cat. # L4919) (for gram positive bacteria)
 - 10mg/ml lysostaphin (Sigma Cat. # L7386) (for gram positive bacteria)
1. Add 1ml of an overnight culture to a 1.5ml microcentrifuge tube.
 2. Centrifuge at 13,000–16,000 × *g* for 2 minutes to pellet the cells. Remove the supernatant. For Gram Positive Bacteria, proceed to Step 3. **For Gram Negative Bacteria go directly to Step 6.**
 3. Resuspend the cells thoroughly in 480µl of 50mM EDTA.
 4. Add the appropriate lytic enzyme(s) to the resuspended cell pellet in a total volume of 120µl, and gently pipet to mix. The purpose of this pretreatment is to weaken the cell wall so that efficient cell lysis can take place.
Note: For certain *Staphylococcus* species, a mixture of 60µl of 10mg/ml lysozyme and 60µl of 10mg/ml lysostaphin is required for efficient lysis. However, many Gram Positive Bacterial Strains (e.g., *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Nocardia oitidiscaviarum*, *Rhodococcus rhodochrous*, and *Brevibacterium albidum*) lyse efficiently using lysozyme alone.
 5. Incubate the sample at 37°C for 30–60 minutes. Centrifuge for 2 minutes at 13,000–16,000 × *g* and remove the supernatant.
 6. Add 600µl of Nuclei Lysis Solution. Gently pipet until the cells are resuspended.
 7. Incubate at 80°C for 5 minutes to lyse the cells; then cool to room temperature.
 8. Add 3µl of RNase Solution to the cell lysate. Invert the tube 2–5 times to mix.
 9. Incubate at 37°C for 15–60 minutes. Cool the sample to room temperature.
 10. Add 200µl of Protein Precipitation Solution to the RNase-treated cell lysate. Vortex vigorously at high speed for 20 seconds to mix the Protein Precipitation Solution with the cell lysate.
 11. Incubate the sample on ice for 5 minutes.



12. Centrifuge at 13,000–16,000 × *g* for 3 minutes.
13. Transfer the supernatant containing the DNA to a clean 1.5ml microcentrifuge tube containing 600µl of room temperature isopropanol.
Note: Some supernatant may remain in the original tube containing the protein pellet. Leave this residual liquid in the tube to avoid contaminating the DNA solution with the precipitated protein.
14. Gently mix by inversion until the thread-like strands of DNA form a visible mass.
15. Centrifuge at 13,000–16,000 × *g* for 2 minutes.
16. Carefully pour off the supernatant and drain the tube on clean absorbent paper. Add 600µl of room temperature 70% ethanol and gently invert the tube several times to wash the DNA pellet.
17. Centrifuge at 13,000–16,000 × *g* for 2 minutes. Carefully aspirate the ethanol.
18. Drain the tube on clean absorbent paper and allow the pellet to air-dry for 10–15 minutes.
19. Add 100µl of DNA Rehydration Solution to the tube and rehydrate the DNA by incubating at 65°C for 1 hour. Periodically mix the solution by gently tapping the tube. Alternatively, rehydrate the DNA by incubating the solution overnight at room temperature or at 4°C.
20. Store the DNA at 2–8°C.

Anexo 3. Secuencia consenso de la muestra DP5, editada en MEGA X con 1606 pares de bases.

```

CTCGTGGCTATGTCTGCTATTTTCGCTTAGCCGCGCTCACCGTAACTACGAGGCCCCAGCAGTGGAAACGCTCCC
CCCAGCCTCGCAGCGTTGGCACCGTATCCTCCAGGCATCAGGGATGAAAAGGGCCGAACCGTCCGGTGCTT
CCGCTCAAACGCCGGACCAGGCGTCTTTGCATGCATTTCGCGATGCGCTGGAGCGTGAGCTGGATGCGCCC
AGCCCAATAGACCGGGCGGGCCAGGCGCTGCAAGCAGCAGCCGTAAACGTCGCCGATCGGAGAGTTCTG
TCACCGGCTCCTTCGCACAGCAAGCTGTCGAGGTGCGCGTCCCGAACAGCGCGATGCGCTGCATTTCTCC
CCCTCAGCTGGGGGTAAAACGCCCGCGTACCAGGATCGGGGGCGCCCTCCCGATCCTGGTACGCCCAT
GGACGCGGACCTGGCAGCGTCCAGCACCGTGAATGTGGGAACAAGATGCGGACCCCTTCGCAGGGGCAGCG
GATGATTTTCCGCAATTCAACGAAGAGGAGATGGCATGTTGATGGAGCTATTTCTAGGGGAACTAGTA
AATATTAATTCTATGGGATTTATTATTCTGGATGAAGGACCCCTGATTGCTGGTGAGATTGAATAAAAAATA
TATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTACGGGAAATAAAAAAGTCGTAGAATAGTGTGGTACGGGGCATGCGGT
GTTGGAGATGGGGAGTAGAGGAAGGGGAGTGTAGTGGAGAGATGTGTATATATTGTGGAATATAGGGGC
GCGTATATAAAAACGGGCAGGCGTGGATGGCGATGATTAGAGTAGGGGAGTTGGAGAATGAGGAAGGAT
GCGTGAGATGGGGGTGTGTGATTTGGTGGGGAGCTTGGGGTCCGGGCATAGTGGGAGGGGTGGTA
GAGGTGTTGTAACAATGCAAGGGTGTAGGTGAGGTGTGAAAGGATTGTATGGATGAGTTATGGGAGAA
GGGTGTTGGTGGGTTATGAGGTATAGGAGTCAAATGGATGTTAGGGTATTAATGGTAAGAGTAAGAAA
GATTTTGTATGGGGGAGGAAGTGGGGATGGTGCAGATGTTGAAGACGTAGGGGAAGGCAGGTG
AAATATGGAGGAAATGTGGGGGGATCGGGCAAAGCGGGAGTGGTATGAAGTGAAGTTGTAGTGTAGAT
AGGGTGTGACATGGGATTGTACATTAATAATTGACGAAATATGGTATATATTTGGGTTGATAATATATGG
GGGTGGGGGTGAGACGTCTGAAGGGAAGATGTGTATTTAATGCGGTTTTATACGGTAAATTGAATTGTG
AACGAAGTTGGATATTGGTTAAAATTTGGTTATTTTAAAAGACATGAAATGGAAGTGGTAGAGTTGAGT
TGATAATTTGATTGAATAATGAAATAATAGTGATACAACCTGGATTGAATGTTTGGTGGTGGTAATAA
TGTTTGGAAATGATAAGGATGTGGATATGAAGATGGGGGCAGGGCAAACGGTAAAGATCAATGAAGTGA
GATGGGATGGGAGACTGTACGT

```

Anexo 4. Secuencia consenso del control positivo editada en MEGA X

```

CCCGCGGGGCTGTCGCTATTTTCGAGAGCCGGCGTACCGAACTCGAGGCCCCAGCAGTGGAAACGCTCCCC
CAGCCTCGCAGCGTTGGCACCGTATCCTCCAGGCATCAGGGATGAAAAGGGCCGAACCGTCCGGTGCTTCC
GCTCAAACGCCGGACCAGGCGTCTTTGCATGCATTTCGCCGATGCGCTGGAGCGTGAGCTGGATGCGCCCAG
CCCAATAGACCGGGCGGGCCAGGCGCTGGCAAGCAGCAGCCGTAAACCGTCCCGATCGGAGAGTTCTGTG
ACCGGCTCCTTCGCACAGCAAGCTGTCGAGGTGCGCGTTCCCGAACAGCGCGATGCGCTGCATTTCTCCCC
CTGCCAGCTGGGGGTAAAACGCCCGCTACCAGGATCGGGGGCGCCCTCCCGATCCTGGTACGCCCA
TGGACGCGGACCTGGCAGCGTCCAGCACCGTGAATGTGGGAACAAGATGCTGACCCCTTCGCAGGGGCAGC
GGATGATTTTCCGCAATTCAACGAAGAGGAGATGGCATGTTGATGGAGCTATTTCTCAGTGAAAATAA
TAAAAAAAAGGGGGGGTTTTGAGGTGTATGGGGATTAATTATGAGGGAAGGAGGCGAGGAGTGAAGT
GGTGGAGAAATTGAAAAAAATAAATATTTTTTTTTTTTTTTTTTAATTTGAGGAGAAAAAAAGTAGAG
CGGGCAAAGCGCTGCAGGGCTGGGTGGGGGAAACGGTGGGGGTGAGGGGAAAGGGGTGAGGGGAGGA
AGGGGGGGGGGGGGGTAAGGTGTGGTGGGGGGTGGGAAAGGGAGGGTGGGGGAGAGGGGGGTG
GAGGGAGGGAGGGGGAAAAAGTCTAGGAGGAAGGGGTGGAGTGAAGGAAAGGAAAGGGATTGGGGAT
GGACGGTGGGATGGGGGGGTGGGGGGTGTGACGGCGGAGGGGGAGGGCGAAGAGGGGGAGGAGGG
GGAAGGTGGGAGGTGGGGGGGAAAGGGGATATGTTAGGAAGGGCGGGTTAGGACGTGGGTAGGTT
AGAGGATGGGGGGTGTGGGATGTGGGCGTTTTGGGGGGAAGGGGGGTGGAAGGGTGGTGGGAGGG
GCGGGGGCGGGGGGTGGATTGAAAGTGGGAGAGGGGGATAATAGAAGAGGTGGGAAGGAGGGAAAAAG
AATGTGGGAATTGAATGGAGGGGGGTGGCGTGAAGTGGGAAGAGAGAAGGAGGGGAGGAGGCAAAAGAG
GGGAGAGGGAAAGGAGGCGAAGGGGTCCGGTAGGTGGGGGTGAGGGGGTGGTGGAAAGTATGGGGG
GGGTAAAGTGTAAAGCTAGGAGGCAGTAGATAATTAGGGAAGGGGGGTGGCCTTGGATGGGATTAAGGAG
GGAAGAGGGGGTAGGATGGTTGGGAGGGGTGGGAGGAAAGAATTATAGGTAAATGGTGAAGAAGTG
GTGGGGGGGATGGATATGATGGGAGTGA TAGAGAGCTAGAGAGGGGTTGATTGTAGAGAGAGAGGG
GGGAGAGTTGGCTAGGAGGGGAGATTTGGGTAGGATAGAGGGAGGATGGAGGGTGGAGGGGGGG
GAAAGTGTGAAAGTGGGGGTGAGGTGGGATGAGTAGGTGTAAGAATTGGAGAGGAGTGGGGGGAG
GGTGTGGGGAGTCGGCTGGAGATTGAAGGAGTAATGGAGGGGGGGTGGAGGGGAGGTGAATTGGAATA
AATGAGAGAGGTGGAGAGGATGGTAAGATTGAAAAAAAGAGGTAGATTGGAGTAAGAAAAGTGGGGGG
GTGGATGGAATTGCGTTGGAAGGTGGGGTGGGTGTAATTGGGGGGAGGTTGAAATACGGAGGTTGG
GTGGGACTGCGCTTAGTGGAGGTGTGAGCAATAATAGGGTGGGGTGAAGTTGGAGGTAAGATGTGAAA
GAGAAGATTCAAGAGTGTGTTGATTATTGAGCGGGGGGGGGGGTGGGGGATAGAAGATGTATAGATAG
TAATAGGGAGAGAAGAGGGGATGAGAGAAGGTGGGGGAGAATGGTGGATTGAGTTAAGGGGTG

```