

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA Y
MOLECULAR DE BACTERIAS PATOGENICAS EN EL CULTIVO
DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) Y SU SENSIBILIDAD A
ANTIBIÓTICOS.

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de
Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales
para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias
Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Protección de
Cultivos

DARÍO ARNALDO ALVARADO RODRÍGUEZ

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2025

DEDICATORIA

A mis padres Arnaldo y Verónica, a mi hermana Roxana, y a mi pareja Ana.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias al financiado de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica bajo el proyecto C0466 “Uso de antibióticos en Costa Rica para el control de infecciones bacteriales en el cultivo de tomate: Aplicación, eficacia y alternativas en pruebas *in vitro* y de campo”, el Sistema de Estudios de Posgrado (SEP), Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales (PPCARN), Centro de Investigación en Protección de Cultivos (CIPROC) y el Laboratorio de Técnicas Moleculares del CIPROC.

Quiero agradecer a mis padres y a mi hermana por su apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida.

A mi pareja Ana por acompañarme y motivarme siempre a dar lo mejor de mí en todo lo que hago.

A mi directora de tesis Dra. Mónica Blanco Meneses por confiar en mí, por su acompañamiento y mentoría en todo este camino.

A los miembros de mi comité asesor, Dr. Fernando García Santamaría y Dr. Walter Barrantes Santamaría por su apoyo y consejos en la realización de este trabajo.

A las personas del Laboratorio de Técnicas Moleculares del CIPROC por abrirme las puertas y hacerme uno más del laboratorio, Anny Calderón, Alejandro Sebiani, Jacqueline Camacho y Gabriel Vargas, gracias por todo su apoyo en el proceso y por su amistad.

A las personas del Laboratorio de Fitopatología del CIPROC, en especial a Gabriela Chinchilla por todo su apoyo, consejos y motivación, a Mauricio Serrano, Oscar Castro, José Esquivel y Pedro Montenegro, gracias por las pláticas, el cafecito de la tarde y por todo el apoyo que me brindaron.

Al Dr. Carlos Chacón y Yeimy Ramírez del Laboratorio de Bacteriología Médica de la Facultad de Microbiología por brindarme su apoyo y asesoramiento en parte del desarrollo experimental.

A todos los amigos que hice en el camino y que me acompañaron en esta etapa, maestros y compañeros de los que aprendí mucho, Edgar Vargas, Isanna Victoriano, María José Cordero, Luis Fernando Benavides, Elizabeth González y su familia, Fabián Cruz, Humberto Lezama, Manuel Solís, Danny Humphreys, Isaac Arias, Andrés Araya, Carolina Quirós.

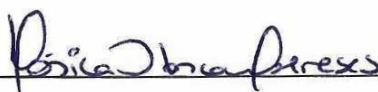
A Karla Segura, Kattya Granados y Priscilla Castillo por su gran apoyo en todos los procesos administrativos.

A la familia Boza Oviedo, por su hospitalidad y cariño, en especial a mami Maru Oviedo Q.E.P.D.

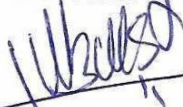
“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Protección de Cultivos.”



Dr. Mauricio Serrano Porras
Representante de la Decana
Sistema de Estudios de Posgrado



Dra. Mónica Blanco Meneses
Directora de Tesis



Dr. Walter Barrantes Santamaría
Asesor



Dr. Fernando García Santamaría
Asesor



Dra. Catalina Salas Durán
Directora
Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales



Darío Arnaldo Alvarado Rodríguez
Candidato

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
HOJA DE APROBACIÓN.....	iv
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT	viii
ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
BIBLIOGRAFÍA.....	4
OBJETIVOS	8
OBJETIVO GENERAL.....	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
CAPÍTULO 1: Caracterización morfológica, bioquímica y molecular de bacterias aisladas de plantas de tomate con infecciones bacterianas colectadas en el Valle Central de Costa Rica	9
1.1 INTRODUCCIÓN.....	9
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
1.2.1 Material vegetal y aislamientos bacterianos.....	12
1.2.2 Descripciones morfológicas	16
1.2.3 Pruebas fisiológicas y bioquímicas	17
1.2.4 Análisis molecular.....	22
1.3 RESULTADOS	27
1.3.1 Caracterización morfológica de los aislamientos	27
1.3.2 Caracterización fisiológica y bioquímica de los aislamientos	28
1.3.3 Análisis molecular.....	33
1.4 DISCUSIÓN.....	49
1.5 BIBLIOGRAFÍA.....	55
1.6 ANEXOS.....	67
CAPÍTULO 2: Bacterias causantes de necrosis medular y decoloración de tejido en plantas de tomate en el Valle Central de Costa Rica	73
2.1 INTRODUCCIÓN.....	73
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	76

2.2.1	Aislamientos bacterianos y material vegetal	76
2.2.2	Inoculación y evaluación.....	78
2.2.3	Análisis estadístico	78
2.2.4	Análisis de secuencias multilocus (MLSA) de cepas patogénicas 80	
2.3	RESULTADOS	83
2.3.1	Pruebas de patogenicidad	83
2.3.2	Análisis de secuencias multilocus (MLSA) de cepas patogénicas 93	
2.4	DISCUSIÓN.....	96
2.5	BIBLIOGRAFÍA.....	101
2.6	ANEXOS.....	108
CAPÍTULO 3: Evaluación <i>in vitro</i> de la sensibilidad de bacterias patogénicas y no patogénicas de tomate a cinco antibióticos de uso agrícola empleados con frecuencia en Costa Rica		
111		
3.1	INTRODUCCIÓN.....	111
3.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	114
3.2.1	Aislamientos bacterianos y antibióticos de uso agrícola	114
3.2.2	Prueba de difusión en disco (método Kirby-Bauer).....	114
3.2.3	Prueba de dilución en agar para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI)	116
3.3	RESULTADOS	119
	DISCUSIÓN.....	133
3.4	BIBLIOGRAFÍA.....	139
DISCUSIÓN GENERAL.....144		
	BIBLIOGRAFÍA.....	147
CONCLUSIONES		
152		
RECOMENDACIONES.....154		

RESUMEN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas más cultivadas a nivel mundial. En Costa Rica, su producción se ve favorecida durante todo el año debido a las condiciones ambientales. Sin embargo, la producción también se ve afectada por el desarrollo de enfermedades de origen biótico, como las causadas por bacterias fitopatógenas. La identificación precisa de las bacterias patogénicas presentes en el cultivo, así como su caracterización y la determinación de la efectividad de los métodos utilizados para su manejo son herramientas necesarias para el desarrollo de estrategias de control efectivas. En este estudio se realizó la caracterización morfológica y bioquímica de bacterias aisladas de plantas de tomate con síntomas de infecciones bacterianas provenientes de diferentes localidades del Valle Central de Costa Rica. Se realizaron pruebas de diagnóstico con cebadores específicos mediante la amplificación de ADN a partir de muestras de tejido, en las que se detectó la presencia de los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas*, y las especies *P. mediterranea*, *P. syringae* pv. *tomato* y *Pectobacterium carotovorum* pv. *carotovorum*. Se analizó la comunidad bacteriana por medio de la secuenciación parcial del gen 16S ARNr a partir de aislamientos puros y se determinó que 55.74% de los aislamientos eran de la clase Gammaproteobacteria con *Pseudomonas* como el género dominante. También se determinó la patogenicidad y virulencia de las cepas de *Pseudomonas alliivorans* LTM 13.1.2, *P. flavescens* LTM 14.2.2, *P. capsici* LTM 78.3.2, reportadas por primera vez en Costa Rica como agentes causales de la necrosis medular del tomate e identificadas mediante MLSA, además de las cepas de *P. straminea* LTM 78.2.1 y *Cedecea neteri* LTM 72.2.1 identificadas como causantes de la decoloración del tejido vascular. Se evaluó la sensibilidad de cepas patogénicas y no patogénicas a cinco antibióticos de uso agrícola y se determinó que 23% de los aislamientos evaluados crecieron en presencia de estreptomina y la misma proporción creció en presencia de tetraciclina, 85% creció en presencia de kasugamicina y 100% en presencia de validamicina. El crecimiento de todos los aislamientos fue inhibido en presencia de gentamicina. De los aislamientos patogénicos, uno creció en presencia de estreptomina y dos en presencia de kasugamicina. Además, se registró que 85% de los aislamientos presentó crecimiento en presencia de múltiples antibióticos. Este estudio presenta resultados de interés para todos los involucrados en la cadena de producción de tomate en Costa Rica, con una base de conocimiento sobre la estructura de la comunidad bacteriana, la identificación de bacterias fitopatógenas que atacan el cultivo, además de la identificación de cepas resistentes a los antimicrobianos comúnmente utilizados en el país.

ABSTRACT

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most widely cultivated vegetables worldwide. In Costa Rica, its production benefits from favorable environmental conditions throughout the year. However, this production is also affected by the development of biotic diseases, such as those caused by phytopathogenic bacteria. Accurate identification of the pathogenic bacteria present in the crop, along with their characterization and the assessment of the effectiveness of management methods, are essential tools for developing effective control strategies. In this study, the morphological and biochemical characterization of bacteria isolated from tomato plants showing symptoms of bacterial infections from different localities in the Central Valley of Costa Rica was performed. Diagnostic tests were conducted using specific primers through DNA amplification from tissue samples, which revealed the presence of the genera *Pseudomonas* and *Xanthomonas*, as well as the species *P. mediterranea*, *P. syringae* pv. *tomato*, and *Pectobacterium carotovorum* pv. *carotovorum*. The bacterial community was analyzed through partial sequencing of the 16S *rRNA* gene from pure isolates, identifying that 55.74% of the isolates belonged to the class *Gammaproteobacteria*, with *Pseudomonas* as the dominant genus. Pathogenicity and virulence of *Pseudomonas allivivans* LTM 13.1.2, *P. flavescens* LTM 14.2.2, and *P. capsici* LTM 78.3.2 strains were also determined, which were reported for the first time in Costa Rica as causal agents of tomato pith necrosis and were identified using MLSA. Additionally, strains of *P. straminea* LTM 78.2.1 and *Cedecea neteri* LTM 72.2.1 were identified as the causal agents of vascular tissue discoloration. The sensitivity of pathogenic and non-pathogenic strains to five agricultural antibiotics was evaluated. It was determined that 23% of the isolates grew in the presence of streptomycin and the same proportion exhibited growth in the presence of tetracycline, 85% of the isolates grew in the presence of kasugamycin, and 100% grew in the presence of validamycin. The growth of all isolates was inhibited in the presence of gentamicin. Among the pathogenic isolates, one grew in the presence of streptomycin, and two in the presence of kasugamycin. Moreover, 85% of the isolates exhibited growth in the presence of multiple antibiotics. This study provides valuable insights for all stakeholders involved in the tomato production chain in Costa Rica, offering a knowledge base on bacterial community structure, the identification of phytopathogenic bacteria affecting the crop, and the identification of strains resistant to commonly used antimicrobials in the country.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1 Procedencia y síntomas de infecciones bacterianas observados en plantas de tomate colectadas en el Valle Central de Costa Rica.....	13
Cuadro 1.2 Cebadores específicos utilizados para detectar la presencia de bacterias patógenas en tejido de plantas de tomate con síntomas de infecciones bacterianas colectadas en fincas del Valle Central de Costa Rica.	25
Cuadro 1.3 Caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica de las colonias de 146 aislamientos bacterianos aislados a partir de muestras de plantas de tomate con síntomas de infecciones bacterianas colectadas en siete cantones del Valle Central de Costa Rica.	30
Cuadro 1.4 Detección de géneros o especies de bacterias fitopatógenas objetivo mediante amplificación de ADN con cebadores específicos a partir de muestras de tejido de plantas de tomate con síntomas de infecciones bacterianas.	34
Cuadro 1.5 Características morfológicas de las colonias de 61 aislamientos bacterianos agrupados en 23 géneros identificados mediante la secuenciación parcial del gen <i>16S ARNr</i>	44
Cuadro 1.6 Características fisiológicas y bioquímicas de las colonias de 61 aislamientos bacterianos evaluadas mediante pruebas bioquímicas convencionales, agrupados en 23 géneros identificados mediante la secuenciación parcial del gen <i>16S ARNr</i>	46
Cuadro 2.1 Cepas evaluadas en las pruebas de patogenicidad.....	77
Cuadro 2.2 Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación parcial de los genes <i>16S ARNr</i> , <i>gyrB</i> , <i>rpoD</i> y <i>rpoB</i> para el análisis de secuencias multilocus (MLSA) de las cepas patógenas de <i>Pseudomonas</i> spp.....	81
Cuadro 2.3 Extensión de necrosis medular/decoloración de tejido (cm) en plantas de tomate de las variedades “Acorazado” y “JR” inoculadas con cepas bacterianas procedentes de varias localidades del Valle Central de Costa Rica a los 21 días después de inoculación (ddi) bajo condiciones de invernadero.....	86
Cuadro 2.4 Efecto de la extensión de la lesión interna (cm) sobre el crecimiento de las plantas (cm) (<i>Alturafinal – Alturainicial</i>) en las variedades de tomate “Acorazado” y “JR” a los 21 días después de inoculación (ddi) bajo condiciones de invernadero.....	92

Cuadro 3.1 Comportamiento de cepas bacterianas en presencia de cuatro antibióticos de uso agrícola evaluada mediante pruebas de difusión en disco y determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante dilución en agar.	121
Cuadro 3.2 Parámetros de modelos de regresión logística para la probabilidad de crecimiento de bacterias patogénicas y no patogénicas de tomate ante los antibióticos de uso agrícola evaluados.....	127

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Agrupamiento de las cepas bacterianas según el perfil bioquímico combinado de pruebas convencionales y el sistema VITEK® 2.....	32
Figura 1.2 Mapa de distribución y frecuencia de las bacterias fitopatógenas detectadas en muestras de tejido de plantas de tomate sintomáticas mediante la amplificación de ADN con cebadores específicos.....	37
Figura 1.3 Diversidad taxonómica y abundancia relativa porcentual de las cepas bacterianas aisladas de tejido sintomático de plantas de tomate en fincas del Valle Central de Costa Rica.	39
Figura 1.4 Diversidad taxonómica y abundancia relativa porcentual de las cepas bacterianas en los diferentes tejidos de las plantas de tomate evaluadas: raíz, base del tallo, tallo inferior, tallo superior, hoja, y fruto.....	40
Figura 1.5 Diversidad taxonómica y abundancia relativa porcentual de las cepas bacterianas aisladas de tejido sintomático de plantas de tomate en siete cantones del Valle Central de Costa Rica.	41
Figura 1.6 Árbol filogenético consenso de cepas aisladas de tejido sintomático de plantas de tomate y cepas tipo de referencia descargadas de la base de datos del GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), elaborado a partir de las secuencias parciales del gen <i>16S ARNr</i> mediante un análisis filogenético Bayesiano.	42
Figura 1.7 Características morfológicas y bioquímicas de los aislamientos correspondientes a los 23 géneros identificados mediante la secuenciación parcial del gen <i>16S ARNr</i>	48
Figura 2.1 Crecimiento (cm) de las plantas de tomate de las variedades “JR” y “Acorazado” inoculadas con cepas bacterianas y plantas testigo inoculadas con buffer fosfato salino (PBS) a los 21 días después de inoculación (ddi) bajo condiciones de invernadero.	84
Figura 2.2 Extensión (cm) de la necrosis medular o la decoloración del tejido en plantas de tomate de las variedades “Acorazado” y “JR” inoculadas con cepas bacterianas y plantas testigo inoculadas con buffer fosfato salino (PBS) a los 21 días después de inoculación (ddi) bajo condiciones de invernadero.....	88
Figura 2.3 Necrosis medular en plantas de tomate inoculadas con cepas bacterianas, evaluada 21 días después de la inoculación (ddi).....	89

Figura 2.4 Decoloración de tejido vascular en plantas de tomate inoculadas con cepas bacterianas, evaluada 21 días después de la inoculación (ddi).	90
Figura 2.5 Síntomas externos observados en plantas de tomate inoculadas con cepas bacterianas, evaluados 21 días después de la inoculación (ddi) bajo condiciones de invernadero.	91
Figura 2.6 Efecto de la extensión de la necrosis medular (cm) sobre el crecimiento de la planta (cm) en plantas de tomate de las variedades “JR” y “Acorazado” 21 días después de la inoculación (ddi) bajo condiciones de invernadero.....	92
Figura 2.7 Árbol filogenético consenso de cepas de <i>Pseudomonas</i> spp. elaborado a partir de las secuencias parciales concatenadas de los genes <i>16S ARNr</i> , <i>gyrB</i> , <i>rpoD</i> y <i>rpoB</i>	93
Figura 2.8 Árbol filogenético consenso elaborado a partir de las secuencias parciales del gen <i>16S ARNr</i> de la cepa LTM 72.2.1 que causó decoloración del tejido, y de las cepas no patogénicas.	95
Figura 3.1 Zonas de inhibición de crecimiento de las cepas bacterianas ante cuatro agentes antibióticos evaluada con el método de difusión en disco.....	122
Figura 3.2 Prueba de difusión en disco (método Kirby-Bauer) con cinco antibióticos de uso agrícola.....	123
Figura 3.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de cuatro agentes antibióticos evaluada con el método de dilución en agar.	125
Figura 3.4 Prueba de dilución en agar para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antibióticos de uso agrícola tetraciclina, estreptomycin, gentamicina, kasugamicina y validamicina.....	126
Figura 3.5 Probabilidad de crecimiento (%) de las bacterias evaluadas ante cuatro antibióticos de uso agrícola, con base en las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) determinadas mediante el método de dilución en agar.....	128
Figura 3.6 Porcentaje de aislamientos (%) con capacidad de crecimiento en presencia de antibióticos de uso agrícola utilizados en Costa Rica para el control de infecciones bacterianas en las plantas.....	129
Figura 3.7 Porcentaje de aislamientos patogénicos y no patogénicos con capacidad de crecimiento en presencia de uno o múltiples antibióticos.....	130

Figura 3.8 Porcentaje de aislamientos según su nivel de virulencia, agrupados de acuerdo con su capacidad de crecimiento en presencia de uno o múltiples antibióticos.....	131
Figura 3.9 Agrupamiento de los aislamientos bacterianos con base en las características de patogenicidad, virulencia y la combinación de los valores de CMI y los diámetros de zonas de inhibición..	132

ÍNDICE DE ANEXOS

Cuadro S1.1 Cepas de referencia utilizadas en el análisis filogenético para la identificación de los aislamientos bacterianos. Se utilizaron las secuencias parciales del gen <i>16S ARNr</i> de cepas tipo depositadas en la base de datos del GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).....	67
Cuadro S1.2 Resultados de pruebas fisiológicas y bioquímicas convencionales y lectura de las tarjetas GN del sistema VITEK® 2 para 17 cepas bacterianas evaluadas. Las cepas están agrupadas por su similitud de acuerdo con el análisis de agrupamiento aglomerativo jerárquico.	71
Cuadro S2.1 Cepas de referencia utilizadas en el análisis de secuencias multilocus (MLSA). Se utilizaron las secuencias parciales de los genes <i>16S ARNr</i> , <i>gyrB</i> , <i>rpoD</i> y <i>rpoB</i> de cepas tipo descargadas de la base de datos de GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).....	108
Cuadro S2.2 Cepas de referencia utilizadas en el análisis filogenético para la identificación de la cepa LTM 72.2.1 y las cepas no patogénicas. Se utilizaron las secuencias parciales del gen <i>16S ARNr</i> de cepas tipo descargadas en la base de datos del GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).....	110

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) pertenece a la familia Solanaceae, donde también se encuentran la papa (*S. tuberosum* L.), la berenjena (*S. melongena* L.), los chiles, ajíes y pimientos (*Capsicum* spp.), entre otros (Heuvelink, 2018). Es una planta dicotiledónea, herbácea, y perenne cultivada de forma anual para el consumo de sus frutos, ya sean frescos o procesados (Escanola et al., 2009; Heuvelink, 2018; López-Marín, 2017). Es de desarrollo rápido, ciclo vegetativo corto, con un periodo de crecimiento de 90 a 150 días (Escanola et al., 2009; FAO, 2022); puede crecer de forma rastrera, erecta o semierecta (Cestoni et al., 2006), y existen variedades de crecimiento determinado, indeterminado o semideterminado (Blancard, 2013; Cestoni et al., 2006; López-Marín, 2017).

Es una de las hortalizas más cultivadas a nivel mundial, con una producción anual de más de 192.3 millones de toneladas en el año 2023 y un área sembrada de más de 5.4 millones de hectáreas (FAOSTAT, 2024). Las principales áreas de producción están ubicadas en zonas templadas que se caracterizan por tener largos períodos de verano y precipitaciones invernales; sin embargo, los tomates también se producen en climas subtropicales (Heuvelink, 2018), y crecen en todas las latitudes bajo diferentes condiciones climáticas y de producción, aunque las condiciones óptimas para su desarrollo son temperaturas diurnas de 18-25°C, temperaturas nocturnas de 15-20°C y humedades relativas de 55-75% (Blancard, 2013; Escanola et al., 2009). El país con mayor producción a nivel mundial es China con casi 70 millones de toneladas en el año 2023, equivalente al 35.46% de la producción mundial, seguido por India con 20.4 millones de toneladas (10.33%), Turquía con 13.3 millones de toneladas (6.73%) y Estados Unidos con 12.3 millones de toneladas (6.26%) (FAOSTAT, 2024).

En Costa Rica, el tomate es una de las hortalizas que más se produce y se consume, la demanda del producto hace que sea un cultivo muy intensivo, y las condiciones ambientales favorecen la producción durante todo el año (López-Marín, 2021). Su cultivo se realiza principalmente en la región del Valle Central, siendo las zonas con mayor producción la zona Central Occidental, seguida de

la zona Central Oriental, y en menores cantidades las zonas Central Sur, Brunca, Chorotega, Pacífico Central y Huetar Norte (López-Marín, 2017), con una producción de 55,307 toneladas métricas sembradas en 1,510 hectáreas en el año 2018 (INEC, 2019).

El tomate es un cultivo que puede ser afectado por factores de estrés abiótico, incluida la degradación ambiental, el cambio climático y la contaminación química, y de igual forma puede ser atacado por plagas y por organismos fitopatógenos como hongos, virus, y bacterias, que, en conjunto, disminuyen su rendimiento notablemente (Blancard, 2013; Sundström et al., 2014), causando síntomas que resultan de la interacción de los mecanismos de ataque del patógeno y los mecanismos de defensa de la planta, así como de los efectos fisiológicos causados por la enfermedad (Arauz-Cavallini, 2011). Las bacterias son microorganismos capaces de causar enfermedades en un amplio rango de plantas hospederas, y pueden colonizar tanto la superficie como los tejidos internos, provocando diferentes síntomas como manchas, pecas, canchales, pudrición de tejidos, y desequilibrios hormonales, entre otros (Kannan et al., 2016; Strange & Scott, 2005). Esta variedad de síntomas afecta el rendimiento en la producción de los cultivos causando pérdidas económicas significativas (Kannan et al., 2016; Mansfield et al., 2012). Debido a esto, las bacterias representan una amenaza mundial para la producción agrícola, por lo que su control es crucial para la seguridad alimentaria (Strange & Scott, 2005; Sundström et al., 2014). Las enfermedades de origen bacteriano en las plantas son más frecuentes en regiones tropicales y subtropicales, donde las condiciones cálidas y húmedas son ideales para su crecimiento, por ende, la severidad puede ser mayor (Kannan et al., 2016; Sundström et al., 2014), especialmente en época lluviosa, ya que provoca una mayor incidencia de enfermedades (Brenes-Peralta et al., 2016; Saborío, 2019).

La mayoría de las especies de bacterias fitopatógenas se encuentran dentro de las familias *Lysobacteraceae* (= *Xanthomonadaceae*) del orden *Lysobacterales* (= *Xanthomonadales*), *Pseudomonadaceae* del orden *Pseudomonadales*, *Burkholderiaceae* del orden *Burkholderiales*, *Microbacteriaceae* del orden

Micrococcales, Enterobacteriaceae, Erwiniaceae (anteriormente Enterobacteriaceae) y Pectobacteriaceae (anteriormente Enterobacteriaceae) del orden Enterobacterales (Adeolu et al., 2016; Kannan et al., 2016; Tindall, 2014). Una gran variedad de bacterias se ha asociado al cultivo de tomate, tanto patógenas como saprófitas. Se han identificado en conjunto más de 250 especies, biovares y patovares de los cuales, siete géneros pueden causar enfermedades en la planta: *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Pectobacterium* (anteriormente *Erwinia*) y *Dickeya* (anteriormente *Pectobacterium*) (Blancard, 2013; Kannan et al., 2016; Samson et al., 2005), además de algunas especies del género *Agrobacterium* que atacan las raíces de la planta (Blancard, 2013). Algunas de las especies patogénicas pueden provocar síntomas similares, por lo que la identificación y el diagnóstico preciso de las bacterias causales de las enfermedades en los cultivos son aspectos cruciales para el desarrollo de métodos de control adecuados (Ramírez-Rojas et al., 2016).

Los esfuerzos para el control de las enfermedades de origen bacteriano se basan principalmente en estrategias preventivas orientadas a reducir las fuentes de inóculo y la dispersión del patógeno (Kolomiets et al., 2019; Sundin et al., 2016). Las aplicaciones de compuestos de cobre o de compuestos de antibióticos han sido parte de las herramientas con las que cuentan los productores para el combate de las infecciones bacterianas en las plantas (Lamichhane et al., 2018; Sundin et al., 2016). En Costa Rica se han utilizado varios productos antibióticos en el cultivo de tomate, principalmente a base de compuestos de oxitetraciclina, estreptomina, gentamicina y kasugamicina (Blanco-Meneses et al., 2023), aunque no existen productos autorizados para este cultivo según el Servicio Fitosanitario del Estado (SFE, 2024).

El desarrollo de resistencia a los antibióticos debido al uso inadecuado de estos compuestos representa un problema de salud a nivel mundial (McManus et al., 2002; McManus & Stockwell, 2000), y existe la preocupación de la influencia del uso de antibióticos en agricultura sobre la resistencia de bacterias presentes en animales y especialmente las relacionadas a la salud humana, mediada por la

transferencia horizontal de genes (Maeusli et al., 2020; McManus et al., 2002; McManus & Stockwell, 2000; Stockwell & Duffy, 2012). Esto denota la importancia de realizar una evaluación de las bacterias presentes en los cultivos por medio de una identificación con un enfoque integrado, así como la determinación de la sensibilidad de estas bacterias a los antibióticos comúnmente utilizados en el país.

BIBLIOGRAFÍA

- Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S., & S. Gupta, R. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 5575–5599. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>
- Arauz-Cavallini, L. F. (2011). *Fitopatología, un enfoque agroecológico* (2a ed.). Editorial UCR.
- Blancard, D. (2013). *Tomato diseases: identification, biology and control* (2a ed.). CRC press.
- Blanco-Meneses, M., Castro-Zúñiga, O., & Calderón-Abarca, A. (2023). Diagnóstico del uso de antibióticos en regiones productoras de tomate en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 47(1), 87–99. <https://doi.org/10.15517/rac.v47i1.53967>
- Brenes-Peralta, L., Jimenez-Morales, M. F., & Gamboa-Murillo, M. (2016). *Diagnóstico de pérdidas y desperdicio alimenticio en dos canales de comercialización de la agrocadena de tomate costarricense para su posterior disminución*. Tecnológico de Costa Rica (TEC).
- Cestoni, F., de Jovel, G., & Urquilla, A. (2006). *Perfil de negocios del tomate cherry o cereza hacia el mercado de los Estados Unidos*. Ministerio de Economía de El Salvador.
- Escanola, V., Alvarado, P., Monardes, H., Urbina, C., & Martin, A. (2009). *Manual de cultivo de tomate (Lycopersicon esculentum Mill.)*. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.
- FAO. (2022). Land & water: crop information: tomato. En *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO)*. <https://www.fao.org/land-water/databases-and-software/crop-information/tomato/en/>

- FAOSTAT. (2024). Estadísticas de cultivos y productos de ganadería. En *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Base de Datos FAOSTAT*. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>
- Heuvelink, E. (Ed.). (2018). *Tomatoes* (2a ed.). CABI.
- INEC. (2019). *Encuesta nacional agropecuaria 2018: resultados generales de la actividad agrícola y forestal*. Instituto Nacional de Estadística y Censos.
- Kannan, V. R., Bastas, K. K., & Antony, R. (2016). Plant pathogenic bacteria: An overview. En V. R. Kannan & K. K. Bastas (Eds.), *Sustainable Approaches to Controlling Plant Pathogenic Bacteria*. CRC Press.
- Kolomiets, Y. V., Grygoryuk, I. P., Butsenko, L. M., & Kalinichenko, A. V. (2019). Biotechnological control methods against phytopathogenic bacteria in tomatoes. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17(2), 3215–3230. https://doi.org/10.15666/aeer/1702_32153230
- Lamichhane, J. R., Osdaghi, E., Behlau, F., Köhl, J., Jones, J. B., & Aubertot, J. N. (2018). Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. En *Agronomy for Sustainable Development* (Vol. 38, Número 3). Springer-Verlag France. <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0503-9>
- López-Marín, L. M. (2017). *Manual técnico del cultivo del tomate: Solanum lycopersicum*. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA).
- López-Marín, L. M. (2021). *Manual de enfermedades pre y poscosecha en tomate (Solanum lycopersicum)* (Instituto). Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA).
- Maeusli, M., Lee, B., Miller, S., Reyna, Z., Lu, P., Yan, J., Ulhaq, A., Skandalis, N., Spellberg, B., & Luna, B. (2020). Horizontal gene transfer of antibiotic resistance from *Acinetobacter baylyi* to *Escherichia coli* on lettuce and subsequent antibiotic resistance transmission to the gut microbiome. *MSphere*, 5(3), e00329-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00329-20>
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G., & Foster, G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(6), 614–629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
- McManus, P. S., & Stockwell, V. O. (2000). Antibiotics for plant diseases control: Silver bullets or rusty sabers. *APSnet Feature Articles*. <https://doi.org/10.1094/APSnetFeature-2000-0600>

- McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W., & Jones, A. L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1), 443–465. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120301.093927>
- 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*, 34(2), 173–183. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1511-3>
- Saborío-Arguello, D. (2021). *Manual de manejo postcosecha del tomate fresco en Costa Rica*. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA).
- Samson, R., Legendre, J. B., Christen, R., Saux, M. F.-L., Achouak, W., & Gardan, L. (2005). Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4), 1415–1427. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02791-0>
- SFE. (2024). Productos agroquímicos registrados, autorizados según cultivo o ingrediente activo. En *Insumos y Fiscalización*. <http://app.sfe.go.cr/SFEInsumos/asp/Insumos/ConsultaRegistroPlaguicida.aspx>
- Stockwell, V. O., & Duffy, B. (2012). Use of antibiotics in plant agriculture. *Revue Scientifique et Technique - Office International Des Épizooties*, 31(1), 199–210. <https://doi.org/10.20506/rst.31.1.2104>
- Strange, R. N., & Scott, P. R. (2005). Plant disease: a threat to global food security. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 83–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839>
- Sundin, G. W., Castiblanco, L. F., Yuan, X., Zeng, Q., & Yang, C. (2016). Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects. *Molecular Plant Pathology*, 17(9), 1506–1518. <https://doi.org/10.1111/mpp.12436>
- Sundström, J. F., Albiñ, A., Boqvist, S., Ljungvall, K., Marstorp, H., Martiin, C., Nyberg, K., Vågsholm, I., Yuen, J., & Magnusson, U. (2014). Future threats to agricultural food production posed by environmental degradation, climate change, and animal and plant diseases – a risk analysis in three economic and climate settings. *Food Security*, 6(2), 201–215. <https://doi.org/10.1007/s12571-014-0331-y>

Tindall, B. J. (2014). The family name Solimonadaceae Losey et al. 2013 is illegitimate, proposals to create the names '*Sinobacter soli*' comb. nov. and '*Sinobacter variicoloris*' contravene the Code, the family name Xanthomonadaceae Saddler and Bradbury 2005 and the order name Xanthomonadales Saddler and Bradbury 2005 are illegitimate and notes on the application of the family names Solibacteraceae Zhou et al. 2008, Nevskiaceae Henrici and Johnson 1935 (Approved Lists 1980) and Lysobacteraceae Christensen and Cook 1978 (Approved Lists 1980) and order name Lysobacteriales Christensen and Cook 1978 (Approved Lists 1980) with respect to the classification of the corresponding type genera Solibacter Zhou et al. 2008, *Nevskia* Famintzin 1892 (Approved Lists 1980) and *Lysobacter* Christensen and Cook 1978 (Approved Lists 1980) and importance of accurately expressing the link between a taxonomic name, its authors and the corresponding description/circumscription/emendation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 293–297. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.057158-0>

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar la caracterización morfológica, bioquímica, molecular y patogénica de las bacterias asociadas a enfermedades en cultivos de tomate del Valle Central del país, así como su sensibilidad a los antibióticos de uso agrícola.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las bacterias patógenas presentes en cultivos de tomate mediante técnicas morfológicas, bioquímicas y moleculares, y referenciarlas geográficamente en las zonas productoras evaluadas.
- Establecer relaciones de patogenicidad entre las bacterias identificadas sobre plantas sanas de tomate por medio de los postulados de Koch.
- Determinar la sensibilidad *in vitro* de las bacterias identificadas a los antibióticos de uso agrícola en el cultivo de tomate.

CAPÍTULO 1: Caracterización morfológica, bioquímica y molecular de bacterias aisladas de plantas de tomate con infecciones bacterianas colectadas en el Valle Central de Costa Rica

1.1 INTRODUCCIÓN

Las plantas albergan una compleja comunidad microbiana que juega un papel importante en procesos de desarrollo y en la salud de la planta; algunos organismos que conforman esta comunidad microbiana promueven el crecimiento y mejoran las defensas de la planta, y otros en cambio, son perjudiciales y causan enfermedades (Brader et al., 2017). Las bacterias son microorganismos capaces de colonizar tanto la superficie como los tejidos internos de las plantas y dependiendo de la zona donde se encuentren pueden clasificarse como bacterias de la rizosfera (zona radicular de la planta), filosfera (superficie aérea de la planta) y endosfera (que habitan en el interior de la planta) (Brader et al., 2017). Algunas especies de bacterias pueden causar enfermedades en un amplio rango de hospederos y generar diferentes síntomas como manchas, clorosis, necrosis, marchitez, pudrición de tejidos, entre otros (Blancard, 2013; Kannan et al., 2016; Strange & Scott, 2005).

Las infecciones bacterianas afectan el rendimiento en la producción de los cultivos y causan pérdidas económicas significativas (Kannan et al., 2016; Mansfield et al., 2012), en algunos casos como el de la marchitez bacteriana en tomate que puede alcanzar hasta un 91% en pérdidas de rendimiento (Yuliar et al., 2015). Las enfermedades de origen bacteriano en las plantas son más frecuentes en regiones tropicales y subtropicales, donde las condiciones climáticas cálidas y húmedas son ideales para el crecimiento y dispersión de las bacterias (Kannan et al., 2016; Sundström et al., 2014), lo que genera pérdidas consistentes en los cultivos, especialmente en época lluviosa donde hay mayor incidencia de enfermedades (Brenes et al., 2015; Saborío, 2019). En Costa Rica se produjeron 55,307 toneladas métricas de tomate en el año 2018, sembradas en un área de 1,510 hectáreas (INEC, 2019), distribuidas en siete regiones

productoras: Central Occidental, Central Oriental, Central Sur, Pacífico Central, Brunca, Chorotega y Huetar Norte. Las condiciones climáticas del país favorecen la producción de tomate durante todo el año, y a la vez, se favorece el desarrollo y dispersión de enfermedades bacterianas (López-Marín, 2017).

La mayoría de las especies de bacterias fitopatógenas se encuentran dentro de las familias Lysobacteraceae (= Xanthomonadaceae) del orden Lysobacterales (= Xanthomonadales), Pseudomonadaceae del orden Pseudomonadales, Burkholderiaceae del orden Burkholderiales, Enterobacteriaceae, Erwiniaceae (anteriormente Enterobacteriaceae) y Pectobacteriaceae (anteriormente Enterobacteriaceae) del orden Enterobacterales (clase Gammaproteobacteria), y la familia Microbacteriaceae del orden Micrococcales (clase Actinomycetes) (Adeolu et al., 2016; Kannan et al., 2016; Tindall, 2014). Una gran variedad de bacterias se ha asociado al cultivo de tomate, tanto patógenas como saprófitas y endófitas. Se ha reportado que algunas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Pectobacterium* (anteriormente *Erwinia*), *Dickeya* (anteriormente *Pectobacterium*), y *Agrobacterium* pueden causar enfermedades en las plantas de tomate (Blancard, 2013; Kannan et al., 2016; Samson et al., 2005).

Todas las partes de la planta son susceptibles al ataque de bacterias patogénicas. Algunos géneros que infectan las hojas y el fruto son *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Pectobacterium* y *Dickeya*; las raíces pueden ser infectadas por *Agrobacterium tumefaciens* y *A. radiobacter*; algunas especies como *Pectobacterium carotovorum*, *Dickeya chrysanthemi* y varias especies de *Pseudomonas* como *P. corrugata*, *P. mediterranea*, *P. cichorii* y *P. viridiflava* infectan la médula del tallo (Catara et al., 2002; Monteiro, 2019; Scarlett et al., 1978; Trantas et al., 2013); y especies como *Clavibacter michiganensis*, el complejo de especies de *Ralstonia solanacearum*, y en algunos casos *Pectobacterium carotovorum* infectan la planta de forma sistémica a través del sistema vascular (Blancard, 2013). En Costa Rica se reportan como las enfermedades más frecuentes en el cultivo de tomate las causadas por especies de *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Pectobacterium* (Blanco-Meneses et al., 2023; Cubero-Agüero et al., 2021; MAG, 2024; SFE, 2009).

Uno de los aspectos más importantes para el manejo de las enfermedades en un cultivo es el diagnóstico mediante la identificación correcta del agente causal de la enfermedad, que debe realizarse de forma oportuna y precisa (Ramírez-Rojas et al., 2016). La identificación de bacterias en las plantas a menudo se realiza mediante el aislamiento de las bacterias en medios de cultivo no selectivos o semi selectivos, seguido de la identificación de las colonias por sus características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, o serológicas, así como la ejecución de ensayos de patogenicidad (López et al., 2003; Schaad, 2001).

Entre las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas que sirven en el proceso de distinción de organismos bacterianos se encuentra la forma y el tamaño de sus células, la presencia y disposición de flagelos, características de movilidad y reproducción, estructura y composición de la pared celular, características de las colonias como la forma, el tipo de bordes, la consistencia, pigmentación, la producción de pigmentos difusibles en medios de cultivo determinados, y la capacidad de crecer a ciertas temperaturas, entre otros (Tindall et al., 2007). Las características bioquímicas determinan la respuesta de las bacterias al reaccionar ante ciertos compuestos debido a la actividad enzimática (Lelliott et al., 1966), además de la capacidad para utilizar diferentes fuentes de carbono para su crecimiento, estas características que pueden evaluarse con métodos convencionales o mediante sistemas semiautomatizados como el Biolog™, API® o VITEK® que cuentan con bases de datos para la identificación de ciertas bacterias con base en su perfil fenotípico, aunque la precisión de la identificación depende de las especies en cuestión debido a las limitaciones de cada sistema (Pinot et al., 2011).

A pesar de que la caracterización morfológica y bioquímica de cultivos bacterianos es un procedimiento de rutina en los laboratorios, el rápido desarrollo de las técnicas moleculares y genómicas ha simplificado y mejorado la detección e identificación de organismos patógenos (Álvarez, 2004). El uso de técnicas como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) con cebadores específicos brinda una alta especificidad y reproducibilidad mediante la amplificación de fragmentos de ADN o ARN para detectar la presencia de

especies objetivo de forma rápida y precisa (Álvarez, 2004). Por otra parte, los análisis filogenéticos basados en la secuencia parcial del gen *16S* de ARN ribosomal (*16S ARNr*) han jugado un papel fundamental en la identificación y clasificación taxonómica de las bacterias (Bou et al., 2011; Janda & Abbott, 2007).

Este capítulo tuvo como objetivo identificar y caracterizar las bacterias cultivables presentes en plantas de tomate con infecciones bacterianas provenientes de fincas del Valle Central de Costa Rica con la aplicación de técnicas de clasificación morfológica, bioquímica y molecular. Se presenta una base sobre la diversidad de la comunidad bacteriana y se identifican especies de importancia agrícola, algunas clasificadas como potenciales bacterias benéficas y otras debido a la relación con el desarrollo de enfermedades en el cultivo de tomate.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Material vegetal y aislamientos bacterianos

Se analizaron muestras de tejido de 55 plantas de tomate con diferentes síntomas de enfermedades bacterianas, colectadas entre noviembre de 2021 y octubre de 2023 en siete cantones del Valle Central de Costa Rica (**Cuadro 1.1**), 51 plantas fueron colectadas en campo de forma dirigida en busca de síntomas de infecciones bacterianas, y cuatro plantas fueron recibidas como parte del servicio de diagnóstico ofrecido por el Laboratorio de Técnicas Moleculares del Centro de Investigación en Protección de Cultivos (CIPROC-UCR).

El procesamiento de las muestras de tomate se realizó en el laboratorio de Fitopatología del CIPROC-UCR. Se seleccionaron de una a cinco submuestras de cada planta dependiendo de la cantidad y distribución de los síntomas para un total de 143 submuestras de tejido; se realizó la desinfección superficial en solución de hipoclorito de sodio al 1% por 30 s, alcohol al 70% por 1 min y tres lavados con agua destilada. Cada submuestra se dividió en dos partes iguales después de la desinfección, una parte destinada al macerado para realizar los

aislamientos bacterianos y la otra parte destinada a la extracción de ADN a partir de tejido para la detección de bacterias mediante PCR con cebadores específicos.

Se extrajo el tejido interno de las secciones de tallo y follaje destinadas al macerado utilizando un bisturí estéril sobre una lámina de vidrio esterilizada mediante flameado, se cortaron secciones de 2-5 mm del tejido y se depositaron en tubos de ensayo con 3 ml de solución salina al 0.85% estéril; el tejido se maceró con un agitador de vidrio estéril y se dejó en reposo de 5-10 min. Posteriormente, con un asa bacteriológica estéril se tomó una gota del macerado homogéneo y se rayó en platos Petri de plástico de 90x15 mm estériles con medio de cultivo de agar nutritivo (AN) OXOID Ltd. CM0003 28 g/L (Thermo Scientific™). Los platos se incubaron de forma invertida a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24-72 horas o hasta observar el crecimiento de colonias bacterianas separadas.

Cuadro 1.1 Procedencia y síntomas de infecciones bacterianas observados en plantas de tomate colectadas en el Valle Central de Costa Rica. Se indica el número de muestras de tejido que fueron evaluadas por cada planta, así como el número de aislamientos obtenidos de cada planta.

ID de Planta	Cantón	Provincia	Var ^a	Síntomas	Tejido analizado	MT ^b	As ^c
LTM_11	Paraíso	Cartago	JR	Peca bacteriana en hojas	Hoja	1	–
LTM_12	Paraíso	Cartago	JR	Hojas cloróticas; necrosis en tallo y hojas; tallo hueco	Base del tallo; tallo inferior	2	1
LTM_13	Paraíso	Cartago	7810	Necrosis en tallo; tallo hueco	Tallo superior	2	3
LTM_14	Paraíso	Cartago	7810	Lesiones necróticas en tallo; tallo hueco	Tallo inferior; tallo superior	2	4
LTM_15	Paraíso	Cartago	Cherry grape	Marchitez general	Tallo inferior; tallo superior	2	–
LTM_16	Turrialba	Cartago	ND ^d	Peca bacteriana en hojas; lesión necrótica en raíz y tallo; tallo hueco	Raíz; base del tallo; hoja	4	–
LTM_17	Turrialba	Cartago	ND	Lesiones necróticas en hojas y tallo superior	Tallo superior; hoja	3	–
LTM_18	Turrialba	Cartago	ND	Necrosis acuosa en tallo inferior; marchitez	Base del tallo; hoja	2	–

ID de Planta	Cantón	Provincia	Var ^a	Síntomas	Tejido analizado	MT ^b	As ^c
LTM_19	Turrialba	Cartago	ND	Necrosis interna en raíz y tallo inferior; hojas marchitas y con manchas marrones	Raíz; tallo inferior; hoja	3	–
LTM_20	Turrialba	Cartago	ND	Peca bacteriana en hojas	Hoja	1	–
LTM_21	Turrialba	Cartago	ND	Lesiones acuosas y hundidas en fruto	Fruto	3	2
LTM_22	Turrialba	Cartago	Vulcano	Necrosis en base del tallo y tallo superior; marchitez	Base del tallo; tallo superior	2	5
LTM_23	Alvarado	Cartago	JR	Necrosis en base del tallo; tallo hueco; marchitez	Base del tallo; hoja	2	5
LTM_24	Alvarado	Cartago	JR	Necrosis en base del tallo; marchitez	Base del tallo; hoja	2	7
LTM_25	Alvarado	Cartago	JR	Necrosis en raíz y base del tallo; marchitez	Base del tallo; hoja	2	6
LTM_28	Paraíso	Cartago	Armada + Milán	Necrosis en tallo inferior; tallo hueco	Tallo inferior	2	3
LTM_29	Paraíso	Cartago	Armada + Milán	Necrosis acuosa en tallo superior; tallo hueco	Tallo superior	1	1
LTM_30	Alajuela	Alajuela	Green rise + 7810	Necrosis acuosa en tallo inferior y tallo superior; tallo hueco; marchitez	Tallo inferior; tallo superior; hoja	4	5
LTM_32	Alajuela	Alajuela	Green rise + 7810	Necrosis acuosa en tallo inferior y tallo superior; tallo hueco; marchitez	Tallo inferior; tallo superior; hoja	3	4
LTM_33	Alajuela	Alajuela	Green rise + 7810	Necrosis seca y acuosa en tallo inferior y tallo superior; tallo hueco; marchitez	Tallo inferior; tallo superior; hoja	4	6
LTM_34	Zarcero	Alajuela	JR	Marchitez general	Tallo inferior; hoja	2	–
LTM_35	Zarcero	Alajuela	JR	Necrosis y agrietamiento en base del tallo; tallo hueco	Base del tallo; tallo inferior	5	–
LTM_36	Zarcero	Alajuela	JR	Puntos grises con apariencia de chancros en fruto	Fruto	1	–
LTM_37	Alajuela	Alajuela	Toreto	Necrosis en base del tallo; tallo hueco; marchitez	Base del tallo; hoja	2	1
LTM_38	Alajuela	Alajuela	Toreto	Necrosis en base del tallo; tallo hueco; marchitez	Base del tallo; hoja	2	1
LTM_39	Alajuela	Alajuela	Toreto	Necrosis en base del tallo; tallo hueco; marchitez	Base del tallo; hoja	2	1
LTM_40	Alajuela	Alajuela	7810	Necrosis acuosa en raíz, base del tallo, tallo inferior y tallo superior; clorosis y marchitez	Raíz; base del tallo; tallo inferior; tallo superior; hoja	5	6

ID de Planta	Cantón	Provincia	Var ^a	Síntomas	Tejido analizado	MT ^b	As ^c
LTM_41	Alajuela	Alajuela	TD1 + 7810	Necrosis en base del tallo, tallo superior y hojas; tallo hueco	Base del tallo; tallo inferior; tallo superior; hoja	4	4
LTM_42	Alajuela	Alajuela	ND	Necrosis en base del tallo; marchitez	Base del tallo	1	1
LTM_46	Alajuela	Alajuela	Green rise + 7810	Lesión agrietada en base del tallo y tallo inferior; marchitez	Base del tallo; tallo inferior; hoja	3	1
LTM_47	Alajuela	Alajuela	TD1 + Toreto	Necrosis acuosa en base del tallo y tallo inferior; marchitez	Base del tallo	1	–
LTM_48	Alajuela	Alajuela	TD1 + Toreto	Necrosis acuosa en base del tallo y tallo inferior; marchitez	Base del tallo; hoja	2	–
LTM_49	Zarcelero	Alajuela	JR	Necrosis interna y externa en base del tallo; tallo hueco	Base del tallo	2	2
LTM_50	Zarcelero	Alajuela	JR	Necrosis en base del tallo, tallo inferior y tallo superior; marchitez	Base del tallo; tallo superior; hoja	3	3
LTM_51	Zarcelero	Alajuela	JR	Necrosis interna en base del tallo y tallo inferior; clorosis	Base del tallo; tallo inferior; hoja	3	3
LTM_52	Zarcelero	Alajuela	JR	Necrosis y agrietamiento en base del tallo, tallo inferior y tallo superior; marchitez	Base del tallo; tallo inferior; tallo superior; hoja	4	4
LTM_53	Alajuela	Alajuela	7810	Pudrición acuosa en tallo inferior y tallo superior; marchitez	Tallo inferior; tallo superior; hoja	5	–
LTM_58	Barva	Heredia	8565	Necrosis en base del tallo; clorosis y marchitez	Base del tallo; hoja	2	4
LTM_59	Barva	Heredia	8565	Necrosis en base del tallo, tallo inferior, tallo superior y hojas; clorosis y marchitez	Raíz; base del tallo; tallo inferior; tallo superior; hoja	5	8
LTM_60	Barva	Heredia	8565	Necrosis en base del tallo, tallo inferior y tallo superior; marchitez	Base del tallo; tallo inferior; tallo superior; hoja	4	7
LTM_61	Barva	Heredia	8565	Peca bacteriana en hojas; necrosis; clorosis; marchitez	Hoja	1	1
LTM_62	Barva	Heredia	8565	Peca bacteriana en hojas; necrosis; clorosis; marchitez	Hoja	1	2
LTM_63	Barva	Heredia	8565	Necrosis seca en base del tallo, tallo inferior y hojas; clorosis y marchitez	Base del tallo; tallo inferior; hoja	4	9
LTM_64	Barva	Heredia	8565	Necrosis seca en base del tallo y hojas; clorosis y marchitez	Base del tallo; hoja	2	4

ID de Planta	Cantón	Provincia	Var ^a	Síntomas	Tejido analizado	MT ^b	As ^c
LTM_65	Barva	Heredia	8565	Peca bacteriana en hojas; clorosis y marchitez	Hoja	1	3
LTM_66	Alajuela	Alajuela	Dionisio	Necrosis y pudrición en la base del tallo	Base del tallo	2	–
LTM_67	Alajuela	Alajuela	Dionisio	Necrosis en base del tallo; lesiones necróticas con halo clorótico en hojas	Base del tallo; hoja	2	–
LTM_68	Alajuela	Alajuela	Toreto	Necrosis en raíz y base del tallo; tallo hueco; marchitez	Raíz; base del tallo; hoja	3	4
LTM_69	Alajuela	Alajuela	Toreto	Necrosis en raíz y base del tallo; tallo hueco; marchitez	Raíz; base del tallo; hoja	3	3
LTM_70	Alajuela	Alajuela	Toreto	Necrosis seca y acuosa en raíz, base del tallo y tallo superior; marchitez	Raíz; base del tallo; tallo superior; hoja	4	6
LTM_71	Alajuela	Alajuela	Toreto	Necrosis seca y acuosa en raíz y base del tallo; marchitez	Raíz; base del tallo; hoja	3	3
LTM_72	Alajuela	Alajuela	Toreto	Necrosis seca y acuosa en base del tallo y tallo inferior; marchitez	Base del tallo; tallo inferior; hoja	3	2
LTM_73	Alajuela	Alajuela	Toreto	Necrosis acuosa en raíz y base del tallo; marchitez	Raíz; base del tallo; hoja	3	–
LTM_74	Alajuela	Alajuela	Toreto	Necrosis en raíz y base del tallo; marchitez	Raíz; base del tallo; hoja	3	4
LTM_78	Santa Bárbara	Heredia	8565	Clorosis y manchas necróticas secas y acuosas en hojas	Hoja	3	7
Total						143	146

^aVar = variedad de tomate. ^bMT = muestras de tejido evaluadas por cada planta. ^cAs = Número de cultivos puros aislados a partir de las muestras de tejido. ^dND = variedad desconocida. LTM = Laboratorio de Técnicas Moleculares CIPROC-UCR. No se obtuvieron aislamientos viables (–).

1.2.2 Descripciones morfológicas

Se realizó el subcultivo para la purificación de los aislamientos mediante el rayado de las colonias separadas de los cultivos originales en medio de AN nuevo y se incubó a 28°C ± 2°C por 24-48 horas. Se obtuvieron 146 aislamientos puros, se describieron las características morfológicas observables a simple vista de las colonias, como la forma (circular, puntiforme, irregular, filamentosa),

los bordes o márgenes (enteros, ondulados, lobulados, filamentosos), la elevación en el medio de cultivo (elevadas, planas, convexas, umbonadas), la textura y consistencia (lisas, concéntricas, rugosas, mucoides), el color de las colonias y el comportamiento óptico frente a la luz transmitida (opacas, translúcidas) y frente a la luz reflejada (brillantes, opacas). También se midió el diámetro de las colonias y se calculó la media con tres repeticiones para agrupar las cepas por su tamaño como grandes (≥ 3 mm de diámetro) y pequeñas (< 3 mm de diámetro) (Sousa et al., 2013). Los cultivos puros se conservaron en tubos Eppendorf de 2 ml con 1.5 ml de caldo nutritivo OXOID Ltd. CM0001 13 g/L (Thermo Scientific™) con 35% de glicerol bajo congelación a -80°C , y estos fueron utilizados para las pruebas posteriores.

1.2.3 Pruebas fisiológicas y bioquímicas

Se realizaron diferentes pruebas fisiológicas y bioquímicas convencionales para generar un perfil general de los aislamientos bacterianos. Las pruebas realizadas fueron la tinción de Gram, hidróxido de potasio (KOH 3%), oxidasa, catalasa y la verificación de crecimiento en medios diferenciales y semiselectivos. Se utilizaron controles positivos y negativos correspondientes en las diferentes pruebas para la interpretación de los resultados.

1.2.3.1 Tinción de Gram

Se realizó la tinción de Gram a los aislamientos puros para separar las bacterias con base en una coloración diferencial, debida a la composición y estructura de la pared celular. Se realizó un frotis bacteriano de cada aislamiento en láminas portaobjetos con una gota de agua destilada, se dejó secar a temperatura ambiente y se fijó al portaobjetos con un mechero de alcohol por 2-3 s, después se aplicó cristal violeta (solución Gram-Hucker), se dejó reposar por 30 s, y se lavó con agua destilada. Luego se aplicó lugol (con 0.4% de yodo diluido), se dejó reposar por 1 min, y se lavó con agua destilada. Después se decoloró con alcohol-acetona (7:3) y se lavó inmediatamente con agua destilada; el proceso de decoloración se repitió hasta que el frotis dejara de liberar el colorante. Por

último, se aplicó safranina (solución Gram-Hucker), se dejó reposar por 30 s, se lavó con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente.

Cada lámina se observó en un microscopio óptico con una amplificación de 1,000 veces (aumento de 100X con inmersión en aceite). Para todos los aislamientos bacterianos se registró si las bacterias eran Gram positivas cuando se observó una coloración violeta en las células, o Gram negativas cuando se observó una coloración rosada, así como la forma de sus células (bacilos, cocos, cocobacilos).

1.2.3.2 Prueba de hidróxido de potasio (KOH 3%)

Esta prueba se realizó de forma complementaria a la tinción de Gram. Con el asa bacteriológica estéril se tomó una colonia separada de cada cultivo puro y se frotó en una gota de KOH al 3% en una lámina portaobjetos y se mezcló durante 10-20 s, luego se tocó y levantó con un palillo de madera estéril para observar si se formaba un hilo viscoso. Las bacterias Gram negativas tienen una pared celular más delgada que las Gram positivas, y al contacto con el KOH, la pared celular se rompe y el contenido celular se libera en la gota de KOH volviéndola viscosa (Gregersen, 1978). Si se observó la formación del hilo viscoso al levantar el palillo de madera se determinó una reacción KOH positiva (bacteria Gram negativa), de lo contrario, la reacción se determinó como KOH negativa (bacteria Gram positiva). Se realizó un análisis de correlación de Pearson entre la tinción de Gram y la prueba de KOH 3% en el entorno de R (R Core Team, 2024).

1.2.3.3 Prueba de oxidasa

La prueba de oxidasa consistió en frotar una colonia bacteriana de cada aislamiento con un palillo de madera estéril sobre una tira reactiva de oxidasa OXOID Ltd. (Microbact™, Thermo Scientific™) para identificar bacterias que producen la enzima citocromo c oxidasa, que interviene en la cadena de transporte de electrones. Las bacterias oxidasa positivas son aeróbicas y pueden usar oxígeno como aceptor terminal de electrones en la respiración

celular y oxidan el reactivo de las tiras provocando un viraje de color a un tono azul-violeta. Las bacterias oxidasa negativas pueden ser anaeróbicas, aeróbicas o facultativas, y no producen la enzima citocromo oxidasa que oxida el reactivo de prueba, por lo tanto, no hay cambio de coloración. Se observó la reacción durante 5-10 s, un color azul-violeta intenso indicó que la reacción fue positiva, de lo contrario, la reacción resultó negativa.

1.2.3.4 Prueba de catalasa

La prueba de catalasa consistió en frotar una colonia de cada aislamiento con un asa bacteriológica en una gota de peróxido de hidrógeno sobre un portaobjetos para observar la formación de burbujas (catalasa positiva), o la ausencia de burbujas (catalasa negativa). Las bacterias catalasa positivas tienen la enzima catalasa, que es generalmente producida por bacterias que respiran usando oxígeno y que las protege de los subproductos tóxicos del metabolismo del oxígeno. Estas bacterias pueden ser aeróbicas estrictas o anaeróbicas facultativas, pero todas tienen la capacidad de respirar utilizando oxígeno como aceptor terminal de electrones. Las bacterias catalasa negativas por su parte, pueden ser anaeróbicas o anaeróbicas facultativas que solo fermentan y pueden respirar utilizando otros aceptores finales de electrones en la cadena respiratoria distintos al oxígeno.

1.2.3.5 Características de crecimiento en medios semiselectivos y diferenciales

Como parte de la caracterización bioquímica, se realizaron cultivos de bacterias en medios semiselectivos y diferenciales para evaluar las características del crecimiento de las colonias en presencia de ciertos compuestos. Los cultivos se realizaron mediante el rayado de bacterias a partir de los cultivos puros. Los medios que se utilizaron fueron el medio B de King (KB), el medio de agar MacConkey y el medio triple azúcar hierro (TSI).

El medio KB, compuesto de glicerol 92.1 g/mol 15 ml/L (Merck); peptona bacteriológica OXOID Ltd. LP0037 10 g/L (Thermo Scientific™); agar bacteriológico OXOID Ltd. LP0011 20 g/L (Thermo Scientific™); fosfato

dipotásico anhídrido (K_2HPO_4) 174.18 g/mol 1.5 g/L (Merck); y sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 246.48 g/mol 1.5 g/L (Merck), fue utilizado para diferenciar entre bacterias que liberan pigmentos fluorescentes y no fluorescentes observadas en un transiluminador ultravioleta (King et al., 1954).

El medio de agar MacConkey OXOID Ltd. CM0115 51.5 g/L (Thermo Scientific™) es selectivo para bacterias Gram negativas y permite diferenciar entre bacterias fermentadoras de lactosa y no fermentadoras de lactosa. Las bacterias fermentadoras de lactosa se identifican mediante el viraje de color del indicador de pH rojo neutro, la absorción en las colonias que adquieren una coloración roja-rosada, y en algunos casos la precipitación de sales biliares. Las bacterias no fermentadoras de lactosa producen colonias incoloras (Flournoy et al., 1990).

El medio TSI OXOID Ltd. CM00277 65 g/L (Thermo Scientific™) es un medio diferencial utilizado para clasificar las bacterias en función de su fermentación de lactosa, glucosa y/o sacarosa con base en los cambios de coloración del medio después de la incubación, así como la producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S) en forma de un precipitado color negro en el medio, y la producción de gas (CO_2) en forma de burbujas de aire o incluso la separación del medio. Se utilizaron tubos de ensayo en los que se dispensaron 5 ml del medio líquido y se dejó gelificar con una inclinación de 45° para obtener una proporción de 3:1 del fondo sobre la parte inclinada.

Los cultivos puros se rayaron en cada uno de los medios y se incubaron a $28^\circ C \pm 2^\circ C$ durante 24-48 horas. Posteriormente, se describieron las características de crecimiento en cada medio, como la forma de las colonias, el color y la textura, así como los virajes de color en el medio. La siembra en el medio TSI se realizó con una aguja bacteriológica mediante punción al fondo del medio y al retirarla se rayó la bacteria en la sección inclinada de la parte superior. La interpretación de los aislamientos en el medio TSI se realizó de acuerdo con Lehman (2005) después de la incubación.

1.2.3.6 Perfil bioquímico en el sistema VITEK® 2

Con el fin de generar un perfil bioquímico más robusto, se utilizaron las tarjetas de identificación GN para bacterias Gram negativas en el sistema VITEK® 2 (bioMérieux) del laboratorio de Bacteriología Médica de la Facultad de Microbiología UCR. Las tarjetas GN incorporan 47 pruebas bioquímicas estándar que determinan la utilización de fuentes de carbono, actividad enzimática y resistencia a ciertos compuestos (Pincus, 2006). Se seleccionaron 17 cepas bacterianas con base en la viabilidad de los aislamientos y la tinción de Gram para realizar dichas pruebas.

Las cepas seleccionadas se rayaron en medio de agar tripticasa-soya (ATS) y se incubaron a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Luego se realizó una suspensión de cada cultivo en tubos de 5 ml con 3 ml de solución salina al 0.45%; la suspensión se llevó a una turbidez de 0.50-0.63 en escala de McFarland, medida con el turbidímetro DensiCheck™ (bioMérieux). Los tubos con las suspensiones bacterianas se cargaron en las gradillas del equipo, se colocaron las tarjetas GN y se ingresó en el sistema VITEK® 2 para las lecturas respectivas de forma automática. El sistema utilizó un periodo de incubación ≤ 10 horas a $35.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, con una toma de datos en intervalos de 15 min durante el periodo completo de incubación. La revisión de las lecturas se realizó al día siguiente de la introducción.

Se realizó un análisis de agrupamiento aglomerativo jerárquico mediante la combinación de las pruebas convencionales y el perfil generado en el sistema VITEK® 2 para las 18 cepas evaluadas con el fin de determinar la disimilitud entre ellas mediante el cálculo de una matriz de distancias euclidianas y el método aglomerativo de Ward con el número óptimo de “clusters”, a través del paquete ‘factoextra’ (Kassambara & Mundt, 2020) en el entorno de R (R Core Team, 2024).

1.2.4 Análisis molecular

1.2.4.1 Extracción de ADN de tejido sintomático y de cultivos puros

La extracción de ADN de muestras de tejido fresco se realizó mediante el protocolo CTAB (Doyle & Doyle, 1990) con las modificaciones de Trout et al. (1997). Las submuestras cortadas en fragmentos pequeños se colocaron en cápsulas individuales con dos balines de acero y se maceró en el molino mezclador MM 400 (Retsch) con una frecuencia de oscilación de 23 Hz durante 2.5 min, luego se tomó una punta de espátula del macerado homogéneo y se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 ml con 150 µl de buffer de extracción (sorbitol 0.35 M; Tris HCl 0.1 M pH 7.5; EDTA 0.005 M pH 8; bisulfito de sodio 0.02 M; agua destilada estéril) y 150 µl de buffer de lisis (NaCl 2 M; Tris HCl 0.2 M pH 7.5; EDTA 0.05 M pH 8; CTAB 2%; agua destilada estéril). Los tubos se agitaron en un vórtex durante 15 s y se colocaron en un calentador de bloque de baño en seco a 65°C durante 60 min.

Después de la incubación se agregó 300 µl de cloroformo isoamil-alcohol 24:1 (Sigma-Aldrich) en una cámara de extracción de gases; los tubos se agitaron de forma manual y se centrifugaron a 14,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 min para separar las fases. La fase acuosa (sobrenadante) se transfirió a un tubo nuevo y se agregó 300 µl de cloroformo isoamil-alcohol 24:1 para una segunda centrifugación a 14,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo donde se agregó 300 µl de etanol puro al 95% frío y 20 µl de acetato de sodio 3 M, luego se agitó manualmente y se dejó precipitar el ADN a -20°C durante toda la noche.

Después de la precipitación, los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm durante 20 minutos y se descartó el etanol al 95% y el acetato de sodio 3 M decantando los tubos en un beaker, luego se realizó el lavado del precipitado de ADN con 150 µl de etanol al 70% frío y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min, luego se descartó el etanol al 70% decantando los tubos en un beaker y se dejó evaporar el remanente con los tubos abiertos dentro de la cámara de flujo laminar. Una vez evaporado el etanol, el precipitado de ADN se resuspendió con 50 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) y se conservó a -20°C. El ADN

de cada muestra se cuantificó en nanogramos por microlitro (ng/μl) con un espectrofotómetro de microvolúmenes NanoDrop™ One (Thermo Scientific™), y se verificó la calidad del ADN con la relación de absorbancia A260/A280 nanómetros (nm) y A260/A230 nm mediante tres lecturas para cada muestra. Debido a que se registraron concentraciones elevadas de ADN genómico, se realizaron diluciones seriadas de 1:10, 1:50, 1:100 y 1:500 para utilizarlas en las pruebas de PCR.

La extracción de ADN de los cultivos puros se realizó con el mismo protocolo utilizado para la extracción de ADN de tejido con algunos cambios, como la omisión del macerado, ya que las colonias bacterianas se depositaron directamente en los tubos con el buffer de extracción y el buffer de lisis con un asa bacteriológica estéril, después se agitó en un vortex por 15 s y se llevó a incubación en el calentador de bloque a 55°C por 60 min. Las centrifugaciones se realizaron a 12,000 rpm con los tiempos correspondientes indicados en la extracción de ADN de tejido. Además, se realizaron dos lavados con etanol al 70% en lugar de uno. El precipitado de ADN se resuspendió con 50 μl de buffer TE y se conservó a -20°C. También se cuantificó y se verificó la calidad del ADN en el espectrofotómetro de microvolúmenes con tres repeticiones para cada muestra. Tanto para las amplificaciones de ADN de las muestras de tejido como para el ADN de los cultivos puros se utilizó una concentración de 20-100 ng/μl.

1.2.4.2 Detección de bacterias fitopatógenas con cebadores específicos

Para detectar la presencia de bacterias fitopatógenas en el tejido sintomático de plantas de tomate se realizó la amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR de tiempo final con cebadores específicos (**Cuadro 1.2**). El volumen final de cada reacción fue de 25 μl y contenía 2.5 μl de Dream Taq buffer 10X con 2 mM de MgCl₂ (Thermo Scientific™), 2.5 μl de dNTP mix 2 mM (Thermo Scientific™), 1.25 μl de cada cebador 100 μM, 0.25 μl de Dream Taq ADN polimerasa 5 U/μl (Thermo Scientific™), 1 μl de ADN y 16.25 μl de agua ultrapura.

Las reacciones de PCR se realizaron de acuerdo con los perfiles térmicos de cada par de cebadores. Para los cebadores CMM5/CMM6, Ps-for/Ps-rev, MM5F/MM5R, Xc-lip-F2/Xc-lip-R2, RST21/RST22 y EXPCCF/EXPCCR se utilizó un perfil de un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, anillamiento a la temperatura requerida de cada marcador por 1 min (**Cuadro 1.2**), extensión a 72°C por 1 min, un ciclo de extensión final a 72°C por 7 min y mantenimiento a 4°C (Dreier et al., 1995; Kang et al., 2003; Lee et al., 2009; Leite et al., 1994; Widmer et al., 1998; Zaccardelli et al., 2005). Para los cebadores PC1/1-PC1/2 y PC5/1-PC5/2 el perfil consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 62°C y 1.5 min a 72°C, con un ciclo de extensión final de 5 min a 72°C (Trantas et al., 2015). Para los cebadores ADE1/ADE2 el perfil utilizado consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 4 min, seguido de 40 ciclos de 30 s a 94°C y 1 min a 72°C, con un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min (Nassar et al., 1996; Tsrer Lahkim et al., 2012).

Después de cada PCR se verificó la amplificación de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa Top Vision (Thermo Scientific™) al 1% en buffer TBE 0.5X (Thermo Scientific™) con un voltaje de 95-100 voltios durante 35 min. Para teñir los fragmentos de ADN amplificados se utilizó 1.5 µl de buffer de carga 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific™) para 5 µl de cada producto de PCR. Para comprobar el tamaño de la banda de ADN se colocó 1.5 µl de GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder (Thermo Scientific™). Una vez terminada la corrida de electroforesis, se observó el gel en un transiluminador ultravioleta. Se confirmó la presencia de las bacterias con la observación de las bandas del tamaño respectivo para cada par de cebadores (**Cuadro 1.2**).

Con los datos de presencia y ausencia se calculó la frecuencia de ocurrencia de las especies o géneros bacterianos encontrados por planta en cada cantón de muestreo y se generó un mapa de distribución de las bacterias en el país, con gráficos de frecuencia anidados que toman en cuenta las detecciones y la coexistencia de diferentes bacterias por planta. Los gráficos de frecuencia y el

mapa de distribución se generaron en el entorno de R (R Core Team, 2024) con los paquetes 'sunburstR', 'sf' y 'ggplot2' (Bostock et al., 2023; Pebesma, 2018; Wickham, 2016).

Cuadro 1.2 Cebadores específicos utilizados para detectar la presencia de bacterias patógenas en tejido de plantas de tomate con síntomas de infecciones bacterianas colectadas en fincas del Valle Central de Costa Rica.

Especie/Género	Cebador	Blanco	Secuencia (5'-3')	T.a ¹ (°C)	Tamaño (pb ²)	Fuente
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	CMM5	<i>pat-1</i>	GCGAATAAGCCCATAT CAA	55	614	Dreier et al. (1995)
	CMM6		CGTCAGGAGGTGCGCC TAATA			
<i>Pseudomonas</i> sp.	Ps-for	<i>16S ARNr</i>	GGTCTGAGAGGATGAT CAGT	66	1007	Widmer et al. (1998)
	Ps-rev		TTAGCTCCACCTCGCG GC			
<i>Pseudomonas mediterranea</i>	PC1/1	<i>pAV619</i>	GGATATGAGCCAGGTC TTCG	62	600	Catara et al. (2002)
	PC1/2		CGCTCAAGCGCGACTT CAG			
<i>Pseudomonas corrugata</i>	PC5/1	<i>pAV620</i>	CCACAGGACAACATGT CCAC	62	1100	Catara et al. (2000; 2002)
	PC5/2		CAGGCGCTTTCTGGAA CATG			
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	MM5F	<i>hrpZPst</i>	GAACGAGCTGAAGGA AGACA	57	532	Zaccardelli et al. (2005)
	MM5R		CAGCCTGGTTAGTCTG GTTA			
<i>Xanthomonas</i> sp.	Xc-lip-F2	<i>estA</i>	TATGTGATGGTGCCGA CCATTC	57	777	Lee et al. (2009)
	Xc-lip-R2		GGACTTCGCGGTCCA CGTCGTAGC			
<i>Xanthomonas vesicatoria</i> (= <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>)	RST21	<i>hrpD</i>	GCACGCTCCAGATCAG CATCGAGG	61	1075	Leite et al., (1994)
	RST22		GGCATCTGCATGCGTG CTCTCCGA			
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	EXPCCF	<i>pECC2F</i>	GAACTTCGCACCGCC GACCTTCTA	60	550	Kang et al. (2003)
	EXPCCR		GCCGTAATTGCCTACC TGCTTAAG			
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	ADE1	<i>peIADE</i>	GATCAGAAAGCCCGCA GCCAGAT	72	420	Nassar et al. (1996)
	ADE2		CTGTGGCCGATCAGG ATGGTTTTGTCGTGC			

¹T.a: Temperatura de anillamiento (°C); ²pb: Tamaño de banda del producto de PCR en pares de bases.

1.2.4.3 Identificación de aislamientos con la secuenciación parcial del gen 16S ARNr

Con el fin de identificar las bacterias aisladas del tejido sintomático se realizó la amplificación parcial del gen 16S de ARN ribosomal (*16S ARNr*) de 61 aislamientos bacterianos mediante PCR de tiempo final con los cebadores universales F27 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991) en un volumen final de 25 µl por cada reacción, que contenía 2.5 µl de Dream Taq buffer 10X (Thermo Scientific™), 2.5 µl de dNTP mix 2 mM (Thermo Scientific™), 1.25 µl de cada marcador 100 µM, 0.25 µl de Dream Taq ADN polimerasa 5 U/µl (Thermo Scientific™), 1 µl de la muestra de ADN, y agua ultrapura para completar el volumen. El perfil térmico consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, anillamiento a 56°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min, extensión final a 72°C por 7 min, y mantenimiento a 4°C. Se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar la amplificación de ADN con fragmentos de 1,500 pb aproximadamente.

Se realizó la purificación de los productos de PCR con 1.5 µl de Exonucleasa 1 (20 U/µl) (Thermo Scientific™) y 3 µl de buffer de reacción 10X por cada 15 µl del producto de PCR, luego se llevó al termociclador con un perfil de activación de la enzima a 37°C por 15 min y un ciclo final a 85°C por 15 min. Una vez purificados los productos de PCR, se enviaron a la compañía MacroGen, Inc. (Seúl, Corea del Sur) para la secuenciación de las muestras con el método Sanger (Sanger et al., 1977; Sanger & Coulson, 1975; Slatko et al., 2018).

El recorte, edición y generación de las secuencias consenso se realizó en BioEdit v.7.0.5.3 (Hall, 1999). Las secuencias fueron comparadas en la base de datos de GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) mediante la herramienta BLAST Nucleotide (Zhang et al., 2000) con una búsqueda limitada a secuencias de cepas tipo. Para la reconstrucción filogenética se descargaron secuencias parciales del gen *16S ARNr* de cepas tipo de especies válidamente publicadas de acuerdo con el Listado de nombres Procariotas con Posición en Nomenclatura (LPSN) (**Cuadro S1.1**). El

alineamiento de las secuencias se realizó en MAFFT v. 7 (Kato et al., 2017) con parámetros por defecto. El tamaño final de las secuencias alineadas y recortadas fue de 1,384 pares de bases (pb). Se utilizó JModelTest v.2.1.10 (Darriba et al., 2012) para determinar el mejor modelo de sustitución nucleotídica.

El árbol filogenético se realizó mediante inferencia Bayesiana en MrBayes v. 3.2.6 (Ronquist et al., 2012). Se corrieron cuatro cadenas con el modelo de sustitución nucleotídica de tiempo general reversible con distribución gamma más sitios invariantes (GTR+I+G) y se ejecutaron 1,000,000 generaciones de cadenas de Markov Monte Carlo (mcmc) y 1,000 generaciones de frecuencia de muestreo de árboles, con un calentamiento (“burnin”) del 25% de las cadenas. Se utilizó la cepa *Bacillus subtilis* IAM 12118^T como grupo externo. El árbol consenso se visualizó y editó en iTOL v.6.9.1 (Letunic & Bork, 2024). Las secuencias analizadas en este estudio fueron depositadas en la base de datos del GenBank bajo las accesiones PQ857593-PQ857653.

Con la identificación de los géneros y las características morfológicas y bioquímicas de los aislamientos evaluadas mediante métodos convencionales, se elaboró un diagrama de Sankey con el paquete ‘ggsankey’ (Sjoberg, 2024) en el entorno de R (R Core Team, 2024) con el fin de visualizar el flujo de las características hacia los géneros identificados y apreciar la proporción de los aislamientos con características específicas.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Caracterización morfológica de los aislamientos

Se caracterizó la morfología de las colonias de 146 cultivos puros aislados a partir de muestras de tejido sintomático de plantas de tomate provenientes de siete cantones del Valle Central de Costa Rica. Los aislamientos se caracterizaron después de 24-72 horas de crecimiento en medio de agar nutritivo (AN) incubado a 28°C ± 2°C. Respecto a la forma de las colonias, 109 aislamientos (74.66%) presentaron forma circular, 21 aislamientos (14.38%)

forma irregular y 16 aislamientos (10.96%) puntiformes; 115 aislamientos (78.77%) presentaron bordes enteros, 22 (15.03%) fueron ondulados y nueve (6.16%) fueron lobulados; en cuanto a la elevación de las colonias en el medio, dos aislamientos (1.37%) presentaron colonias convexas, 88 (60.27%) colonias elevadas, 54 (36.99%) colonias planas y dos (1.37%) colonias umbonadas. Los aislamientos presentaron una amplia diversidad de coloraciones y tonalidades, 72 aislamientos (49.32%) presentaron tonalidades en color amarillo, 32 aislamientos (21.92%) color blanco, 13 aislamientos (8.90%) color crema, 18 aislamientos (12.24%) color naranja, seis (4.11%) color rosado, y cinco aislamientos (3.42%) incoloros o transparentes (**Cuadro 1.3**).

En cuanto a la consistencia y textura, 137 aislamientos (93.84%) presentaron colonias lisas, tres (2.05%) mucoides y seis (4.11%) rugosas. El comportamiento óptico de las colonias se evaluó frente a la luz emitida en donde 104 aislamientos (71.23%) presentaron colonias opacas y 42 aislamientos (28.77%) con colonias translúcidas; frente a la luz reflejada 145 aislamientos (99.32%) presentaron colonias brillantes y uno (0.68%) presentó colonias opacas. El tamaño de las colonias bacterianas presentó un rango de 0.3-6.01 mm de diámetro, con una media = 1.86 mm; desviación estándar (SD) = 1.02 mm; error estándar (SE) = 0.08 mm. Las colonias se agruparon por su tamaño como grandes (≥ 3 mm de diámetro) y pequeñas (< 3 mm de diámetro); 18 aislamientos (12.33%) presentaron colonias grandes y 128 aislamientos (87.67%) colonias pequeñas (**Cuadro 1.3**).

1.3.2 Caracterización fisiológica y bioquímica de los aislamientos

Se realizó la caracterización fisiológica y bioquímica de las cepas bacterianas mediante pruebas convencionales. Según la tinción de Gram se identificaron 46 aislamientos (31.51%) como Gram negativos, de estos 43 fueron bacilos y 3 fueron cocos; se identificaron 87 aislamientos (59.59%) como Gram positivos, 29 bacilos y 58 cocos; y 13 aislamientos (8.90%) como no determinados (ND). En la prueba de KOH 3% se registraron 42 cepas (28.77%) KOH positivas y 104 (71.23%) KOH negativas. La correlación entre la tinción de Gram y la prueba de

KOH 3% fue estadísticamente significativa, con un $r = -0.83$; intervalo de confianza al 95% (IC95%) = -0.88, -0.77; $p < 0.001$. En la prueba de oxidasa se registraron 30 cepas (20.55%) con una reacción positiva y 116 (79.45%) con una reacción negativa. En la prueba de catalasa 133 cepas (91.10%) presentaron reacciones positivas y 13 cepas (8.90%) presentaron una reacción negativa. En el medio B de King (KB), 21 cepas (14.38%) liberaron pigmentos difusibles fluorescentes en el medio, 91 (62.33%) no liberaron pigmentos fluorescentes y 34 (23.29%) no fueron determinadas (ND). En cuanto al crecimiento en medio de agar MacConkey y la fermentación de lactosa, 35 cepas (23.97%) crecieron en el medio y fueron no fermentadoras de lactosa, 85 cepas (58.22%) no crecieron en el medio y 26 cepas (17.81%) no fueron evaluadas en la prueba (ND) (**Cuadro 1.3**).

En la prueba del medio triple azúcar hierro (TSI) se identificaron 27 cepas (18.49%) como fermentadoras de glucosa, lactosa y/o sacarosa (interpretación del medio = A/A [ácido sobre ácido], medio amarillo en la parte inclinada y en el fondo del tubo después de incubación), cinco de ellas (3.42%) con producción de gas (A/AG). Nueve cepas (6.16%) fueron fermentadoras de glucosa (interpretación del medio = K/A [alcalino sobre ácido], medio rojo-rosado en la parte inclinada y amarillo en el fondo del tubo después de incubación), tres de ellas (2.05%) con producción de gas (K/AG). Se identificaron 81 aislamientos (55.48%) como no fermentadores de glucosa, lactosa, ni sacarosa (interpretación del medio = K/K [alcalino sobre alcalino], medio rojo-rosado en la parte inclinada y en el fondo del tubo después de incubación [27 aislamientos; 18.49%]; K/NC [alcalino sobre sin cambios], medio rojo-rosado en la parte superior y rojo-naranja en el fondo del tubo después de incubación [20 aislamientos; 13.70%]; o NC/NC [sin cambios sobre sin cambios], medio rojo-naranja en la parte inclinada y en el fondo del tubo después de incubación [34 aislamientos; 23.29%]). No se observó producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S) en ninguna de las cepas evaluadas. No se determinó el perfil de 29 cepas (19.86%) en esta prueba (**Cuadro 1.3**).

Cuadro 1.3 Caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica de las colonias de 146 aislamientos bacterianos aislados a partir de muestras de plantas de tomate con síntomas de infecciones bacterianas colectadas en siete cantones del Valle Central de Costa Rica. La evaluación de las características se realizó después de 24-48 horas de incubación a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Características		As ^a	Frecuencia Relativa (%)
Morfológicas			
Forma	circular	109	74.66
	irregular	21	14.38
	puntiforme	16	10.96
Bordes	enteros	115	78.77
	lobulados	9	6.16
	ondulados	22	15.07
Elevación	convexa	2	1.37
	elevada	88	60.27
	plana	54	36.99
	umbonada	2	1.37
Consistencia	lisa	137	93.84
	mucoide	3	2.05
	rugosa	6	4.11
Color	amarillo	72	49.32
	blanco	32	21.92
	crema	13	8.90
	naranja	18	12.33
	rosado	6	4.11
	incolore	5	3.42
Apariencia frente a luz emitida	opaca	104	71.23
	translúcida	42	28.77
Apariencia frente a luz reflejada	brillante	145	99.32
	opaca	1	0.68
Tamaño	grande	18	12.33
	pequeña	128	87.67
Bioquímicas			
Tinción de Gram	bacilos Gram negativos	43	29.45
	cocos Gram negativos	3	2.05
	bacilos Gram positivos	29	19.86
	cocos Gram positivos	58	39.73
	ND ^b	13	8.90
KOH 3%	negativa	104	71.23
	positiva	42	28.77
Catalasa	negativa	13	8.90
	positiva	133	91.10

Características		As ^a	Frecuencia Relativa (%)
Oxidasa	negativa	116	79.45
	positiva	30	20.55
Fluorescencia en medio B de King	no fluorescente	91	62.33
	fluorescente	21	14.38
	ND	34	23.29
Fermentación de lactosa en medio MacConkey	negativa	35	23.97
	no crecimiento ^c	85	58.22
	ND	26	17.81
Fermentación de glucosa, lactosa y/o sacarosa en medio TSI ^d	A/A	22	15.07
	A/AG	5	3.42
	K/A	6	4.11
	K/AG	3	2.05
	K/K	27	18.49
	K/NC	20	13.70
	NC/NC	34	23.29
	ND	29	19.86

^aAs = Número de aislamientos. ^bND = No determinado (aislamientos que no fueron evaluados en la prueba correspondiente). ^cno crecimiento = aislamientos que no crecieron en el medio de agar MacConkey. ^dCódigos de interpretación en medio TSI: A/A = ácido/ácido (fermentadoras de glucosa de forma aeróbica y de glucosa, lactosa y/o sacarosa). K/A = alcalino/ácido (fermentadoras de glucosa). K/K = alcalino/alcalino (no fermentadoras de glucosa, lactosa, ni sacarosa). K/NC = alcalino/sin cambios (no fermentadoras de glucosa, lactosa, ni sacarosa). NC/NC = sin cambios/sin cambios (no fermentadoras de glucosa, lactosa, ni sacarosa). G = producción de gas (oxígeno o dióxido de carbono).

Además de las pruebas convencionales, se realizó un perfil bioquímico de 17 cepas Gram negativas con las tarjetas de identificación GN en el sistema VITEK[®] 2, que incluye 47 pruebas estándar de utilización de fuentes de carbono, actividad enzimática y resistencia (Pincus, 2006). Mediante la combinación de las pruebas convencionales y el perfil bioquímico generado en el sistema VITEK[®] 2 (**Cuadro S1.2**), se realizó un análisis de agrupamiento aglomerativo jerárquico para las 17 cepas evaluadas. No se registró ningún perfil idéntico entre las cepas; se obtuvo un rango de disimilitud de 0.5 a 32.1 entre ellas. Las cepas se

agruparon en cuatro “clusters” (**Figura 1.1**). En el primer “cluster” se agruparon nueve cepas de *Pseudomonas* sp. (LTM 13.1.2, LTM 13.1.3, LTM 14.2.2, LTM 14.3.1, LTM 32.2.1, LTM 40.2.3, LTM 78.1.1, LTM 78.2.1 y LTM 78.3.2) y dos cepas de *Stenotrophomonas* sp. (LTM 49.1.1 y LTM 78.2.3); en el segundo se agruparon dos cepas de *Agrobacterium* sp. (LTM 78.1.2 y LTM 78.2.2); en el tercero se agruparon dos cepas de *Serratia* sp. (LTM 71.3.2 y LTM 74.3.1); y en el cuarto las cepas de *Cedecea* sp. (LTM 72.2.1) y *Pantoea* sp. (LTM 78.3.1). La menor disimilitud (0.5) se registró entre las cepas LTM 32.2.1 y LTM 78.1.1 (**Figura 1.1**), ambas identificadas como *Pseudomonas* sp. La identificación de las cepas para el agrupamiento se realizó con el análisis molecular de la secuencia parcial del gen *16S ARNr*, ya que el sistema VITEK® 2 logró identificar solamente 11 cepas (64.7%) exitosamente a nivel de género, e identificó de forma incorrecta o nula seis de las cepas evaluadas.

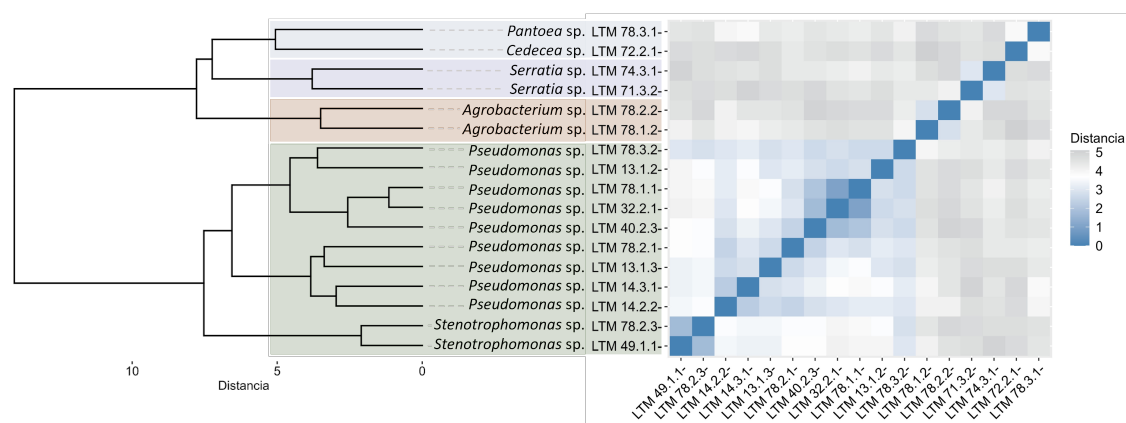


Figura 1.1 Agrupamiento de las cepas bacterianas según el perfil bioquímico combinado de pruebas convencionales y el sistema VITEK® 2. Se muestra el dendrograma del agrupamiento jerárquico de las cepas en cuatro “clusters”, obtenido con el método aglomerativo de Ward a partir de una matriz distancias euclidianas para calcular la disimilitud entre las cepas evaluadas. Celdas con tonalidades azules en la matriz de distancias indican mayor similitud entre las cepas.

1.3.3 Análisis molecular

1.3.3.1 Detección de bacterias fitopatógenas en tejido sintomático de plantas de tomate

Se utilizaron cebadores específicos en reacciones de PCR de tiempo final con muestras de tejido sintomático de tomate y se detectó la presencia del género *Xanthomonas* en cinco plantas de 54 evaluadas (frecuencia de detección = 9.26%), en los cantones de Paraíso y Turrialba en la provincia de Cartago, Barva y Santa Bárbara en la provincia de Heredia. La bacteria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* fue detectada en dos plantas (3.70%), en el cantón de Turrialba en la provincia de Cartago y en el cantón Alajuela en la provincia de Alajuela (**Cuadro 1.4; Figura 1.2**). El género *Pseudomonas* se detectó en un total de 52 plantas (96.30%) en los siete cantones evaluados. Dentro de este género, se detectó la presencia de *Pseudomonas mediterranea*, en 15 plantas (27.78%), en el cantón Paraíso de la provincia de Cartago, Alajuela y Zarceró en la provincia de Alajuela, y Barva en la provincia de Heredia; y la presencia de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en seis plantas (11.11%), en los cantones Paraíso y Turrialba en la provincia de Cartago, Barva y Santa Bárbara en la provincia de Heredia (**Cuadro 1.4; Figura 1.2**).

Se detectó la coexistencia de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pseudomonas mediterranea* en una planta del cantón de Alajuela, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en una planta del cantón Turrialba, y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y *Xanthomonas* sp. en una planta del cantón de Santa Bárbara; además de la presencia simultánea de *Xanthomonas* y *Pseudomonas* en plantas de los cantones de Barva en Heredia, Paraíso y Turrialba en Cartago (**Cuadro 1.4; Figura 1.2**). No se detectó la presencia de *Dickeya chrysanthemi*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria* (= *X. campestris* pv. *vesicatoria*) ni *Pseudomonas corrugata* en las muestras analizadas.

Cuadro 1.4 Detección de géneros o especies de bacterias fitopatógenas objetivo mediante la amplificación de ADN con cebadores específicos a partir de muestras de tejido de plantas de tomate con síntomas de infecciones bacterianas.

ID de Planta	Cantón	Provincia	Var ^a	Síntomas	Género/Especie detectada
LTM_11	Paraíso	Cartago	JR	Peca bacteriana en hojas	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
LTM_12	Paraíso	Cartago	JR	Hojas cloróticas; necrosis en tallo y hojas; tallo hueco	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_13	Paraíso	Cartago	7810	Necrosis en tallo; tallo hueco	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_14	Paraíso	Cartago	7810	Lesiones necróticas en tallo; tallo hueco	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_15	Paraíso	Cartago	Cherry grape	Marchitez general	<i>Xanthomonas</i> sp.; <i>Pseudomonas mediterranea</i>
LTM_16	Turrialba	Cartago	ND ^b	Peca bacteriana en hojas; lesión necrótica en raíz y tallo; tallo hueco	<i>Xanthomonas</i> sp.; <i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_17	Turrialba	Cartago	ND	Lesiones necróticas en hojas y tallo superior	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_18	Turrialba	Cartago	ND	Necrosis acuosa en tallo inferior; marchitez	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
LTM_19	Turrialba	Cartago	ND	Necrosis interna en raíz y tallo inferior; hojas marchitas y con manchas marrones	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> ; <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
LTM_20	Turrialba	Cartago	ND	Peca bacteriana en hojas	–
LTM_21	Turrialba	Cartago	ND	Lesiones acuosas y hundidas en fruto	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
LTM_22	Turrialba	Cartago	Vulcano	Necrosis en base del tallo y tallo superior; marchitez	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_23	Alvarado	Cartago	JR	Necrosis en base del tallo; tallo hueco; marchitez	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_24	Alvarado	Cartago	JR	Necrosis en base del tallo; marchitez	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_25	Alvarado	Cartago	JR	Necrosis en raíz y base del tallo; marchitez	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_28	Paraíso	Cartago	Armada + Milán	Necrosis en tallo inferior; tallo hueco	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_29	Paraíso	Cartago	Armada + Milán	Necrosis acuosa en tallo superior; tallo hueco	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_30	Alajuela	Alajuela	Green rise + 7810	Necrosis acuosa en tallo inferior y tallo superior; tallo hueco; marchitez	<i>Pseudomonas</i> sp.

ID de Planta	Cantón	Provincia	Var ^a	Síntomas	Género/Especie detectada
LTM_32	Alajuela	Alajuela	Green rise + 7810	Necrosis acuosa en tallo inferior y tallo superior; tallo hueco; marchitez	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_33	Alajuela	Alajuela	Green rise + 7810	Necrosis seca y acuosa en tallo inferior y tallo superior; tallo hueco; marchitez	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_34	Zarcero	Alajuela	JR	Marchitez general	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_35	Zarcero	Alajuela	JR	Necrosis y agrietamiento en base del tallo; tallo hueco	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_36	Zarcero	Alajuela	JR	Puntos grises con apariencia de chancros en fruto	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_37	Alajuela	Alajuela	Toreto	Necrosis en base del tallo; tallo hueco; marchitez	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_38	Alajuela	Alajuela	Toreto	Necrosis en base del tallo; tallo hueco; marchitez	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_39	Alajuela	Alajuela	Toreto	Necrosis en base del tallo; tallo hueco; marchitez	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_40	Alajuela	Alajuela	7810	Necrosis acuosa en raíz, base del tallo, tallo inferior y tallo superior; clorosis y marchitez	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_41	Alajuela	Alajuela	TD1 + 7810	Necrosis en base del tallo, tallo superior y hojas; tallo hueco	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> ; <i>Pseudomonas mediterranea</i>
LTM_42	Alajuela	Alajuela	ND	Necrosis en base del tallo; marchitez	NA ^c
LTM_46	Alajuela	Alajuela	Green rise + 7810	Lesión agrietada en base del tallo y tallo inferior; marchitez	<i>Pseudomonas mediterranea</i>
LTM_47	Alajuela	Alajuela	TD1 + Toreto	Necrosis acuosa en base del tallo y tallo inferior; marchitez	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_48	Alajuela	Alajuela	TD1 + Toreto	Necrosis acuosa en base del tallo y tallo inferior; marchitez	<i>Pseudomonas mediterranea</i>
LTM_49	Zarcero	Alajuela	JR	Necrosis interna y externa en base del tallo; tallo hueco	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_50	Zarcero	Alajuela	JR	Necrosis en base del tallo, tallo inferior y tallo superior; marchitez	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_51	Zarcero	Alajuela	JR	Necrosis interna en base del tallo y tallo inferior; clorosis	<i>Pseudomonas</i> sp.

ID de Planta	Cantón	Provincia	Var ^a	Síntomas	Género/Especie detectada
LTM_52	Zarcelero	Alajuela	JR	Necrosis y agrietamiento en base del tallo, tallo inferior y tallo superior; marchitez	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_53	Alajuela	Alajuela	7810	Pudrición acuosa en tallo inferior y tallo superior; marchitez	<i>Xanthomonas</i> sp.; <i>Pseudomonas mediterranea</i>
LTM_58	Barva	Heredia	8565	Necrosis en base del tallo; clorosis y marchitez	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
LTM_59	Barva	Heredia	8565	Necrosis en base del tallo, tallo inferior, tallo superior y hojas; clorosis y marchitez	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_60	Barva	Heredia	8565	Necrosis en base del tallo, tallo inferior y tallo superior; marchitez	–
LTM_61	Barva	Heredia	8565	Peca bacteriana en hojas; necrosis; clorosis; marchitez	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_62	Barva	Heredia	8565	Peca bacteriana en hojas; necrosis; clorosis; marchitez	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_63	Barva	Heredia	8565	Necrosis seca en base del tallo, tallo inferior y hojas; clorosis y marchitez	<i>Pseudomonas mediterranea</i>
LTM_64	Barva	Heredia	8565	Necrosis seca en base del tallo y hojas; clorosis y marchitez	<i>Pseudomonas mediterranea</i>
LTM_65	Barva	Heredia	8565	Peca bacteriana en hojas; clorosis y marchitez	<i>Xanthomonas</i> sp.; <i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_66	Alajuela	Alajuela	Dionisio	Necrosis y pudrición en la base del tallo	<i>Pseudomonas mediterranea</i>
LTM_67	Alajuela	Alajuela	Dionisio	Necrosis en base del tallo; lesiones necróticas con halo clorótico en hojas	<i>Pseudomonas</i> sp.
LTM_68	Alajuela	Alajuela	Toreto	Necrosis en raíz y base del tallo; tallo hueco; marchitez	<i>Pseudomonas mediterranea</i>
LTM_69	Alajuela	Alajuela	Toreto	Necrosis en raíz y base del tallo; tallo hueco; marchitez	<i>Pseudomonas mediterranea</i>
LTM_70	Alajuela	Alajuela	Toreto	Necrosis seca y acuosa en raíz, base del tallo y tallo superior; marchitez	<i>Pseudomonas mediterranea</i>
LTM_71	Alajuela	Alajuela	Toreto	Necrosis seca y acuosa en raíz y base del tallo; marchitez	<i>Pseudomonas mediterranea</i>
LTM_72	Alajuela	Alajuela	Toreto	Necrosis seca y acuosa en base del tallo y tallo inferior; marchitez	<i>Pseudomonas mediterranea</i>
LTM_73	Alajuela	Alajuela	Toreto	Necrosis acuosa en raíz y base del tallo; marchitez	<i>Pseudomonas mediterranea</i>

ID de Planta	Cantón	Provincia	Var ^a	Síntomas	Género/Especie detectada
LTM_74	Alajuela	Alajuela	Toreto	Necrosis en raíz y base del tallo; marchitez	<i>Pseudomonas mediterranea</i>
LTM_78	Santa Bárbara	Heredia	8565	Clorosis y manchas necróticas secas y acuosas en hojas	<i>Xanthomonas</i> sp.; <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>

^aVar = variedad de tomate. ^bND: variedad desconocida. ^cNA = No se realizó análisis molecular del tejido de esa planta. No se detectó ninguno de los géneros/especies objetivo (-).

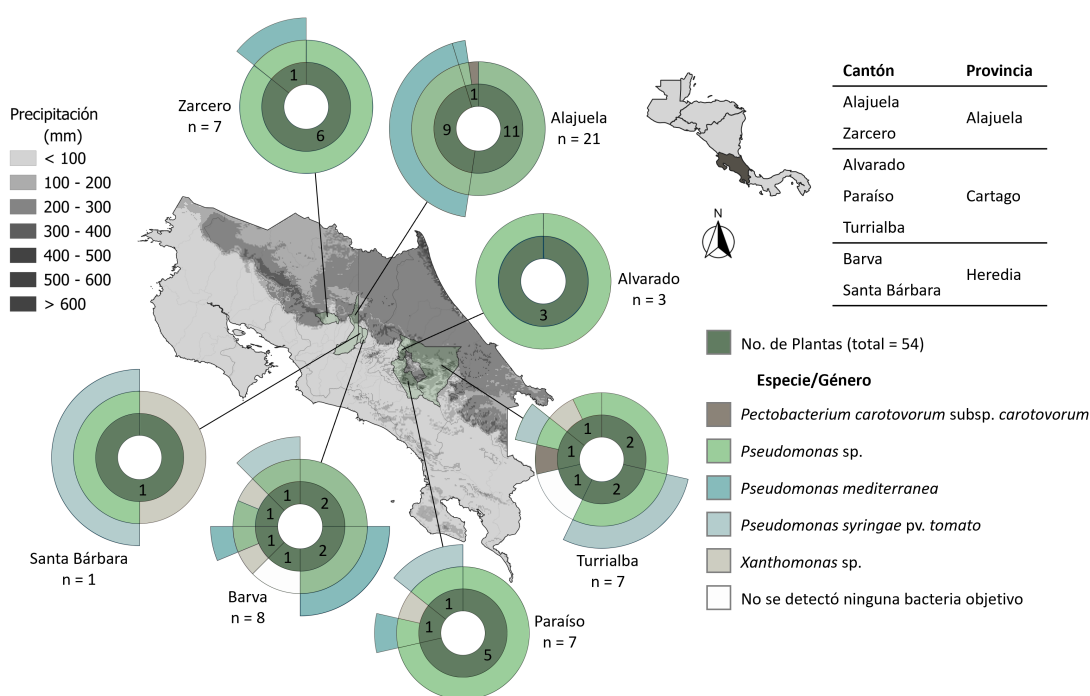


Figura 1.2 Mapa de distribución y frecuencia de las bacterias fitopatógenas detectadas en muestras de tejido de plantas de tomate sintomáticas mediante la amplificación de ADN con cebadores específicos. Los gráficos muestran la frecuencia relativa de las bacterias detectadas (anillo medio y externo) por número de plantas analizadas (anillo interno) en cada cantón.

1.3.3.2 Identificación de aislamientos con la secuenciación parcial del gen 16S ARNr

A partir las secuencias parciales del gen 16S ARNr de 61 aislamientos, se identificaron cinco clases taxonómicas, siendo la más abundante la clase Gammaproteobacteria (γ -bacteria) con 34 aislamientos (abundancia relativa = 55.74%), seguido de la clase Actinomycetes con 18 aislamientos (29.51%). Las clases Alphaproteobacteria (α -bacteria), Betaproteobacteria (β -bacteria) y Bacilli presentaron cuatro (6.56%), tres (4.92%) y dos (3.28%) aislamientos, respectivamente (**Figura 1.3 A**). Dentro de la clase Gammaproteobacteria, el orden más predominante fue Pseudomonadales con 21 aislamientos (34.43% del total de aislamientos), seguido de Enterobacterales con siete aislamientos (11.48%). Dentro de los Actinomycetes el orden más abundante fue Micrococcales con 15 aislamientos (24.59%) (**Figura 1.3 A**). En el orden Pseudomonadales la única familia presente fue Pseudomonadaceae, con el único género *Pseudomonas* (**Figura 1.3 B y C**). La segunda familia más abundante fue Microbacteriaceae con 10 aislamientos (16.39%), siete de ellos (11.48%) pertenecientes al género *Microbacterium* (**Figura 1.3 B y C**).

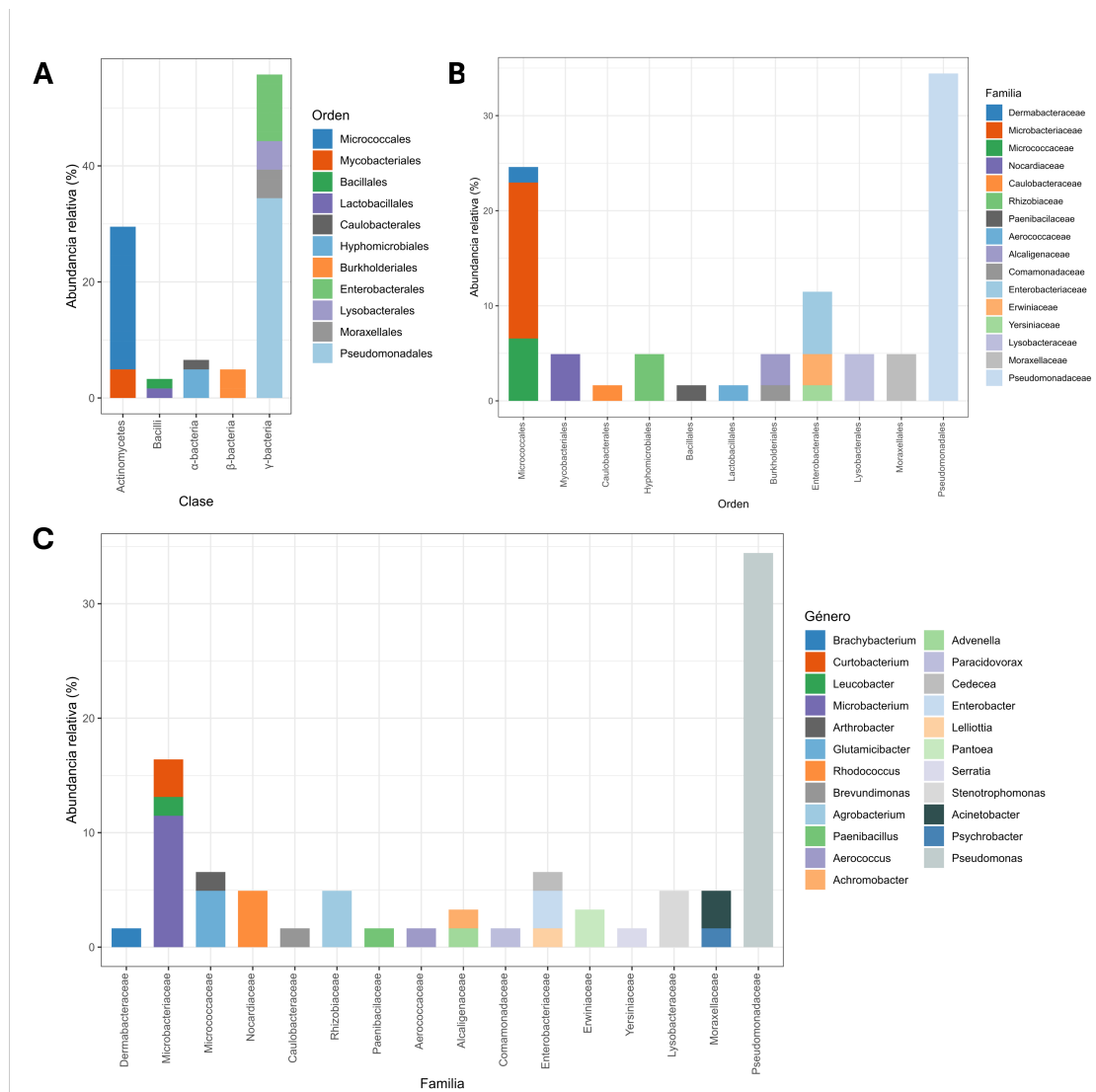


Figura 1.3 Diversidad taxonómica y abundancia relativa porcentual de las cepas bacterianas aisladas de tejido sintomático de plantas de tomate en fincas del Valle Central de Costa Rica. Abundancia relativa (%) en el nivel de **A)** orden por clase taxonómica, **B)** familia por orden, y **C)** género por familia.

Los aislamientos bacterianos provenían de seis partes principales de la planta: raíz (dos aislamientos; abundancia relativa = 3.28%), base del tallo (10; 16.39%), tallo inferior (16; 26.23%), tallo superior (ocho; 13.11%), hoja (24; 39.34%) y fruto (uno; 1.64%). En la raíz se aislaron bacterias de la clase Actinomycetes y Gammaproteobacteria. En la base del tallo se registró mayor abundancia relativa de la clase Actinomycetes (9.84%), seguido de la clase Gammaproteobacteria

(4.92%). En el tallo inferior, tallo superior y hoja se registró mayor abundancia de Gammaproteobacteria con 18.03%, 6.56% y 22.95%, respectivamente, seguido de Actinomycetes con 6.56%, 4.92% y 6.56%, respectivamente. En el fruto solamente se registró un aislamiento de la clase Gammaproteobacteria (**Figura 1.4 A**). Los órdenes más abundantes fueron Pseudomonadales en hoja (14.75%), tallo inferior (9.84%) y tallo superior (6.56%); Micrococcales en la base del tallo (8.20%) y en la hoja (6.56%); y Enterobacterales en la hoja (6.56%) (**Figura 1.4 B**). La familia más abundante por tejido fue Pseudomonadaceae en la hoja (14.75%), tallo inferior (9.84%) y tallo superior (6.56%) (**Figura 1.4 C**). Los géneros más abundantes fueron *Pseudomonas* en la hoja (14.75%), tallo inferior (9.84%) y tallo superior (6.56%) (**Figura 1.4 D**).

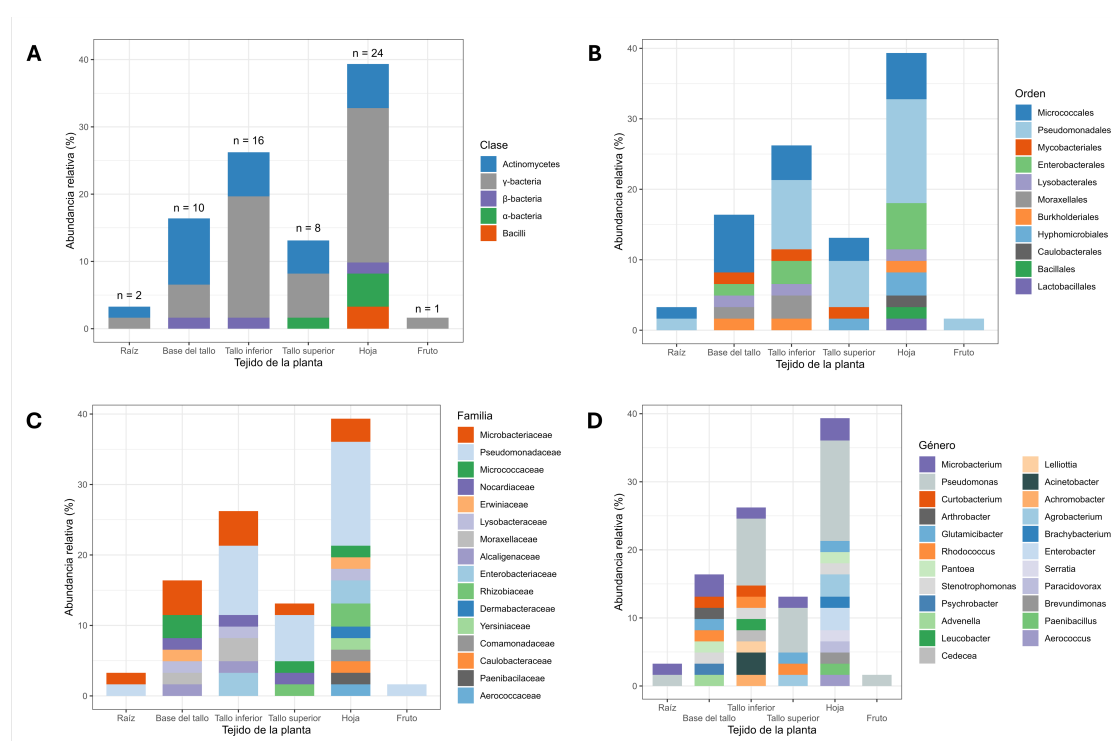


Figura 1.4 Diversidad taxonómica y abundancia relativa porcentual de las cepas bacterianas en los diferentes tejidos de las plantas de tomate evaluadas: raíz, base del tallo, tallo inferior, tallo superior, hoja, y fruto. Abundancia relativa (%) en el nivel de **A)** clase, **B)** orden, **C)** familia, y **D)** género.

Respecto a la procedencia de los aislamientos, los cantones de Alajuela y Alvarado presentaron mayor abundancia de Actinomycetes (14.75% y 8.20%, respectivamente); Gammaproteobacteria fue la clase más abundante en los cantones de Barva (19.67%), Paraíso (9.84%), Santa Bárbara (6.56%), Zarcero (4.92%), y la única clase en Turrialba (**Figura 1.5 A**). El orden más abundante en Alajuela y en Alvarado fue Micrococcales (11.48% y 8.20%, respectivamente); Pseudomonadales fue el orden más abundante en los cantones de Barva (11.48%) y Paraíso (9.84%) (**Figura 1.5 B**). Las familias más abundantes fueron Microbacteriaceae en Alajuela (9.84%), Pseudomonadaceae en Barva (11.48%) y Paraíso (9.84%) (**Figura 1.5 C**). El género más abundante fue *Pseudomonas* en los cantones de Barva (11.48%), Paraíso (9.84%) y Alajuela (6.56%) (**Figura 1.5 D**).

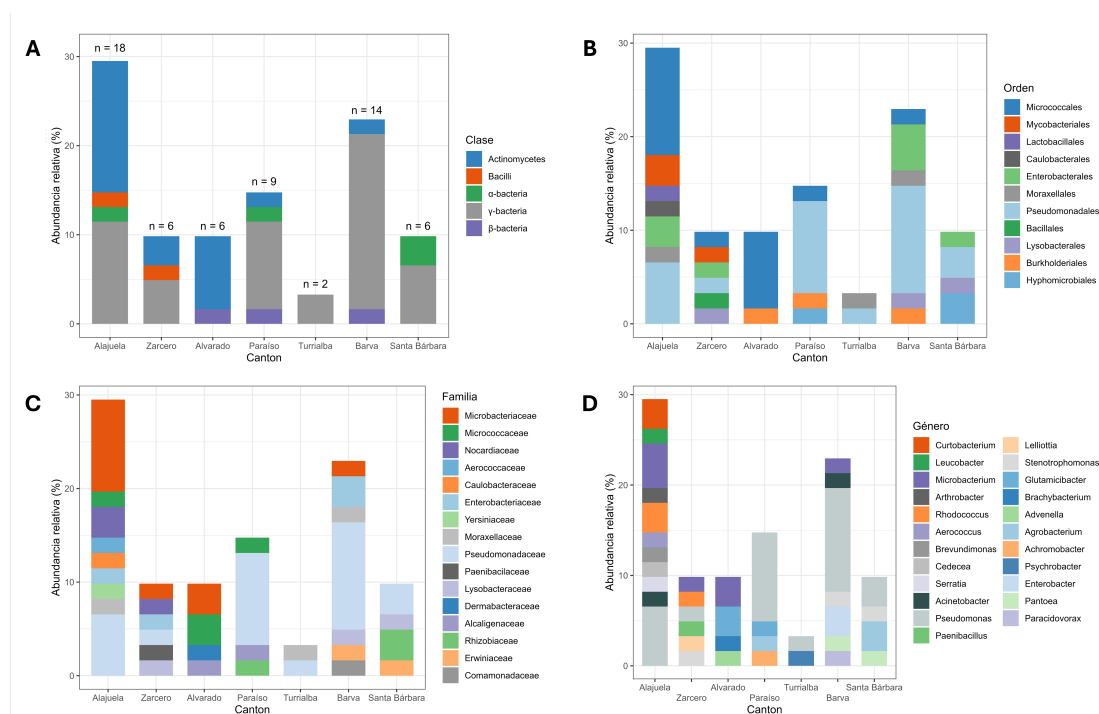


Figura 1.5 Diversidad taxonómica y abundancia relativa porcentual de las cepas bacterianas aisladas de tejido sintomático de plantas de tomate en siete cantones del Valle Central de Costa Rica. Abundancia relativa (%) en el nivel de **A)** clase, **B)** orden, **C)** familia, y **D)** género.

Mediante el análisis filogenético Bayesiano utilizando las secuencias parciales del gen *16S ARNr* se identificaron 29 especies y un total de 23 géneros. De 61 aislamientos, 21 (34.43%) se identificaron dentro del género *Pseudomonas*, diez de estos aislamientos (16.39%) presentaron mayor similitud con la especie *Pseudomonas punonensis*. Tres aislamientos (4.92%) fueron identificados como *Agrobacterium cavarae* y otros tres aislamientos se identificaron dentro del género *Rhodococcus*. Las especies *Microbacterium arborescens*, *M. oxydans* y *Pseudomonas straminea* presentaron dos aislamientos cada una (3.28%). El resto de las especies contó únicamente con un representante (**Figura 1.6**).

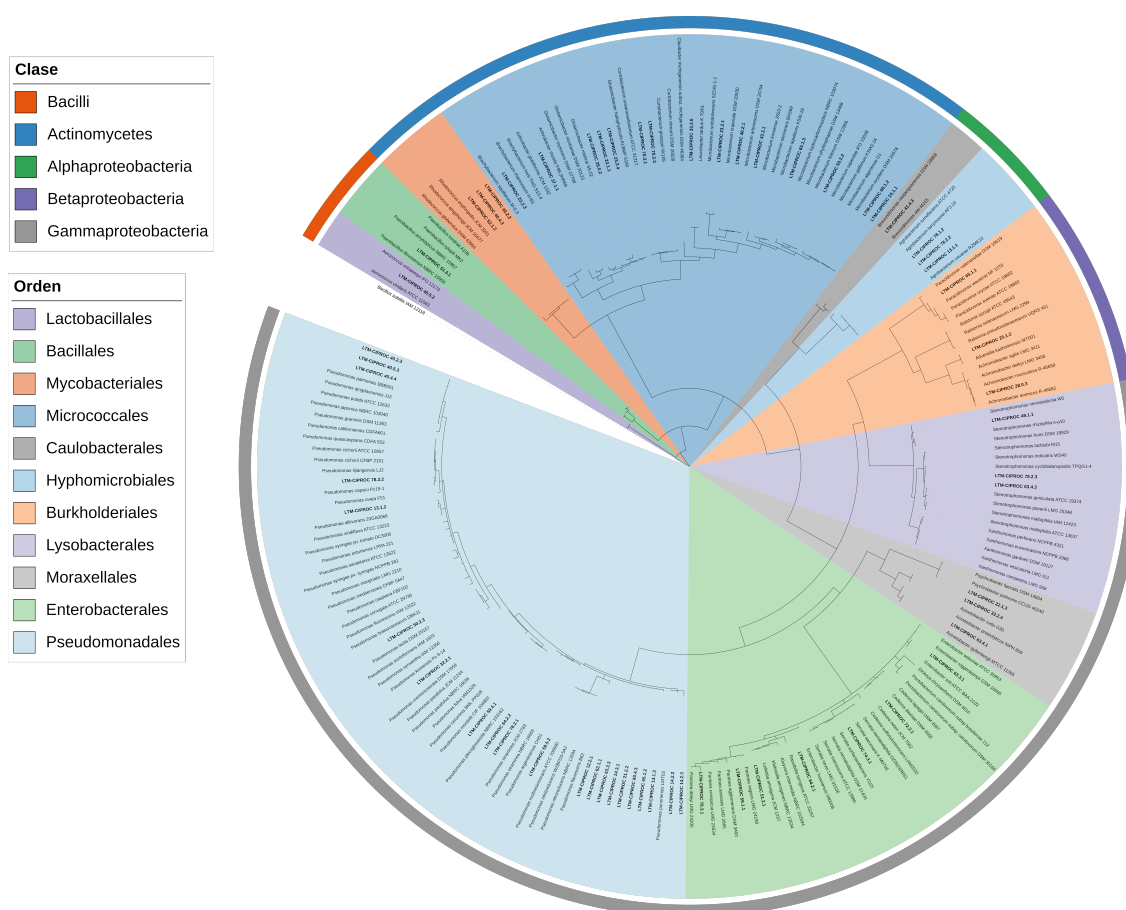


Figura 1.6 Árbol filogenético consenso de cepas aisladas de tejido sintomático de plantas de tomate y cepas tipo de referencia descargadas de la base de datos del GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), elaborado a partir de las secuencias parciales del gen *16S ARNr* mediante un análisis filogenético Bayesiano. Las cepas analizadas en este estudio se muestran en “negrita” con el acrónimo ‘LTM-CIPROC’ (Laboratorio de Técnicas

Moleculares-CIPROC). Se utilizó la cepa de *Bacillus subtilis* IAM 12118^T como grupo externo. El anillo externo indica la clase taxonómica de las cepas y los polígonos internos indican el orden.

El género con mayor representación dentro de los 61 aislamientos identificados fue *Pseudomonas*, con 21 aislamientos (34.43%). Las características morfológicas predominantes de los aislamientos dentro de este género fueron colonias de forma circular (14; 66.6%); bordes enteros (12; 57.14%); perfil elevado (11; 52.38%) y plano (9; 42.86%); color amarillo (13; 61.90%) en diferentes tonalidades; consistencia lisa (19; 90.48%); en cuanto a la apariencia frente a la luz emitida a través de las colonias, 11 aislamientos (52.38%) fueron opacos y 10 (47.62%) translúcidos; todos los aislamientos tuvieron una apariencia brillante frente a la luz reflejada; en cuanto al tamaño de las colonias, 15 aislamientos (71.43%) presentaron colonias pequeñas y 6 aislamientos (28.57%) presentaron colonias grandes (**Cuadro 1.5; Figura 1.7**). Respecto a las características bioquímicas evaluadas mediante métodos convencionales, los aislamientos del género *Pseudomonas* fueron Gram negativos; 17 aislamientos (80.95%) fueron KOH positivos, cuatro de los aislamientos (19.05%) no generaron un hilo viscoso visible al realizar la prueba, por lo que fueron catalogados como KOH negativos; todos los aislamientos presentaron una reacción positiva en la prueba de catalasa; 12 (57.14%) presentaron una reacción negativa y 9 (42.86%) una reacción positiva en la prueba de oxidasa; 13 aislamientos (61.90%) produjeron pigmentos difusibles fluorescentes en el medio B de King; 15 aislamientos (71.43%) crecieron en el medio MacConkey y fueron no fermentadores de lactosa; cuatro aislamientos (19.05%) fermentaron glucosa en el medio TSI; un aislamiento (4.76%) fermentó glucosa, lactosa y/o sacarosa; y un aislamiento (4.76%) produjo gas (CO₂) (**Cuadro 1.6; Figura 1.7**).

Cuadro 1.5 Características morfológicas de las colonias de 61 aislamientos bacterianos agrupados en 23 géneros identificados mediante la secuenciación parcial del gen *16S ARNr*. Se muestra el número de aislamientos de cada género para cada característica morfológica.

Género	As ^a	Forma ^b			Bordes ^c			Elevación ^d			Color ^e						Consistencia ^f			LE ^g		LR ^h		Tamaño ⁱ	
		C	I	P	E	L	O	Cv	EI	PI	A	B	Cr	N	Rs	In	Li	M	Rg	Op	TI	Br	Op	G	Pq
<i>Achromobacter</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	
<i>Acinetobacter</i>	2	2	0	0	2	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	2	0	0	2	0	2	0	1	1	
<i>Advenella</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	
<i>Aerococcus</i>	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	
<i>Agrobacterium</i>	3	2	0	1	3	0	0	1	2	0	0	2	1	0	0	3	0	0	3	0	3	0	0	3	
<i>Arthrobacter</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	
<i>Brachybacterium</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	
<i>Brevundimonas</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	
<i>Cedecea</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	
<i>Curtobacterium</i>	2	0	2	0	0	0	2	0	1	1	2	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	2	
<i>Enterobacter</i>	2	2	0	0	1	0	1	0	0	2	0	1	1	0	0	2	0	0	0	2	2	0	0	2	
<i>Glutamicibacter</i>	3	3	0	0	3	0	0	0	2	1	2	0	1	0	0	3	0	0	2	1	3	0	2	1	
<i>Lelliottia</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	
<i>Leucobacter</i>	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	
<i>Microbacterium</i>	7	5	0	2	7	0	0	0	6	1	3	1	1	1	0	7	0	0	6	1	7	0	0	7	
<i>Paenibacillus</i>	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	
<i>Pantoea</i>	2	2	0	0	2	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	2	0	0	1	1	2	0	0	2	
<i>Paracitovorax</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	
<i>Pseudomonas</i>	21	14	6	1	12	3	6	1	11	9	13	4	0	2	0	19	2	0	11	10	21	0	6	15	
<i>Psychrobacter</i>	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	
<i>Rhodococcus</i>	3	1	2	0	2	1	0	0	3	0	0	1	0	0	2	2	0	1	3	0	3	0	0	3	
<i>Serratia</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	
<i>Stenotrophomonas</i>	3	1	0	2	3	0	0	0	2	1	2	0	1	0	0	3	0	0	1	2	3	0	0	3	

Género	As ^a	Forma ^b			Bordes ^c			Elevación ^d			Color ^e						Consistencia ^f			LE ^g		LR ^h		Tamaño ⁱ	
		C	I	P	E	L	O	Cv	El	Pl	A	B	Cr	N	Rs	In	Li	M	Rg	Op	TI	Br	Op	G	Pq
Total	61	44	11	6	45	4	12	2	38	21	28	17	8	3	3	2	58	2	1	41	20	61	0	11	50

^aAs = Número de aislamientos. ^bForma: C = circular; I = irregular; P = puntiforme. ^cBorde: E = entero; L = lobulado; O = ondulado. ^dElevación: Cv = convexa; El = elevada; Pl = plana. ^eColor: A = amarillo; B = blanco; Cr = crema; N = naranja; Rs = rosado; In = incoloro. ^fConsistencia: Li = lisa; M = mucoide; R = rugosa. ^gLE (Comportamiento óptico frente a luz emitida): Op = opaca; TI = translúcida. ^hLR (Comportamiento óptico frente a luz reflejada): Br = brillante; Op = opaca. ⁱTamaño: G = grande (≥ 3 mm); Pq = pequeña (< 3 mm).

Cuadro 1.6 Características fisiológicas y bioquímicas de las colonias de 61 aislamientos bacterianos evaluadas mediante pruebas bioquímicas convencionales, agrupados en 23 géneros identificados mediante la secuenciación parcial del gen *16S ARNr*. Se muestra el número de aislamientos de cada género para cada característica.

Género	As ^a	Tinción Gram ^b		KOH 3%		Catalasa		Oxidasa		Fluorescencia en medio B de King			Fermentación de lactosa en medio MacConkey				Fermentación de glucosa en medio TSI			Fermentación de glucosa, lactosa y/o sacarosa en medio TSI			Producción de gas (CO ²) en medio TSI			
		G-	G+	-	+	-	+	-	+	-	+	ND ^c	-	+	NA ^d	ND	-	+	ND	-	+	ND	-	+	ND	
<i>Achromobacter</i>	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
<i>Acinetobacter</i>	2	2	0	0	2	0	2	2	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	
<i>Advenella</i>	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
<i>Aerococcus</i>	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>Agrobacterium</i>	3	3	0	1	2	1	2	2	1	3	0	0	3	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	0	0	
<i>Arthrobacter</i>	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
<i>Brachybacterium</i>	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>Brevundimonas</i>	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
<i>Cedecea</i>	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	
<i>Curtobacterium</i>	2	0	2	1	1	0	2	2	0	1	0	1	0	0	2	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	
<i>Enterobacter</i>	2	2	0	0	2	0	2	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	
<i>Glutamicibacter</i>	3	0	3	3	0	0	3	3	0	3	0	0	0	0	3	0	3	0	0	3	0	0	3	0	0	
<i>Lelliottia</i>	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
<i>Leucobacter</i>	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
<i>Microbacterium</i>	7	0	7	7	0	1	6	6	1	6	0	1	0	0	6	1	4	2	1	4	2	1	6	0	1	
<i>Paenibacillus</i>	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>Pantoea</i>	2	2	0	0	2	0	2	2	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	
<i>Paracidovorax</i>	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	
<i>Pseudomonas</i>	21	21	0	4	17	0	21	12	9	4	13	4	15	0	2	4	16	4	1	19	1	1	19	1	1	
<i>Psychrobacter</i>	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	

Género	As ^a	Tinción Gram ^b		KOH 3%		Catalasa		Oxidasa		Fluorescencia en medio B de King			Fermentación de lactosa en medio MacConkey				Fermentación de glucosa en medio TSI			Fermentación de glucosa, lactosa y/o sacarosa en medio TSI			Producción de gas (CO ₂) en medio TSI		
		G-	G+	-	+	-	+	-	+	-	+	ND ^c	-	+	NA ^d	ND	-	+	ND	-	+	ND	-	+	ND
<i>Rhodococcus</i>	3	0	3	3	0	0	3	3	0	3	0	0	0	0	3	0	2	1	0	3	0	0	3	0	0
<i>Serratia</i>	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
<i>Stenotrophomonas</i>	3	3	0	1	2	0	3	1	2	2	0	1	2	0	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1
Total	61	41	20	26	35	4	57	42	19	36	13	12	29	0	21	11	39	14	8	45	8	8	49	4	8

^aAs = Número de aislamientos. ^bTinción Gram: G- = Gram negativa; G+ = Gram positiva. ^cND = No determinado. ^dNA = No aplica (bacterias que no crecieron en el medio de agar MacConkey). La prueba resultó positiva (+) o negativa (-).

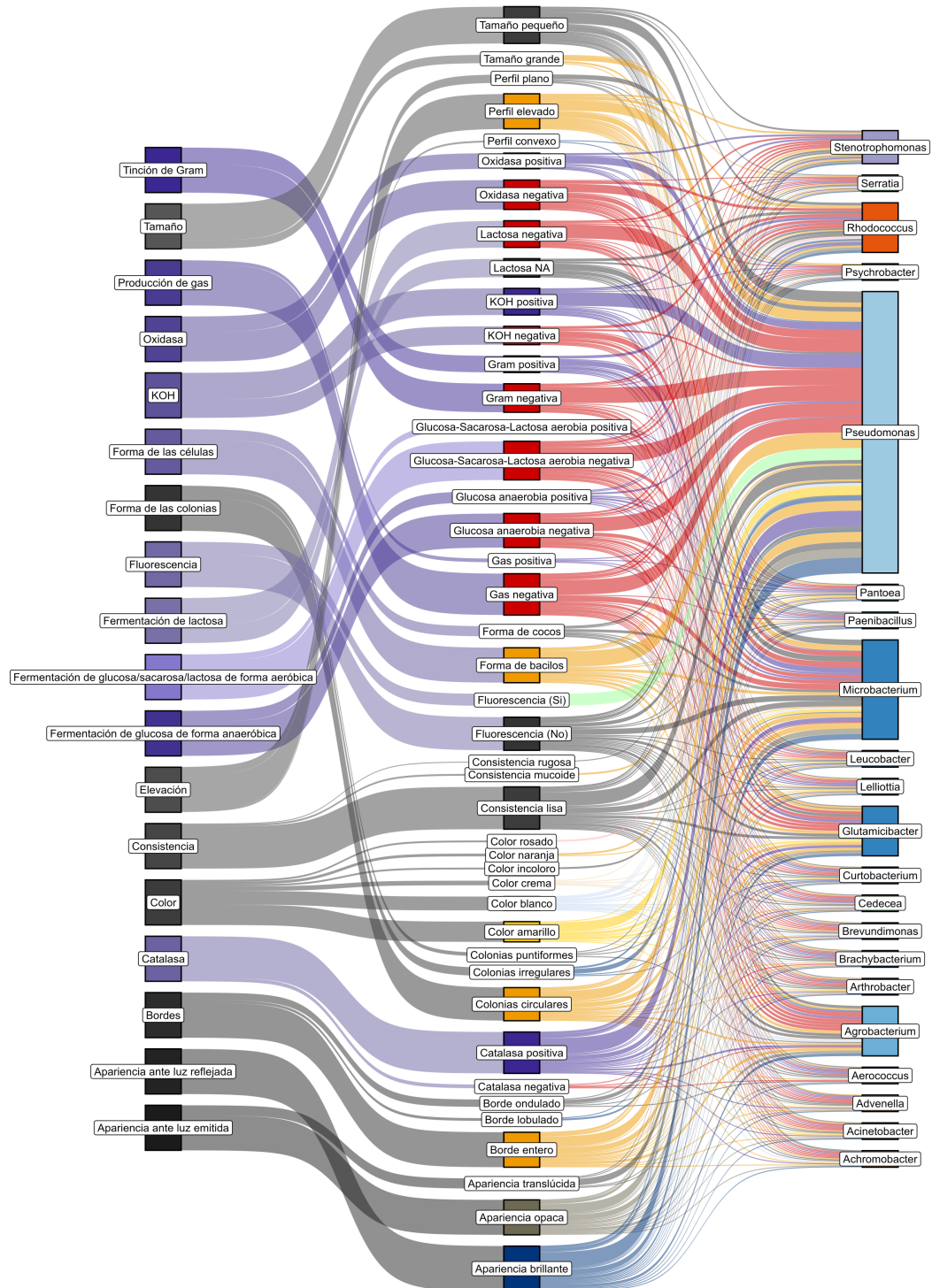


Figura 1.7 Características morfológicas y bioquímicas de los aislamientos correspondientes a los 23 géneros identificados mediante la secuenciación parcial del gen *16S ARNr*. El grosor de las líneas indica la proporción de los aislamientos para cada característica por género.

1.4 DISCUSIÓN

Los aislamientos bacterianos presentaron colonias con características morfológicas diversas, sin embargo, se observó un patrón similar en la mayoría, con predominancia de colonias con forma circular (72.13%), bordes enteros (73.77%), colonias elevadas sobre el medio (62.30%), color amarillo (45.90%), consistencia lisa (95.08%), apariencia opaca frente a la luz emitida a través de las colonias (67.21%), apariencia brillante frente a la luz reflejada (100%) y tamaño pequeño con diámetros < 3 mm (81.97%). Aunque el uso de medios de cultivo no selectivos genera una mayor diversidad en la morfología de los aislamientos en comparación con medios selectivos cuando se cultivan organismos específicos (Sousa et al., 2013), los patrones de crecimiento de diferentes especies pueden ser muy similares como se observó en los resultados. El hecho de observar patrones similares en colonias de diferentes especies, y a la vez, poder encontrar patrones diferentes de una misma cepa bajo condiciones análogas convierte la identificación morfológica de las colonias en un desafío (Sousa et al., 2013). A pesar de los avances moleculares en la identificación bacteriana, la caracterización morfológica continúa siendo útil para brindar información sobre las estrategias de adaptación de las bacterias ante ciertas condiciones, manifestada macroscópicamente a través de alteraciones en las características morfológicas (Sousa et al., 2011), además de ser un complemento para la identificación de la diversidad y la variabilidad dentro de una cepa bacteriana (Qamer et al., 2003).

La gran mayoría de bacterias fitopatógenas son Gram negativas y se encuentran clasificadas dentro del filo Proteobacteria; las bacterias Gram positivas capaces de causar enfermedades en plantas por lo general se encuentran dentro de la clase Actinomycetes y principalmente dentro de los géneros *Streptomyces*, *Rhodococcus* y *Clavibacter* (Eichenlaub & Gartemann, 2011). La mayoría de las bacterias aisladas en este estudio, incluyendo los aislamientos no identificados a nivel de género mediante técnicas moleculares, fueron Gram positivas (59.59%) y solamente 31.51% se clasificaron como Gram negativas, además del 8.90% de los aislamientos sin clasificar. Con la prueba de KOH se determinó que 71.23% de los aislamientos fueron Gram positivos y 28.77% fueron Gram

negativos. Se determinó una correlación significativa con la tinción de Gram, $r = -0.83$; IC95% = $-0.88, -0.77$; $p < 0.001$. Respecto a los 61 aislamientos identificados a nivel de género, se agruparon incorrectamente cuatro aislamientos del género *Pseudomonas*, uno de *Stenotrophomonas*, uno de *Paracidovorax* como KOH negativos, y uno de *Curtobacterium* como KOH positivo (11.48%; N = 61), lo que pudo deberse a factores como la edad del cultivo, la cantidad de bacteria utilizada, la concentración y frescura del KOH o el tipo de bacteria. El método de KOH ha sido descrito junto a la prueba de sensibilidad a la Vancomicina como métodos simples y comparables que pueden ser utilizadas como alternativas o en adición a la tinción de Gram (Arthi et al., 2003; Dash & Payyappilli, 2016; von Graevenitz & Bucher, 1983), aunque pueden agrupar incorrectamente algunos géneros de bacterias (Halebian et al., 1981; Manafi & Kneifel, 1990).

Los métodos semiautomatizados para la determinación de perfiles bioquímicos han sido ampliamente utilizados para la caracterización de bacterias con base en sus características fenotípicas, y han sido combinados con técnicas moleculares para la identificación de bacterias dentro de un enfoque integrado (Bou et al., 2011; Kim et al., 2021; Pinot et al., 2011; Tindall et al., 2007). El sistema VITEK® 2 genera un perfil bioquímico con 47 pruebas estandarizadas y cuenta con una base para la identificación automática de 135 taxones de los bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores de mayor importancia clínica (Pincus, 2006). Sin embargo, la identificación de bacterias de origen ambiental no es precisa debido a las limitaciones de su base de datos (Pinot et al., 2011). En este estudio, las cepas caracterizadas no fueron identificadas de forma precisa por lo que se recomienda utilizar el sistema VITEK® 2 solamente para determinar las características bioquímicas de los aislamientos y no para la identificación de bacterias ambientales.

Mediante las amplificaciones de PCR con cebadores específicos, el género detectado con mayor frecuencia en las muestras de tomate fue *Pseudomonas*, además estuvo presente en muestras de los siete cantones evaluados. Este género está ampliamente distribuido en el mundo y sus especies pueden

colonizar y desarrollarse en un amplio rango de nichos ecológicos como suelo, agua, plantas, animales y humanos (Girard et al., 2021), por lo que no es extraño que sea el género detectado con mayor frecuencia en las plantas evaluadas. Dentro de este género, se detectó la presencia de *P. mediterranea* y *P. syringae* pv. *tomato*, la primera asociada a la necrosis medular (Catara et al., 2002) y la segunda asociada a la mancha bacteriana (Preston, 2000). La especie *P. mediterranea* no cuenta con un registro previo en el país, aunque en el continente americano se ha reportado asociada a la necrosis medular del tomate en Brasil (Rodrigues et al., 2010), Argentina (Alippi & López, 2010), Uruguay (Silvera-Pérez et al., 2023) y Estados Unidos (Searcy et al., 2015; Xu et al., 2013). Aunque *P. mediterranea* fue detectada en 15 plantas (27.27%) mediante los cebadores específicos, no se logró obtener ningún aislamiento de dicha especie. La especie *Pseudomonas syringae* ha sido catalogada como uno de los principales fitopatógenos a nivel mundial por su impacto en la producción agrícola, destacando el impacto económico del patovar *tomato* (Mansfield et al., 2012).

Otro agente patógeno detectado con cebadores específicos fue *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, uno de los principales agentes causales de la pudrición blanda en cultivos de solanáceas incluyendo tomate (Blanco-Meneses et al., 2023; Cubero-Agüero et al., 2021). Esta especie es de especial importancia ya que causa lesiones al tallo y los frutos del tomate durante el cultivo y también durante su transporte y almacenamiento, provoca daños serios en la producción ya que un fruto enfermo puede contaminar al resto de los frutos almacenados (Bhat et al., 2010; Blancard, 2013). Además, se detectó la presencia del género *Xanthomonas* en plantas provenientes de los cantones de Barva y Santa Bárbara en Heredia, Paraíso y Turrialba en Cartago. Este género contiene varias especies involucradas en el desarrollo de enfermedades en plantas de tomate, como *X. perforans*, *X. gardneri*, *X. vesicatoria* y *X. euvesicatoria* (Catara et al., 2021; Strayer-Scherer et al., 2019).

Las co-infecciones por la presencia simultánea de bacterias patogénicas en la planta hospedera pueden generar resultados diversos en cuanto a la severidad

de las enfermedades. El incremento o la disminución de la severidad depende de varios factores, como las interacciones entre los patógenos coexistentes y las interacciones entre los patógenos y el hospedero, los momentos y la extensión de colonización de cada patógeno, entre otros (Sadhukhan et al., 2024). En este estudio se detectó la coexistencia de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pseudomonas mediterranea* en una planta del cantón de Alajuela mediante el uso de cebadores específicos; estas dos especies son capaces de provocar la necrosis medular en tomate, una enfermedad cuya severidad se ve incrementada por las interacciones sinérgicas entre varias especies de patógenos (Aiello et al., 2017; Lamichhane & Venturi, 2015).

También se detectó la coexistencia de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en muestras foliares de una planta del cantón de Turrialba en Cartago, así como *P. syringae* pv. *tomato* y *Xanthomonas* sp. en muestras foliares de una planta del cantón de Santa Bárbara en Heredia; ambas muestras presentaban manchas o pecas en las hojas. En el último caso, Shenge et al. (2008) reportan una dominancia de *P. syringae* pv. *tomato* sobre *X. campestris* pv. *vesicatoria* tanto *in vitro* como *in planta* debido a un crecimiento continuo y más acelerado de las poblaciones de *P. syringae* pv. *tomato*. Si bien es cierto que la coexistencia de especies patogénicas y las infecciones mixtas son comunes en ambientes agrícolas, la mayoría de los estudios y ensayos de patogenicidad se enfocan en una enfermedad causada por una especie patogénica a la vez, por lo que múltiples interacciones y mecanismos de interacción entre varios patógenos y las plantas hospederas permanecen desconocidos (Lamichhane & Venturi, 2015; Sadhukhan et al., 2024).

La complejidad de la comunidad bacteriana identificada con el análisis molecular de la secuencia parcial del gen *16S ARNr* mediante un enfoque dependiente de cultivo fue similar a la reportada por López et al. (2020), quienes aislaron bacterias endófitas en plantas sanas de tomate e identificaron aislamientos pertenecientes a la clase Gammaproteobacteria como la más abundante (71%), seguida del filo Actinobacteria (12.5%), Firmicutes (12.5%) y la clase Alphaproteobacteria (4%). También identificaron aislamientos bacterianos en

plantas enfermas con el síntoma de punto gris, causado por el hongo *Stemphylium* spp., y reportaron mayor abundancia de bacterias del filo Actinobacteria (~60%) (López et al., 2020). Los autores mencionaron que la comunidad bacteriana se ve afectada por el gran impacto que tienen los patógenos fúngicos sobre la cantidad y diversidad de nutrientes, así como los metabolitos secundarios en los tejidos, siendo las bacterias del filo Proteobacteria las más inhibidas (López et al., 2020).

Otros estudios que también reportan mayor abundancia del filo Proteobacteria son el de Dong et al. (2019) quienes identificaron al género *Acinetobacter* como el más abundante en tallos y hojas de forma epífita, y *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas* como los más abundantes de forma endófito en raíz, tallo y hojas; Kim et al. (2006) quienes identificaron al filo Proteobacteria como el más abundante (53%) en muestras de suelo, rizosfera y raíz de plantas de tomate, especialmente las clases Alpha y Gammaproteobacteria; y Uribe-Lorío et al. (2024) quienes realizaron un estudio en 19 cultivos de Costa Rica, e identificaron a la clase Gammaproteobacteria como la más abundante, y dentro de esta al género *Pseudomonas* con 48% del total de aislamientos evaluados, y específicamente en tomate con tres aislamientos de seis (50%).

Aunque el rol que cumplen muchos microorganismos de la filosfera, rizosfera y endosfera en las plantas hospederas no está del todo esclarecido, estudiar las comunidades microbianas genera información crucial para la identificación de candidatos potenciales como agentes de control biológico y promotores de crecimiento (Afzal et al., 2019; Dong et al., 2019). En este estudio se aislaron algunas cepas de géneros o especies que han sido reportados como agentes de control biológico y que presentan una gran relevancia en la protección de cultivos por su actividad antagonista ante organismos patógenos en diversos agroecosistemas incluyendo el cultivo de tomate, entre ellas *Paenibacillus* sp., *Acinetobacter* sp. y *Pantoea vagans* (Afzal et al., 2019; Yuliar et al., 2015).

También se aislaron varias cepas de *Microbacterium* sp., un género de importancia en el sector agrícola por su potencial como promotor de crecimiento (Cordovez et al., 2018); *Advenella kashmirensis*, una bacteria que posee un gran

potencial como agente de biorremediación en suelos contaminados con agroquímicos como el 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil) etano (DDT) (Abbes et al., 2018), y como promotor de crecimiento bajo condiciones de estrés por salinidad (Kuzmina et al., 2022), al igual que *Glutamicibacter halophytocola* (Qin et al., 2018); *Enterobacter asburiae*, que ha sido evaluada como promotor de crecimiento en suelos contaminados con fungicidas debido a su tolerancia y características como la solubilización de fosfatos, presencia de sideróforos y síntesis de ácido indol acético (Ahemad & Khan, 2010); *Curtobacterium oceanosedimentum*, tolerante al cadmio y promotora de crecimiento en chile tabasco (*Capsicum frutescens*) (Patel et al., 2022); *Pseudomonas azotoformans*, promotora de crecimiento que alivia el estrés por sequía (Ansari et al., 2021); y bacterias con genes asociados a la promoción de crecimiento como *Stenotrophomonas geniculata* (Ercole et al., 2024) y *Serratia nematodiphila* (Dastager et al., 2011).

Además de las cepas con potencial como agentes de control biológico y promoción del crecimiento, se aislaron cepas de especies que han sido reportadas como patogénicas en otros cultivos, entre ellas *Pseudomonas alliivorans*, que causa síntomas similares a los de la pudrición del bulbo en cebolla causada por *P. viridiflava* (Zhao et al., 2022), esta última conocida por provocar la necrosis medular en tomate (Alippi et al., 2003); *Pseudomonas capsici*, causante de mancha bacteriana en chile y en tomate (Zhao et al., 2021, 2023); *Pseudomonas straminea*, que ha sido observada en una asociación sinérgica con *Xanthomonas perforans* y otras especies de *Pseudomonas* con un efecto de acentuación de los síntomas de la necrosis medular en tomate (Aiello et al., 2013, 2017); *Lelliottia amnigena*, agente causal de pudrición suave en papa (Osei et al., 2022); y *Cedecea neteri*, patógeno causante de pudriciones en hongos comestibles (Huang et al., 2024; Liu et al., 2021; Yan et al., 2018).

Este estudio presenta una base sobre la estructura de la comunidad bacteriana cultivable en plantas de tomate con infecciones bacterianas colectadas en fincas del Valle Central de Costa Rica con el uso de métodos de evaluación morfológica, bioquímica y molecular. Se reporta la detección de especies

fitopatógenas identificadas mediante la amplificación de ADN por PCR con cebadores específicos. Se reporta la identificación de bacterias endófitas con potencial como agentes de control biológico y promoción de crecimiento que podrían cumplir un papel importante en la defensa de la plata. También se reporta la identificación de especies de importancia agrícola debido al desarrollo de enfermedades tanto en el cultivo de tomate como en otros cultivos, algunas de ellas como *Pseudomonas allivivans* y *P. capsici* reportadas por primera vez para Costa Rica.

1.5 BIBLIOGRAFÍA

- Abbes, C., Mansouri, A., Werfelli, N., & Landoulsi, A. (2018). Aerobic biodegradation of DDT by *Advenella kashmirensis* and its potential use in soil bioremediation. *Soil and Sediment Contamination*, 27(6), 455–468. <https://doi.org/10.1080/15320383.2018.1485629>
- Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S., & S. Gupta, R. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 5575–5599. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>
- Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., & Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, 221, 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- Ahemad, M., & Khan, M. S. (2010). Plant growth promoting activities of phosphate-solubilizing *Enterobacter asburiae* as influenced by fungicides. *EurAsian Journal of Biosciences*, 88–95. <https://doi.org/10.5053/ejobios.2010.4.0.11>
- Aiello, D., Scuderi, G., Vitale, A., Firrao, G., Polizzi, G., & Cirvilleri, G. (2013). A pith necrosis caused by *Xanthomonas perforans* on tomato plants. *European Journal of Plant Pathology*, 137(1), 29–41. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0214-7>
- Aiello, D., Vitale, A., Ruota, A. D. La, Polizzi, G., & Cirvilleri, G. (2017). Synergistic interactions between *Pseudomonas* spp. and *Xanthomonas perforans* in

- enhancing tomato pith necrosis symptoms. *Journal of Plant Pathology*, 99(3), 731–740.
- Alippi, A. M., Dal Bo, E., Ronco, L. B., López, M. V., López, A. C., & Aguilar, O. M. (2003). *Pseudomonas* populations causing pith necrosis of tomato and pepper in Argentina are highly diverse. *Plant Pathology*, 52(3), 287–302. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00850.x>
- Alippi, A. M., & López, A. C. (2010). First report of *Pseudomonas mediterranea* causing tomato pith necrosis in Argentina. *Plant Pathology*, 59(6), 1163. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02291.x>
- Álvarez, A. M. (2004). Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 42(1), 339–366. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140329>
- Ansari, F. A., Jabeen, M., & Ahmad, I. (2021). *Pseudomonas azotoformans* FAP5, a novel biofilm-forming PGPR strain, alleviates drought stress in wheat plant. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 18(12), 3855–3870. <https://doi.org/10.1007/s13762-020-03045-9>
- Arthi, K., Appalaraju, B., & Parvathi, S. (2003). Vancomycin sensitivity and KOH string test as an alternative to Gram staining of bacteria. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 21(2), 121–123. [https://doi.org/10.1016/S0255-0857\(21\)03135-2](https://doi.org/10.1016/S0255-0857(21)03135-2)
- Bhat, K. A., Masood, S. D., Bhat, N. A., Bhat, M. A., Razvi, S. M., Mir, M. R., Akhtar, S., Wani, N., & Habib, M. (2010). Current status of post harvest soft rot in vegetables: a review. *Asian Journal of Plant Sciences*, 9(4), 200–208. <https://doi.org/10.3923/ajps.2010.200.208>
- Blancard, D. (2013). *Tomato diseases: identification, biology and control* (2nd ed.). CRC press.
- Blanco-Meneses, M., Castro-Zúñiga, O., & Calderón-Abarca, A. (2023). Diagnóstico del uso de antibióticos en regiones productoras de tomate en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 47(1), 87–99. <https://doi.org/10.15517/rac.v47i1.53967>
- Bostock, M., Rodden, K., Warne, K., & Russell, K. (2023). *sunburstR: Sunburst “Htmlwidget”*. <https://github.com/timelyportfolio/sunburstR>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>

- Brader, G., Compant, S., Vescio, K., Mitter, B., Trognitz, F., Ma, L.-J., & Sessitsch, A. (2017). Ecology and genomic insights into plant-pathogenic and plant-nonpathogenic endophytes. *Annual Review of Phytopathology*, 55, 61–83. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035641>
- Brenes, L., Jimenez-Morales, M. F., & Gamboa-Murillo, M. (2015). *Diagnóstico de pérdidas y desperdicio alimenticio en dos canales de comercialización de la agrocadena de tomate costarricense para su posterior disminución*. Tecnológico de Costa Rica (TEC). https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/6458/diagnostico_perdidas_desperdicio_alimenticio.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Catara, V., Arnold, D., Cirvilleri, G., & Vivian, A. (2000). Specific oligonucleotide primers for the rapid identification and detection of the agent of tomato pith necrosis, *Pseudomonas corrugata*, by PCR amplification: evidence for two distinct genomic groups. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 753–762. <https://doi.org/10.1023/A:1026507423848>
- Catara, V., Cubero, J., Pothier, J. F., Bosis, E., Bragard, C., Đermić, E., Holeva, M. C., Jacques, M. A., Petter, F., Pruvost, O., Robène, I., Studholme, D. J., Tavares, F., Vicente, J. G., Koebnik, R., & Costa, J. (2021). Trends in molecular diagnosis and diversity studies for phytosanitary regulated *Xanthomonas*. *Microorganisms*, 9(4), 862. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040862>
- Catara, V., Sutra, L., Morineau, A., Achouak, W., Christen, R., & Gardan, L. (2002). Phenotypic and genomic evidence for the revision of *Pseudomonas corrugata* and proposal of *Pseudomonas mediterranea* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1749–1758. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02174-0>
- Cordovez, V., Schop, S., Hordijk, K., Dupré De Boulois, H., Coppens, F., Hanssen, I., Raaijmakers, J. M., Carrión, V. J., & Stabb, E. V. (2018). Priming of plant growth promotion by volatiles of root-associated *Microbacterium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(22), e01865-18. <https://journals.asm.org/journal/aem>
- Cubero-Agüero, D., Brenes-Guillén, L., Vidaurre-Barahona, D., & Uribe-Lorío, L. (2021). *Raoultella terrigena* y *Pectobacterium carotovorum* en hortalizas en dos provincias de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 32(1), 178–195. <https://doi.org/10.15517/am.v32i1.40845>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Dash, C., & Payyappilli, R. J. (2016). KOH string and Vancomycin susceptibility test as an alternative method to Gram staining. *Journal of International*

Medicine and Dentistry, 3(2), 88–90.
<https://doi.org/10.18320/JIMD/201603.0288>

- Dastager, S. G., Deepa, C. K., & Pandey, A. (2011). Potential plant growth-promoting activity of *Serratia nematodiphila* NII-0928 on black pepper (*Piper nigrum* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(2), 259–265. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0454-z>
- Dong, C. J., Wang, L. L., Li, Q., & Shang, Q. M. (2019). Bacterial communities in the rhizosphere, phyllosphere and endosphere of tomato plants. *PLoS ONE*, 14(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223847>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13–15.
- Dreier, J., Bempohl, A., & Eichenlaub, R. (1995). Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, 85(4), 462–468. <https://doi.org/10.1094/Phyto-85-462>
- Eichenlaub, R., & Gartemann, K.-H. (2011). The *Clavibacter michiganensis* subspecies: Molecular investigation of Gram-positive bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 445–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095258>
- Ercole, T. G., Kava, V. M., Petters-Vandresen, D. A. L., Ribeiro, R. A., Hungria, M., & Galli, L. V. (2024). Unveiling agricultural biotechnological prospects: The draft genome sequence of *Stenotrophomonas geniculata* LGMB417. *Current Microbiology*, 81(8), 247. <https://doi.org/10.1007/s00284-024-03784-9>
- Flournoy, D. J., Wongpradit, S., & Silberg, S. L. (1990). Facilitating identification of lactose-fermenting Enterobacteriaceae on MacConkey agar. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, 70, 5–8.
- Girard, L., Lood, C., Höfte, M., Vandamme, P., Rokni-Zadeh, H., van Noort, V., Lavigne, R., & De Mot, R. (2021). The ever-expanding *Pseudomonas* genus: Description of 43 new species and partition of the *Pseudomonas putida* group. *Microorganisms*, 9(8), 1766. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081766>
- Gregersen, T. (1978). Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 5(2), 123–127. <https://doi.org/10.1007/BF00498806>
- Halebian, S., Harris, B., Finegold, S. M., & Rolfe, R. D. (1981). Rapid method that aids in distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 13(3), 444–448. <https://doi.org/10.1128/jcm.13.3.444-448.1981>

- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Huang, Z., Huang, Y., Nie, Y., & Liu, B. (2024). Biological characteristics of two pathogens causing brown blotch in *Agaricus bisporus* and the toxin identification of *Cedecea neteri*. *Phytopathology Research*, 6(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s42483-024-00239-8>
- INEC. (2019). *Encuesta nacional agropecuaria 2018: resultados generales de la actividad agrícola y forestal*. Instituto Nacional de Estadística y Censos.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- Kang, H. W., Kwon, S. W., & Go, S. J. (2003). PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* ssp *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant Pathology*, 52, 127–133. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00822.x>
- Kannan, V. R., Bastas, K. K., & Antony, R. (2016). Plant pathogenic bacteria: An overview. En V. R. Kannan & K. K. Bastas (Eds.), *Sustainable Approaches to Controlling Plant Pathogenic Bacteria*. CRC Press.
- Kassambara, A., & Mundt, F. (2020). *factoextra: Extract and visualize the results of multivariate data analyses* (R package version 1.0.7). <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>
- Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2017). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Kim, H. S., Cheon, W., Lee, Y., Kwon, H.-T., Seo, S.-T., Balaraju, K., & Jeon, Y. (2021). Identification and characterization of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* causing bacterial blight of walnuts in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 37(2), 137–151. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.12.2020.0217>
- Kim, J. S., Dungan, R. S., Kwon, S. W., & Weon, H. Y. (2006). The community composition of root-associated bacteria of the tomato plant. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(12), 1267–1273. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9171-z>
- King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2), 301–307.

- Kuzmina, L. Y., Gilvanova, E. A., Galimzyanova, N. F., Arkhipova, T. N., Ryabova, A. S., Aktuganov, G. E., Sidorova, L. V., Kudoyarova, G. R., & Melent'ev, A. I. (2022). Characterization of the novel plant rowth-stimulating strain *Advenella kashmirensis* IB-K1 and evaluation of its efficiency in saline soil. *Microbiology*, 91(2), 173–183. <https://doi.org/10.1134/S0026261722020072>
- Lamichhane, J. R., & Venturi, V. (2015). Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: A growing trend. *Frontiers in Plant Science*, 6, 385. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00385>
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. En E. Stackebrandt & M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (pp. 115–175). John Wiley and Sons.
- Lee, Y. A., Sung, A. N., Liu, T. F., & Lee, Y. S. (2009). Combination of chromogenic differential medium and estA-specific PCR for isolation and detection of phytopathogenic *Xanthomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21), 6831–6838. <https://doi.org/10.1128/AEM.01653-09>
- Lehman, D. (2005). Triple sugar iron agar protocols. *American Society for Microbiology*, 1–7.
- Leite, R. P., Minsavage, G. V, Bonas, U., & Stall, R. E. (1994). Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the hrp genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(4), 1068–1077. <https://doi.org/10.1128/aem.60.4.1068-1077.1994>
- Lelliott, R. A., Billing, E., & Hayward, A. C. (1966). A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic Pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology*, 29(3), 470–489. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1966.tb03499.x>
- Letunic, I., & Bork, P. (2024). Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae268>
- Liu, Z., Zhou, S., Zhang, W., Wu, S., Chen, X., Wang, X., Hu, H., & Chen, Q. (2021). First report of *Cedecea neteri* causing yellow rot disease in *Pleurotus pulmonarius* in China. *Plant Disease*, 105(4), 1189. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-20-1886-PDN>
- López, M. M., Bertolini, E., Olmos, A., Caruso, P., Gorris, M. T., Llop, P., Penyalver, R., & Cambra, M. (2003). Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. *International Microbiology*, 6(4), 233–243. <https://doi.org/10.1007/s10123-003-0143-y>

- López, S. M. Y., Pastorino, G. N., Fernández-González, A. J., Franco, M. E. E., Fernández-López, M., & Balatti, P. A. (2020). The endosphere bacteriome of diseased and healthy tomato plants. *Archives of Microbiology*, *202*(10), 2629–2642. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01987-9>
- López-Marín, L. M. (2017). *Manual técnico del cultivo del tomate: Solanum lycopersicum*. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA).
- MAG. (2024). *Tomate: Manual de buenas prácticas agrícolas con enfoque de adaptación al cambio climático*.
- Manafi, M., & Kneifel, W. (1990). Rapid methods for differentiating Gram-positive from Gram-negative aerobic and facultative anaerobic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, *69*(6), 822–827. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb01579.x>
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G., & Foster, G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, *13*(6), 614–629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
- Monteiro, F. P. (2019). Pith necrosis associated with *Pseudomonas viridiflava* in tomato plants in Brazil. *Plant Pathology & Quarantine*, *9*(1), 1–5. <https://doi.org/10.5943/ppq/9/1/1>
- Nassar, A., Darrasse, A., Lemattre, M., Kotoujansky, A., Dervin, C., Vedel, R., & Bertheau, Y. (1996). Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR- amplified fragments of pel genes. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(7), 2228–2235. <https://doi.org/10.1128/aem.62.7.2228-2235.1996>
- Osei, R., Yang, C., Cui, L., Ma, T., Li, Z., & Boamah, S. (2022). Isolation, identification, and pathogenicity of *Lelliottia amnigena* causing soft rot of potato tuber in China. *Microbial Pathogenesis*, *164*, 105441. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105441>
- Patel, M., Patel, K., Al-Keridis, L. A., Alshammari, N., Badraoui, R., Elsbali, A. M., Al-Soud, W. A., Hassan, M. I., Yadav, D. K., & Adnan, M. (2022). Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria *Curtobacterium oceanosedimentum* improves growth attributes and strengthens antioxidant system in chili (*Capsicum frutescens*). *Sustainability*, *14*(7). <https://doi.org/10.3390/su14074335>
- Pebesma, E. (2018). Simple features for R: Standardized support for spatial vector data. *The R Journal*, *10*(1), 439–446. <https://doi.org/10.32614/RJ-2018-009>

- Pincus, D. H. (2006). Microbial identification using the bioMérieux VITEK® 2 system. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*. Bethesda, MD: Parenteral Drug Association, 1–32.
- Pinot, C., Deredjian, A., Nazaret, S., Brothier, E., Cournoyer, B., Segonds, C., & Favre-Bonté, S. (2011). Identification of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from environmental and clinical samples: A rapid and efficient procedure. *Journal of Applied Microbiology*, 111(5), 1185–1193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05120.x>
- Preston, G. M. (2000). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: the right pathogen, of the right plant, at the right time. *Molecular Plant Pathology*, 1(5), 263–275. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2000.00036.x>
- Qamer, S., Sandoe, J. A. T., & Kerr, K. G. (2003). Use of colony morphology to distinguish different enterococcal strains and species in mixed culture from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2644–2646. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2644-2646.2003>
- Qin, S., Feng, W.-W., Zhang, Y.-J., Wang, T.-T., Xiong, Y.-W., Xing, K., Qin, C., Feng, S., Zhang, W.-W., Wang, Y.-J., Xiong, T.-T., Diversity, X. K. 2018, & Cann, I. (2018). Diversity of bacterial microbiota of coastal halophyte *Limonium sinense* and amelioration of salinity stress damage by symbiotic plant growth-promoting actinobacterium *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(01533–18), e01533-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01533-18>
- R Core Team. (2024). *R: A language and environment for statistical computing*. <https://www.R-project.org/>
- 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*, 34(2), 173–183. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1511-3>
- Rodrigues, L. M. R., Destéfano, S. A. L., Beriam, L. O. S., & Rodrigues-Neto, J. (2010). Occurrence of *Pseudomonas mediterranea* on tomato in Brazil. *Plant Pathology*, 59(4), 797–797. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02237.x>
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>

- Saborío-Arguello, D. (2021). *Manual de manejo postcosecha del tomate fresco en Costa Rica*. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA).
- Sadhukhan, S., Jacques, M.-A., & Potnis, N. (2024). Influence of co-occurring weakly pathogenic bacterial species on bacterial spot disease dynamics on tomato. *Plant Disease*, *108*(1), 190–199. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-23-0837-RE>
- Samson, R., Legendre, J. B., Christen, R., Saux, M. F.-L., Achouak, W., & Gardan, L. (2005). Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zea* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *55*(4), 1415–1427. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02791-0>
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, *94*(3), 441–448. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Scarlett, C. M., Fletcher, J. T., Roberts, P., & Lelliot, R. A. (1978). Tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas corrugata* n. sp. *Annals of Applied Biology*, *88*(1), 105–114. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1978.tb00684.x>
- Schaad, N. W. (2001). Initial identification of common genera. En N. W. Schaad, J. B. Jones, & W. Chun (Eds.), *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria* (3rd ed.). APS Press.
- Searcy, J. V. K., Smith, S., Gitaitis, R. D., & Dutta, B. (2015). First report of tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas mediterranea* in Georgia, USA. *Plant Disease*, *100*(2), 518. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-15-0715-PDN>
- SFE. (2009). *Lista de enfermedades de los cultivos agrícolas y forestales de Costa Rica, 2009*.
- Shenge, K. C., Mabagala, R. B., & Mortensen, C. N. (2008). Coexistence between neighbours: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, incitants of bacterial speck and

- spot diseases of tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 41(8), 559–571. <https://doi.org/10.1080/03235400600881752>
- Silvera-Pérez, E., Maeso, D., Catara, V., Rubio, L., Leoni, C., Amaral, J., Estelda, C., Hernández, M., Bóffano, L., & González, P. (2023). *Pseudomonas* spp. associated with tomato pith necrosis in the Salto area, Northwest Uruguay. *European Journal of Plant Pathology*, 165(4), 715–724. <https://doi.org/10.1007/s10658-023-02639-6>
- Sjoberg, D. (2024). *ggsankey: Sankey, alluvial and sankey bump plots* (R package version 0.0.99999). <https://github.com/davidsjoberg/ggsankey>
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of next-generation sequencing technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, 122(1), e59. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>
- Sousa, A. M., Machado, I., Nicolau, A., & Pereira, M. O. (2013). Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling. *Journal of Microbiological Methods*, 95(3), 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.09.020>
- Sousa, A. M., Machado, I., & Pereira, M. O. (2011). Phenotypic switching: an opportunity to bacteria thrive. En *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. (Vol. 1, pp. 252–262).
- Strange, R. N., & Scott, P. R. (2005). Plant disease: a threat to global food security. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 83–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839>
- Strayer-Scherer, A., Liao, Y.-Y., Abrahamian, P., Timilsina, S., Paret, M., Momol, T., Jones, J., & Vallad, G. (2019). *Integrated management of bacterial spot on tomato in Florida*. <https://edis.ifas.ufl.edu>
- Sundström, J. F., Albiñ, A., Boqvist, S., Ljungvall, K., Marstorp, H., Martiin, C., Nyberg, K., Vågsholm, I., Yuen, J., & Magnusson, U. (2014). Future threats to agricultural food production posed by environmental degradation, climate change, and animal and plant diseases – a risk analysis in three economic and climate settings. *Food Security*, 6(2), 201–215. <https://doi.org/10.1007/s12571-014-0331-y>
- Tindall, B. J. (2014). The family name Solimonadaceae Losey et al. 2013 is illegitimate, proposals to create the names ‘*Sinobacter soli*’ comb. nov. and ‘*Sinobacter variicoloris*’ contravene the Code, the family name Xanthomonadaceae Saddler and Bradbury 2005 and the order name Xanthomonadales Saddler and Bradbury 2005 are illegitimate and notes on the application of the family names Solibacteraceae Zhou et al. 2008, Nevskiaceae Henrici and Johnson 1935 (Approved Lists 1980) and Lysobacteraceae Christensen and Cook 1978 (Approved Lists 1980) and

- order name *Lysobacteriales* Christensen and Cook 1978 (Approved Lists 1980) with respect to the classification of the corresponding type genera *Solibacter* Zhou et al. 2008, *Nevskia* Famintzin 1892 (Approved Lists 1980) and *Lysobacter* Christensen and Cook 1978 (Approved Lists 1980) and importance of accurately expressing the link between a taxonomic name, its authors and the corresponding description/circumscription/emendation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 293–297. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.057158-0>
- Tindall, B. J., Sikorski, J., Smibert, R. A., & Krieg, N. R. (2007). Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. En C. A. Reddy, T. J. Beveridge, J. A. Breznak, G. A. Marzluf, T. M. Schmidt, & L. R. Snyder (Eds.), *Methods for General and Molecular Microbiology* (3rd ed., pp. 330–393). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555817497.ch15>
- Trantas, E. A., Sarris, P. F., Mpalantinaki, E. E., Pentari, M. G., Ververidis, F. N., & Goumas, D. E. (2013). A new genomovar of *Pseudomonas cichorii*, a causal agent of tomato pith necrosis. *European Journal of Plant Pathology*, 137(3), 477–493. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0258-8>
- Trantas, E. A., Sarris, P. F., Pentari, M. G., Mpalantinaki, E. E., Ververidis, F. N., & Goumas, D. E. (2015). Diversity among *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea* isolated from tomato and pepper showing symptoms of pith necrosis in Greece. *Plant Pathology*, 64(2), 307–318. <https://doi.org/10.1111/ppa.12261>
- Trout, C. L., Ristaino, J. B., Madritch, M., & Wangsomboondee, T. (1997). Rapid detection of *Phytophthora infestans* in late blight-infected potato and tomato using PCR. *Plant Disease*, 81(9), 1042–1048. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.9.1042>
- Tsrer Lahkim, L., Erlich, O., Hazanovsky, M., Ben Daniel, B., Zig, U., & Lebiush, S. (2012). Detection of *Dickeya* spp. latent infection in potato seed tubers using PCR or ELISA and correlation with disease incidence in commercial field crops under hot-climate conditions. *Plant Pathology*, 61(1), 161–168. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02492.x>
- Uribe-Lorío, L., Uribe, L., Rodríguez, C., García, F., & Aráuz, L. F. (2024). Diversidad y resistencia a antibióticos en bacterias asociadas a síntomas de infección bacteriana en cultivos de Costa Rica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 42(2), 13. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2305-5>
- von Graevenitz, A., & Bucher, C. (1983). Accuracy of the KOH and vancomycin tests in determining the Gram reaction of non-enterobacterial rods. *Journal of Clinical Microbiology*, 18(4), 983–985. <https://doi.org/10.1128/jcm.18.4.983-985.1983>

- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. Springer-Verlag New York. <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Widmer, F., Seidler, R. J., Gillevet, P. M., Watrud, L. S., & Di Giovanni, G. D. (1998). A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas (sensu stricto)* in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(7), 2545–2553. <https://doi.org/10.1128/aem.64.7.2545-2553.1998>
- Xu, X., Baysal-Gurel, F., & Miller, S. A. (2013). First report of tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas mediterranea* in the United States and *P. corrugata* in Ohio. *Plant Disease*, *97*(7), 988–988. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-12-1208-PDN>
- Yan, J. J., Chen, B. Z., Wang, R. Q., Liu, F., Wei, Q., Xie, B. G., & Jiang, Y. J. (2018). First report of *Cedecea neteri* -induced soft rot disease of *Pholiota nameko* in China. *Plant Disease*, *102*(10), 2025–2025. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-17-1951-PDN>
- Yuliar, Asi Nion, Y., & Toyota, K. (2015). Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes and Environments*, *30*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14144>
- Zaccardelli, M., Spasiano, A., Bazzi, C., & Merighi, M. (2005). Identification and in planta detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using PCR amplification of hrpZPst. *European Journal of Plant Pathology*, *111*(1), 85–90. <https://doi.org/10.1007/s10658-004-2734-7>
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational biology*, *7*(1–2), 203–214.
- Zhao, M., Gitaitis, R., & Dutta, B. (2023). Characterization of *Pseudomonas capsici* strains from pepper and tomato. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1267395. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1267395>
- Zhao, M., Koirala, S., Chen, H.-C., Gitaitis, R., Kvitko, B., & Dutta, B. (2021). *Pseudomonas capsici* sp. nov., a plant-pathogenic bacterium isolated from pepper leaf in Georgia, USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *71*(8), 004971. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004971>
- Zhao, M., Tyson, C., Chen, H.-C., Paudel, S., Gitaitis, R., Kvitko, B., & Dutta, B. (2022). *Pseudomonas alliivorans* sp. nov., a plant-pathogenic bacterium isolated from onion foliage in Georgia, USA. *Systematic and Applied Microbiology*, *45*(1), 126278. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126278>

1.6 ANEXOS

Cuadro S1.1 Cepas de referencia utilizadas en el análisis filogenético para la identificación de los aislamientos bacterianos. Se utilizaron las secuencias parciales del gen *16S ARNr* de cepas tipo depositadas en la base de datos del GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

Espece	Cepa	Accesión
<i>Achromobacter agilis</i>	LMG 3411 ^T	NR_152013
<i>Achromobacter animicus</i>	R-46662 ^T	NR_117615
<i>Achromobacter deleyi</i>	LMG 3458 ^T	NR_152014
<i>Achromobacter mucicolens</i>	R-46658 ^T	NR_117613
<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	MTCC 11365 ^T	AB859736
<i>Acinetobacter proteolyticus</i>	NIPH 809 ^T	NR_148846
<i>Acinetobacter rudis</i>	G30 ^T	NR_115988
<i>Advenella kashmirensis</i>	WT001 ^T	AJ864470
<i>Aerococcus urinaeequi</i>	IFO 12173 ^T	D87677
<i>Aerococcus viridans</i>	ATCC 11563 ^T	M58797
<i>Agrobacterium cavarae</i>	RZME10 ^T	MK940276
<i>Agrobacterium larrymoorie</i>	AF3.10 ^T	NR_026519
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	ATCC 4720 ^T	MT534522
<i>Arthrobacter globiformis</i>	JCM 1332 ^T	NR_112192
<i>Arthrobacter rhombi</i>	F98.3HR69 ^T	NR_026448
<i>Brachybacterium horti</i>	THG-S15-4 ^T	NR_147735
<i>Brachybacterium rhamnosum</i>	H-6S ^T	NR_042109
<i>Brachybacterium squillarum</i>	M-6-3 ^T	NR_117297
<i>Brevundimonas naejangsanensis</i>	DSM 23858 ^T	OM074022
<i>Brevundimonas olei</i>	MJ15 ^T	NR_117268
<i>Cedecea davisae</i>	DSM 4568 ^T	NR_025243
<i>Cedecea lapagei</i>	DSM 4587 ^T	NR_126317
<i>Cedecea neteri</i>	JCM 7582 ^T	LC504043
<i>Cedecea sulfonilyureivorans</i>	LAM2020 ^T	MW429197
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	DSM 46364 ^T	NR_036892
<i>Curtobacterium citreum</i>	DSM 20528 ^T	NR_026156
<i>Curtobacterium gossypii</i>	VK105 ^T	NR_181607
<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	ATCC 31317 ^T	NR_104839
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	DSM 4610 ^T	AJ233412
<i>Enterobacter asburiae</i>	ATCC 35953 ^T	OP818065
<i>Enterobacter huaxiensis</i>	090008 ^T	MK049964
<i>Enterobacter roggenkampii</i>	DSM 16690 ^T	CP017184
<i>Enterobacter soli</i>	ATCC BAA-2102 ^T	NR_117547
<i>Glutamicibacter halophytocola</i>	KLBMP 5180 ^T	MK424284
<i>Glutamicibacter mishrai</i>	S5-52 ^T	NR_169398
<i>Glutamicibacter mysorens</i>	DSM 12798 ^T	NR_025613

Especie	Cepa	Accesión
<i>Glutamicibacter nicotianae</i>	DSM 20123 ^T	NR_026190
<i>Klebsiella aerogenes</i>	NBRC 13534 ^T	KP764198
<i>Kluyvera intermedia</i>	NBRC 102594 ^T	AB681871
<i>Lelliottia amnigena</i>	JCM 1237 ^T	AB004749
<i>Leucobacter tardus</i>	K 70/01 ^T	NR_042694
<i>Microbacterium algeriense</i>	G1 ^T	MK480726
<i>Microbacterium aquilitoris</i>	KSW-18 ^T	OR039656
<i>Microbacterium arborescens</i>	DSM 20754 ^T	NR_029265
<i>Microbacterium foliorum</i>	DSM 12966 ^T	MW578384
<i>Microbacterium galbinum</i>	KSW2-24 ^T	MW703968
<i>Microbacterium hydrocarbonoxidans</i>	NBRC 103074 ^T	MK424288
<i>Microbacterium imperiale</i>	DSM 20530 ^T	X77442
<i>Microbacterium koreense</i>	JS53-2 ^T	NR_043304
<i>Microbacterium oleivorans</i>	BAS69 ^T	NR_042262
<i>Microbacterium oxydans</i>	DSM 20578 ^T	MH321609
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	DSM 13468 ^T	MK424292
<i>Microbacterium saperdae</i>	IFO 15038 ^T	NR_024637
<i>Microbacterium sorbitolivorans</i>	SZDIS-1-1 ^T	NR_153688
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	NBRC 15957 ^T	OQ876690
<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	NBRC 15959 ^T	NR_113828
<i>Paenibacillus tundrae</i>	A10b ^T	MN728277
<i>Paenibacillus tylopili</i>	MK2 ^T	NR_115990
<i>Pantoea agglomerans</i>	DSM 3493 ^T	NR_041978
<i>Pantoea ananatis</i>	LMG 2665 ^T	Z96081
<i>Pantoea conspicua</i>	LMG 24534 ^T	NR_116247
<i>Pantoea deleyi</i>	LMG 24200 ^T	NR_116114
<i>Pantoea vagans</i>	LMG 24199 ^T	EF688012
<i>Paracidovorax avenae</i>	ATCC 19860 ^T	AF078759
<i>Paracidovorax oryzae</i>	ATCC 19882 ^T	NR_043752
<i>Paracidovorax valerianellae</i>	DSM 16619 ^T	KF931150
<i>Paracidovorax wautersii</i>	NF 1078 ^T	NR_109656
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliense</i>	212 ^T	JF926716
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	DSM 30168 ^T	NR_041971
<i>Pseudomonas alliivorans</i>	20GA0068 ^T	NR_181670
<i>Pseudomonas argentinensis</i>	CH01 ^T	NR_043115
<i>Pseudomonas asturiensis</i>	LPPA 221 ^T	NR_108461
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	IAM 1603 ^T	D84009
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	DBK11 ^T	AF100321
<i>Pseudomonas californiensis</i>	CDFA601 ^T	OL780805
<i>Pseudomonas capsici</i>	Pc19-1 ^T	NR_181640
<i>Pseudomonas caspiana</i>	FBF102 ^T	HG805773
<i>Pseudomonas ceruminis</i>	BML-PP028 ^T	MT498800
<i>Pseudomonas cichorii</i>	CFBP 2101 ^T	NR_117824
<i>Pseudomonas cichorii</i>	ATCC 10857 ^T	NR_112070
<i>Pseudomonas corrugata</i>	ATCC 29736 ^T	D84012

Especie	Cepa	Accesión
<i>Pseudomonas cremoricolorata</i>	DSM 17059 ^T	NR_104279
<i>Pseudomonas flavescens</i>	B62 ^T	U01916
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	IAM 12022 ^T	D84013
<i>Pseudomonas fulva</i>	IAM 1529 ^T	NR_115610
<i>Pseudomonas graminis</i>	DSM 11363 ^T	NR_026395
<i>Pseudomonas japonica</i>	NBRC 103040 ^T	KT825519
<i>Pseudomonas koreensis</i>	Ps 9-14 ^T	AF468452
<i>Pseudomonas lactis</i>	DSM 29167 ^T	NR_156986
<i>Pseudomonas lijiangensis</i>	LJ2 ^T	MZ723343
<i>Pseudomonas marginalis</i>	LMG 2210 ^T	Z76663
<i>Pseudomonas mediterranea</i>	CFBP 5447 ^T	AF386080
<i>Pseudomonas monteilii</i>	CIP 104883 ^T	NR_024910
<i>Pseudomonas multiresinivorans</i>	ATCC 700690 ^T	NR_119225
<i>Pseudomonas nitritireducens</i>	WZBFD3-52A ^T	NR_133020
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	NBRC 12694 ^T	NR_113601
<i>Pseudomonas ovata</i>	F51 ^T	NR_180078
<i>Pseudomonas palmensis</i>	BBB001 ^T	NR_181427
<i>Pseudomonas parafulva</i>	JCM 11224 ^T	LC507438
<i>Pseudomonas parafulva</i>	NBRC 16636 ^T	NR_104278
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	NBRC 103162 ^T	NR_114226
<i>Pseudomonas punonensis</i>	LMT03 ^T	NR_109583
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 12633 ^T	MG708344
<i>Pseudomonas qingdaonensis</i>	JJ3 ^T	NR_169411
<i>Pseudomonas quasicaspiana</i>	CDFA 553 ^T	OL780796
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	ATCC 13522 ^T	AB021402
<i>Pseudomonas straminea</i>	JCM 2783 ^T	LC420056
<i>Pseudomonas straminea</i>	NBRC 16665 ^T	NR_113859
<i>Pseudomonas synxantha</i>	IAM 12356 ^T	D84025
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	DC3000	AE016853
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	NCPPB 281 ^T	DQ318866
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	ATCC 13223 ^T	NR_114482
<i>Psychrobacter faecalis</i>	DSM 14664 ^T	NR_118025
<i>Psychrobacter pulmonis</i>	CCUG 46240 ^T	NR_118026
<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	UQRS 461 ^T	NR_134148
<i>Ralstonia solanacearum</i>	LMG 2299 ^T	EF016361
<i>Ralstonia syzygii</i>	ATCC 49543 ^T	AB021403
<i>Raoultella terrigena</i>	ATCC 33257 ^T	MG846020
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	JCM 3201 ^T	AB429546
<i>Rhodococcus globerulus</i>	DSM 43954 ^T	KF410361
<i>Rhodococcus qingshengii</i>	JCM 15477 ^T	CP096563
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 13880 ^T	PP112078
<i>Serratia nematodiphila</i>	DSM 21420 ^T	PP068848
<i>Serratia nematodiphila</i>	DZ0503SBS1 ^T	NR_044385
<i>Serratia nevei</i>	LMG 31536 ^T	CP149940
<i>Serratia sarumanii</i>	K-M0706 ^T	CP124750
<i>Serratia surfactantfaciens</i>	YD25 ^T	NR_169468

Especie	Cepa	Accesión
<i>Stenotrophomonas cyclobalanopsidis</i>	TPQG1-4 ^T	NR_180613
<i>Stenotrophomonas geniculata</i>	ATCC 19374 ^T	MT672503
<i>Stenotrophomonas humi</i>	DSM 18929 ^T	MW629800
<i>Stenotrophomonas indicatrix</i>	WS40 ^T	KJ452162
<i>Stenotrophomonas lactitubi</i>	M15 ^T	NR_179509
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	IAM 12423 ^T	NR_041577
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ATCC 13637 ^T	NR_112030
<i>Stenotrophomonas nematodicola</i>	W5 ^T	NR_181111
<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	LMG 25348 ^T	NR_118008
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	e-p10 ^T	NR_121739
<i>Xanthomonas campestris</i>	LMG 568 ^T	X95917
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	NCPPB 2968 ^T	KU301881
<i>Xanthomonas gardneri</i>	DSM 19127 ^T	FR749911
<i>Xanthomonas perforans</i>	NCPPB 4321 ^T	KU301893
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	ATCC 35937 ^T	Y10761
<i>Bacillus subtilis</i> ^{GE}	IAM 12118 ^T	AB042061

^T = Cepa tipo. ^{GE} = Grupo externo

Prueba fisiológica/bioquímica											II		III		IV		
	49.1.1	78.2.3	14.2.2	14.3.1	13.1.3	78.2.1	40.2.3	32.2.1	78.1.1	13.1.2	78.3.2	78.1.2	78.2.2	71.3.2	74.3.1	72.2.1	78.3.1
Palatinosa (PLE)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Tirosina Arilamidasa (TyrA)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Ureasa (URE)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
D-Sorbitol (dSOR)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Sacarosa/Sucrosa (SAC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
D-Tagatosa (dTAG)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D-Trehalosa (dTRE)	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Citrato (CIT)	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
Malonato (MNT)	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
5-Keto-D-Gluconato (5KG)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Alcalinización de L-Lactato (ILATk)	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Alfa-Glucosidasa (AGLU)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Alcalinización de Succinato (SUCT)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
Beta-N-Acetil-Galactosaminidasa (NAGA)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Alfa-Galactosidasa (AGAL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Fosfatasa (PHOS)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Glicina Arilamidasa (GlyA)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Ornitina decarboxilasa (ODC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Lisina decarboxilasa (LDC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Asimilación de L-Histidina (IHISa)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumarato (CMT)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
Beta-Glucuronidasa (BGUR)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Resistencia O/129 (O129R)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Glu-Gli-Arg-Arilamidasa (GGAA)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Asimilación de L-Malato (IMLTa)	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ellman (ELLM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
Asimilación de L-Lactato (ILATa)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Resultado positivo (+); resultado negativo (-).

CAPÍTULO 2: Bacterias causantes de necrosis medular y decoloración de tejido en plantas de tomate en el Valle Central de Costa Rica

2.1 INTRODUCCIÓN

El tomate es un cultivo susceptible a múltiples enfermedades provocadas por patógenos de origen bacteriano; en Costa Rica se reportan algunas enfermedades frecuentes como la marchitez o maya bacteriana causada por el complejo de especies de *Ralstonia*, la pudrición blanda causada por *Pectobacterium* sp., la peca bacteriana provocada por *Pseudomonas* sp., y la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas* sp. (Blanco-Meneses et al., 2023; MAG, 2024; SFE, 2009). Además de estas enfermedades, existen algunas que no se reportan con tanta frecuencia en los cultivos o que simplemente no se han registrado en el país. Tal es el caso de la necrosis medular del tomate, cuyo síntoma característico ha sido observado de forma recurrente en muestras colectadas entre 2021 y 2023 en diferentes localidades del Valle Central de Costa Rica.

La necrosis medular del tomate fue descrita en Reino Unido en la década de 1970 causada por *Pseudomonas corrugata* (Scarlett et al., 1978), y se dispersó rápidamente por varios países de Europa (Blancard, 2013). Actualmente, la necrosis medular es una enfermedad que se distribuye en la mayoría de las áreas productoras de tomate alrededor del mundo y afecta principalmente las plantaciones en invernadero, aunque los daños en campo pueden ser sustanciales (Blancard, 2013; Silvera-Pérez et al., 2023). Además de *P. corrugata*, se han reportado múltiples agentes causales de esta enfermedad, entre ellos varias especies de *Pseudomonas* como *P. mediterranea* (Catara et al., 2002), *P. cichorii* (Trantas et al., 2013), *P. viridiflava* (Monteiro, 2019), *P. marginalis* (Bella & Catara, 2010; Silvera-Pérez et al., 2023), *P. fluorescens* y *P. putida* (Mota et al., 2021), además de especies de otros géneros como *Xanthomonas perforans* (Aiello et al., 2013) y *Pectobacterium carotovorum* (Caruso et al., 2016). Aunque los agentes causales de la necrosis medular son

considerados patógenos débiles y oportunistas (Catara, 2007), la incidencia puede ser del 10-100% de la plantación, según la especie patógena, el entorno, el sistema de cultivo y las prácticas de manejo utilizadas (Bella & Catara, 2010; Catara, 2007; Lai et al., 1983; Scarlett et al., 1978); y se han registrado pérdidas en tamaño y peso de los frutos por planta hasta del 20% (Moura et al., 2005).

Los síntomas principales de la enfermedad en plantas de tomate se manifiestan inicialmente como un marchitamiento y clorosis en las hojas jóvenes; el síntoma característico son las lesiones necróticas en la médula, que pueden presentar una coloración marrón oscura y una apariencia desagregada seca o acuosa que se extienden longitudinalmente en el interior del tallo; también pueden aparecer manchas necróticas en la parte externa del tallo y pueden formarse raíces adventicias incluso hasta dos metros por encima del suelo; las raíces bajo el suelo también pueden verse afectadas por la necrosis de forma ocasional (Catara, 2007; Trantas et al., 2015). En infecciones severas la marchitez es generalizada y conduce a la muerte de las plantas (Silvera-Pérez et al., 2023). La enfermedad se desarrolla desde la base del tallo y se extiende hacia las partes aéreas de la planta; la detección de los síntomas, generalmente, sucede muy tarde en el ciclo productivo del hospedero, afectando la cosecha (Blancard, 2013; Silvera-Pérez et al., 2023). Varios factores son detonantes para el desarrollo de la enfermedad, las condiciones climáticas húmedas, el exceso de irrigación y de nitrógeno, la presencia de agua libre en la superficie de las plantas y las heridas ocasionadas por el deshoje pueden aumentar la incidencia y severidad de la enfermedad (Blancard, 2013).

Pseudomonas corrugata ha sido la principal especie asociada a la enfermedad desde su descripción, esta especie se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial en la mayoría de los países productores de tomate (CABI 2022). En el continente americano *P. corrugata* se ha registrado en Brasil (Quezado-Duval et al., 2007), Argentina (Alippi et al., 2003), Uruguay (Silvera-Pérez et al., 2023), México (Rodríguez-Alvarado et al., 2002) y Estados Unidos (Bond & Black, 1986; Jones, 1983; Lai et al., 1983; Powell et al., 2013; Xu et al., 2013). En Costa Rica no existen reportes oficiales de las especies causales de la necrosis medular del tomate, aunque un estudio realizado en 2012 reportó inoculaciones en plantas

de tomate con una cepa de *P. corrugata* identificada mediante el sistema Biolog™ (Henreaux, 2012); y otro estudio identificó una cepa de *P. corrugata* en cultivo de calabacín (*Cucurbita pepo*) con síntomas de pudrición blanda mediante el mismo sistema de identificación (Uribe-Lorío et al., 2024); además, el Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica (MAG) y el Servicio Fitosanitario del Estado (SFE) (MAG, 2024; SFE, 2009) reportan a *P. corrugata* como el agente causal de la necrosis medular del tomate en el país. Sin embargo, no existen estudios dirigidos a la identificación de la especie o especies causales de la necrosis medular del tomate mediante técnicas moleculares en el país.

Entre las técnicas moleculares para la identificación de bacterias patogénicas, el análisis de secuencias multilocus (MLSA) ha sido un método confiable utilizado para la reconstrucción filogenética de especies bacterianas estrechamente relacionadas (Gevers et al., 2005; Girard et al., 2021). El enfoque multilocus utiliza las secuencias concatenadas de varios genes de mantenimiento (“housekeeping genes”) para realizar la reconstrucción filogenética y brinda una mayor confiabilidad comparado con la inferencia filogenética con un solo gen, como el *16S ARNr* (Girard et al., 2021). Los genes de mantenimiento más utilizados para la reconstrucción filogenética de especies del género *Pseudomonas* son la subunidad B de la ADN girasa (*gyrB*), el factor sigma de la ARN polimerasa (*rpoD*) y la subunidad beta de la ARN polimerasa (*rpoB*) (Girard et al., 2020; Mulet et al., 2010; Silvera-Pérez et al., 2023; Trantas et al., 2013, 2015; Zhao et al., 2023).

El objetivo de este capítulo fue determinar la patogenicidad de 13 cepas bacterianas aisladas de plantas de tomate con síntomas de infecciones bacterianas provenientes de diferentes localidades del Valle Central de Costa Rica, inoculadas en dos variedades de tomate y evaluadas bajo condiciones de invernadero. Las pruebas de patogenicidad fueron dirigidas para evaluar la necrosis medular y síntomas similares como la decoloración del tejido interno. Además, se identificaron las cepas más virulentas mediante un análisis filogenético de secuencias multilocus (MLSA).

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Aislamientos bacterianos y material vegetal

Se evaluaron 13 cepas de bacterias Gram negativas aisladas de plantas de tomate con síntomas de infecciones bacterianas, colectadas en cinco cantones del Valle Central de Costa Rica. Las cepas bacterianas fueron identificadas previamente mediante la secuenciación parcial del gen *16S ARNr* (**Cuadro 2.1**). El inóculo se preparó con aislamientos puros de 24 horas de crecimiento en medio de agar tripticasa soya (ATS); las colonias bacterianas se suspendieron en buffer fosfato salino (PBS) hasta alcanzar una turbidez de 0.50-0.63 en escala de McFarland, equivalente a 1×10^8 UFC/ml, medida con el turbidímetro DensiCheck™ (bioMérieux). Además, se realizó un recuento de las suspensiones bacterianas mediante diluciones seriadas y siembra en medio ATS incubado a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas con el fin de confirmar la concentración de cada solución.

Se utilizaron dos variedades de tomate para realizar los ensayos de patogenicidad, la variedad comercial “JR”, que es una variedad susceptible a las enfermedades bacterianas del tomate, y la variedad “Acorazado” desarrollada por el programa de mejoramiento de tomate de la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno (EEAFBM-UCR), que cuenta con genes de resistencia a *Ralstonia solanacearum* filotipo I y al virus de la cuchara (TYLCV). Las plántulas se encontraban en un estadio de tres a cuatro hojas verdaderas (cinco semanas) y se mantuvieron en macetas plásticas de 12.8x10 cm con suelo esterilizado, desde el momento del trasplante hasta la evaluación de la prueba.

Cuadro 2.1 Cepas evaluadas en las pruebas de patogenicidad. Se muestra la identidad más cercana de las cepas con base en la secuencia parcial del gen *16S ARNr* comparadas con cepas tipo de la base de datos de GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

Cepa	Cantón	Provincia	Cepa tipo más cercana (blastn - GenBank)	Porcentaje de identidad (%)
LTM 13.1.2	Paraíso	Cartago	<i>Pseudomonas alliivorans</i> 20GA0068 ^T	99.85
LTM 14.2.2	Paraíso	Cartago	<i>Pseudomonas punonensis</i> LMT03 ^T	99.71
LTM 32.2.1	Alajuela	Alajuela	<i>Pseudomonas parafulva</i> NBRC 16636 ^T ; <i>P. parafulva</i> JCM 11244 ^T ; <i>P. cremoricolorata</i> DSM 17059 ^T ; <i>P. fulva</i> NBRC 16637 ^T	100.00
LTM 40.2.3	Alajuela	Alajuela	<i>Pseudomonas palmensis</i> BBB001 ^T ; <i>P. japonica</i> NBRC 103040 ^T ; <i>P. qingdaonensis</i> JJ3 ^T	100.00
LTM 49.1.1	Zarcero	Alajuela	<i>Stenotrophomonas nematodicola</i> W5 ^T	99.86
LTM 71.3.2	Alajuela	Alajuela	<i>Serratia surfactantfaciens</i> YD25 ^T ; <i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420 ^T ; <i>Serratia sarumanii</i> K-M0706 ^T ; <i>Symbiopectobacterium purcellii</i> SyEd1 ^T	99.32
LTM 72.2.1	Alajuela	Alajuela	<i>Cedecea neteri</i> JCM 7582 ^T	99.93
LTM 74.3.1	Alajuela	Alajuela	<i>Serratia sarumanii</i> K-M0706 ^T	100.00
LTM 78.1.1	Santa Bárbara	Heredia	<i>Pseudomonas parafulva</i> NBRC 16636 ^T ; <i>P. parafulva</i> JCM 11244 ^T ; <i>P. cremoricolorata</i> DSM 17059 ^T ; <i>P. fulva</i> NBRC 16637 ^T	98.13
LTM 78.2.1	Santa Bárbara	Heredia	<i>Pseudomonas straminea</i> NBRC 16665 ^T ; <i>P. straminea</i> JCM 2783 ^T	99.24
LTM 78.2.3	Santa Bárbara	Heredia	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> MTCC 434 ^T ; <i>S. hibiscicola</i> ATCC 19867 ^T ; <i>S. cyclobalanopsidis</i> TPQG1-4 ^T	99.55
LTM 78.3.1	Santa Bárbara	Heredia	<i>Pantoea deleyi</i> LMG 24200 ^T	98.80
LTM 78.3.2	Santa Bárbara	Heredia	<i>Pseudomonas capsici</i> Pc19-1 ^T	99.93

LTM = Laboratorio de Técnicas Moleculares CIPROC-UCR. ^T = Cepa tipo

2.2.2 Inoculación y evaluación

La inoculación se realizó mediante inyección directa con jeringas de 1 ml (Nipro). En cada planta se inocularon 100 μ l de solución bacteriana en el tallo, a la altura de la primera hoja verdadera, con la aguja inclinada en un ángulo de 45°. Se realizaron seis repeticiones por cada cepa y cada variedad y se utilizaron seis plantas por variedad como tratamientos testigo inoculadas de la misma forma con buffer fosfato salino (PBS), para un total de 168 plantas evaluadas. Las plantas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero a una temperatura de 26.3°C \pm 2.9°C (media \pm desviación estándar) y humedad relativa de 58.8% \pm 9.1%. El periodo de evaluación fue de 21 días después de inoculación (ddi).

Se midió la altura de las plantas el día de inoculación y a los 21 ddi para evaluar el crecimiento (cm): $\Delta Alt_i = Alt_{i,t+1} - Alt_{i,t}$, donde ΔAlt_i es la diferencia de altura de cada planta i ; $Alt_{i,t+1}$ representa la altura de cada planta i a los 21 ddi $t + 1$; y $Alt_{i,t}$ representa la altura de cada planta i el día de inoculación t . Los síntomas externos se evaluaron de forma visual a los 7, 14 y 21 ddi. La evaluación de los síntomas internos se realizó mediante la disección de las plantas a los 21 ddi; se realizó un corte longitudinal del tallo partiendo del punto de inoculación hacia ambos extremos. Se midió la extensión de la necrosis interna (cm) en las plantas que presentaron el síntoma. Para completar los postulados de Koch se realizó el reaislamiento de las bacterias en medio de agar nutritivo (AN) incubado a 28°C \pm 2°C por 24-48 horas. Por último, se realizó la confirmación de la identidad de las bacterias reaisladas del tejido sintomático mediante la secuenciación parcial del gen *16S ARNr*.

2.2.3 Análisis estadístico

Se calculó la variable respuesta $\Delta Alt_{i,j,k}$, que representa el crecimiento de cada planta i por cada cepa j y cada variedad de tomate k . Se modeló la proporción del cambio en la altura de la planta como una variable normal aleatoria con media $\mu_{\Delta Alt_{i,j,k}}$ y varianza $\sigma_{\Delta Alt}^2$ y se ajustó un modelo de la media del cambio en la altura

como una función lineal con interacción entre la cepa bacteriana y la variedad de tomate:

$$\mu_{\Delta Alt_{i,j,k}} = \beta_0 + \beta_1 cepa_{i,k} * \beta_2 var_{i,j} + \epsilon_i \quad \text{Ec 2.1}$$

Donde β_0 representa el intercepto; $\beta_1 cepa_{i,k}$ representa el coeficiente de las cepas bacterianas evaluadas; y $\beta_2 var_{i,j}$ representa las variedades de tomate utilizadas; ϵ_i representa un efecto individual aleatorio de media cero. Se realizó la prueba de contraste de medias “Least significant difference” (LSD) de Fisher para determinar la significancia de las diferencias de crecimiento por cepa bacteriana y variedad de tomate.

Se ajustó el mismo modelo con interacción para la extensión de la necrosis como variable respuesta $Nec_{i,j,k}$ como una variable normal aleatoria con media $\mu_{Nec_{i,j,k}}$ y varianza σ_{Nec}^2 :

$$\mu_{Nec_{i,j,k}} = \beta_0 + \beta_1 cepa_{i,k} * \beta_2 var_{i,j} + \epsilon_i \quad \text{Ec 2.2}$$

Donde β_0 representa el intercepto; $\beta_1 cepa_{i,k}$ representa las cepas bacterianas evaluadas; y $\beta_2 var_{i,j}$ representa el coeficiente para las variedades de tomate utilizadas; ϵ_i representa un efecto individual aleatorio de media cero. También se realizó la prueba de contraste de medias LSD de Fisher para determinar la significancia de las diferencias de la extensión de la necrosis interna por cepa bacteriana y variedad de tomate. Se asignó una categoría de virulencia a cada cepa en función de la extensión de la necrosis interna con base en la escala de severidad descrita por Aysan et al. (2004), que clasifica las cepas como “No Virulentas” si no se observan síntomas (valor en la escala = 0), “Poco virulentas” si presenta una extensión de necrosis de 0.1-2.0 cm (valor en la escala = 1), “Virulentas” si presenta una necrosis de 2.1-4.0 cm (valor en la escala = 2), y “Muy virulentas” si presenta una necrosis ≥ 4.1 cm (valor en la escala = 3). Tanto el modelo de la **Ec 2.1** como el de la **Ec 2.2** fueron seleccionados con base en el criterio de información de Akaike (AIC) como los mejores modelos para la variable respuesta respectiva.

Se ajustó un modelo de regresión lineal múltiple para determinar el efecto de la extensión de la necrosis sobre el crecimiento de las plantas para cada variedad de tomate ($\Delta Alt_{i,k}$), con media $\mu_{\Delta Alt_{i,k}}$ y varianza $\sigma_{\Delta Alt}^2$:

$$\mu_{\Delta Alt_{i,k}} = \beta_0 + \beta_1 Nec_{i,k} + \beta_2 var_i + \epsilon_i \quad \text{Ec 2.3}$$

Donde β_0 representa el intercepto; $\beta_1 Nec_{i,k}$ representa la extensión de la necrosis medular; y $\beta_2 var_i$ representa las variedades de tomate utilizadas; ϵ_i representa un efecto individual aleatorio de media cero. Todos los análisis se realizaron en el entorno de R (R Core Team, 2024). Para realizar la selección de los modelos con base en el AIC se utilizó la librería 'performance' (Lüdecke et al., 2021), para las pruebas de contraste de medias se utilizó la librería 'agricolae' (de Mendiburu, 2023) y para graficar los modelos se utilizaron las librerías 'ggeffects' y 'ggplot2' (Lüdecke, 2018; Wickham, 2016).

2.2.4 Análisis de secuencias multilocus (MLSA) de cepas patogénicas

Debido a las limitaciones que presenta la secuenciación del gen *16S ARNr* al no ser lo suficientemente diverso para distinguir entre especies de bacterias estrechamente relacionadas (Almeida et al., 2010; Girard et al., 2021), se llevó a cabo un análisis filogenético de secuencias multilocus (MLSA) para las cepas de *Pseudomonas* que resultaron patogénicas "muy virulentas" o "virulentas" con las secuencias parciales concatenadas del gen *16S ARNr* y los genes de mantenimiento ("housekeeping genes") de la subunidad B de la ADN girasa (*gyrB*), el factor sigma de la ARN polimerasa (*rpoD*) y la subunidad beta de la ARN polimerasa (*rpoB*).

En las reacciones de PCR se utilizó un volumen final de 25 μ l por cada reacción, que contenía 2.5 μ l de Dream Taq buffer 10X (Thermo Scientific™), 2.5 μ l de dNTP mix 2 mM (Thermo Scientific™), 1.25 μ l de cada cebador 100 μ M (**Cuadro 2.2**), 0.25 μ l de Dream Taq ADN polimerasa 5 U/ μ l (Thermo Scientific™), 1 μ l de la muestra de ADN, y agua ultrapura para completar el volumen. El perfil térmico para la amplificación del gen *16S ARNr* fue de un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 1 min, 72°C por 2 min, y una extensión final a 72°C por 7 min. El perfil térmico para la

amplificación del gen *gyrB* consistió en un ciclo a 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 62°C por 30 s, 72°C por 2 min, y una extensión final a 72°C por 7 min (Yamamoto et al., 2000). El perfil térmico para el gen *rpoD* consistió en un ciclo a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1.5 min, y un ciclo a 72°C por 10 min (Mulet et al., 2009). El perfil térmico para el gen *rpoB* consistió en un ciclo a 94°C por 1.5 min, seguido de 40 ciclos a 94°C por 10 s, 50°C por 20 s, 72°C por 50 s, y un ciclo de extensión final a 72°C por 5 min (Tayeb et al., 2005). La amplificación de los productos de PCR fue confirmada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con un voltaje de 95 voltios por 35 min.

Cuadro 2.2 Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación parcial de los genes *16S ARNr*, *gyrB*, *rpoD* y *rpoB* para el análisis de secuencias multilocus (MLSA) de las cepas patogénicas de *Pseudomonas* spp.

Gen	Cebador	Secuencia (5'-3')	T.a ¹ (°C)	Tamaño (pb ²)	Fuente
<i>16S ARNr</i>	F27 _{PS}	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	56	1500	Lane (1991)
	1492 _{RPS}	TACGGYTACCTTGTTACGACTT			
<i>gyrB</i>	UP1 _{EP}	CAGGAAACAGCTATGACCAYGSNGGNGGN AARTTYRA	62	966	Yamamoto et al. (2000)
	APrU _P	TGTAAAACGACGGCCAGTGCNNGGRTCYTTY TCYTGRCA			
	M13 _{RS}	CAGGAAACAGCTATGACC			
	M13(-21) _S	TGTAAAACGACGGCCAGT			
<i>rpoD</i>	PsEG30 _{FPS}	ATYGAAATCGCCAARCG	55	760	Mulet et al. (2009)
	PsEG790 _{RPS}	CGGTTGATKTCCTTGA			
<i>rpoB</i>	LAPS _{PS}	TGGCCGAGAACCAGTTCCGCGT	50	1229	Tayeb et al. (2005)
	LAPS27 _{PS}	CGGCTTCGTCCAGCTTGTTTCAG			

¹T.a = Temperatura de anillamiento (°C). ²pb = Tamaño de banda del producto de PCR en pares de bases. P = Cebador utilizado para la amplificación de PCR. S = Cebador utilizado para la secuenciación

Los productos de PCR se purificaron con Exonucleasa 1 y se enviaron a secuenciar a la compañía MacroGen, Inc. (Seúl, Corea del Sur) con el método de Sanger (Sanger & Coulson, 1975). Las secuencias fueron editadas y ensambladas en BioEdit v.7.0.5.3 (Hall, 1999) junto con secuencias de cepas

tipo de especies de *Pseudomonas* descargadas del GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (**Cuadro S2.1**). El alineamiento de las secuencias de cada locus se realizó en MAFFT v. 7 (Kato et al., 2017) con parámetros por defecto. Las secuencias alineadas y recortadas de los genes *16S ARNr* (1,266 pb), *gyrB* (443 pb), *rpoD* (409 pb) y *rpoB* (669 pb) se concatenaron en una sola matriz con Mesquite v.3.61 (Maddison & Maddison, 2019), para un total de 2,787 pb. Se utilizó JModelTest v.2.1.10 (Darriba et al., 2012) para determinar el mejor modelo de sustitución nucleotídica de cada locus.

Se realizó un análisis filogenético Bayesiano en MrBayes v.3.2.6 (Ronquist et al., 2012). Se corrieron cuatro cadenas con el modelo de sustitución nucleotídica de tiempo general reversible más sitios invariantes con distribución gamma (GTR+I+G) para los genes *16S ARNr*, *gyrB* y *rpoD*; y con el modelo simétrico más sitios invariantes con distribución gamma (SYM+I+G) para el gen *rpoB*. Se ejecutaron 1,000,000 generaciones de cadenas de Markov Monte Carlo (mcmc) y 1,000 generaciones de frecuencia de muestreo de árboles, con un calentamiento ("burnin") del 25% de las cadenas. Se utilizó la cepa *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071^T (= IFO12689^T = LMG 1242^T) como grupo externo. También se realizó un análisis filogenético con el método de Máxima Verosimilitud en el programa RAxML v.8.2.12 (Stamatakis, 2014) en la interfaz de raxmlGUI v.2.0.9 (Edler et al., 2021), con el modelo de sustitución nucleotídica GTR+I+G, con 1,000 repeticiones y valores de soporte de Bootstrap. El árbol filogenético consenso se visualizó y editó en iTOL v.6.9.1 (Letunic & Bork, 2024). Las secuencias parciales de los genes de mantenimiento *gyrB*, *rpoD* y *rpoB* de las cepas de *Pseudomonas* patogénicas fueron depositadas en la base de datos del GenBank bajo las accesiones PQ883186-PQ883197.

La identidad de la cepa LTM 72.2.1 y las cepas no patogénicas se analizó mediante la inferencia filogenética con el gen *16S ARNr* comparadas con secuencias tipo de la base de datos del GenBank (**Cuadro S2.2**) bajo el mismo procedimiento mencionado para el análisis multilocus, exceptuando el concatenamiento de secuencias. Se utilizó el modelo de sustitución nucleotídica

GTR+I+G y un total de 1,346 pb. Se utilizó la cepa *Bacillus subtilis* IAM 12118^T como grupo externo.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Pruebas de patogenicidad

El crecimiento de las plantas ($Altura_{final} - Altura_{inicial}$) durante el periodo de evaluación fue variable, con un rango de 4.1 a 32.4 cm, media \pm error estándar = 19.91 ± 0.36 cm. Las plantas de la variedad "Acorazado" inoculadas con la cepa LTM 72.2.1 presentaron la menor media de crecimiento (12.38 ± 2.01 cm; media \pm intervalo de confianza al 95% [IC 95%]) seguido de las plantas inoculadas con la cepa LTM 78.3.1 en la misma variedad de tomate (13.62 ± 2.48 cm). Las plantas con mayor crecimiento fueron el testigo de la variedad "Acorazado" con 25.33 ± 2.89 cm y las plantas de la variedad "JR" inoculadas con la cepa LTM 78.2.1 con 24.47 ± 1.60 cm. Se observó una tendencia de menor crecimiento en la mayoría de las plantas de la variedad "Acorazado" respecto a las plantas de la variedad "JR" inoculadas con la misma cepa, con diferencias significativas ($p < 0.05$) para las cepas LTM 72.2.1, LTM 78.2.1 y LTM 78.3.1 (**Cuadro 2.3; Figura 2.1**). El resto de las cepas no presentó diferencias significativas de crecimiento ($p > 0.05$) entre variedades.

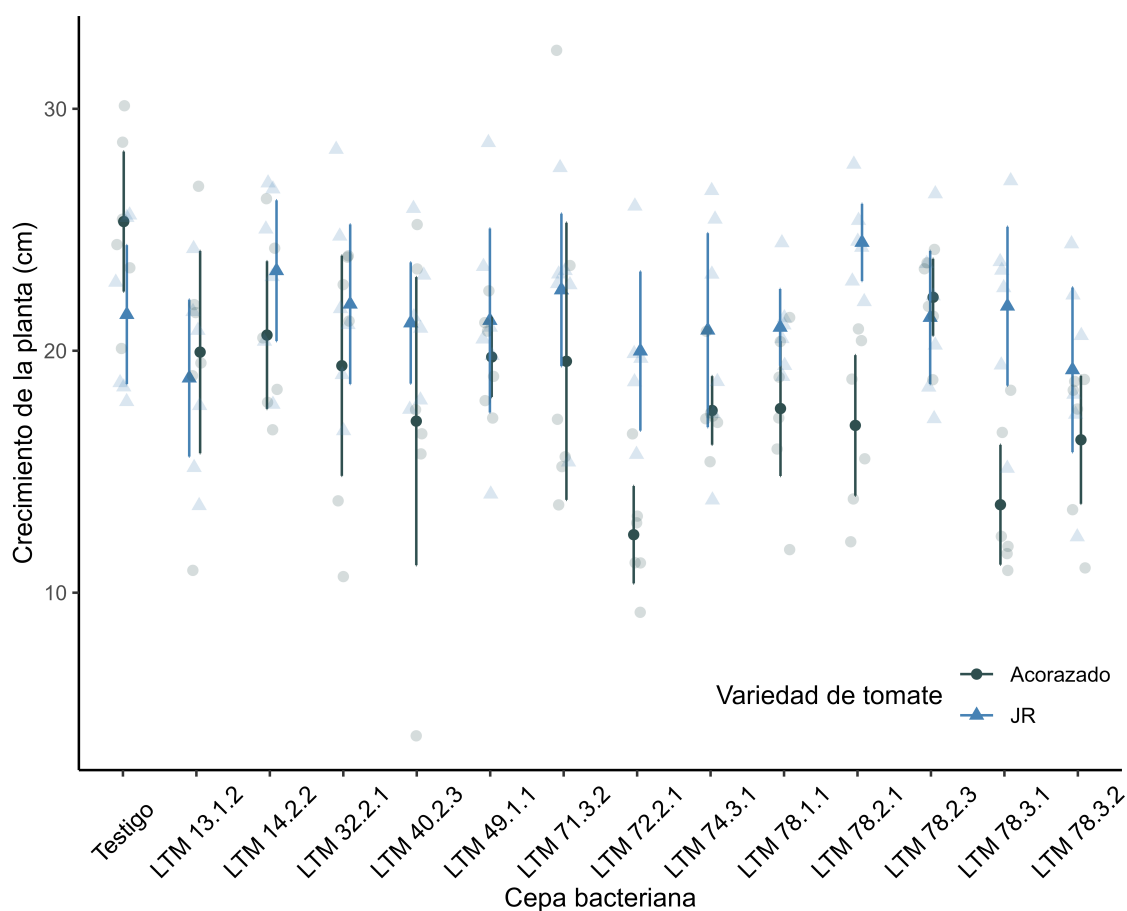


Figura 2.1 Crecimiento ($Altura_{final} - Altura_{inicial}$; [cm]) de las plantas de tomate de las variedades “JR” y “Acorazado” inoculadas con cepas bacterianas y plantas testigo inoculadas con buffer fosfato salino (PBS) a los 21 días después de inoculación (ddi) bajo condiciones de invernadero. Los símbolos oscuros indican la media de crecimiento de las plantas por cada cepa y cada variedad; las barras de error indican el intervalo de confianza al 95%. Los símbolos claros representan los valores reales para apreciar la variabilidad.

Se establecieron relaciones de patogenicidad en cinco de las 13 cepas bacterianas evaluadas en las variedades de tomate “JR” y “Acorazado”. Los síntomas evaluados fueron la necrosis medular y la decoloración del tejido interno del tallo. Se asignó una escala de severidad del síntoma y una categoría de virulencia basadas en la extensión de la lesión interna (cm). Las cepas que solamente causaron una oxidación leve en el sitio de inoculación sin extenderse por el tejido vascular se consideraron como no virulentas (**Cuadro 2.3; Figura**

2.2). Tres de las cinco cepas patogénicas causaron necrosis medular y dos causaron decoloración del tejido vascular. La cepa LTM 13.1.2 fue la más virulenta con una necrosis medular de 11.55 ± 5.25 cm y 4.57 ± 1.37 cm (media \pm IC 95%) en las variedades “JR” y “Acorazado”, respectivamente (**Cuadro 2.3; Figura 2.2; Figura 2.3**). Las plantas de la variedad “JR” inoculadas con la cepa LTM 13.1.2 presentaron una media de altura final de 42.35 ± 2.23 cm, por lo que la necrosis medular abarcó en promedio el 27.3% de la longitud de la parte aérea de las plantas a los 21 días después de inoculación. La variedad de tomate “Acorazado” inoculado con la cepa LTM 13.1.2 presentó en promedio una extensión de necrosis medular 39.57% menor que la variedad “JR”. La cepa LTM 13.1.2 fue la única que presentó una diferencia significativa ($p < 0.05$) de la extensión del síntoma entre las dos variedades de tomate (**Cuadro 2.3; Figura 2.2**).

La cepa LTM 78.3.2 fue la segunda más virulenta, con una necrosis de 4.63 ± 1.03 cm y 4.12 ± 1.86 cm en las variedades “JR” y “Acorazado”, respectivamente (**Cuadro 2.3; Figura 2.2; Figura 2.3**). Las cepas anteriores (LTM 13.1.2 y LTM 78.3.2) fueron categorizadas como “Muy virulentas” según la escala de severidad de la necrosis medular descrita por Aysan et al. (2004). La cepa LTM 14.2.2 se categorizó como “Virulenta” en ambas variedades de tomate, con una necrosis medular de 3.10 ± 2.49 cm en la variedad “JR” y 2.45 ± 2.37 cm en la variedad “Acorazado” (**Cuadro 2.3; Figura 2.2; Figura 2.3**).

Cuadro 2.3 Extensión de necrosis medular/decoloración de tejido (cm) en plantas de tomate de las variedades “Acorazado” y “JR” inoculadas con cepas bacterianas procedentes de varias localidades del Valle Central de Costa Rica a los 21 días después de inoculación (ddi) bajo condiciones de invernadero. Se muestra la media \pm intervalo de confianza al 95% (IC 95%).

Cepa	Especie/Género ^a	Cantón	Provincia	Var ^b	Sint ^c	Crecimiento de la planta ^{de} (cm)		Extensión del síntoma ^e (cm)		Escala ^f	Categoría de virulencia
LTM 13.1.2	<i>Pseudomonas allivivans</i>	Paraíso	Cartago	Ac	NM	19.95 \pm 4.18	bcdefg	4.57 \pm 1.37	b	3	Muy virulenta
				JR	NM	18.85 \pm 3.24	cdefg	11.55 \pm 5.25	a	3	Muy virulenta
LTM 14.2.2	<i>Pseudomonas flavescens</i>	Paraíso	Cartago	Ac	NM	20.67 \pm 3.05	bcdefg	2.45 \pm 2.37	cde	2	Virulenta
				JR	NM	23.32 \pm 2.91	abc	3.10 \pm 2.49	bcd	2	Virulenta
LTM 32.2.1	<i>Pseudomonas</i> sp.	Alajuela	Alajuela	Ac	O	19.37 \pm 4.55	cdefg	0.38 \pm 0.28	ef	0	No virulenta
				JR	O	21.92 \pm 3.30	abcde	0.33 \pm 0.22	f	0	No virulenta
LTM 40.2.3	<i>Pseudomonas</i> sp.	Alajuela	Alajuela	Ac	O	17.10 \pm 5.95	fgh	0.32 \pm 0.20	f	0	No virulenta
				JR	O	21.15 \pm 2.51	abcdef	0.32 \pm 0.08	f	0	No virulenta
LTM 49.1.1	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Zarcero	Alajuela	Ac	O	19.75 \pm 1.66	cdefg	0.35 \pm 0.26	ef	0	No virulenta
				JR	O	21.25 \pm 3.80	abcdef	0.47 \pm 0.26	ef	0	No virulenta
LTM 71.3.2	<i>Serratia</i> sp.	Alajuela	Alajuela	Ac	O	19.58 \pm 5.73	cdefg	0.28 \pm 0.18	f	0	No virulenta
				JR	O	22.50 \pm 3.15	abc	0.20 \pm 0.13	f	0	No virulenta
LTM 72.2.1	<i>Cedecea neteri</i>	Alajuela	Alajuela	Ac	DT	12.38 \pm 2.01	i	1.70 \pm 2.31	def	1	Poco virulenta
				JR	DT	20.00 \pm 3.29	bcdefg	0.74 \pm 1.11	ef	1	Poco virulenta
LTM 74.3.1	<i>Serratia</i> sp.	Alajuela	Alajuela	Ac	O	17.52 \pm 1.42	efgh	0.32 \pm 0.14	f	0	No virulenta
				JR	O	20.85 \pm 4.01	bcdefg	0.35 \pm 0.24	ef	0	No virulenta
LTM 78.1.1	<i>Pseudomonas</i> sp.	Santa Bárbara	Heredia	Ac	O	17.60 \pm 2.79	defgh	0.75 \pm 0.77	ef	0	No virulenta
				JR	O	20.97 \pm 1.59	abcdef	0.72 \pm 0.55	ef	0	No virulenta
LTM 78.2.1	<i>Pseudomonas straminea</i>	Santa Bárbara	Heredia	Ac	DT	16.93 \pm 2.90	fghi	1.32 \pm 1.92	def	1	Poco virulenta
				JR	DT	24.47 \pm 1.60	ab	2.03 \pm 1.83	cdef	2	Virulenta

Cepa	Especie/Género ^a	Cantón	Provincia	Var ^b	Sint ^c	Crecimiento de la planta ^{de} (cm)		Extensión del síntoma ^e (cm)		Escala ^f	Categoría de virulencia
LTM 78.2.3	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Santa Bárbara	Heredia	Ac	O	22.20 ± 1.59	abcd	0.50 ± 0.40	ef	0	No virulenta
				JR	O	21.38 ± 2.75	abcdef	0.45 ± 0.15	ef	0	No virulenta
LTM 78.3.1	<i>Pantoea deleyi</i>	Santa Bárbara	Heredia	Ac	O	13.62 ± 2.48	hi	0.47 ± 0.21	ef	0	No virulenta
				JR	O	21.85 ± 3.28	abcde	0.58 ± 0.35	ef	0	No virulenta
LTM 78.3.2	<i>Pseudomonas capsici</i>	Santa Bárbara	Heredia	Ac	NM	16.32 ± 2.64	ghi	4.12 ± 1.86	bc	3	Muy virulenta
				JR	NM	19.20 ± 3.40	cdefg	4.63 ± 1.03	b	3	Muy virulenta
Testigo ^g	-	-	-	Ac	-	25.33 ± 2.89	a	0.00 ± 0.00	f	-	-
				JR	-	21.50 ± 2.87	abcdef	0.00 ± 0.00	f	-	-

^aCepas identificadas a nivel de género mediante análisis del gen *16S ARNr*; cepas identificadas a nivel de especie mediante el análisis de secuencias multilocus (MLSA) con los genes *16S ARNr*, *gyrB*, *rpoD* y *rpoB*. ^bVar (Variedad de tomate): Ac = “Acorazado”; JR = “JR”. ^cSint (Síntoma): NC = necrosis medular; DT = decoloración de tejido. ^dCrecimiento de la planta (cm) = $Altura_{final} - Altura_{inicial}$, 21 ddi. ^eMedias ± IC 95% seguidas de letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de contraste LSD de Fisher (alpha = 0.05). ^fEscala de severidad (Aysan et al., 2004): 0 = sin síntomas internos visibles; 1 = 0.1-2.0 cm de necrosis medular; 2 = 2.1-4.0 cm de necrosis medular; 3 = ≥ 4.1 cm de necrosis medular. ^gTestigo = plantas inoculadas con 100 µl de buffer fosfato salino (PBS) mediante inyección al tallo.

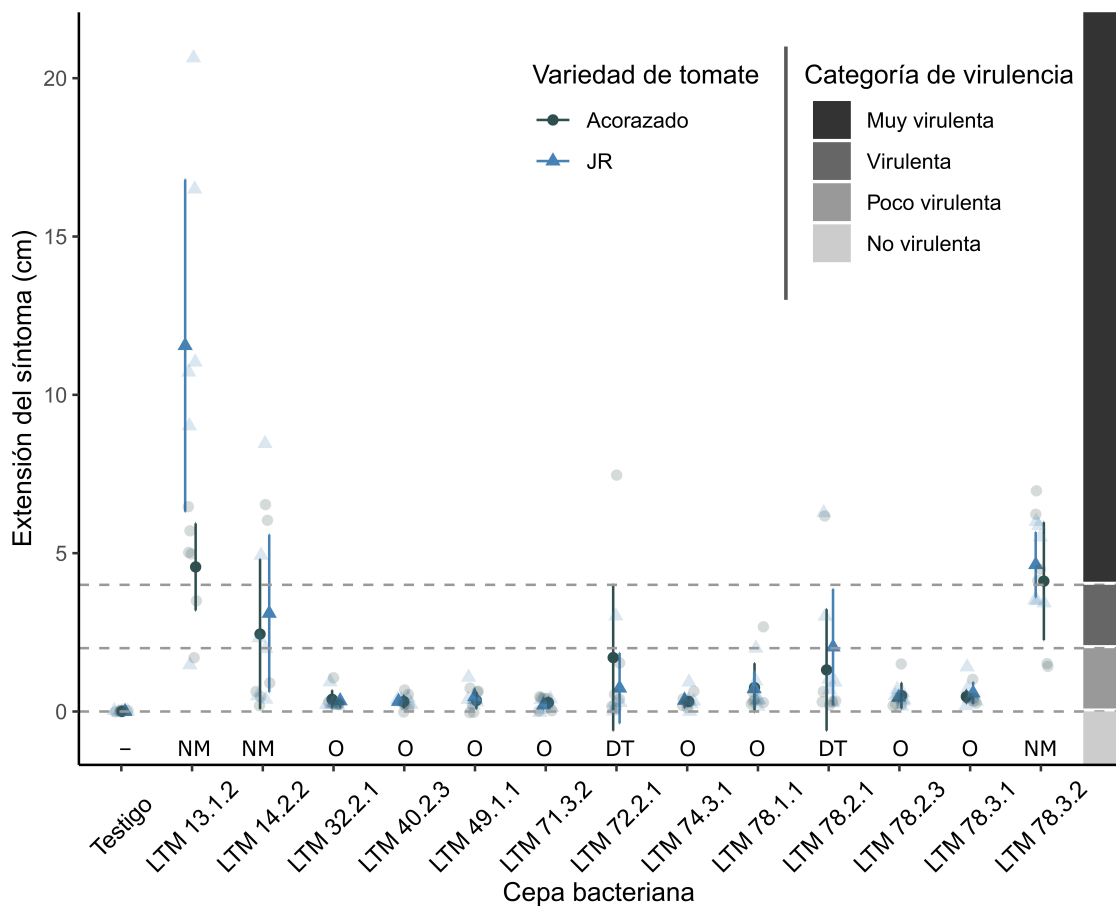


Figura 2.2 Extensión (cm) de la necrosis medular (NM) o la decoloración del tejido (DT) en plantas de tomate de las variedades "Acorazado" y "JR" inoculadas con cepas bacterianas y plantas testigo inoculadas con buffer fosfato salino (PBS) a los 21 días después de inoculación (ddi) bajo condiciones de invernadero. Oxidación en sitio de inoculación (O). Categorías de virulencia según escala de severidad (Aysan et al., 2004): **No virulenta** = sin síntomas internos visibles (valor en escala = 0); **Poco virulenta** = 0.1-2.0 cm de necrosis medular (valor en escala = 1); **Virulenta** = 2.1-4.0 cm de necrosis medular (valor en escala = 2); y **Muy virulenta** = ≥ 4.1 cm de necrosis interna (valor en escala = 3). Los símbolos oscuros indican las medias de la extensión de necrosis (NM) o la decoloración del tejido (DT) en las plantas por cada cepa y cada variedad, las barras de error indican el intervalo de confianza al 95%. Los símbolos claros representan los valores reales para apreciar la variabilidad.



Figura 2.3 Necrosis medular en plantas de tomate inoculadas con cepas bacterianas, evaluada 21 días después de la inoculación (ddi). **A)** Cepa LTM 13.1.2 en var. “JR”; **B)** Cepa LTM 14.2.2 en var. “JR”; **C)** Cepa LTM 78.3.2 en var. “JR”; **D)** Testigo var. “JR”; **E)** Cepa LTM 13.1.2 en var. “Acorazado”; **F)** Cepa LTM 14.2.2 en var. “Acorazado”; **G)** Cepa LTM 78.3.2 en var. “Acorazado”; **H)** Testigo var. “Acorazado”. Barras de escala = 5 cm.

Además de las cepas anteriores que causaron necrosis medular, también se consideraron como patogénicas las cepas LTM 78.2.1 categorizada como “Virulenta” con 2.03 ± 1.83 cm de decoloración del tejido en la variedad “JR”, y la cepa LTM 72.2.1 categorizada como “Poco virulenta” con 1.70 ± 2.31 cm de decoloración de tejido en la variedad “Acorazado” (**Cuadro 2.3; Figura 2.2; Figura 2.4**). Estas cepas presentaron una mayor variabilidad que el resto de las cepas “Poco virulentas” que causaron decoloración en el punto de inoculación. El resto de las cepas no ocasionó síntomas internos visibles dentro del tiempo de evaluación, aunque si se observó una leve oxidación en el sitio de inoculación.

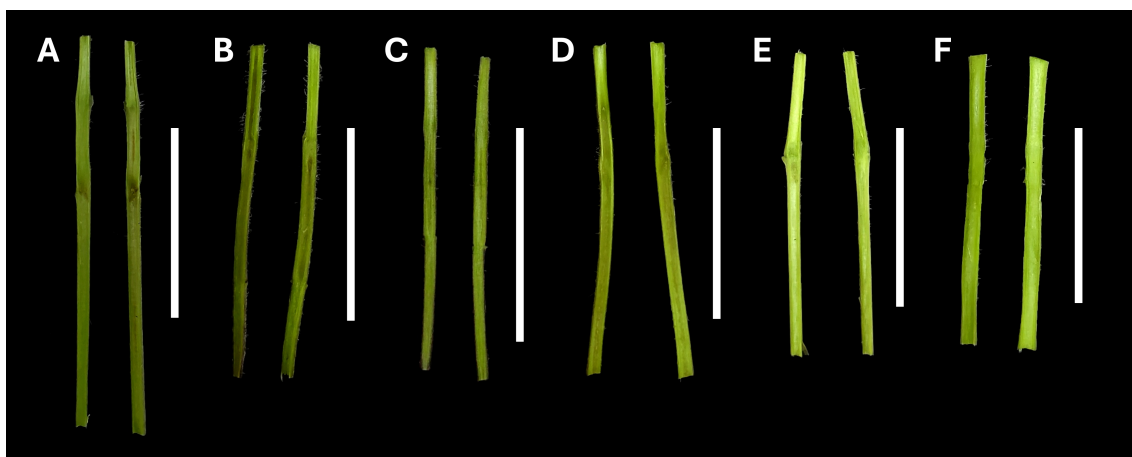


Figura 2.4 Decoloración de tejido vascular en plantas de tomate inoculadas con cepas bacterianas, evaluada 21 días después de la inoculación (ddi). Cepa LTM 78.2.1 en var. “JR” (**A**) y var. “Acorazado” (**B**); Cepa LTM 72.2.1 en var. “JR” (**C**) y var. “Acorazado” (**D**); Testigo var. “JR” (**E**) y var. “Acorazado” (**F**). Barras de escala = 5 cm.

La tendencia observada fue de una mayor extensión de la necrosis medular o decoloración de tejido en la variedad “JR” respecto a la variedad “Acorazado”, excepto en las plantas inoculadas con la cepa LTM 72.2.1, que presentaron una mayor extensión de decoloración de tejido en la variedad “Acorazado” (1.70 ± 2.31 cm) que en la variedad “JR” (0.74 ± 1.11 cm). En cuanto a los síntomas externos, se observó decoloración y hundimiento del tejido en el punto de

inoculación en las plantas inoculadas con las cepas LTM 13.1.2 y LTM 78.3.2 en ambas variedades de tomate (**Figura 2.5**); la cepa LTM 14.2.2 causó una decoloración leve en el punto de inoculación.



Figura 2.5 Síntomas externos observados en plantas de tomate inoculadas con cepas bacterianas, evaluados 21 días después de la inoculación (ddi) bajo condiciones de invernadero. Cepa LTM 13.1.2 en var. “JR” (**A**) y var. “Acorazado” (**B**); Cepa LTM 78.3.2 en var. “JR” (**C**) y var. “Acorazado” (**D**). Barras de escala = 1 cm.

Se determinó que la extensión de la lesión interna en el tallo de las plantas tiene un efecto de reducción de -0.20 ± 0.12 cm (media \pm SE) sobre el crecimiento de las plantas, sin embargo, el efecto no fue estadísticamente significativo ($p > 0.05$). La diferencia de crecimiento entre las variedades de tomate si presentó diferencias significativas ($p < 0.05$), con un crecimiento 3.05 ± 0.69 cm mayor en la variedad “JR” que en la variedad “Acorazado” (**Cuadro 2.4; Figura 2.6**).

Cuadro 2.4 Efecto de la extensión de la lesión interna (cm) sobre el crecimiento de las plantas (cm) ($Altura_{final} - Altura_{inicial}$) en las variedades de tomate “Acorazado” y “JR” a los 21 días después de inoculación (ddi) bajo condiciones de invernadero.

Parámetro	Coef ^a	SE ^b	IC 95% ^c	t(df = 164)	p
Intercepto (Var. “Acorazado”)	18.70	0.51	17.70 – 19.70	36.79	< 0.001
Extensión de necrosis	-0.20	0.12	-0.43 – 0.03	-1.67	0.095
Variedad “JR”	3.05	0.69	1.70 – 4.41	4.41	< 0.001

^aCoef = coeficiente; ^bSE = error estándar; ^cIC 95% = Intervalo de confianza al 95%; df = grados de libertad; alpha = 0.05

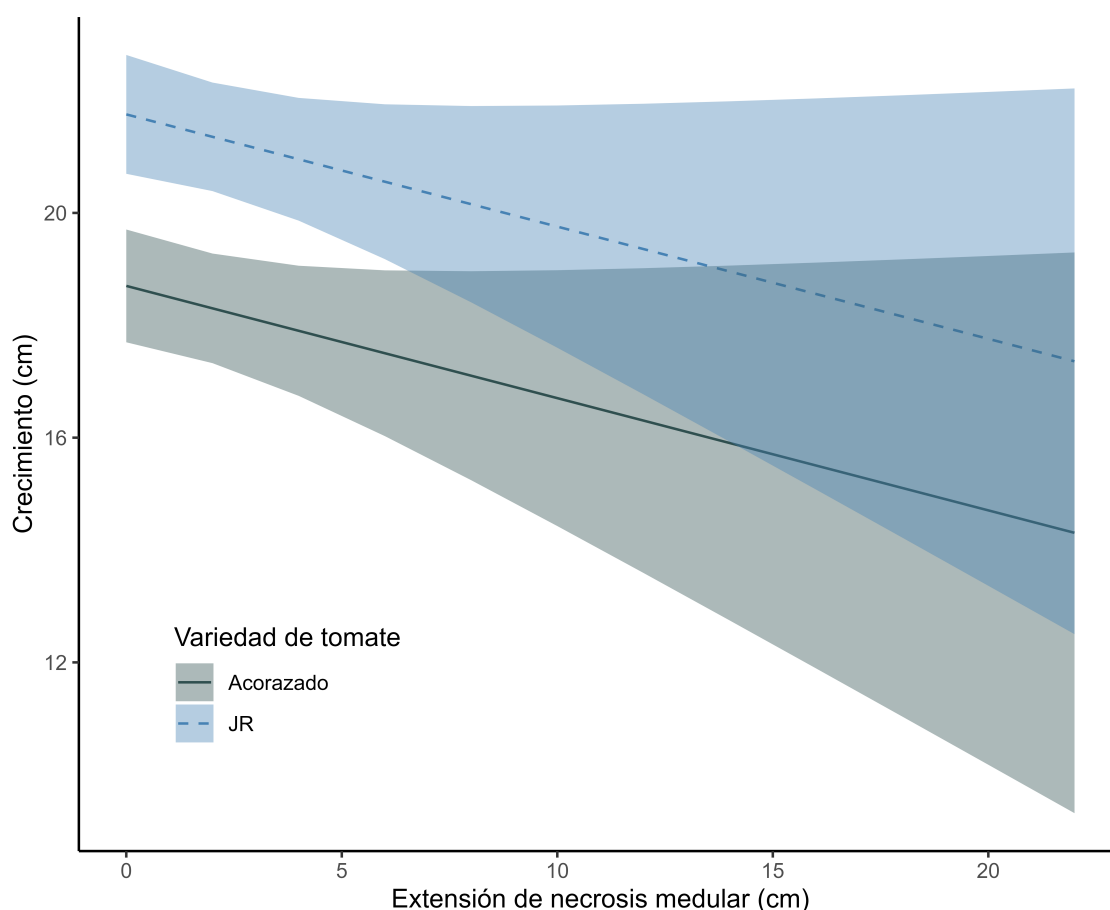


Figura 2.6 Efecto de la extensión de la necrosis medular (cm) sobre el crecimiento de la planta (cm) ($Altura_{final} - Altura_{inicial}$) en plantas de tomate de las variedades “JR” y “Acorazado” 21 días después de la inoculación (ddi) bajo condiciones de invernadero.

2.3.2 Análisis de secuencias multilocus (MLSA) de cepas patogénicas

Según el análisis filogenético de secuencias multilocus (MLSA) con las secuencias concatenadas de los genes *16S ARNr*, *gyrB*, *rpoD* y *rpoB* (Figura 14), la cepa LTM 13.1.2 fue identificada como *Pseudomonas allivivans*, estrechamente relacionada con *Pseudomonas viridiflava*. La cepa LTM 78.3.2 fue identificada como *Pseudomonas capsici*, y presenta una estrecha relación con *Pseudomonas cichorii*. La cepa LTM 14.2.2 se identificó como *Pseudomonas flavescens* y la cepa LTM 78.2.1 se identificó como *Pseudomonas straminea* (Figura 2.7).

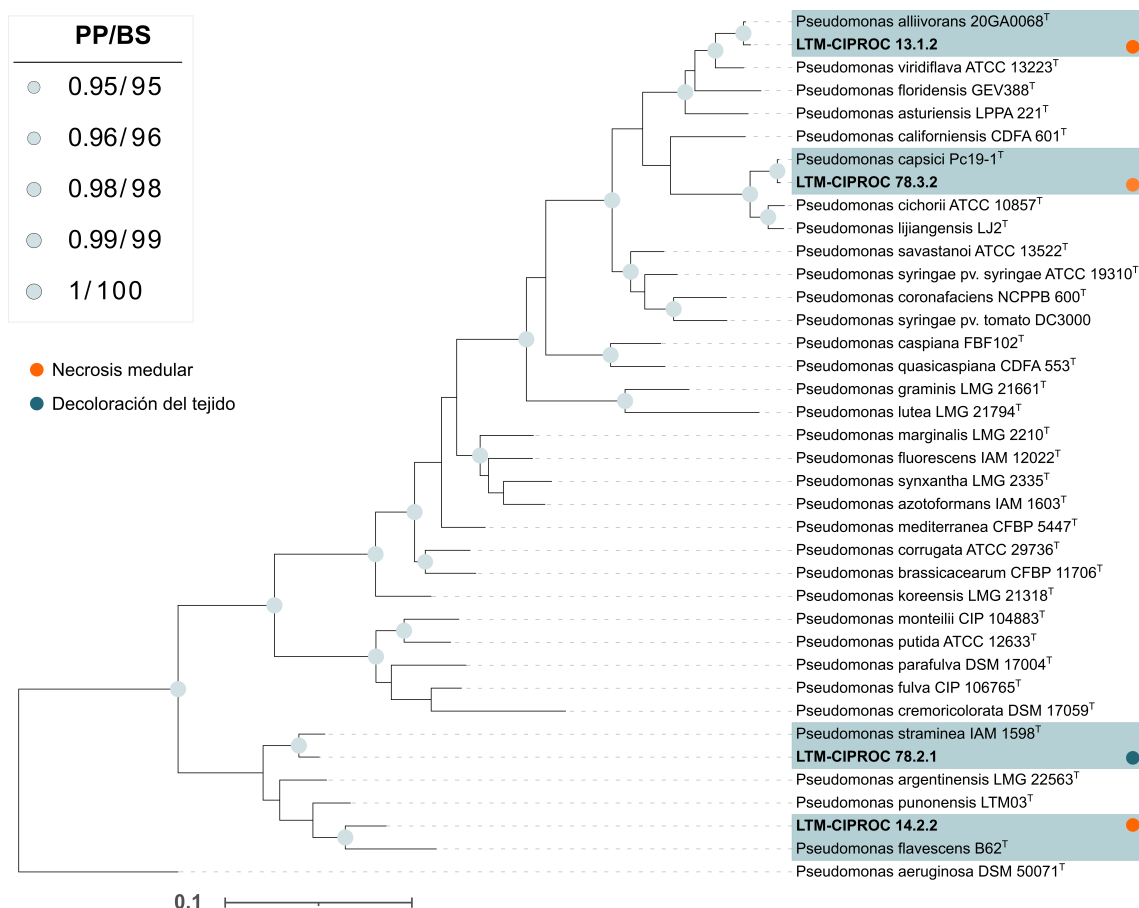


Figura 2.7 Árbol filogenético consenso de cepas de *Pseudomonas* spp. elaborado a partir de las secuencias parciales concatenadas de los genes *16S ARNr*, *gyrB*, *rpoD* y *rpoB*. Las cepas analizadas en este estudio se muestran en “negrita” con el acrónimo ‘LTM’ (Laboratorio de Técnicas Moleculares, CIPROC-UCR) y sombreadas junto con la cepa tipo más relacionada según el análisis. Se

muestra la topología del análisis filogenético Bayesiano. Los círculos en los nodos indican la combinación de valores de soporte PP/BS (PP = probabilidad posterior de la inferencia Bayesiana ≥ 0.95 después de 1,000,000 repeticiones; BS = soporte de Bootstrap de la Máxima Verosimilitud $\geq 95\%$ después de 1,000 repeticiones). Se utilizó la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071^T (= IFO12689^T = LMG 1242^T) como grupo externo. ^T = Cepa tipo. La barra de escala representa el número estimado de sustituciones por sitio.

La cepa LTM 72.2.1 que causó decoloración en el tejido se agrupó en un subclado con la cepa de *Cedecea neteri* JCM 7582^T con una probabilidad posterior (PP) de 0.97 en la inferencia Bayesiana y un soporte de Bootstrap (BS) de 83% en la inferencia de Máxima Verosimilitud (**Figura 2.8**). Respecto a las cepas no patogénicas, las cepas LTM 32.2.1 y LTM 78.1.1 se agruparon en un clado con las cepas de *Pseudomonas fulva* IAM 1529^T, *P. cremoricolorata* DSM 17059^T, *P. parafulva* NBRC 16636^T y *P. parafulva* JCM 11244^T con una PP de 1 y un BS de 81%. La cepa LTM 40.2.3 se agrupó en un subclado con las cepas *P. japónica* NBRC 103040^T, *P. palmensis* BBB001^T, *P. qingdaonensis* JJ3^T y *P. putida* ATCC 12633^T con una PP de 1 y un BS de 98%. La cepa LTM 49.1.1 se agrupó dentro del clado de *Stenotrophomonas nematodocola* W5^T con una PP de 0.77 y un BS de 75%. La cepa LTM 78.2.3 se agrupó en un subclado con *S. lactitubi* M15^T, *S. indicatrix* WS40^T, *S. cyclobalanopsidis* TPQG1.4^T y *S. hibiscicola* ATCC 19867^T con una PP de 0.73 y un BS de 40%. Las cepas LTM 71.3.2 y LTM 74.3.1 se agruparon en un clado con las especies de *Serratia* spp., la última más cercana a *S. nematodiphila* DZ0503SBS1^T y *S. sarumanii* K-M0706^T con una PP de 0.60 y un BS de 42%. La cepa LTM 78.3.1 se agrupó en un subclado con la cepa de *Pantoea deleyi* LMG 24200^T con una PP de 1 y un BS de 99% (**Figura 2.8**).

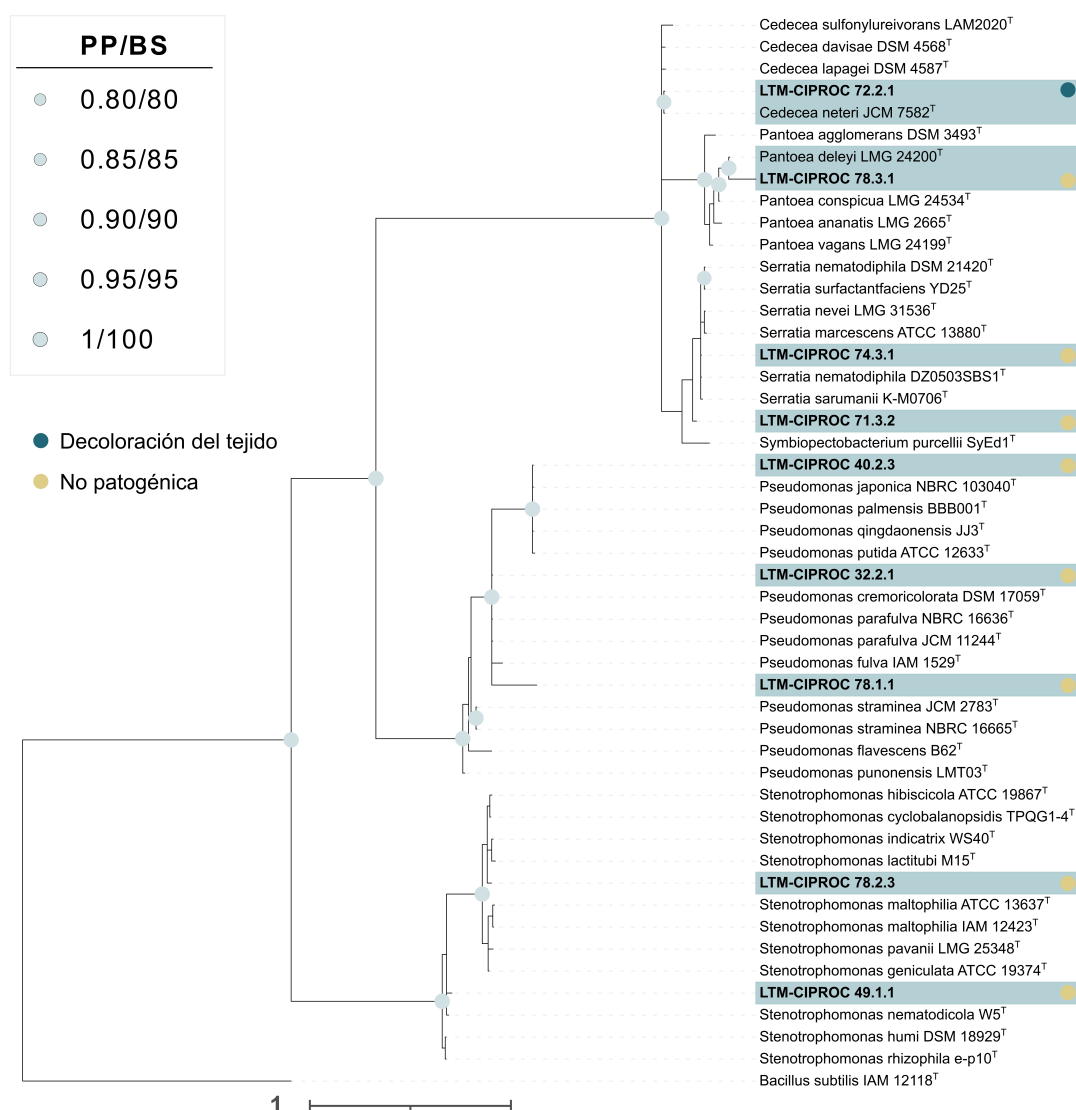


Figura 2.8 Árbol filogenético consenso elaborado a partir de las secuencias parciales del gen *16S ARNr* de la cepa LTM 72.2.1 que causó decoloración del tejido, y de las cepas no patogénicas. Las cepas analizadas en este estudio se muestran en “negrita” con el acrónimo ‘LTM’ (Laboratorio de Técnicas Moleculares, CIPROC-UCR) y sombreadas junto con la cepa tipo más cercana según el análisis. Se muestra la topología del análisis filogenético Bayesiano. Los círculos en los nodos indican la combinación de valores de soporte PP/BS (PP = probabilidad posterior de la inferencia Bayesiana ≥ 0.80 después de 1,000,000 repeticiones; BS = soporte de Bootstrap de la Máxima Verosimilitud $\geq 80\%$ después de 1,000 repeticiones). Se utilizó la cepa de *Bacillus subtilis* IAM

12118^T como grupo externo. ^T = Cepa tipo. La barra de escala representa el número estimado de sustituciones por sitio.

2.4 DISCUSIÓN

La cepa LTM 13.1.2 identificada como *Pseudomonas alliivorans* fue la más virulenta en la prueba de patogenicidad. Esta especie fue descrita recientemente, aislada de lesiones foliares en plantas de cebolla (*Allium cepa*) en Georgia, EE. UU., causando síntomas similares a los causados por *P. viridiflava*, como rayas foliares y pudrición del bulbo de la cebolla (Zhao et al., 2022). Además, *P. alliivorans* fue identificada como uno de los agentes causales de la mancha foliar en cucurbitáceas en Florida, EE. UU. (Fullem et al., 2024). A la fecha no se han reportado más hospederos y tampoco se ha reportado fuera de EE. UU., por lo que este es el primer reporte de *P. alliivorans* en tomate y en Costa Rica, además de ser el primer reporte de *P. alliivorans* como agente causal de la necrosis medular. Con lo anterior, se amplía el rango de hospederos y el rango de distribución de la especie. Así mismo, surge el cuestionamiento de si esta bacteria es capaz de causar enfermedades en más especies de solanáceas que se cultivan comúnmente en Costa Rica, como chile (*Capsicum annum*) y papa (*Solanum tuberosum*), sumado a la incertidumbre sobre su presencia en las plantaciones de cebolla y cucurbitáceas en el país. La estrecha relación filogenética que existe entre *P. alliivorans* y *P. viridiflava* (Zhao et al., 2022), un reconocido agente causal de la necrosis medular del tomate (Alippi et al., 2003; Monteiro, 2019; Silvera-Pérez et al., 2023), podría indicar que existen cepas con identificaciones erróneas en diferentes regiones del mundo, como ha sucedido con varias especies de *Pseudomonas* (Tran et al., 2017).

La extensión de la necrosis causada por la cepa de *P. alliivorans* LTM 13.1.2 en la variedad de tomate “JR” alcanzó una longitud considerable de la parte aérea de la planta apenas 21 días después de la inoculación, lo que indica una alta severidad de la enfermedad, sin embargo, Monteiro et al. (2019) reportan que la necrosis causada por la cepa EPAGRI BacPvT1 de *P. viridiflava* en tomate puede no causar un daño tangible ni pérdidas en el rendimiento (peso de los

frutos) a pesar de provocar lesiones en las plantas, ya que el peso total de los frutos cosechados de plantas inoculadas comparado con el de las plantas no inoculadas no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$). La extensión de la necrosis medular en la variedad “Acorazado” fue en promedio casi 40% menor que en la variedad “JR”, lo que podría indicar que la variedad “Acorazado” presenta cierta tolerancia a la cepa LTM 13.1.2, aunque fue categorizada como “Muy virulenta” en ambas variedades según la escala de severidad (Aysan et al., 2004) al producir una necrosis ≥ 4.1 cm. Es necesario realizar estudios futuros con la cepa de *P. allivivans* LTM 13.1.2 para determinar su efecto en la productividad de las plantas y en todo su ciclo de desarrollo, así como determinar su rango de hospederos. Además, es necesaria la implementación de medidas preventivas adecuadas en las plantaciones de tomate del país debido a la severidad observada con esta cepa.

La cepa LTM 78.3.2 identificada como *Pseudomonas capsici* fue la segunda más virulenta en la prueba de patogenicidad. Esta especie fue descrita recientemente como agente causal de la mancha foliar en chile (*Capsicum annum*) en Georgia, EE. UU. (Zhao et al., 2021). *P. capsici* se encuentra estrechamente relacionada con *P. cichorii* (Zhao et al., 2021, 2023), otra de las especies causantes de la necrosis medular en tomate (Trantas et al., 2013); esta relación llevó al agrupamiento de varias cepas colectadas en Florida, EE.UU. en 2012 como un nuevo grupo filogenético dentro de *P. cichorii* (Timilsina et al., 2017), sin embargo, mediante la hibridación digital de ADN-ADN, la identidad nucleotídica promedio (ANI), y el análisis de filogenomas, dichas cepas fueron reclasificadas como *P. capsici* (Zhao et al., 2023). Esta especie ha sido reportada además como agente causal de la mancha foliar en cultivos de cucurbitáceas en el sudeste de EE. UU. (Fullem et al., 2024) y de la mancha bacteriana en ricino (*Ricinus communis*) en Corea del Sur (Do et al., 2023), y presenta un amplio rango de hospederos según Zhao et al. (2023), siendo patogénica en chile, tomate, berenjena (*Solanum melongena*), repollo chino (*Brassica rapa* subsp. *chinensis*) y lechuga (*Lactuca sativa*). Sin embargo, *P. capsici* ha sido asociada solamente a síntomas foliares en los hospederos, por lo que este es el primer

reporte de *P. capsici* como agente causal de la necrosis medular en tomate y es el primer reporte de la especie en Costa Rica.

La extensión de la necrosis interna causada por la cepa de *P. capsici* LTM 78.3.2 fue similar en ambas variedades de tomate, 4.12 ± 1.86 cm (media \pm IC95%) en “Acorazado” y 4.63 ± 1.03 cm en “JR”, por lo que fue categorizada como “Muy virulenta” según la escala de severidad (Aysan et al., 2004). Al igual que con la cepa de *P. allivivorans* LTM 13.1.2, es necesario realizar estudios de mediano y largo plazo con la cepa de *P. capsici* LTM 78.3.2 para determinar su efecto en la productividad del cultivo de tomate con diferentes métodos de inoculación como aspersión foliar e inyección al tallo. Además, es importante tomar en cuenta que *P. capsici* puede causar síntomas foliares a mayores temperaturas que otras bacterias (Fullem et al., 2024), por lo que se requiere un monitoreo constante para la detección de nuevos brotes de enfermedades asociadas a *P. capsici* en tomate y en otros cultivos, así como la implementación de medidas preventivas adecuadas para reducir el riesgo de dispersión del patógeno.

La cepa LTM 14.2.2 identificada como *Pseudomonas flavescens*, con una probabilidad posterior de 1 en la inferencia filogenética Bayesiana y un soporte de Bootstrap de 97% en la inferencia de Máxima Verosimilitud dentro del análisis de secuencias multilocus, indujo el síntoma de necrosis medular en plantas de tomate y fue categorizada como una cepa “Virulenta”. *P. flavescens* fue descrita por primera vez habitando canchales producidos por *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* en árboles de nogal o nuez de castilla (*Juglans regia*) (Hildebrand et al., 1994) y recientemente fue identificada como el agente causal del chancro bacteriano del nogal en Corea del Sur (Kim et al., 2020). A pesar de que esta especie fue descrita hace tres décadas, existe muy poca información al respecto, y la mayoría son menciones dentro de estudios taxonómicos que la colocan dentro del grupo de *Pseudomonas straminea* (Girard et al., 2021). La cepa LTM 14.2.2 fue la tercera con mayor severidad de los síntomas con una extensión de necrosis de 2.45 ± 2.37 cm en la variedad “Acorazado” y 3.10 ± 2.49 cm en la variedad “JR”. Al igual que con las cepas anteriores, este es el primer reporte de *P. flavescens* causando necrosis medular en tomate.

La cepa LTM 78.2.1 fue identificada como *Pseudomonas straminea*, un patógeno débil capaz de causar decoloración vascular en plantas de tomate (Aiello et al., 2013). En este estudio, la cepa LTM 78.2.1 categorizada como “Poco virulenta” presentó una extensión de la decoloración en el tejido de 2.03 ± 1.83 cm en las plantas de la variedad “JR” 21 días después de inoculación (ddi). Estos valores concuerdan con los reportados por (Aiello et al., 2013) quienes inocularon dos cepas de *P. straminea* y obtuvieron lesiones de 1.8 ± 0.4 cm y 3.0 ± 0.6 cm a los 15 ddi, 4.3 ± 0.5 y 4.1 ± 0.5 cm a los 90 ddi, y describieron las lesiones como decoloraciones vasculares. Otro aspecto importante de esta bacteria es que presenta una interacción sinérgica con otras especies de *Pseudomonas* y con *Xanthomonas perforans* provocando un incremento de los síntomas de la necrosis medular a través de una coinfección en las plantas de tomate (Aiello et al., 2017).

La cepa LTM 72.2.1 fue identificada como *Cedecea neteri* JCM 7582^T con una probabilidad posterior de 0.97 en la inferencia Bayesiana y un soporte de Bootstrap de 83% en la inferencia de Máxima Verosimilitud, sin embargo, debido a la cercanía con las demás especies del género se recomienda realizar un análisis de secuencias multilocus o de genoma completo para esclarecer la identidad de esta cepa. Al igual que la cepa de *Pseudomonas straminea* LTM 78.2.1, la cepa de *Cedecea neteri* LTM 72.2.1 causó decoloración en el tejido y se categorizó como “Poco virulenta” con 1.70 ± 2.31 cm de decoloración en la variedad de tomate “Acorazado”, sin embargo, en una de las plantas la extensión fue de 7.5 cm. El género *Cedecea* contiene especies capaces de causar pudriciones en hongos comestibles (Huang et al., 2024; Liu et al., 2021), sin embargo, su patogenicidad en hortalizas no ha sido reportada y se cuenta con poca información sobre las cinco especies que conforman el género, *C. neteri*; *C. davisae*; *C. lapagei*; *C. sulfonyleivorans* y ‘*C. colo*’ (Parte et al., 2020).

Se registraron síntomas externos como decoloración y hundimiento del tejido del tallo en el punto de inoculación en las plantas inoculadas con las cepas que causaron necrosis medular, *Pseudomonas alliivorans* LTM 13.1.2, *P. flavescens* LTM 14.2.2 y *P. capsici* LMT 78.3.2. Estos síntomas son comunes en plantas

infectadas con bacterias causantes de la necrosis medular como *Pseudomonas corrugata*, *P. mediterranea* y *P. cichorii* (Catara, 2007; Trantas et al., 2013). No se observó la producción de raíces adventicias en el tallo con ninguna de las cepas patogénicas; este puede ser un síntoma ocasional generado por algunas bacterias causantes de la necrosis medular (Catara, 2007; Trantas et al., 2013), sin embargo, el tiempo de evaluación de los síntomas en este estudio fue específico para determinar la patogenicidad de las cepas, por lo que se recomienda evaluar el desarrollo de síntomas con las cepas más virulentas durante todo el ciclo de producción.

En Costa Rica se han observado síntomas asociados a la necrosis medular en plantaciones de tomate en diferentes localidades del país, sin embargo, no se había caracterizado la enfermedad ni se habían identificado las especies patógenas causales. Este es el primer estudio en el país que describe los síntomas en los primeros estadios del cultivo e identifica las especies responsables de causar la necrosis medular del tomate. Debido a la diversidad de bacterias patogénicas observada, es probable que la necrosis medular sea causada por más especies que no se identificaron en este estudio y que no han sido reportadas como agentes causales, además, la enfermedad puede ser ocasionada por la interacción de dos especies o más, como se ha registrado en otros países (Aiello et al., 2017). Además, se reportan especies capaces de causar decoloración del tejido vascular, un síntoma de menor severidad, aunque puede debilitar la planta y volverla propensa al ataque de patógenos oportunistas.

2.5 BIBLIOGRAFÍA

- Aiello, D., Scuderi, G., Vitale, A., Firrao, G., Polizzi, G., & Cirvilleri, G. (2013). A pith necrosis caused by *Xanthomonas perforans* on tomato plants. *European Journal of Plant Pathology*, 137(1), 29–41. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0214-7>
- Aiello, D., Vitale, A., Ruota, A. D. La, Polizzi, G., & Cirvilleri, G. (2017). Synergistic interactions between *Pseudomonas* spp. and *Xanthomonas perforans* in enhancing tomato pith necrosis symptoms. *Journal of Plant Pathology*, 99(3), 731–740.
- Alippi, A. M., Dal Bo, E., Ronco, L. B., López, M. V., López, A. C., & Aguilar, O. M. (2003). *Pseudomonas* populations causing pith necrosis of tomato and pepper in Argentina are highly diverse. *Plant Pathology*, 52(3), 287–302. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00850.x>
- Almeida, N. F., Yan, S., Cai, R., Clarke, C. R., Morris, C. E., Schaad, N. W., Schuenzel, E. L., Lacy, G. H., Sun, X., Jones, J. B., Castillo, J. A., Bull, C. T., Leman, S., Guttman, D. S., Setubal, J. C., & Vinatzer, B. A. (2010). PAMDB: A multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology*, 100(3), 208–215. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-3-0208>
- Aysan, Y., Yildiz, N., & Yucel, F. (2004). Identification of *Pseudomonas viridiflava* on tomato by traditional methods and enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytoparasitica*, 32(2), 146–153. <https://doi.org/10.1007/BF02979780>
- Bella, P., & Catara, V. (2010). Occurrence of tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas marginalis* in Italy. *Plant Pathology*, 59(2), 402. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02185.x>
- Blancard, D. (2013). *Tomato diseases: identification, biology and control* (2nd ed.). CRC press.
- Blanco-Meneses, M., Castro-Zúñiga, O., & Calderón-Abarca, A. (2023). Diagnóstico del uso de antibióticos en regiones productoras de tomate en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 47(1), 87–99. <https://doi.org/10.15517/rac.v47i1.53967>
- Bond, W. P., & Black, L. L. (1986). Tomato pith necrosis (*Pseudomonas corrugata*) in field-grown tomatoes in Louisiana. *Plant Disease*, 70(11), 1074.
- Caruso, A., Licciardello, G., Rosa, R. La, Catara, V., & Bella, P. (2016). Mixed infection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* in tomato stem rot in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 98(3), 661–665.

- Catara, V. (2007). *Pseudomonas corrugata*: plant pathogen and/or biological resource? *Molecular Plant Pathology*, 8(3), 233–244. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00391.x>
- Catara, V., Sutra, L., Morineau, A., Achouak, W., Christen, R., & Gardan, L. (2002). Phenotypic and genomic evidence for the revision of *Pseudomonas corrugata* and proposal of *Pseudomonas mediterranea* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1749–1758. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02174-0>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- de Mendiburu, F. (2023). *agricolae: Statistical procedures for agricultural research*. <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>
- Do, H., Lee, S. Y., Lee, B. W., Ham, H., Lee, M.-H., & Lee, Y. K. (2023). First report of bacterial spot disease caused by *Pseudomonas capsici* on castor bean in Korea. *Research in Plant Disease*, 29(4), 440–444. <https://doi.org/10.5423/RPD.2023.29.4.440>
- Edler, D., Klein, J., Antonelli, A., & Silvestro, D. (2021). raxmlGUI 2.0: A graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML. *Methods in Ecology and Evolution*, 12(2), 373–377. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/2041-210X.13512>
- Fullem, K. R., Pena, M. M., Potnis, N., Goss, E. M., Minsavage, G. V., Iriarte, F. B., Holland, A., Jones, J. B., & Paret, M. L. (2024). Unexpected diversity of pseudomonads associated with bacterial leaf spot of cucurbits in the southeastern United States. *Plant Disease*, 108(3), 592–598. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-23-1081-SR>
- Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T., Feil, E. J., Stackebrandt, E., de Peer, Y. Van, Vandamme, P., Thompson, F. L., & Swings, J. (2005). Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 733–739. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1236>
- Girard, L., Lood, C., Höfte, M., Vandamme, P., Rokni-Zadeh, H., van Noort, V., Lavigne, R., & De Mot, R. (2021). The ever-expanding *Pseudomonas* genus: Description of 43 new species and partition of the *Pseudomonas putida* group. *Microorganisms*, 9(8), 1766. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081766>
- Girard, L., Lood, C., Rokni-Zadeh, H., van Noort, V., Lavigne, R., & De Mot, R. (2020). Reliable identification of environmental *Pseudomonas* isolates using the rpoD gene. *Microorganisms*, 8(8), 1166. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081166>

- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Henreaux, J. (2012). *Efecto del biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos y microorganismos benéficos sobre el desarrollo, productividad y resistencia de las plantas, Turrialba, Costa Rica*. CATIE.
- Hildebrand, D. C., Palleroni, N. J., Hendson, M., Toth, J., & Johnson, J. L. (1994). *Pseudomonas flavescens* sp. nov., Isolated from Walnut Blight Cankers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(3), 410–415. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-3-410>
- Huang, Z., Huang, Y., Nie, Y., & Liu, B. (2024). Biological characteristics of two pathogens causing brown blotch in *Agaricus bisporus* and the toxin identification of *Cedecea neteri*. *Phytopathology Research*, 6(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s42483-024-00239-8>
- Jones, J. B. (1983). Occurrence of stem necrosis on field-grown tomatoes incited by *Pseudomonas corrugata* in Florida. *Plant Disease*, 67(4), 425–426.
- Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2017). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Kim, H.-S., Lee, D.-H., Lee, S. K., Lee, S.-H., & Seo, S.-T. (2020). First report of walnut blight canker on walnut tree (*Juglans regia*) by *Pseudomonas flavescens* in South Korea. *Journal of Plant Pathology*, 102(3), 943–943. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00520-7>
- Lai, M., Opgenorth, D. C., & White, J. B. (1983). Occurrence of *Pseudomonas corrugata* on tomato in California. *Plant Disease*, 67(1), 110–112. <https://doi.org/10.1094/pd-67-110>
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. En E. Stackebrandt & M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (pp. 115–175). John Wiley and Sons.
- Letunic, I., & Bork, P. (2024). Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae268>
- Liu, Z., Zhou, S., Zhang, W., Wu, S., Chen, X., Wang, X., Hu, H., & Chen, Q. (2021). First report of *Cedecea neteri* causing yellow rot disease in *Pleurotus pulmonarius* in China. *Plant Disease*, 105(4), 1189. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-20-1886-PDN>

- Lüdecke, D. (2018). ggeffects: Tidy data frames of marginal effects from regression models. *Journal of Open Source Software*, 3(26), 772. <https://doi.org/10.21105/joss.00772>
- Lüdecke, D., Ben-Shachar, M. S., Patil, I., Waggoner, P., & Makowski, D. (2021). performance: An R package for assessment, comparison and testing of statistical models. *Journal of Open Source Software*, 6(60), 3139. <https://doi.org/10.21105/joss.03139>
- Maddison, W. P., & Maddison, D. R. (2019). *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis*. <http://www.mesquiteproject.org>
- MAG. (2024). *Tomate: Manual de buenas prácticas agrícolas con enfoque de adaptación al cambio climático*.
- Monteiro, F. P. (2019). Pith necrosis associated with *Pseudomonas viridiflava* in tomato plants in Brazil. *Plant Pathology & Quarantine*, 9(1), 1–5. <https://doi.org/10.5943/ppq/9/1/1>
- Monteiro, F. P., Ogoshi, C., Cardoso, D. A., & Perazolli, V. (2019). Pith necrosis of tomato caused by *Pseudomonas viridiflava* may not decrease production. *Asian Journal of Agricultural and Horticultural Research*, 4(4), 1–6. <https://doi.org/10.9734/ajahr/2019/v4i430030>
- Mota, L. C. B., Tebaldi, N. D., & Luz, J. M. Q. (2021). Occurrence of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida* associated to tomato pith necrosis in Brazil. *Horticultura Brasileira*, 39(3), 258–263. <https://doi.org/10.1590/s0102-0536-20210303>
- Moura, M. L., Brito, L. M., Mourão, I. M., Jacques, M. A., & Duclos, J. (2005). Tomato pith necrosis (TPN) caused by *P. corrugata* and *P. mediterranea*: Severity of damages and crop loss assessment. *Acta Horticulturae*, 695, 365–372. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2005.695.45>
- Mulet, M., Bennisar, A., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2009). An rpoD-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples. *Molecular and Cellular Probes*, 23(3–4), 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2009.02.001>
- Mulet, M., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology*, 12(6), 1513–1530. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02181.x>
- Parte, A. C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C., & Göker, M. (2020). List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5607–5612. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>
- Powell, M., Gundersen, B., Miles, C. A., Humann, J. L., Schroeder, B. K., & Inglis, D. A. (2013). First report of tomato pith necrosis (*Pseudomonas corrugata*)

- on tomato (*Solanum lycopersicum*) in Washington. *Plant Disease*, 97(10), 1381–1381. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-13-0265-PDN>
- Quezado-Duval, A. M., Guimarães, C. M. N., & Martins, O. M. (2007). Occurrence of *Pseudomonas corrugata* causing pith necrosis on tomato plants in Goiás, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 32(6), 520. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582007000600014>
- R Core Team. (2024). *R: A language and environment for statistical computing*. <https://www.R-project.org/>
- Rodríguez-Alvarado, G., Holguín-Peña, J., Ochoa-Álvarez, N., Fernández-Pavía, S. P., & Geraldo-Verdugo, J. A. (2002). *Pseudomonas corrugata* causing pith necrosis on tomato plants in Baja California Sur, México. *Plant Disease*, 86(5), 563–563. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.5.563B>
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3), 441–448. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)
- Scarlett, C. M., Fletcher, J. T., Roberts, P., & Lelliot, R. A. (1978). Tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas corrugata* n. sp. *Annals of Applied Biology*, 88(1), 105–114. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1978.tb00684.x>
- SFE. (2009). *Lista de enfermedades de los cultivos agrícolas y forestales de Costa Rica, 2009*.
- Silvera-Pérez, E., Maeso, D., Catara, V., Rubio, L., Leoni, C., Amaral, J., Estelda, C., Hernández, M., Bóffano, L., & González, P. (2023). *Pseudomonas* spp. associated with tomato pith necrosis in the Salto area, Northwest Uruguay. *European Journal of Plant Pathology*, 165(4), 715–724. <https://doi.org/10.1007/s10658-023-02639-6>
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Tayeb, L. A., Ageron, E., Grimont, F., & Grimont, P. A. D. (2005). Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on rpoB sequences and application for the identification of isolates. *Research in Microbiology*, 156(5–6), 763–773. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.02.009>

- Timilsina, S., Adkison, H., Testen, A. L., Newberry, E. A., Miller, S. A., Paret, M. L., Minsavage, G. V., Goss, E. M., Jones, J. B., & Vallad, G. E. (2017). A novel phylogroup of *Pseudomonas cichorii* identified following an unusual disease outbreak on tomato. *Phytopathology*, *107*(11), 1298–1304. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-17-0178-R>
- Tran, P. N., Savka, M. A., & Gan, H. M. (2017). *In-silico* taxonomic classification of 373 genomes reveals species misidentification and new genospecies within the genus *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1296. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01296>
- Trantas, E. A., Sarris, P. F., Mpalantinaki, E. E., Pentari, M. G., Ververidis, F. N., & Goumas, D. E. (2013). A new genomovar of *Pseudomonas cichorii*, a causal agent of tomato pith necrosis. *European Journal of Plant Pathology*, *137*(3), 477–493. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0258-8>
- Trantas, E. A., Sarris, P. F., Pentari, M. G., Mpalantinaki, E. E., Ververidis, F. N., & Goumas, D. E. (2015). Diversity among *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea* isolated from tomato and pepper showing symptoms of pith necrosis in Greece. *Plant Pathology*, *64*(2), 307–318. <https://doi.org/10.1111/ppa.12261>
- Uribe-Lorío, L., Uribe, L., Rodríguez, C., García, F., & Aráuz, L. F. (2024). Diversidad y resistencia a antibióticos en bacterias asociadas a síntomas de infección bacteriana en cultivos de Costa Rica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *42*(2), 13. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2305-5>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. Springer-Verlag New York. <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Xu, X., Baysal-Gurel, F., & Miller, S. A. (2013). First report of tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas mediterranea* in the United States and *P. corrugata* in Ohio. *Plant Disease*, *97*(7), 988–988. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-12-1208-PDN>
- Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D. L., Jackson, R. W., Vivian, A., & Harayama, S. (2000). Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes The GenBank accession numbers for the sequences determined in this work are: *gyrB*, D37926, D37297, D86005–D86019 and AB039381–AB0. *Microbiology*, *146*(10), 2385–2394. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2385>
- Zhao, M., Gitaitis, R., & Dutta, B. (2023). Characterization of *Pseudomonas capsici* strains from pepper and tomato. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1267395. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1267395>
- Zhao, M., Koirala, S., Chen, H.-C., Gitaitis, R., Kvitko, B., & Dutta, B. (2021). *Pseudomonas capsici* sp. nov., a plant-pathogenic bacterium isolated

from pepper leaf in Georgia, USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(8), 004971.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004971>

Zhao, M., Tyson, C., Chen, H.-C., Paudel, S., Gitaitis, R., Kvitko, B., & Dutta, B. (2022). *Pseudomonas alliivorans* sp. nov., a plant-pathogenic bacterium isolated from onion foliage in Georgia, USA. *Systematic and Applied Microbiology*, 45(1), 126278.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126278>

2.6 ANEXOS

Cuadro S2.1 Cepas de referencia utilizadas en el análisis de secuencias multilocus (MLSA). Se utilizaron las secuencias parciales de los genes *16S ARNr*, *gyrB*, *rpoD* y *rpoB* de cepas tipo descargadas de la base de datos de GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

Especie	Cepa	Número de accesión en el GenBank del NCBI			
		<i>16S ARNr</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>	<i>rpoB</i>
<i>Pseudomonas allivivans</i>	20GA0068 ^T	NR_181670	NZ_JAFFZW010000003	NZ_JAFFZW010000003	NZ_JAFFZW010000009
<i>Pseudomonas argentinensis</i>	CH01 ^T = LMG 22563 ^T	AY691188	FN554170	FN554451	FN554728
<i>Pseudomonas asturiensis</i>	LPPA 221 ^T = LMG 26898 ^T	NR_108461	HF546083	HF549098	NZ_FRDA01000024
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	IAM 1603 ^T = CIP 106744 ^T	D84009	AB039411	AB039547	AJ717458
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	DBK11 ^T = CFBP 11706 ^T = CIP 107059 ^T	AF100321	AM084675	AM084334	AJ717436
<i>Pseudomonas californiensis</i>	DCDFA 601 ^T	OL780805	NZ_JAGTPK010000044	NZ_JAGTPK010000016	NZ_JAGTPK010000012
<i>Pseudomonas capsici</i>	Pc19-1 ^T	NR_181640	NZ_JAFGZD010000007	MW623635	NZ_JAFGZD010000008
<i>Pseudomonas caspiana</i>	FBF102 ^T	HG805773	HG805671	HG805592	NZ_LOHF01000009
<i>Pseudomonas cichorii</i>	ATCC 10857 ^T = NCPPB 943 ^T = LMG 2162 ^T	NR_112070	AB039434	AB039526	AJ717418
<i>Pseudomonas coronafaciens</i>	NCPPB 600 ^T = LMG13190 ^T	NR_179736	MF666682	MF666679	AJ717443
<i>Pseudomonas corrugata</i>	ATCC 29736 ^T = NCPPB 2445 ^T = LMG 2172 ^T	D84012	AB039460	AB039566	AJ717487
<i>Pseudomonas cremoricolorata</i>	IAM 1541 ^T = DSM 17059 ^T = CIP 107616 ^T	AB060137	FN554181	FN554462	AJ717476
<i>Pseudomonas flavescens</i>	B62 ^T = LMG18387 ^T = CIP 104204 ^T	U01916	FN554183	FN554465	AJ717468
<i>Pseudomonas floridensis</i>	GEV388 ^T	NR_159301	NZ_MUIO010000086	KY612203	NZ_MUIO010000023
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	IAM 12022 ^T = CIP 69.13 ^T	D84013	D86016	AB039545	AJ717451
<i>Pseudomonas fulva</i>	NRIC 0108 ^T = IAM 1529 ^T = CIP 106765 ^T	AB060136	AB039395	AB039586	AJ717419
<i>Pseudomonas graminis</i>	DSM 11363 ^T = LMG 21661 ^T = CIP 105897 ^T	NR_026395	FN554187	FN554469	AJ717429
<i>Pseudomonas koreensis</i>	Ps 9-14 ^T = LMG 21318 ^T	AF468452	FN554194	FN554476	FN554737
<i>Pseudomonas lijiangensis</i>	LJ2 ^T	MZ723343	NZ_CP076668	MZ735712	NZ_CP076668
<i>Pseudomonas lutea</i>	OK2 ^T = LMG 21974 ^T	AY364537	FN554198	FN554480	FN554738

Especie	Cepa	Número de accesión en el GenBank del NCBI			
		16S ARNr	gyrB	rpoD	rpoB
<i>Pseudomonas marginalis</i>	LMG 2210 ^T = NCPPB 667 ^T	Z76663	AB039448	AB039575	AJ717425
<i>Pseudomonas mediterranea</i>	CFBP 5447 ^T = CIP 107708 ^T	AF386080	AM084678	AM084337	AJ717449
<i>Pseudomonas monteilii</i>	CIP 104883 ^T = DSM 14164 ^T	AF064458	FN554205	FN554488	AJ717455
<i>Pseudomonas parafulva</i>	AJ 2129 ^T = DSM 17004 ^T = CIP 107617 ^T	AB060132	FN554216	FN554500	AJ717471
<i>Pseudomonas punonensis</i>	LMT03 ^T	NR_109583	JX435105	JX435103	JX435104
<i>Pseudomonas putida</i>	IAM 1236 ^T = ATCC 12633 ^T = LMG 2257 ^T	D84020	AB039451	AB039581	AJ717474
<i>Pseudomonas quasicaspiana</i>	C DFA 553 ^T	OL780796	NZ_JAGTPI010000002	NZ_JAGTPI010000020	NZ_JAGTPI010000043
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	ATCC 13522 ^T = NCPPB 639 ^T = CIP 103721 ^T	AB021402	AB039469	AB039514	AJ717422
<i>Pseudomonas straminea</i>	IAM 1598 ^T = LMG 21615 ^T	D84023	AB039410	AB039600	FN554758
<i>Pseudomonas synxantha</i>	IAM 12356 ^T = IFO 3913 ^T = LMG 2335 ^T	D84025	AB039415	AB039550	AJ717420
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	NCPPB 281 ^T = PDDCC 3023 ^T = ATCC 19310 ^T	DQ318866	AB039428	AB039516	FN554759
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	DC3000	AE016853	AE016853	EU296593	AE016853
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	CECT 458 ^T = PDDCC 2848 ^T = ATCC 13223 ^T	AY180972	AB039427	AB039520	FN554764
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^{GE}	DSM 50071 ^T = IFO12689 ^T = LMG 1242 ^T	HE978271	AB039386	AB039607	AJ717442

^T = Cepa tipo. ^{GE} = Grupo externo

Cuadro S2.2 Cepas de referencia utilizadas en el análisis filogenético para la identificación de la cepa LTM 72.2.1 y las cepas no patogénicas. Se utilizaron las secuencias parciales del gen *16S ARNr* de cepas tipo descargadas en la base de datos del GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

Especie	Cepa	Accesión
<i>Cedecea davisae</i>	DSM 4568 ^T	NR_025243
<i>Cedecea lapagei</i>	DSM 4587 ^T	NR_126317
<i>Cedecea neteri</i>	JCM 7582 ^T	LC504043
<i>Cedecea sulfonyleivorans</i>	LAM2020 ^T	MW429197
<i>Pantoea agglomerans</i>	DSM 3493 ^T	NR_041978
<i>Pantoea ananatis</i>	LMG 2665 ^T	Z96081
<i>Pantoea conspicua</i>	LMG 24534 ^T	NR_116247
<i>Pantoea deleyi</i>	LMG 24200 ^T	NR_116114
<i>Pantoea vagans</i>	LMG 24199 ^T	EF688012
<i>Pseudomonas cremoricolorata</i>	DSM 17059 ^T	NR_104279
<i>Pseudomonas flavescens</i>	B62 ^T	U01916
<i>Pseudomonas fulva</i>	IAM 1529 ^T	NR_115610
<i>Pseudomonas japonica</i>	NBRC 103040 ^T	KT825519
<i>Pseudomonas palmensis</i>	BBB001 ^T	NR_181427
<i>Pseudomonas parafulva</i>	JCM 11224 ^T	LC507438
<i>Pseudomonas parafulva</i>	NBRC 16636 ^T	NR_104278
<i>Pseudomonas punonensis</i>	LMT03 ^T	NR_109583
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 12633 ^T	MG708344
<i>Pseudomonas qingdaonensis</i>	JJ3 ^T	NR_169411
<i>Pseudomonas straminea</i>	JCM 2783 ^T	LC420056
<i>Pseudomonas straminea</i>	NBRC 16665 ^T	NR_113859
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 13880 ^T	PP112078
<i>Serratia nematodiphila</i>	DSM 21420 ^T	PP068848
<i>Serratia nematodiphila</i>	DZ0503SBS1 ^T	NR_044385
<i>Serratia nevei</i>	LMG 31536 ^T	CP149940
<i>Serratia sarumanii</i>	K-M0706 ^T	CP124750
<i>Serratia surfactantfaciens</i>	YD25 ^T	NR_169468
<i>Stenotrophomonas cyclobalanopsidis</i>	TPQG1-4 ^T	NR_180613
<i>Stenotrophomonas geniculata</i>	ATCC 19374 ^T	MT672503
<i>Stenotrophomonas hibiscicola</i>	ATCC 19867 ^T	MT780275
<i>Stenotrophomonas humi</i>	DSM 18929 ^T	MW629800
<i>Stenotrophomonas indicatrix</i>	WS40 ^T	KJ452162
<i>Stenotrophomonas lactitubi</i>	M15 ^T	NR_179509
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	IAM 12423 ^T	NR_041577
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ATCC 13637 ^T	NR_112030
<i>Stenotrophomonas nematodicola</i>	W5 ^T	NR_181111
<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	LMG 25348 ^T	NR_118008
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	e-p10 ^T	NR_121739
<i>Symbiopectobacterium purcellii</i>	SyEd1 ^T	NR_181864
<i>Bacillus subtilis</i> ^{GE}	IAM 12118 ^T	AB042061

^T = Cepa tipo. ^{GE} = Grupo externo

CAPÍTULO 3: Evaluación *in vitro* de la sensibilidad de bacterias patogénicas y no patogénicas de tomate a cinco antibióticos de uso agrícola empleados con frecuencia en Costa Rica

3.1 INTRODUCCIÓN

El manejo de enfermedades bacterianas en el cultivo de tomate está basado en estrategias preventivas orientadas a reducir las fuentes de inóculo y la dispersión del patógeno, como la siembra de material resistente, el manejo de la densidad y momentos de siembra, la rotación de cultivos, el manejo del riego y el drenaje, la disposición adecuada de residuos de cosecha y el control de arvenses, así como la intervención del cultivo con métodos químicos o biológicos (Kolomiiets et al., 2019; Sundin et al., 2016). Las aplicaciones de compuestos de cobre se han implementado como medidas preventivas contra infecciones bacterianas y fúngicas desde la década de 1880 (Lamichhane et al., 2018; Sundin et al., 2016). Sin embargo, al convertirse en el método más utilizado para el manejo de enfermedades de origen bacteriano alrededor del mundo, ha llevado al surgimiento de cepas resistentes (Fan et al., 2022; Lamichhane et al., 2018; Sundin et al., 2016); además, los compuestos de cobre presentan efectos adversos en el ambiente y la biodiversidad, ya que han contaminado suelos y aguas subterráneas, con un gran impacto en la microbiota del suelo (Lamichhane et al., 2018; Merrington et al., 2002), y su acumulación en el suelo afecta la salud de los cultivos a largo plazo debido a la fitotoxicidad (Lamichhane et al., 2018).

Desde el descubrimiento del potencial de los antibióticos como la estreptomicina para tratar enfermedades en plantas en la década de 1950, estos compuestos han formado parte de las herramientas de manejo de los cultivos para los productores alrededor del mundo (McManus et al., 2002; McManus & Stockwell, 2000; Sundin et al., 2016). Los antibióticos adquirieron gran popularidad ya que se requerían dosis pequeñas y su toxicidad en las plantas era baja o nula comparada con los compuestos a base de metales que se utilizaban en ese momento (McManus et al., 2002). Sin embargo, al poco tiempo desde su

introducción en los sistemas agrícolas, surgieron poblaciones bacterianas patógenas y no patógenas con fenotipos resistentes a los antibióticos, por lo que la eficacia de estos métodos de control ha sido impactada de forma negativa (McManus et al., 2002; McManus & Stockwell, 2000; Sundin et al., 2016). El uso extensivo de los antimicrobianos durante múltiples años o el elevado número de aplicaciones en una misma temporada de producción están correlacionados con la selección de resistencia en las poblaciones de bacterias patógenas y no patógenas, así como con la reducción de la efectividad de los tratamientos (Batuman et al., 2024; McManus et al., 2002; Sundin et al., 2016).

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los antibióticos debido a la presión de selección causada por las aplicaciones no reguladas de estos productos, o pueden adquirir genes que codifican determinantes de resistencia, generalmente mediante la transferencia horizontal de genes, incluso desde especies filogenéticamente distintas (McGhee & Sundin, 2011; Soucy et al., 2015; Sundin et al., 2016; Sundin & Wang, 2018). Aunque existen bacterias que pueden presentar una resistencia intrínseca a los antibióticos, independiente de la transferencia horizontal de genes y previa a la exposición a antibióticos, ya que poseen características estructurales o funcionales inherentes que les permiten sobrevivir en la presencia de antibióticos (Blair et al., 2015). Los principales mecanismos de resistencia que presentan las bacterias pueden resumirse en tres grupos principales: mecanismos que modifican el sitio diana del antibiótico ya sea por una mutación genética o una modificación post-traducciona del objetivo; mecanismos que reducen la concentración intracelular del antibiótico como resultado de la poca penetración por la disminución de la permeabilidad de la membrana celular o mediante la expulsión del antibiótico con bombas de eflujo; y mecanismos de inactivación del antibiótico por hidrólisis o por modificación de la molécula (Batuman et al., 2024; Blair et al., 2015). La resistencia a los antibióticos representa un problema de salud a nivel mundial en el ámbito humano, animal y vegetal debido a la preocupación de que las bacterias resistentes dentro de un ambiente agrícola puedan transferir genes de resistencia a bacterias de importancia clínica (Maeusli et al., 2020; McManus et al., 2002; McManus & Stockwell, 2000; Rodríguez et al., 2006, 2008; Stockwell

& Duffy, 2012). Esta preocupación es uno de los factores que determina la escasez de antibióticos considerados para ser utilizados en agricultura (Batuman et al., 2024).

En Costa Rica, durante los últimos años se han utilizado diferentes antibióticos registrados para unos pocos cultivos, como el Agry-Gent Plus 8 WP a base de oxitetraciclina y gentamicina, autorizado en papa (*Solanum tuberosum*) y piña (*Ananas comosus*); Kasumin 2 SL a base de kasugamicina, autorizado en arroz (*Oriza sativa*), chile dulce (*Capsicum annuum*) y repollo (*Brassica oleracea*); Cuprimicin 61.7 WP a base de oxitetraciclina, estreptomicina y sulfato tribásico de cobre, autorizado en aguacate (*Persea americana*), banano (*Musa AAA*), plátano (*Musa AAB*), cacao (*Theobroma cacao*), café (*Coffea arabica*), cebolla (*Allium cepa*), frijol (*Phaseolus vulgaris*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*); y otros productos cuyo uso ha sido cancelado como Agri-Mycin 16.5 WP a base de oxitetraciclina y estreptomicina; Agri-Mycin 44.3 WP a base de oxitetraciclina, estreptomicina y sulfato tribásico de cobre; y Terramicina Agrícola 5 WP a base de oxitetraciclina; (SFE, 2024). También se reporta el uso de validamicina en papa (Ramírez-Muñoz et al., 2014), aunque este antibiótico tiene principalmente una actividad fungicida, y se comercializa bajo los nombres Cepex 10 SL y Validacin 5 SL a base de validamicina A, autorizado en arroz y café (SFE, 2024). Para el cultivo de tomate no existen antibióticos autorizados según el Servicio Fitosanitario del Estado (SFE), sin embargo, al presentarse infecciones bacterianas algunos productores aplican productos con contenido de antibióticos como estreptomicina, oxitetraciclina, gentamicina y kasugamicina (Blanco-Meneses et al., 2023).

Además de las limitantes normativas, los estudios de sensibilidad de bacterias fitopatógenas a estos antibióticos en el país son escasos, sin embargo, en algunos casos se han revelado hallazgos importantes de comunidades bacterianas asociadas a los cultivos con características de resistencia a uno o varios antibióticos (Rodríguez et al., 2006, 2008; Uribe-Lorío et al., 2024). Estos conocimientos son de mayor interés para los involucrados en las cadenas de producción agrícola ya que pueden determinar la disponibilidad de compuestos efectivos para el control de agentes bacterianos patógenos en los diferentes

cultivos. El objetivo de este estudio fue determinar la sensibilidad de bacterias patogénicas y no patogénicas de tomate a compuestos puros de los antibióticos de uso agrícola aplicados con mayor frecuencia para el combate de enfermedades bacterianas en Costa Rica.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Aislamientos bacterianos y antibióticos de uso agrícola

Se evaluaron 13 cepas de bacterias Gram negativas patogénicas y no patogénicas aisladas de plantas de tomate con síntomas de infecciones bacterianas, colectadas en diferentes localidades del Valle Central de Costa Rica. Las cepas bacterianas fueron identificadas previamente mediante la secuenciación parcial del gen *16S ARNr* o el Análisis de Secuencias Multilocus (MLSA) con las secuencias concatenadas de los genes *16S ARNr*, *gyrB*, *rpoD* y *rpoB*. Además de las cepas de prueba, se utilizaron las cepas ATCC 25922 de *Escherichia coli* y ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa* donadas por el Laboratorio de Bacteriología Médica de la Facultad de Microbiología-UCR como control de calidad en las pruebas para determinar la sensibilidad a antibióticos (CLSI, 2020).

Se utilizaron cinco compuestos puros de antibióticos de uso agrícola para determinar la sensibilidad de los aislamientos bacterianos. Los antibióticos seleccionados fueron estreptomicina, gentamicina, kasugamicina, tetraciclina y validamicina. La sensibilidad de los aislamientos bacterianos a los antibióticos se evaluó mediante pruebas de difusión en disco con el método Kirby-Bauer y pruebas de dilución en agar para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI).

3.2.2 Prueba de difusión en disco (método Kirby-Bauer)

La prueba de difusión en disco consistió en colocar discos de papel filtro impregnados con cantidades conocidas de los diferentes antibióticos sobre platos de agar rayados con las cepas bacterianas con el fin de determinar el diámetro de las zonas de inhibición de crecimiento de cada antibiótico por cepa

bacteria. El inóculo se preparó a una concentración de 1×10^8 UFC/ml con cultivos frescos (< 24 horas de crecimiento) mediante la suspensión bacteriana de cada cepa en tubos de ensayo con 3 ml de solución salina estéril al 0.85% hasta alcanzar una turbidez similar a la de un patrón McFarland 0.5 (equivalente a 1×10^8 UFC/ml); la concentración del inóculo se confirmó midiendo la absorbancia de la suspensión a una longitud de onda de 625 nm en un espectrofotómetro de microvolúmenes hasta alcanzar valores entre 0.08 y 0.13, equivalente a 1×10^8 UFC/ml (Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021). Las suspensiones bacterianas se rayaron de manera uniforme con aplicadores de algodón estériles en platos Petri de 90 mm de diámetro con 25 ml de medio sólido de agar Mueller-Hinton (MHA) OXOID™ CM0337 (38g/L).

Los discos de antibióticos utilizados fueron: a) tetraciclina 30 μg (OXOID™); b) estreptomina 10 μg (OXOID™); c) gentamicina 10 μg (OXOID™); d) kasugamicina 250 μg (impregnado manualmente con solución de clorhidrato de kasugamicina VETRANAL™ Sygma-Aldrich); y e) validamicina 250 μg (impregnado manualmente con solución de validamicina A Gold Biotechnology®). Los discos impregnados de forma manual se prepararon con papel filtro Whatman No. 42, cortados con perforadora de papel de 6 mm de diámetro y esterilizados en autoclave a 121°C por 15 min; la concentración inicial de las soluciones de kasugamicina y validamicina para impregnar los discos de papel filtro se determinó con la fórmula:

$$C_{ia} = C_{ad} \times V_{ad} \quad \text{Ec 3.1}$$

Donde C_{ia} = Concentración diluida del antibiótico (a partir de solución stock); C_{ad} = Cantidad de antibiótico por disco (mg); V_{ad} = Volumen de antibiótico impregnado por disco (ml). Previo a la preparación manual de los discos con antibiótico se realizaron pruebas del volumen de líquido soportado por los discos de papel filtro y el tiempo de secado impregnando los discos con agua destilada; también se realizó una prueba preliminar de difusión del antibiótico estreptomina en discos de papel filtro con una cantidad de 10 μg por disco en el medio MHA rayado con las cepas de *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa*

ATCC 27853 y se comparó con los halos de inhibición generados con los discos de estreptomina 10 µg OXOID™.

Se determinó que el volumen máximo soportado por los discos de papel filtro para un secado adecuado en un periodo menor de una hora fue de 25 µl por disco, por lo que para alcanzar la cantidad deseada de kasugamicina y validamicina de 250 µg por disco, se preparó una solución de cada antibiótico a una concentración de 10 mg/ml y se impregnó cada disco con 25 µl del antibiótico respectivo. En cada plato inoculado con una cepa individual se colocaron discos de los cinco antibióticos con pinzas estériles en una distribución de cruz; la distancia entre cada disco dentro del plato fue ≥ 25 mm y la distancia entre los discos y el borde del plato fue ≥ 15 mm. Se realizaron tres repeticiones por cada cepa bacteriana incluyendo las cepas control. Los platos se incubaron de forma invertida a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 16-24 horas. La preparación del inóculo, el rayado del inóculo, la colocación de los discos, y la colocación en la incubadora se realizaron en periodos no mayores a 30 min entre cada uno.

Después del periodo de incubación se midió el diámetro de las zonas de inhibición de crecimiento generados alrededor de los discos de antibiótico para las tres repeticiones por cada cepa y se calculó la media para cada antibiótico. Para los antibióticos tetraciclina, estreptomina y gentamicina se compararon los diámetros de las zonas de inhibición con los puntos de corte de las categorías de sensibilidad para bacterias de importancia clínica susceptibles, intermedias y resistentes del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), susceptible: ≥ 15 mm para tetraciclina, estreptomina y gentamicina; intermedia: 12-14 mm para tetraciclina y estreptomina, 13-14 mm para gentamicina; y resistente: ≤ 11 mm para tetraciclina y estreptomina, ≤ 12 mm para gentamicina (CLSI, 2020).

3.2.3 Prueba de dilución en agar para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los cinco compuestos puros de antibióticos de uso agrícola sobre las 13 cepas de prueba

y las cepas de control de calidad, se utilizó el método de dilución en medio de agar Mueller-Hinton (MHA). Se prepararon soluciones stock con concentraciones de 10 mg/ml para cada antibiótico, utilizando los compuestos: clorhidrato de tetraciclina (VETRANAL™ Sygma-Aldrich), sesquisulfato de estreptomina (VETRANAL™ Sygma-Aldrich), sulfato de gentamicina (VETRANAL™ Sygma-Aldrich), clorhidrato de kasugamicina (VETRANAL™ Sygma-Aldrich), y validamicina A (Gold Biotechnology®). Se pesó 0.1 g de cada compuesto y se diluyó con 10 ml de agua destilada estéril, excepto la tetraciclina que se diluyó en 10 ml de etanol al 50%. Después de homogeneizar las soluciones, todas excepto la tetraciclina, se esterilizaron con filtro de 0.22 µm y se dispensaron en alícuotas de 1 ml; la solución de tetraciclina se dispensó directamente en alícuotas de 1 ml. Las alícuotas de las soluciones de tetraciclina, estreptomina y gentamicina se conservaron a 4°C, mientras que las alícuotas de las soluciones de kasugamicina y validamicina se conservaron a -20°C hasta su uso.

Las concentraciones de antibiótico evaluadas en el medio fueron de 1, 5, 10, 30, 50, 100, 250 y 500 µg/ml para tetraciclina, estreptomina y kasugamicina; 1, 5, 10, 30 y 50 µg/ml para gentamicina; y 1, 5, 10, 30, 50, 500, 1000, 2000 y 3000 µg/ml para validamicina. El volumen de la solución stock de cada antibiótico necesario para alcanzar las diferentes concentraciones en 100 ml de medio se determinó con la fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad \text{Ec 3.2}$$

Donde C_1 = concentración inicial de la solución stock del antibiótico; V_1 = volumen inicial a tomar de la solución stock del antibiótico; C_2 = concentración final del antibiótico en el medio; y V_2 = volumen final del medio. Las diluciones de los antibióticos en el medio se realizaron agregando el volumen requerido de cada antibiótico con una micropipeta a un matraz Erlenmeyer con medio de agar Mueller-Hinton (MHA) a una temperatura de 50-55°C hasta completar 100 ml. Se transfirieron 25 ml de medio con antibiótico en platos Petri de 90 mm de diámetro y se realizaron tres repeticiones por cada concentración de antibiótico. El inóculo de cada cepa bacteriana se preparó a una concentración final en plato

de 1×10^4 UFC/ml, obtenida mediante una dilución 1:100 de la suspensión bacteriana al 1×10^8 UFC/ml, seguido de la siembra de 10 μ l sobre el medio con una micropipeta. Las 16 cepas fueron sembradas en el mismo plato para completar una repetición de cada concentración por antibiótico. Los platos se incubaron de forma invertida a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 16-24 horas.

Después del periodo de incubación se registró el crecimiento bacteriano en cada punto de inoculación. Se registró la concentración mínima en la que se inhibió el crecimiento de las cepas en su totalidad en las tres repeticiones para cada antibiótico. Para los antibióticos tetraciclina y gentamicina se compararon las CMI con los rangos de referencia para los puntos de corte de bacterias de importancia clínica susceptibles, intermedias y resistentes del CLSI que son: susceptible: $\leq 4 \mu\text{g/ml}$; intermedia: $8 \mu\text{g/ml}$; y resistente: $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ (CLSI, 2020); para estreptomycinina se utilizó el punto de corte de bacterias resistentes $\geq 50 \mu\text{g/ml}$ utilizado por Córdova et al. (2022) con especies de *Pseudomonas* asociadas al cultivo de tomate en Chile. Para kasugamicina se utilizó el punto de corte $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ utilizado por McGhee & Sundin (2011).

Los resultados de ambas pruebas se interpretaron como la capacidad de crecimiento en presencia de los antibióticos evaluados y no como una clasificación de cepas resistentes o susceptibles, ya que los puntos de corte del CLSI han sido determinados a través de métodos farmacológicos en seres humanos, lo que representa una limitante en la interpretación de resultados para bacterias aisladas de plantas.

Con los valores de CMI para cada antibiótico se ajustaron modelos lineales generalizados con distribución binomial (regresión logística) para predecir la probabilidad de crecimiento de las bacterias (μ_{Crec}) ante diferentes concentraciones de los antibióticos. Se definió la variable respuesta μ_{Crec} como una variable binomial con enlace logit de la probabilidad esperada de crecimiento ($y = 1$) y $1 - \mu_{Crec}$ como la probabilidad de no crecimiento ($y = 0$):

$$\log\left(\frac{\mu_{Crec}}{1-\mu_{Crec}}\right) = \beta_0 + \beta \text{ Conc. ab} \quad \text{Ec 3.3}$$

Donde β_0 representa el intercepto y $\beta \text{ Conc. ab}$ representa el coeficiente de la concentración del antibiótico. Los gráficos de los modelos se realizaron con las librerías 'sjPlot', 'ggplot2' y 'patchwork' (Lüdecke, 2023; Pedersen, 2024; Wickham, 2016) en el entorno de R (R Core Team, 2024).

También se elaboró un mapa de calor utilizando la librería 'pheatmap' (Kolde, 2019) a partir de una matriz de distancias euclidianas para definir el agrupamiento de los aislamientos con base en sus características de patogenicidad, virulencia y la combinación de valores de CMI en la prueba de dilución en agar y los diámetros de zonas de inhibición en la prueba de difusión en disco.

3.3 RESULTADOS

Se realizó la prueba de difusión en disco (método Kirby-Bauer) para determinar el comportamiento de 13 cepas bacterianas ante cinco agentes antibióticos de uso agrícola. Todos los aislamientos mostraron zonas de inhibición con diámetros > 15 mm con los discos de gentamicina 10 μg (**Cuadro 3.1; Figura 3.1**). Las cepas que presentaron una mayor zona de inhibición con los discos de gentamicina 10 μg fueron las cepas de *Pseudomonas alliivorans* LTM 13.1.2 con 29.17 ± 0.33 mm (media \pm intervalo de confianza al 95% [IC95%]), *Pseudomonas flavescens* LTM 14.2.2 con 28.83 ± 0.33 mm, *Pseudomonas straminea* LTM 78.2.1 con 25.83 ± 0.65 mm y *Pseudomonas capsici* LTM 78.3.2 con 24.50 ± 0.57 mm (**Cuadro 3.1; Figura 3.1; Figura 3.2**); todas categorizadas como virulentas o muy virulentas y causantes de la necrosis medular en tomate. La cepa con menor diámetro de zona de inhibición de crecimiento fue la de *Cedecea neteri* LTM 72.2.1 con 17.50 ± 0.57 mm. La cepa control de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 presentó un halo de inhibición de crecimiento de 10 mm, por debajo del rango descrito de 17-23 mm (CLSI, 2020) El halo observado para gentamicina en la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 fue de 18.33 ± 0.33 mm, levemente por debajo del rango descrito de 19-26 mm (CLSI, 2020).

Los discos de tetraciclina 30 μg generaron halos de inhibición en 11 de las cepas de prueba, con diámetros > 15 mm. El crecimiento de las cepas LTM 71.3.2 y

LTM 74.3.1, ambas del género *Serratia*, no fue inhibido con los discos de tetraciclina (**Cuadro 3.1; Figura 3.1; Figura 3.2**). La cepa *E. coli* ATCC 25922 presentó un halo de inhibición de 24.00 ± 0.57 mm, dentro del rango registrado por el CLSI de 18-25 mm (CLSI, 2020). Los discos de estreptomicina 10 μ g generaron halos de inhibición en 10 de las cepas de prueba, cinco de estas con halos de inhibición ≥ 15 mm. Dentro de las cepas con inhibición de crecimiento, la que presentó el menor diámetro de inhibición fue la cepa de *Serratia* sp. LTM 74.3.1 con 11.17 ± 0.86 mm, esta se encontró en el límite del punto de corte para las bacterias de importancia clínica resistentes a la estreptomicina ≤ 11 mm (CLSI, 2020). El crecimiento de las cepas de *Pseudomonas alliivorans* LTM 13.1.2, *Pseudomonas* sp. LTM 78.1.1 y *Pantoea deleyi* LTM 78.3.1 no fue inhibido con los discos de estreptomicina 10 μ g (**Cuadro 3.1; Figura 3.1; Figura 3.2**). La cepa control *E. coli* ATCC 25922 presentó un halo de inhibición de 14 mm, que concuerda con el rango registrado por el CLSI de 12-20 mm (CLSI, 2020).

Los discos de kasugamicina 250 μ g generaron halos de inhibición en 11 de las cepas de prueba y para la cepa control *E. coli* ATCC 25922, con el mayor diámetro de inhibición en la cepa de *Pseudomonas flavescens* LTM 14.2.2 con 26.67 ± 1.63 mm. Dentro de las cepas con inhibición de crecimiento, la cepa de *Pseudomonas* sp. LTM 78.2.3 fue la que presentó el menor diámetro con 4.50 ± 4.42 mm. El crecimiento de las cepas de *Pseudomonas alliivorans* LTM 13.1.2 y *Pantoea deleyi* LTM 78.3.1 no fue inhibido con los discos de kasugamicina 250 μ g (**Cuadro 3.1; Figura 3.1; Figura 3.2**). Los discos de validamicina 250 μ g no inhibieron el crecimiento de ninguna de las cepas evaluadas (**Figura 3.2**).

Cuadro 3.1 Comportamiento de cepas bacterianas en presencia de cuatro antibióticos de uso agrícola evaluada mediante pruebas de difusión en disco y determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante dilución en agar. Los diámetros de zonas de inhibición (DZI) se muestran como la media \pm intervalo de confianza al 95% (mm). Los valores de CMI se muestran como $\mu\text{g/ml}$. La información correspondiente a la validamicina no se muestra ya que no tuvo ningún efecto de inhibición de crecimiento en ninguna de las cepas en ambas pruebas.

Cepa	Especie/Género	Antibiótico							
		Estreptomicina		Gentamicina		Kasugamicina		Tetraciclina	
		DZI ^a	CMI ^b	DZI	CMI	DZI	CMI	DZI	CMI
		S: ≥ 15 mm; I: 12-14 mm; R: ≤ 11 mm	R: ≥ 50 $\mu\text{g/ml}$	S: ≥ 15 mm; I: 13-14 mm; R: ≤ 12 mm	S: ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$; I: 8 $\mu\text{g/ml}$; R: ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$	-	R: ≥ 100 $\mu\text{g/ml}$	S: ≥ 15 mm; I: 12-14 mm; R: ≤ 11 mm	S: ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$; I: 8 $\mu\text{g/ml}$; R: ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$
LTM 13.1.2	<i>Pseudomonas alliivorans</i>	0.00 \pm 0.00	50	29.17 \pm 0.33	1	0.00 \pm 0.00	500	31.00 \pm 0.57	1
LTM 14.2.2	<i>Pseudomonas flavescens</i>	24.83 \pm 0.33	5	28.83 \pm 0.33	1	26.67 \pm 1.63	30	28.50 \pm 0.57	1
LTM 32.2.1	<i>Pseudomonas</i> sp.	12.17 \pm 0.33	5	19.33 \pm 0.33	1	22.33 \pm 0.86	100	18.50 \pm 0.00	5
LTM 40.2.3	<i>Pseudomonas</i> sp.	16.67 \pm 0.33	5	23.00 \pm 0.57	1	18.50 \pm 1.70	100	21.33 \pm 0.86	5
LTM 49.1.1	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	14.83 \pm 0.33	10	24.33 \pm 0.86	5	13.67 \pm 0.65	250	22.83 \pm 0.65	5
LTM 71.3.2	<i>Serratia</i> sp.	12.00 \pm 0.00	30	20.33 \pm 0.33	1	10.50 \pm 1.50	250	0.00 \pm 0.00	100
LTM 72.2.1	<i>Cedecea neteri</i>	13.17 \pm 1.18	5	17.50 \pm 0.57	1	13.00 \pm 2.04	250	20.17 \pm 0.86	5
LTM 74.3.1	<i>Serratia</i> sp.	11.17 \pm 0.86	30	18.83 \pm 1.42	1	9.00 \pm 1.50	250	0.00 \pm 0.00	100
LTM 78.1.1	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.00 \pm 0.00	500	18.50 \pm 0.57	1	20.50 \pm 1.50	100	18.67 \pm 0.65	5
LTM 78.2.1	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	21.83 \pm 0.33	1	25.83 \pm 0.65	1	20.17 \pm 0.33	30	23.17 \pm 0.33	5
LTM 78.2.3	<i>Pseudomonas</i> sp.	15.00 \pm 0.00	30	23.00 \pm 1.96	5	4.50 \pm 4.42	> 500	20.67 \pm 1.63	100
LTM 78.3.1	<i>Pantoea deleyi</i>	0.00 \pm 0.00	250	19.50 \pm 0.57	1	0.00 \pm 0.00	> 500	26.00 \pm 0.57	1
LTM 78.3.2	<i>Pseudomonas capsici</i>	19.67 \pm 1.31	1	24.50 \pm 0.57	1	21.00 \pm 1.96	100	27.67 \pm 0.65	1
ATCC25922	<i>Escherichia coli</i>	14.00 \pm 0.00	5	18.33 \pm 0.33	1	13.50 \pm 0.98	250	24.00 \pm 0.57	1
ATCC27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.00 \pm 0.00	100	10.00 \pm 0.00	30	0.00 \pm 0.00	500	13.67 \pm 0.33	10

^aDZI: Diámetro de zona de inhibición (mm). Puntos de corte: S = susceptible, I = intermedia, R = resistente (CLSI, 2020).

^bCMI: Concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/ml}$). Puntos de corte: S = susceptible, I = intermedia, R = resistente para gentamicina y tetraciclina (CLSI, 2020), estreptomina (Córdova et al., 2022), kasugamicina (McGhee & Sundin, 2011). Cepas de control de calidad: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

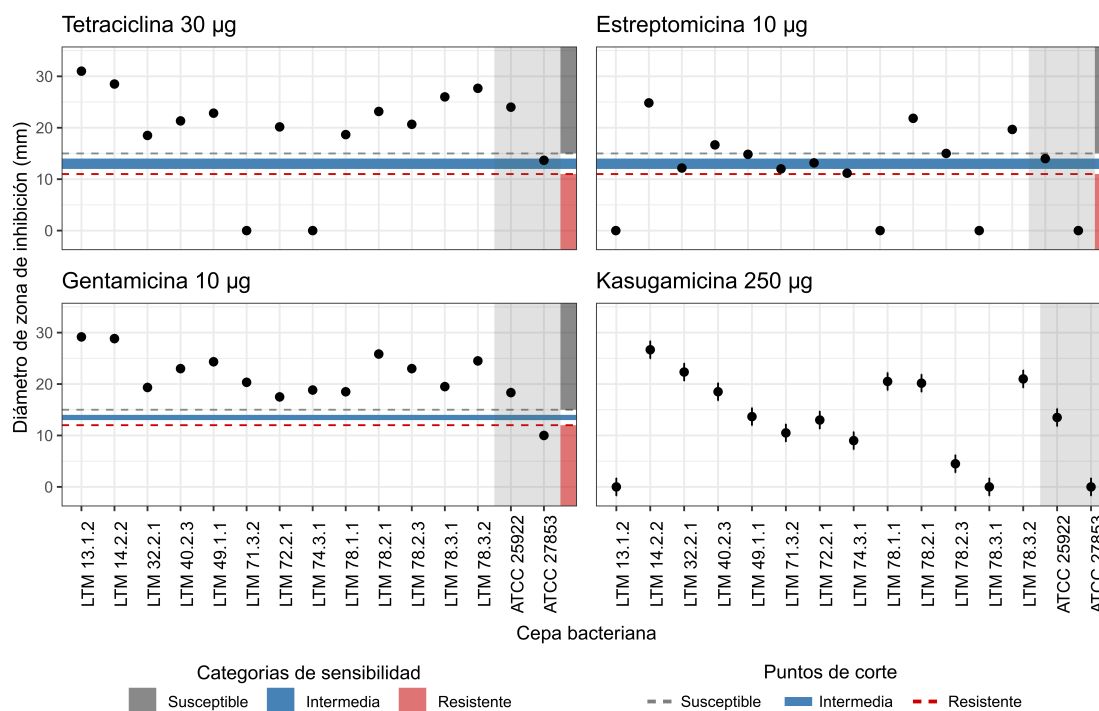


Figura 3.1 Zonas de inhibición de crecimiento de las cepas bacterianas ante cuatro agentes antibióticos evaluada con el método de difusión en disco. Categorías de interpretación de la sensibilidad y puntos de corte para los diámetros de las zonas de inhibición según el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI). Puntos de corte: resistente: ≤ 11 mm para tetraciclina y estreptomicina, ≤ 12 mm para gentamicina; intermedia: 12-14 mm para tetraciclina y estreptomicina, 13-14 mm para gentamicina; y susceptible: ≥ 15 mm para tetraciclina, estreptomicina y gentamicina. Los puntos negros indican la media del diámetro de la zona de inhibición en cada cepa y las barras de error indican el intervalo de confianza al 95%. Las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (resaltadas en gris) fueron utilizadas como control de calidad en las pruebas. La kasugamicina no cuenta con referencias de puntos de corte en la literatura.

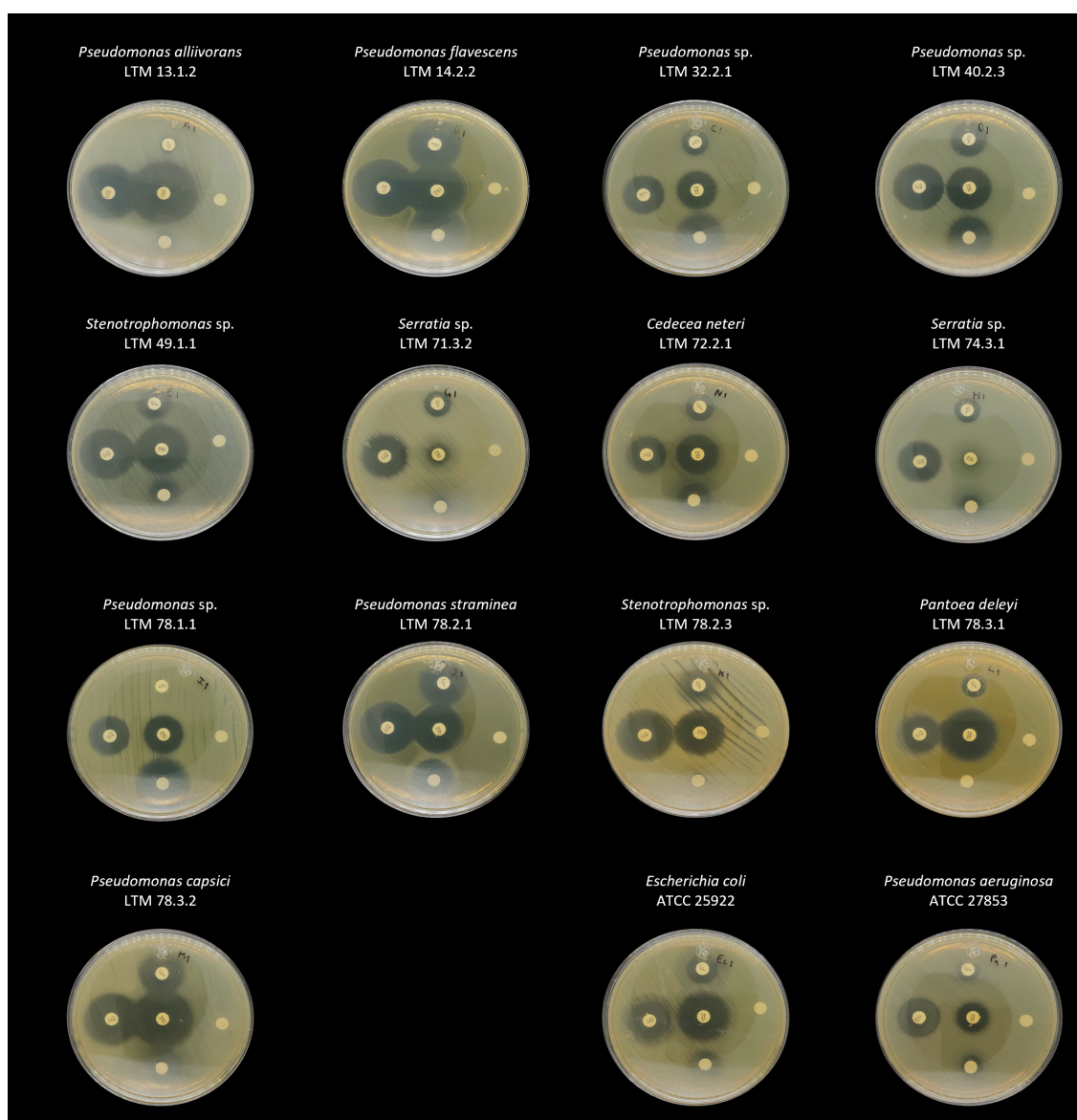


Figura 3.2 Prueba de difusión en disco (método Kirby-Bauer) con cinco antibióticos de uso agrícola. Posición de los discos con antibiótico en todos los platos (vista inferior del plato): centro = tetraciclina 30 µg; arriba = estreptomicina 10 µg; izquierda = gentamicina 10 µg; derecha = validamicina 250 µg; abajo = kasugamicina 250 µg. Cepas control: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Se muestra una de las repeticiones para cada cepa.

Se realizó la prueba de dilución en agar para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antibióticos evaluados contra los aislamientos

bacterianos. De forma similar a la prueba de difusión en disco, el antibiótico más efectivo fue la gentamicina, con una CMI de 1 µg/ml para 11 de las cepas de prueba, y 5 µg/ml para las cepas de *Stenotrophomonas* sp. LTM 49.1.1 y LTM 78.2.3 (**Cuadro 3.1; Figura 3.3; Figura 3.4**). La mediana de la CMI de gentamicina fue de 1 µg/ml, y la media ± desviación estándar fue de 1.61 ± 1.50 µg/ml. La cepa control de *E. coli* ATCC 25922 presentó una CMI de 1 µg/ml, rango registrado en el CLSI de 0.25-1 µg/ml (CLSI, 2020). La cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 presentó una CMI de 30 µg/ml, por encima del rango registrado de 0.5-2 µg/ml (CLSI, 2020).

Para la tetraciclina las CMI fueron de 1-100 µg/ml, con una mediana de 5 µg/ml y una media de 25.69 ± 42.40 µg/ml; con 1 µg/ml en las cepas de *P. alliivorans* LTM 13.1.2, *P. flavescens* LTM 14.2.2 y *P. capsici* LTM 78.3.2; y 5 µg/ml para las cepas de *Cedecea neteri* LTM 72.2.1 y *Pseudomonas straminea* LTM 78.2.1. La CMI más elevada para tetraciclina fue de 100 µg/ml en los aislamientos de *Serratia* sp. LTM 71.3.2 y LTM 74.3.1, y *Stenotrophomonas* sp. LTM 78.2.3 (**Cuadro 3.1; Figura 3.3; Figura 3.4**). Las cepas control *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 presentaron valores de CMI dentro del rango registrado, 0.5-2 µg/ml y 8-32 µg/ml, respectivamente (CLSI, 2020). Para la estreptomomicina se determinó un rango de CMI de 1-500 µg/ml, con una mediana de 10 µg/ml y una media de 70.92 ± 145.06 µg/ml. Las cepas de *Pseudomonas straminea* LTM 78.2.1 y *P. capsici* LTM 78.3.2 presentaron la CMI más baja de 1 µg/ml, seguidas de las cepas de *P. flavescens* LTM 14.2.2 y *Cedecea neteri* LTM 72.2.1 con 5 µg/ml. La cepa de *Pseudomonas alliivorans* LTM 13.1.2 presentó una CMI de 50 µg/ml. La CMI más elevada para estreptomomicina fue de 500 µg/ml en el aislamiento de *Pseudomonas* sp. LTM 78.1.1 (**Cuadro 3.1; Figura 3.3; Figura 3.4**).

La kasugamicina presentó un rango de CMI más variable, de 30 µg/ml a > 500 µg/ml, con una mediana de 100 µg/ml y una media de 178.18 ± 138.77 µg/ml; las cepas de *Pseudomonas flavescens* LTM 14.2.2 y *P. straminea* LTM 78.2.1 presentaron la CMI más baja (30 µg/ml); las cepas de *Pseudomonas* sp. LTM 32.2.1, LTM 40.2.3, LTM 78.1.1 y *P. capsici* LTM 78.3.2 presentaron una CMI de 100 µg/ml. Las cepas de *Stenotrophomonas* sp. LTM 49.1.1, *Serratia* sp. LTM

71.3.2 y LTM 74.3.1, y *Cedecea neteri* LTM 72.2.1 presentaron una CMI de 250 $\mu\text{g/ml}$; la CMI para la cepa de *P. alliivorans* LTM 13.1.2 fue de 500 $\mu\text{g/ml}$ (concentración más alta evaluada). Las cepas de *Stenotrophomonas* sp. LTM 78.2.3 y *Pantoea deleyi* LTM 78.3.1 presentaron una CMI > 500 $\mu\text{g/ml}$ (**Cuadro 3.1; Figura 3.3; Figura 3.4**). La validamicina no tuvo ningún efecto de inhibición en el crecimiento de las cepas evaluadas con las diferentes concentraciones de antibiótico en el medio (1-3000 $\mu\text{g/ml}$) (**Figura 3.4**).

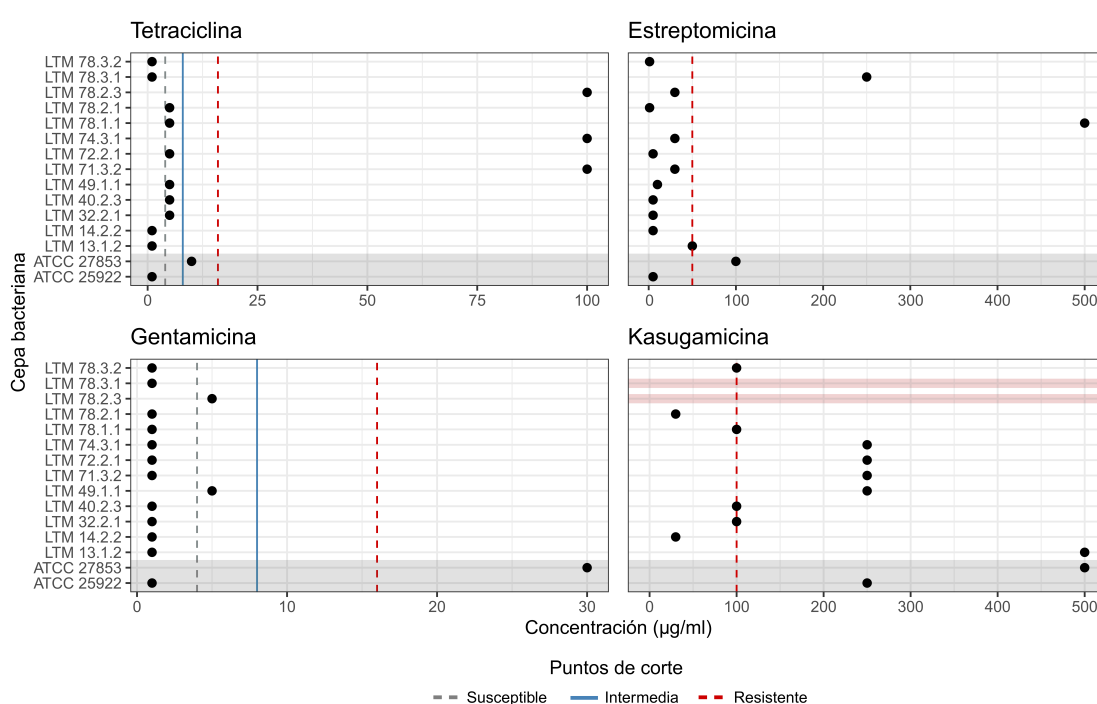


Figura 3.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de cuatro agentes antibióticos evaluada con el método de dilución en agar. Puntos de corte de las CMI de tetraciclina y gentamicina según el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI): susceptibles: $\leq 4 \mu\text{g/ml}$; intermedias: $8 \mu\text{g/ml}$; y resistentes: $\geq 16 \mu\text{g/ml}$. Puntos de corte de la CMI para bacterias resistentes a estreptomicina: $\geq 50 \mu\text{g/ml}$ (Córdova et al., 2022) y a kasugamicina: $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ (McGhee & Sundin, 2011). Los puntos negros indican la concentración que inhibió completamente el crecimiento en las tres repeticiones correspondientes a cada cepa. Las líneas horizontales rojas en kasugamicina indican las cepas en las que la CMI fue > 500 $\mu\text{g/ml}$ (concentración máxima evaluada). Las cepas de

Escherichia coli ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (resaltadas en gris) fueron utilizadas como control de calidad.

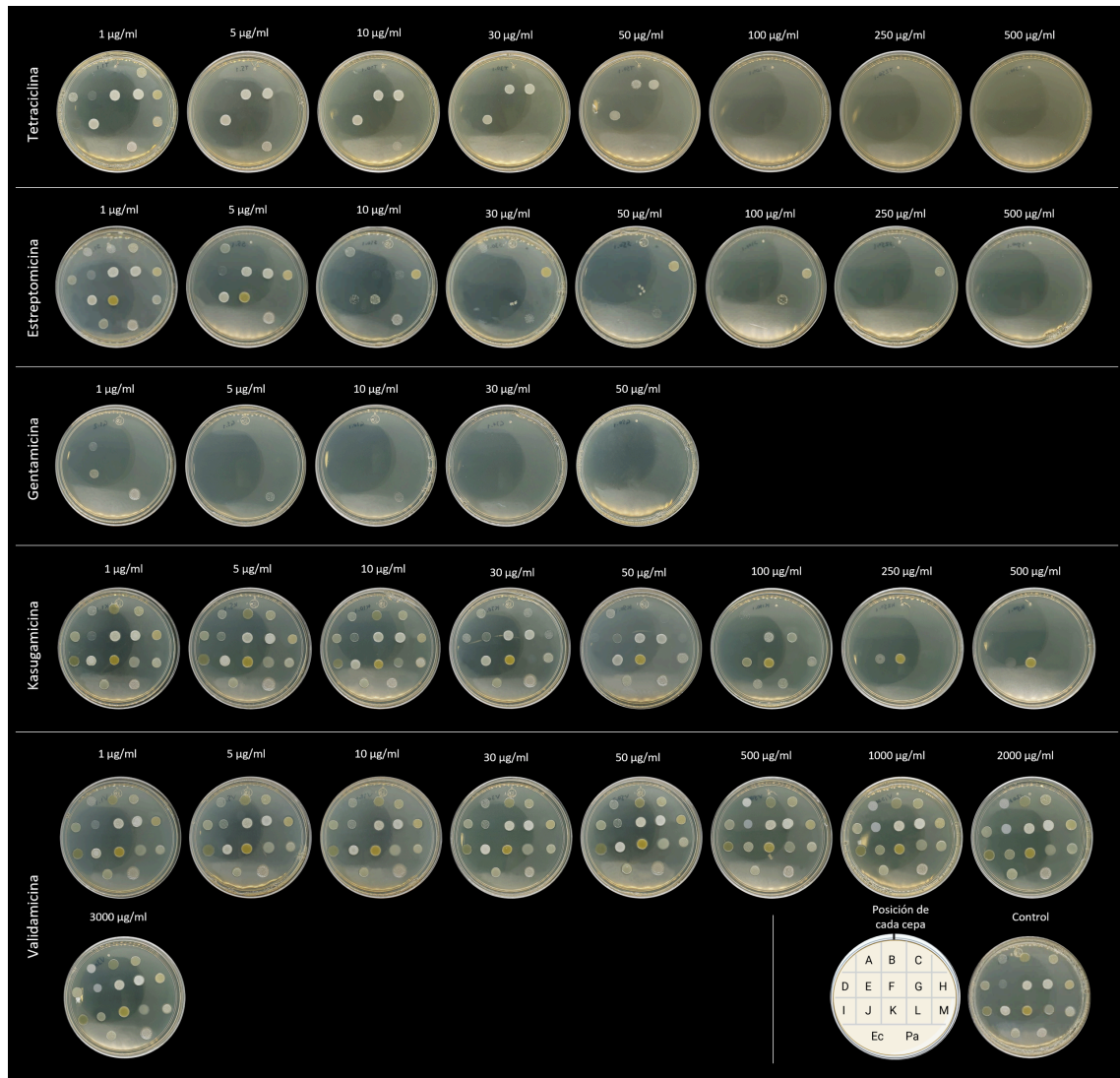


Figura 3.4 Prueba de dilución en agar para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antibióticos de uso agrícola tetraciclina, estreptomina, gentamicina, kasugamicina y validamicina. Cepas bacterianas en “Posición de cada cepa”: **A)** LTM 13.1.2, **B)** LTM 14.2.2, **C)** LTM 32.2.1, **D)** LTM 40.2.3, **E)** LTM 49.1.1, **F)** LTM 71.3.2, **G)** LTM 74.3.1, **H)** LTM 78.1.1, **I)** LTM 78.2.1, **J)** LTM 78.2.3, **K)** LTM 78.3.1, **L)** LTM 78.3.2, **M)** LTM 72.2.1, **Ec)** *Escherichia coli* ATCC 25922, **Pa)** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. **Control** = cepas

sembradas en medio de agar Mueller-Hinton (MHA) sin antibiótico. Se muestra una de las repeticiones para cada concentración por antibiótico.

Se determinó que el antibiótico gentamicina generó la mayor reducción en el crecimiento de las bacterias con un factor de 0.84 veces por cada aumento en una unidad de la concentración del antibiótico (Odds Ratio = 1: sin cambio; Odds Ratio < 1: disminución; Odds Ratio > 1: aumento); y la kasugamicina presenta la menor reducción del crecimiento con un factor de 0.99 veces. La tetraciclina y la estreptomycinina presentaron factores de 0.96 y 0.98 veces, respectivamente (**Cuadro 3.2**).

Cuadro 3.2 Parámetros de modelos de regresión logística para la probabilidad de crecimiento de bacterias patogénicas y no patogénicas de tomate ante los antibióticos de uso agrícola evaluados.

Antibiótico	Parámetro	Odds Ratio	SE	IC95%	Z _(df = 358)	p
Tetraciclina	Intercepto	0.80	0.15	0.55 – 1.16	-1.19	0.235
	Concentración	0.96	7.32E-03	0.95 – 0.98	-4.82	< 0.001
Estreptomycinina	Intercepto	1.22	0.2	0.89 – 1.69	1.21	0.227
	Concentración	0.98	3.53E-03	0.97 – 0.99	-5.26	< 0.001
Gentamicina	Intercepto	0.27	0.11	0.12 – 0.57	-3.34	< 0.001
	Concentración	0.84	0.06	0.71 – 0.94	-2.35	0.019
Kasugamicina	Intercepto	11.58	2.54	7.68 – 18.23	11.15	< 0.001
	Concentración	0.99	1.34E-03	0.99 – 0.99	-8.91	< 0.001

Odds Ratio = probabilidad (veces) de que $y = 1$ por cada aumento de una unidad en la variable predictora; SE = error estándar. IC 95% = Intervalo de confianza al 95%; df = grados de libertad; alpha = 0.05

A una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, la probabilidad de crecimiento de las bacterias es de 36% (IC95% = 29% – 43%) para tetraciclina, 50% (IC95% = 43% – 57%) para estreptomycinina, 5% \pm (IC95% = 2% – 12%) para gentamicina, y 91% (IC95% = 87% – 94%) para kasugamicina (**Figura 3.5**). Si la concentración de antibiótico aumenta a 100 $\mu\text{g/ml}$, la probabilidad de crecimiento de las bacterias es de 2%

(IC95% = 1% – 7%) para tetraciclina, 15% (IC95% = 9% – 24%) para estreptomina, 0% \pm (IC95% = 0% – 1%) para gentamicina, y 78% (IC95% = 72% – 83%) para kasugamicina (**Figura 3.5**).

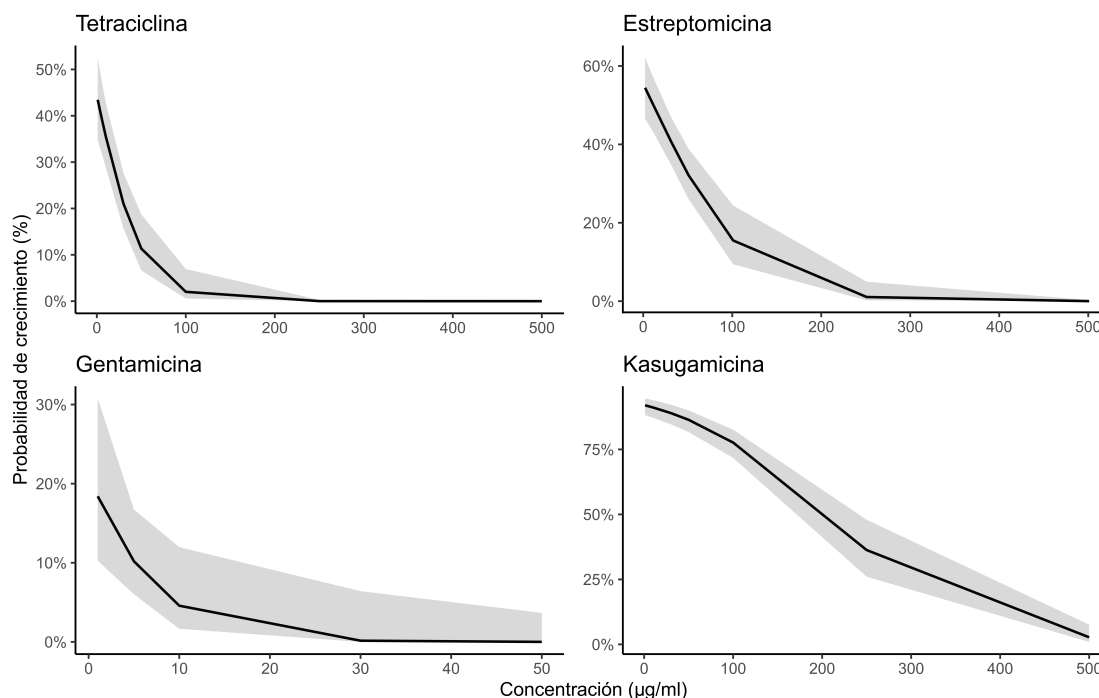


Figura 3.5 Probabilidad de crecimiento (%) de las bacterias evaluadas ante cuatro antibióticos de uso agrícola, con base en las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) determinadas mediante el método de dilución en agar.

Se determinó que 23% de los aislamientos presentó crecimiento en presencia de concentraciones altas de estreptomina y tetraciclina, con valores de CMI \geq 50 µg/ml y 100 µg/ml, respectivamente. El crecimiento de todos los aislamientos (100%) fue inhibido por la gentamicina. En el caso de la kasugamicina, 85% de los aislamientos presentó crecimiento en presencia de concentraciones altas del antibiótico, con valores de CMI \geq 100 µg/ml. Todos los aislamientos (100%) crecieron en presencia de validamicina en todas las concentraciones evaluadas (1-3000 µg/ml) (**Figura 3.6**). Respecto al crecimiento de los aislamientos bacterianos en presencia de los diferentes antibióticos y su relación con la patogenicidad, se registró que los aislamientos patogénicos presentaron

crecimiento frente a la estreptomycin y la kasugamicina (sin tomar en cuenta la validamicina). El crecimiento de dos aislamientos patogénicos fue inhibido en presencia de gentamicina, estreptomycin, kasugamicina y tetraciclina. Tres aislamientos no patogénicos presentaron crecimiento en presencia de tetraciclina y kasugamicina, y dos aislamientos ante estreptomycin y kasugamicina (**Figura 3.7**). En cuanto a la virulencia de los aislamientos, de las cepas muy virulentas una presentó crecimiento frente a la estreptomycin, otra a la kasugamicina y otra fue inhibida ante los antibióticos evaluados. Una cepa poco virulenta presentó crecimiento en presencia de kasugamicina (**Figura 3.8**).

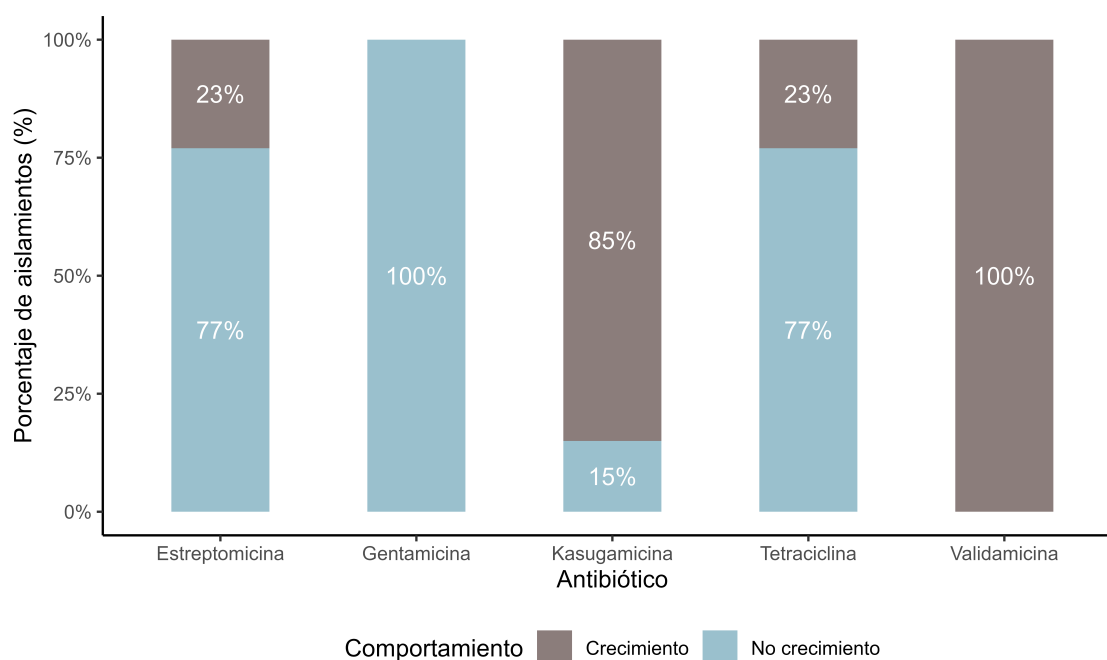


Figura 3.6 Porcentaje de aislamientos (%; N = 13) con capacidad de crecimiento en presencia de antibióticos de uso agrícola utilizados en Costa Rica para el control de infecciones bacterianas en las plantas. Los aislamientos fueron categorizados tomando en cuenta la interpretación de las pruebas de difusión en disco y las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) evaluadas con la prueba de dilución en agar.

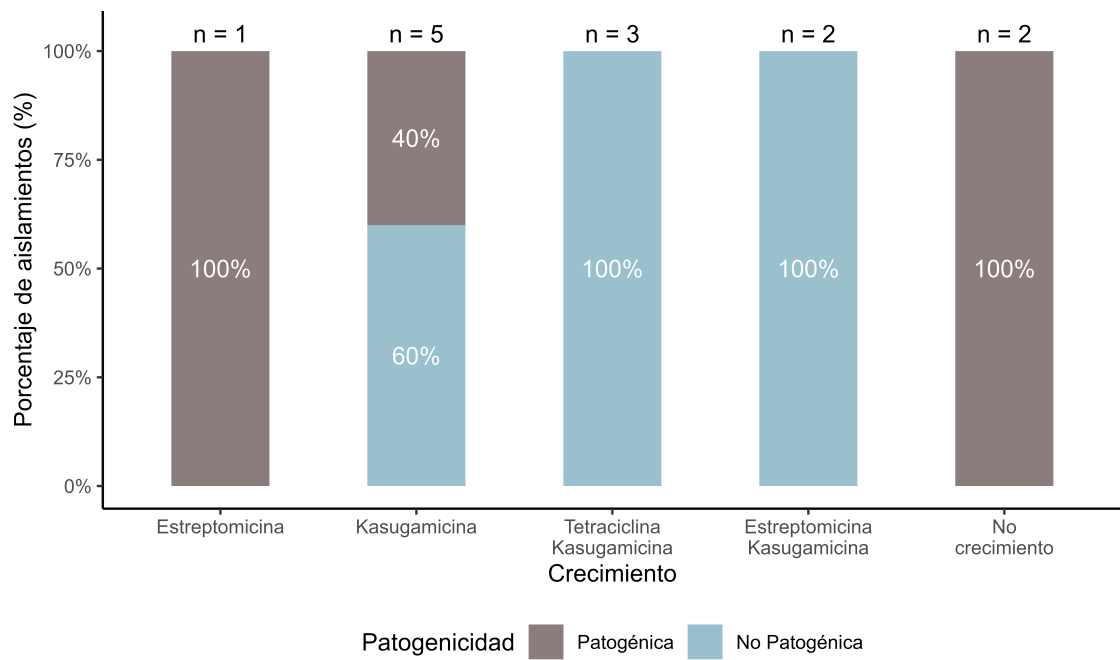


Figura 3.7 Porcentaje de aislamientos patogénicos y no patogénicos con capacidad de crecimiento en presencia de uno o múltiples antibióticos. No crecimiento = aislamientos con ausencia de crecimiento en presencia de los antibióticos evaluados, excluyendo la validamicina.

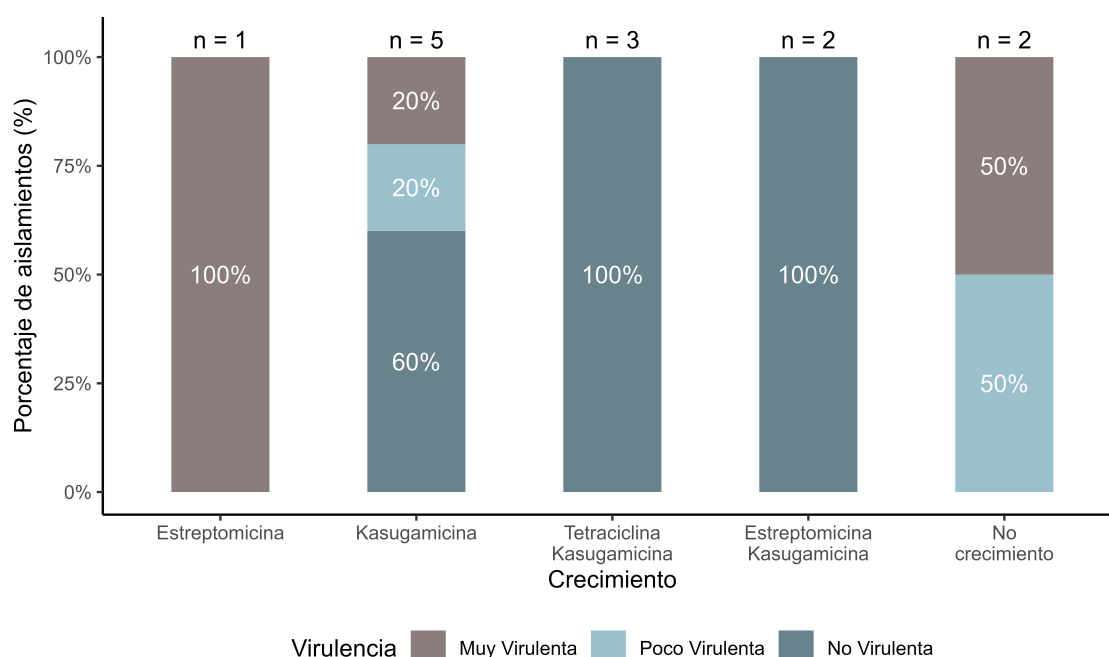


Figura 3.8 Porcentaje de aislamientos según su nivel de virulencia, agrupados de acuerdo con su capacidad de crecimiento en presencia de uno o múltiples antibióticos. No crecimiento = aislamientos con ausencia de crecimiento en presencia de todos los antibióticos evaluados en conjunto, excluyendo la validamicina.

Las cepas evaluadas fueron agrupadas con base en su similitud según las características de patogenicidad, virulencia y la combinación de los valores de CMI y los diámetros de zonas de inhibición, mediante una matriz de distancias euclidianas. El agrupamiento definió dos “clusters” entre cepas patogénicas y no patogénicas. Sin contar la validamicina, los aislamientos de *Pseudomonas allivorans* LTM 13.1.2. y *Pantoea deleyi* LTM 78.3.1 presentaron crecimiento en presencia de estreptomicina y kasugamicina. Los dos aislamientos de *Serratia* sp., LTM 71.3.2 y LTM 74.3.1, y la cepa de *Stenotrophomonas* LTM 78.2.3 presentaron crecimiento en presencia de tetraciclina y kasugamicina. No se observó una relación entre la patogenicidad/virulencia y el crecimiento en presencia de los antibióticos evaluados (**Figura 3.9**).

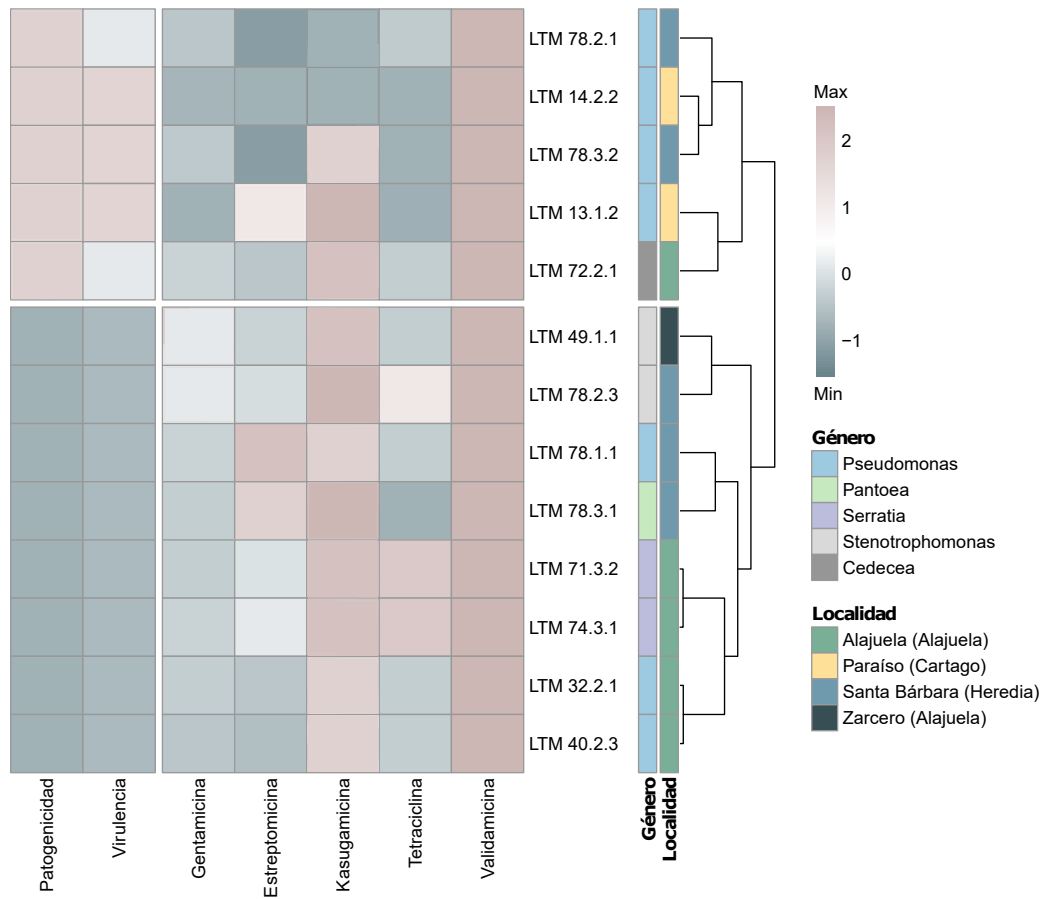


Figura 3.9 Agrupamiento de los aislamientos bacterianos con base en las características de patogenicidad, virulencia y la combinación de los valores de CMI y los diámetros de zonas de inhibición. La similitud entre las cepas fue calculada mediante una matriz de distancias euclidianas. Los valores fueron normalizados para la representación gráfica. Valores positivos indican fenotipos patogénicos, diferentes grados de virulencia y la combinación de valores más elevados de concentración mínima inhibitoria (CMI) y menores diámetros de zonas de inhibición. Valores negativos indican fenotipos no patogénicos, no virulentos y la combinación de valores bajos de CMI y mayores diámetros de zonas de inhibición. Se muestran los géneros bacterianos y la localidad de procedencia de las cepas.

DISCUSIÓN

El uso de antibióticos para el manejo de enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas en cultivos de tomate en Costa Rica es una práctica común; en una encuesta realizada a 39 agricultores de diferentes zonas productoras del país, Blanco-Meneses et al. (2023) registraron que 71.8% de los productores utilizan antibióticos u otros agroquímicos para el manejo de enfermedades bacterianas. Además, los autores registraron que los antibióticos utilizados eran productos a base de oxitetraciclina, estreptomicina, gentamicina y kasugamicina (Blanco-Meneses et al., 2023). En este estudio se evaluó el comportamiento de bacterias patogénicas y no patogénicas aisladas de plantas de tomate con síntomas de enfermedades provocadas por bacterias a tres de los antibióticos anteriores, además de la tetraciclina en lugar de la oxitetraciclina, y la validamicina.

La tetraciclina es un antibiótico bacteriostático que se une al ribosoma de la bacteria de forma reversible y que bloquea la síntesis de proteínas mientras se encuentra unido al ribosoma (Grossman, 2016; Stockwell & Duffy, 2012). Tiene el mismo mecanismo de acción que la oxitetraciclina, un antibiótico utilizado con mayor frecuencia en la agricultura. En este estudio la proporción de aislamientos resistentes a tetraciclina fue de 23% (n = 3), con valores de CMI de 100 µg/ml, dos de los aislamientos fueron del género *Serratia* y uno del género *Stenotrophomonas*. En Costa Rica, Rodríguez et al. (2007) evaluaron 10 cepas de *Stenotrophomonas* sp. y nueve cepas de *Serratia* sp. resistentes a oxitetraciclina asociadas a cultivos, y todas fueron resistentes también a la tetraciclina. Rodríguez et al. (2006) reportaron genes de resistencia a la oxitetraciclina en muestras de lechuga comestible (*Lactuca sativa* var. *capitata*) provenientes de Costa Rica, y Rodríguez et al. (2008) mencionan que la aspersión de oxitetraciclina en el cultivo de cilantro (*Coriandrum sativum*) no disminuye las poblaciones de bacterias resistentes ni los genes de resistencia en bacterias de suelo. Por otra parte, Uribe-Lorío et al. (2024) registraron que aproximadamente 15% de los aislamientos provenientes de muestras de tomate con síntomas de infecciones bacterianas fue resistente a oxitetraciclina; y

Córdova et al. (2022) registraron que 1.6% de aislamientos de *Pseudomonas* spp. provenientes de muestras de tomate en Chile fue resistente a la tetraciclina.

La estreptomicina es un aminoglucósido bactericida de amplio espectro que se une de forma irreversible al ribosoma de la bacteria y bloquea la síntesis de proteínas (Stockwell & Duffy, 2012). El desarrollo de resistencia a la estreptomicina es un rasgo estable en bacterias patógenas de plantas, ya que se han reportado aislamientos resistentes incluso diez años después de detener las aplicaciones del antibiótico (Stockwell & Duffy, 2012). En este estudio se registraron tres aislamientos resistentes a la estreptomicina con el punto de corte utilizado por Córdova et al. (2022) de 50 µg/ml. La cepa de *Pseudomonas allivivans* LTM 13.1.2 con una CMI de 50 µg/ml no presentó inhibición de crecimiento en la prueba de difusión con los discos de estreptomicina 10 µg y es una cepa patogénica muy virulenta capaz de causar necrosis medular en tomate. Las otras dos cepas resistentes, *Pseudomonas* sp. LTM 78.1.1 y *Pantoea deleyi* LTM 78.3.1 con CMI de 500 µg/ml y 250 µg/ml, respectivamente, fueron aislamientos no patogénicos. Tomando en cuenta los criterios de interpretación de la prueba de difusión en disco del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2020), los aislamientos de *Pseudomonas* sp. LTM 32.2.1, *Serratia* sp. LTM 71.3.2 y *Cedecea neteri* LTM 72.2.1 presentan una sensibilidad disminuida a la estreptomicina con diámetros de zonas de inhibición de 12-14 mm. Uribe-Lorío et al. (2024) registraron que más del 60% de los aislamientos provenientes de muestras de tomate en Costa Rica presentó resistencia a la estreptomicina; y Córdova et al. (2022) registraron que 45% de los aislamientos de *Pseudomonas* spp. de tomate en Chile fue resistente este antibiótico. Además, Córdova et al. (2022) reportaron que, de esos aislamientos, 55% eran fenotipos altamente resistentes con valores de CMI \geq 200 µg/ml. En este estudio se consideran los aislamientos de *Pseudomonas* sp. LTM 78.1.1 y *Pantoea deleyi* LTM 78.3.1 como fenotipos altamente resistentes según ese criterio.

La gentamicina es un aminoglucósido que se une al ribosoma bacteriano e inhibe la síntesis de proteínas. Al contrario de la estreptomicina, la gentamicina se une a varios sitios en el ribosoma, por lo que se requieren varias mutaciones

cromosomales en las bacterias para generar mutantes resistentes espontáneos (Stockwell & Duffy, 2012). No obstante, las bacterias pueden adquirir resistencia por medio de genes codificantes de enzimas que modifican el antibiótico por medio de la transferencia horizontal de genes independientemente de la exposición al antibiótico (Heuer et al., 2006). Todos los aislamientos evaluados en este estudio fueron susceptibles a la gentamicina en las pruebas de difusión en disco y dilución en agar según los criterios de interpretación del CLSI. Esto concuerda con otros estudios que determinaron la sensibilidad de bacterias de tomate y otros cultivos; Córdova et al. (2022) no registraron resistencia a gentamicina en especies de *Pseudomonas* provenientes de muestras de tomate en Chile. De forma similar, Uribe-Lorío et al. (2024) no registraron resistencia a gentamicina en bacterias provenientes de muestras de tomate en Costa Rica, sin embargo, reportaron aislamientos provenientes de muestras de repollo (*Brassica oleracea* var. *capitata*), lechuga (*L. sativa* var. *capitata*), banano (*Musa paradisiaca*) y chile dulce (*Capsicum annuum*) con resistencia a la gentamicina. Rodríguez et al. (2006) reportaron genes de resistencia a gentamicina en lechuga (*L. sativa* var. *capitata*) en Costa Rica. Además, Rodríguez et al. (2008) indican que las aspersiones foliares de gentamicina en cultivo de cilantro (*C. sativum*) no disminuyen las poblaciones de bacterias resistentes ni los genes de resistencia en bacterias de suelo. Lo anterior podría considerarse como un riesgo potencial para el cultivo de tomate, ya que bacterias patógenicas susceptibles a la gentamicina pueden desarrollar poblaciones resistentes al antibiótico debido a la interacción con bacterias resistentes presentes en otros cultivos, principalmente de la misma familia, como el caso del chile dulce (fam. Solanaceae).

La kasugamicina es un aminoglucósido que inhibe la unión del aminoacil-ARNt con el complejo del mensajero-ribosoma, inhibiendo la síntesis de polipéptidos (Tanaka et al., 1966). En este estudio solamente dos aislamientos resultaron susceptibles a la kasugamicina y el resto de los aislamientos (84.6%) fue resistente. Los valores de tendencia central para la CMI de kasugamicina fueron similares a los descritos por Levitan (1967), quienes registraron una mediana de CMI de 250 µg/ml y un rango de 64-500 µg/ml contra aislamientos de

Pseudomonas spp. en caldo de tripticasa-soya. Sin embargo, difieren mucho de los resultados obtenidos por Adaskaveg et al. (2011), quienes registraron una media de CMI de 18.5 µg/ml y un rango de 6.9-46.7 µg/ml contra aislamientos de *Erwinia amylovora*. Los autores además mencionan que la eficacia de la kasugamicina es dependiente de la combinación de factores como la especie bacteriana, el medio de cultivo y el pH del medio. McGhee & Sundin (2011) evaluaron la sensibilidad de bacterias Gram negativas aisladas de flores, hojas y suelo de cultivos de manzana, y reportaron que 73% de los aislamientos de flores y hojas y 70% de los aislamientos de suelo fueron resistentes a la kasugamicina. Los autores utilizaron diferentes niveles de sensibilidad a la kasugamicina, donde la resistencia fue definida como baja, intermedia o alta con base en el crecimiento de los aislamientos en medio Luria Bertani enmendado con 100, 250 o 500 µg/ml de kasugamicina, respectivamente. En este estudio, los aislamientos de *Pseudomonas* sp. LTM 32.2.1, LTM 40.2.3, LTM 78.1.1 y *P. capsici* LTM 78.3.2 serían considerados fenotipos con resistencia baja; los aislamientos de *Stenotrophomonas* sp. LTM 49.1.1, *Serratia* sp. LTM 71.3.2 y LTM 74.3.1, y *Cedecea neteri* LTM 72.2.1 como fenotipos con resistencia intermedia; y los aislamientos de *P. allivivans* LTM 13.1.2, *Stenotrophomonas* sp. LTM 78.2.3 y *Pantoea deleyi* LTM 78.3.1 como fenotipos con resistencia alta según ese criterio.

La validamicina no tuvo ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las cepas bacterianas evaluadas en este estudio. Este antibiótico es un aminoglucósido utilizado principalmente para el control del tizón de la vaina del arroz provocado por el hongo *Rhizoctonia solani*, ya que inhibe el metabolismo energético y cambia el componente de la pared celular al suprimir la actividad de la trehalasa (Bian et al., 2020; Kido et al., 1986). La validamicina también puede controlar efectivamente la marchitez por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, el tizón tardío (*Phytophthora infestans*), el mildiú polvoso (*Oidium* spp.) en tomate (Ishikawa et al., 2005). Respecto a su actividad bacteriostática o bactericida, Ishikawa et al. (1996) reportaron que la validamicina A inhibe el crecimiento de *Ralstonia solanacearum* en medio con trehalosa como única fuente de carbohidrato, también reportaron que retrasa la aparición de síntomas

de la marchitez bacteriana cuando se inocula de forma preventiva y post inoculación en las plantas de tomate. Ishikawa et al. (2004) reportaron que las aplicaciones foliares de validamicina A en dosis de 62.5 µg/ml controló efectivamente la pudrición negra en repollo causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* reduciendo en un 40% la severidad de la enfermedad y la proporción de plantas infectadas. Bian et al. (2020) mencionan que la validamicina A induce un tipo de resistencia de amplio espectro que involucra las vías de señalización del ácido salicílico, ácido jasmónico y el etileno ante *Pseudomonas syringae*, y hongos como *Botrytis cinerea* y *Fusarium graminearum* en *Arabidopsis thaliana*. Por otra parte, Kim et al. (2023) reportaron bacterias fitopatógenas resistentes a concentraciones de 1x, 10x y 100x de validamicina A. Guo et al. (2024) mencionan que las aplicaciones de validamicina reducen la comunidad fúngica en la superficie de las hojas sintomáticas de tabaco (*N. tabacum*), sin embargo, la comunidad bacteriana se ve incrementada, incluyendo bacterias del género *Pseudomonas*.

Otro aspecto importante del uso de antibióticos es que las bacterias pueden presentar resistencia a múltiples antibióticos. En este estudio se determinó que seis aislamientos (46%) presentaron crecimiento en presencia de tetraciclina y kasugamicina o estreptomina y kasugamicina. Tomando en cuenta el crecimiento en presencia de la validamicina, la proporción de aislamientos con capacidad de crecimiento en presencia de múltiples antibióticos asciende al 85%. Córdova et al. (2022) registraron que 96.9% de los aislamientos de *Pseudomonas* spp. presentó resistencia múltiple en al menos dos de los antibióticos que evaluaron, entre ellos un aislamiento resistente a tetraciclina y estreptomina. Uribe-Lorío et al. (2024) registraron que, de 69 aislamientos resistentes provenientes de diferentes cultivos de Costa Rica, incluyendo el tomate, 13 (18.8%) presentaron resistencia múltiple a estreptomina y tetraciclina (8), estreptomina y gentamicina (4) o estreptomina, tetraciclina y gentamicina (1). La kasugamicina y la validamicina no se utilizan aparte de sus aplicaciones en agricultura, por el contrario, la tetraciclina, estreptomina y gentamicina son antibióticos utilizados en salud humana para tratar enfermedades de origen bacteriano (Sundin et al., 2016).

Desde un punto de vista de manejo y de forma general, el antibiótico más eficaz fue la gentamicina, seguido de la tetraciclina y la estreptomina, con base en los valores de CMI obtenidos y la reducción de la probabilidad de crecimiento de las bacterias al aumentar las concentraciones de antibiótico. Sin embargo, la eficacia de estos antibióticos debe determinarse bajo condiciones de campo, donde influyen muchos factores que incluyen los componentes, combinaciones y coadyuvantes de los productos comerciales disponibles en el mercado; factores ambientales como la precipitación, temperatura y radiación ultravioleta; factores de operación como las dosis, momentos, secuencias y equipos de aplicación; y los factores propios de cada cultivo como el tipo de planta y sus características estructurales y fisiológicas (Al-Rimawi et al., 2019; Batuman et al., 2024; Killiny et al., 2020). Además de los factores ambientales y de operación, los factores legales son los que determinan la disponibilidad de los productos en los diferentes países. Por ejemplo, en Costa Rica no existen antibióticos registrados para su uso en el cultivo de tomate (SFE, 2024); sumado a esto, en el 2022 se propuso un proyecto de ley ante la Asamblea Legislativa bajo el nombre “Regulación de plaguicidas altamente peligrosos para la salud y el ambiente” que tiene por finalidad la prohibición del uso de agroquímicos, en donde se incluyen los antibióticos gentamicina, estreptomina, kasugamicina y tetraciclina, y también prescribe una vigilancia continua sobre agroquímicos con peligro potencial, en donde se incluye al antibiótico validamicina. Encontrar alternativas al uso de antibióticos para el manejo de enfermedades de origen bacteriano y disminuir el desarrollo de resistencia es una necesidad en la actualidad (Mann et al., 2021), sin embargo, muchas de las alternativas existentes hoy en día no son asequibles para los productores pequeños. Así mismo, eliminar el uso de antibióticos es una acción que no se debe tomar a la ligera ya que es uno de los métodos principales, y en muchos casos el único método disponible con el que se cuenta para el control de las enfermedades de origen bacteriano (Mann et al., 2021). Por esta razón, acatar las dosis y las recomendaciones de aplicación de cada producto es fundamental para reducir el riesgo de desarrollo de resistencia, así como la vigilancia continua para la identificación de cepas resistentes.

Este estudio brinda una valiosa información sobre la sensibilidad de bacterias patogénicas y no patogénicas aisladas de muestras de tomate, a los antibióticos de uso agrícola utilizados con mayor frecuencia en Costa Rica. Si bien es cierto que los estudios *in vitro* pueden diferir de la realidad en campo, los resultados obtenidos sirven como la base para el diseño de investigaciones futuras que permitan comprender la dinámica de los antimicrobianos en patosistemas específicos, así como ser un punto de comparación con trabajos de invernadero y de campo, además de servir como herramienta para la selección de ingredientes activos que sean eficaces para el control de las poblaciones de organismos patogénicos.

3.4 BIBLIOGRAFÍA

- Adaskaveg, J. E., Förster, H., & Wade, M. L. (2011). Effectiveness of kasugamycin against *Erwinia amylovora* and its potential use for managing fire blight of pear. *Plant Disease*, 95(4), 448–454. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-10-0679>
- Al-Rimawi, F., Hijaz, F., Nehela, Y., Batuman, O., & Killiny, N. (2019). Uptake, translocation, and stability of oxytetracycline and streptomycin in citrus plants. *Antibiotics*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040196>
- Batuman, O., Britt-Ugartemendia, K., Kunwar, S., Yilmaz, S., Fessler, L., Redondo, A., Chumachenko, K., Chakravarty, S., & Wade, T. (2024). The use and impact of antibiotics in plant agriculture: A review. *Phytopathology*, 114(5), 885–909. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-23-0357-IA>
- Bian, C., Duan, Y., Wang, J., Xiu, Q., Wang, J., Hou, Y., Song, X., & Zhou, M. (2020). Validamycin A induces broad-spectrum resistance involving salicylic acid and jasmonic acid/ethylene signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33(12), 1424–1437. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0211-R>
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Blanco-Meneses, M., Castro-Zúñiga, O., & Calderón-Abarca, A. (2023). Diagnóstico del uso de antibióticos en regiones productoras de tomate en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 47(1), 87–99. <https://doi.org/10.15517/rac.v47i1.53967>

- CLSI. (2020). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (30th ed.). Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI supplement M100.
- Córdova, P., Rivera-González, J. P., Rojas-Martínez, V., Villarreal, P., Zamorano, A., Fiore, N., San Martín, D., Vera, F., Gálvez, E., Romero, J., Barrueto, J., Ilabaca-Díaz, C., & Higuera, G. (2022). Antimicrobial multiresistant phenotypes of genetically diverse *Pseudomonas* spp. isolates associated with tomato plants in Chilean orchards. *Horticulturae*, 8(8), 750. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080750>
- Fan, X., Saleem, T., & Zou, H. (2022). Copper resistance mechanisms in plant pathogenic bacteria. *Phytopathologia Mediterranea*, 61(1), 129–138. <https://doi.org/10.36253/phyto-13282>
- Grossman, T. H. (2016). Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025387>
- Guo, M., Hu, J., Jiang, C., Zhang, Y., Wang, H., Zhang, X., Hsiang, T., Shi, C., Wang, Q., & Wang, F. (2024). Response of microbial communities in the tobacco phyllosphere under the stress of validamycin. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1328179. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1328179>
- Heuer, H., Krögerrecklenfort, E., Wellington, E. M. H., Egan, S., Elsas, J. D., Overbeek, L., Collard, J.-M., Guillaume, G., Karagouni, A. D., Nikolakopoulou, T. L., & Smalla, K. (2006). Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. *FEMS Microbiology Ecology*, 42(2), 289–302. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb01019.x>
- Ishikawa, R., Fujimori, K., & Matsuura, K. (1996). Antibacterial activity of validamycin A against *Pseudomonas solanacearum* and its efficacy against tomato bacterial wilt. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 62(5), 478–482.
- Ishikawa, R., Shirouzu, K., Nakashita, H., Lee, H. Y., Motoyama, T., Yamaguchi, I., Teraoka, T., & Arie, T. (2005). Foliar spray of validamycin A or validoxylamine A controls tomato fusarium wilt. *Phytopathology*, 95(10), 1209–1216. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1209>
- Ishikawa, R., Suzuki-Nishimito, M., Fukuchi, A., & Matsuura, K. (2004). Effective control of cabbage black rot by validamycin A and its effect on extracellular polysaccharide-production of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Journal of Pesticide Science*, 29(3), 209–213. <https://doi.org/10.1584/jpestics.29.209>
- Kido, V. Y., Nagasato, T., Ono, K., Fujimoto, Y., Uyeda, M., & Shibata, M. (1986). Change in a cell-wall component of *Rhizoctonia solani* inhibited by

- validamycin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(6), 1519–1525. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.50.1519>
- Killiny, N., Hijaz, F., Gonzalez-blanco, P., Jones, S. E., Pierre, M. O., & Vincent, C. I. (2020). Effect of adjuvants on oxytetracycline uptake upon foliar application in citrus. *Antibiotics*, 9(10), 1–16. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100677>
- Kim, J. Y., Baek, K. H., & Lee, S. Y. (2023). Evaluation of resistance of phytopathogenic bacteria to agricultural antibiotics. *Research in Plant Disease*, 29(2), 168–173. <https://doi.org/10.5423/RPD.2023.29.2.168>
- Kolde, R. (2019). *pheatmap: Pretty Heatmaps* (R package version 1.0.12). <https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>
- Kolomiiets, Y. V., Grygoryuk, I. P., Butsenko, L. M., & Kalinichenko, A. V. (2019). Biotechnological control methods against phytopathogenic bacteria in tomatoes. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17(2), 3215–3230. https://doi.org/10.15666/aeer/1702_32153230
- Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. En *Pathogens* (Vol. 10, Número 2, pp. 1–21). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>
- Lamichhane, J. R., Osdaghi, E., Behlau, F., Köhl, J., Jones, J. B., & Aubertot, J. N. (2018). Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. En *Agronomy for Sustainable Development* (Vol. 38, Número 3). Springer-Verlag France. <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0503-9>
- Levitan, A. A. (1967). In vitro antibacterial activity of Kasugamycin. *Applied Microbiology*, 15(4), 750–753. <https://doi.org/10.1128/am.15.4.750-753.1967>
- Lüdecke, D. (2023). *sjPlot: Data visualization for statistics in social science*. <https://cran.r-project.org/package=sjPlot>
- Maeusli, M., Lee, B., Miller, S., Reyna, Z., Lu, P., Yan, J., Ulhaq, A., Skandalis, N., Spellberg, B., & Luna, B. (2020). Horizontal gene transfer of antibiotic resistance from *Acinetobacter baylyi* to *Escherichia coli* on lettuce and subsequent antibiotic resistance transmission to the gut microbiome. *MSphere*, 5(3), e00329-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00329-20>
- Mann, A., Nehra, K., Rana, J. S., & Dahiya, T. (2021). Antibiotic resistance in agriculture: Perspectives on upcoming strategies to overcome upsurge in resistance. En *Current Research in Microbial Sciences* (Vol. 2). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100030>

- McGhee, G. C., & Sundin, G. W. (2011). Evaluation of kasugamycin for fire blight management, effect on nontarget bacteria, and assessment of kasugamycin resistance potential in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, *101*(2), 192–204. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-10-0128>
- McManus, P. S., & Stockwell, V. O. (2000). Antibiotics for plant diseases control: Silver bullets or rusty sabers. *APSnet Feature Articles*. <https://doi.org/10.1094/APSnetFeature-2000-0600>
- McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W., & Jones, A. L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, *40*(1), 443–465. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120301.093927>
- Merrington, G., Rogers, S. L., & Van Zwieten, L. (2002). The potential impact of long-term copper fungicide usage on soil microbial biomass and microbial activity in an avocado orchard. *Australian Journal of Soil Research*, *40*(5), 749–759. <https://doi.org/10.1071/SR01084>
- Pedersen, T. L. (2024). *patchwork: The composer of plots* (R package version 1.3.0). <https://CRAN.R-project.org/package=patchwork>
- R Core Team. (2024). *R: A language and environment for statistical computing*. <https://www.R-project.org/>
- Ramírez-Muñoz, F., Fournier-Leiva, M. L., Ruepert, C., & Hidalgo-Ardón, C. (2014). Uso de agroquímicos en el cultivo de papa en Pacayas, Cartago, Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, *25*(2), 337–345. <https://doi.org/10.15517/am.v25i2.15441>
- Rodríguez, C., Altendorf, K., Smalla, K., & Lipski, A. (2008). Spraying of oxytetracycline and gentamicin onto field-grown coriander did not affect the abundance of resistant bacteria, resistance genes, and broad host range plasmids detected in tropical soil bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, *44*(4), 589–596. <https://doi.org/10.1007/s00374-007-0242-6>
- Rodríguez, C., Lang, L., Wang, A., Altendorf, K., García, F., & Lipski, A. (2006). Lettuce for human consumption collected in Costa Rica contains complex communities of culturable oxytetracycline and gentamicin resistant bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(9), 5870–5876. <https://doi.org/10.1128/AEM.00963-06>
- Rodríguez, C., Wachlin, A., Altendorf, K., García, F., & Lipski, A. (2007). Diversity and antimicrobial susceptibility of oxytetracycline-resistant isolates of *Stenotrophomonas* sp. and *Serratia* sp. associated with Costa Rican crops. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(6), 2550–2560. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03496.x>
- SFE. (2024). Productos agroquímicos registrados, autorizados según cultivo o ingrediente activo. En *Insumos y Fiscalización*.

<http://app.sfe.go.cr/SFEInsumos/asp/Insumos/ConsultaRegistroPlaguicida.aspx>

- Soucy, S. M., Huang, J., & Gogarten, J. P. (2015). Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nature Reviews Genetics*, 16(8), 472–482. <https://doi.org/10.1038/nrg3962>
- Stockwell, V. O., & Duffy, B. (2012). Use of antibiotics in plant agriculture. *Revue Scientifique et Technique - Office International Des Épizooties*, 31(1), 199–210. <https://doi.org/10.20506/rst.31.1.2104>
- Sundin, G. W., Castiblanco, L. F., Yuan, X., Zeng, Q., & Yang, C. (2016). Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects. *Molecular Plant Pathology*, 17(9), 1506–1518. <https://doi.org/10.1111/mpp.12436>
- Sundin, G. W., & Wang, N. (2018). Antibiotic resistance in plant-pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 56(1), 161–180. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045946>
- Tanaka, N., Yamaguchi, H., & Umezawa, H. (1966). Mechanism of kasugamycin action on polypeptide synthesis. *The Journal of Biochemistry*, 60(4), 429–434.
- Uribe-Lorío, L., Uribe, L., Rodríguez, C., García, F., & Aráuz, L. F. (2024). Diversidad y resistencia a antibióticos en bacterias asociadas a síntomas de infección bacteriana en cultivos de Costa Rica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 42(2), 13. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2305-5>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. Springer-Verlag New York. <https://ggplot2.tidyverse.org>

DISCUSIÓN GENERAL

Este estudio comprendió un análisis integral de las bacterias presentes en plantas de tomate con síntomas de infecciones bacterianas provenientes de varias localidades del Valle Central de Costa Rica. Las pruebas moleculares del tejido sintomático mediante la amplificación de ADN con cebadores específicos revelaron la presencia de géneros conocidos como *Pseudomonas* y *Xanthomonas*, así como especies asociadas a enfermedades importantes en cultivos de tomate, como *P. mediterranea*, causante de la necrosis medular (Catara et al., 2002); *P. syringae* pv. *tomato*, causante de la peca bacteriana (Preston, 2000); y *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, causante de la pudrición blanda (Charkowski, 2006). Adicionalmente, se observó la coexistencia de estas especies fitopatógenas en las plantas analizadas, lo que podría traducirse en infecciones mixtas como se ha reportado en otros estudios (Aiello et al., 2017; Caruso et al., 2016). Sin embargo, no se obtuvieron aislamientos de estas tres especies, por lo que es necesario realizar muestreos dirigidos a los síntomas característicos de cada enfermedad para aislar e identificar las cepas presentes en el país.

El análisis de la comunidad bacteriana mediante la secuenciación parcial del gen *16S ARNr* a partir de cultivos bacterianos aislados de tejido sintomático reveló la prevalencia de la clase Gammaproteobacteria, con *Pseudomonas* como el género dominante. Este resultado coincide con diferentes estudios que identifican esta clase y el género como uno de los más abundantes en cultivos de tomate (Dong et al., 2019; Kim et al., 2006; López et al., 2020; Uribe-Lorío et al., 2024). Dentro de la comunidad bacteriana también se identificaron géneros de importancia agrícola que cuentan con especies con potencial como agentes de control biológico como *Paenibacillus* sp., *Acinetobacter* sp. y *Pantoea vagans* (Afzal et al., 2019; Yuliar et al., 2015); además de bacterias asociadas a la promoción de crecimiento en las plantas como *Microbacterium* sp. (Cordovez et al., 2018), *Advenella kashmirensis* (Kuzmina et al., 2022), *Glutamicibacter halophytocola* (Qin et al., 2018), *Enterobacter asburiae* (Ahemad & Khan, 2010), *Curtobacterium* sp. (Patel et al., 2022), *Pseudomonas azotoformans* (Ansari

et al., 2021), *Stenotrophomonas geniculata* (Ercole et al., 2024) y *Serratia nematodiphila* (Dastager et al., 2011); por lo que un estudio para evaluar sus propiedades benéficas sería muy enriquecedor y ayudaría a comprender mejor los aspectos relacionados con la salud del cultivo.

Un aspecto esencial de este estudio fue la evaluación de la patogenicidad y virulencia de diversas cepas. La identificación y comprobación de la patogenicidad de las cepas de *Pseudomonas alliivorans* LTM 13.1.2, *P. flavescens* LTM 14.2.2 y *P. capsici* LTM 78.3.2 como agentes causales de la necrosis medular del tomate en Costa Rica es un registro de gran relevancia ya que estas especies se suman a la lista de bacterias fitopatógenas presentes en el país. Así mismo, este es el primer reporte que demuestra la capacidad de causar la necrosis medular del tomate para estas tres especies. Lo anterior resalta la importancia de la identificación local de organismos patogénicos, ya que, aunque el daño causado por la necrosis medular depende mucho del contexto de producción (Blancard, 2013; Catara, 2007), las especies involucradas pueden provocar diferentes síntomas en las plantas (Fullem et al., 2024; Khanal et al., 2023; Kim et al., 2020; Zhao et al., 2021, 2022, 2023), lo que conlleva a complicaciones en el manejo de las enfermedades, por lo que el diagnóstico temprano es crucial para la implementación de estrategias de manejo efectivas.

Otro aspecto importante en este estudio fue que se evidenció la prevalencia de cepas con la capacidad de crecer en presencia de antibióticos comúnmente utilizados para el control de infecciones bacterianas en el país. En particular, 23% de los aislamientos creció en presencia de estreptomycinina y tetraciclina de forma individual, 85% presentó crecimiento en presencia de kasugamicina y 100% creció en presencia de validamicina. Estos resultados son alarmantes ya que se suman a una larga lista de estudios referentes a la resistencia a los antimicrobianos de uso agrícola (Córdova et al., 2022; Heuer et al., 2006; Lyu et al., 2019; McGhee & Sundin, 2011; Rodríguez et al., 2006, 2007, 2008; Scheck et al., 1996; Thompson & Sharkady, 2021; Uribe-Lorío et al., 2024; Valenzuela et al., 2019). La capacidad de crecimiento en presencia de múltiples antibióticos observada en 85% de los aislamientos evaluados resulta altamente

preocupante, ya que la falta de opciones efectivas para el tratamiento de estas infecciones podría comprometer la producción de tomate en la región y plantea un serio desafío para el manejo de las enfermedades de origen bacteriano. La identificación de cepas resistentes refuerza la necesidad de una gestión más estricta del uso de antibióticos en la agricultura y especialmente en países latinoamericanos (Uribe-Lorío et al., 2024), así como la implementación de estrategias para reducir la resistencia bacteriana.

Este estudio proporciona información valiosa sobre la estructura de la comunidad bacteriana y la diversidad de patógenos que afectan al cultivo de tomate en Costa Rica. Los resultados indican la necesidad urgente de desarrollar estrategias de manejo integrado que incluyan el uso racional de antibióticos o en su defecto el reemplazo de estos por otros mecanismos de control, el monitoreo continuo de las cepas resistentes y la implementación de prácticas agrícolas que limiten la propagación de estas bacterias. El uso de métodos de control biológico acompañado de un mayor asesoramiento para los productores pueden ser estrategias complementarias para reducir las pérdidas de rendimiento en los cultivos. Además, el desarrollo de variedades tolerantes o resistentes a bacterias fitopatógenas podría ofrecer una solución a largo plazo para mitigar el efecto de las infecciones bacterianas en el cultivo de tomate. Los resultados de este estudio proporcionan una visión integral sobre las bacterias fitopatógenas que afectan al cultivo de tomate en Costa Rica, con énfasis en la diversidad bacteriana, la patogenicidad de las cepas y el comportamiento frente a los antibióticos utilizados en el país. La información obtenida puede contribuir a mejorar las estrategias de control y manejo de las enfermedades, además de servir como una herramienta para que los productores tomen decisiones informadas dirigidas al manejo de infecciones bacterianas en sus cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

- Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., & Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, 221, 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- Ahemad, M., & Khan, M. S. (2010). Plant growth promoting activities of phosphate-solubilizing *Enterobacter asburiae* as influenced by fungicides. *EurAsian Journal of Biosciences*, 88–95. <https://doi.org/10.5053/ejobios.2010.4.0.11>
- Aiello, D., Vitale, A., Ruota, A. D. La, Polizzi, G., & Cirvilleri, G. (2017). Synergistic interactions between *Pseudomonas* spp. and *Xanthomonas perforans* in enhancing tomato pith necrosis symptoms. *Journal of Plant Pathology*, 99(3), 731–740.
- Ansari, F. A., Jabeen, M., & Ahmad, I. (2021). *Pseudomonas azotoformans* FAP5, a novel biofilm-forming PGPR strain, alleviates drought stress in wheat plant. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 18(12), 3855–3870. <https://doi.org/10.1007/s13762-020-03045-9>
- Blancard, D. (2013). *Tomato diseases: identification, biology and control* (2nd ed.). CRC press.
- Caruso, A., Licciardello, G., Rosa, R. La, Catara, V., & Bella, P. (2016). Mixed infection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* in tomato stem rot in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 98(3), 661–665.
- Catara, V. (2007). *Pseudomonas corrugata*: plant pathogen and/or biological resource? *Molecular Plant Pathology*, 8(3), 233–244. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00391.x>
- Catara, V., Sutra, L., Morineau, A., Achouak, W., Christen, R., & Gardan, L. (2002). Phenotypic and genomic evidence for the revision of *Pseudomonas corrugata* and proposal of *Pseudomonas mediterranea* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1749–1758. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02174-0>
- Charkowski, A. O. (2006). The soft rot *Erwinia*. In S. S. Gnanamanickam (Ed.), *Plant-Associated Bacteria* (pp. 423–505). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_13
- Córdova, P., Rivera-González, J. P., Rojas-Martínez, V., Villarreal, P., Zamorano, A., Fiore, N., San Martín, D., Vera, F., Gálvez, E., Romero, J., Barrueto, J., Ilabaca-Díaz, C., & Higuera, G. (2022). Antimicrobial multiresistant phenotypes of genetically diverse *Pseudomonas* spp.

- isolates associated with tomato plants in Chilean orchards. *Horticulturae*, 8(8), 750. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080750>
- Cordovez, V., Schop, S., Hordijk, K., Dupré De Boulois, H., Coppens, F., Hanssen, I., Raaijmakers, J. M., Carrión, V. J., & Stabb, E. V. (2018). Priming of plant growth promotion by volatiles of root-associated *Microbacterium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(22), e01865-18. <https://journals.asm.org/journal/aem>
- Dastager, S. G., Deepa, C. K., & Pandey, A. (2011). Potential plant growth-promoting activity of *Serratia nematodiphila* NII-0928 on black pepper (*Piper nigrum* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(2), 259–265. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0454-z>
- Dong, C. J., Wang, L. L., Li, Q., & Shang, Q. M. (2019). Bacterial communities in the rhizosphere, phyllosphere and endosphere of tomato plants. *PLoS ONE*, 14(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223847>
- Ercole, T. G., Kava, V. M., Petters-Vandresen, D. A. L., Ribeiro, R. A., Hungria, M., & Galli, L. V. (2024). Unveiling agricultural biotechnological prospects: The draft genome sequence of *Stenotrophomonas geniculata* LGMB417. *Current Microbiology*, 81(8), 247. <https://doi.org/10.1007/s00284-024-03784-9>
- Fullem, K. R., Pena, M. M., Potnis, N., Goss, E. M., Minsavage, G. V., Iriarte, F. B., Holland, A., Jones, J. B., & Paret, M. L. (2024). Unexpected diversity of pseudomonads associated with bacterial leaf spot of cucurbits in the southeastern United States. *Plant Disease*, 108(3), 592–598. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-23-1081-SR>
- Heuer, H., Krögerrecklenfort, E., Wellington, E. M. H., Egan, S., Elsas, J. D., Overbeek, L., Collard, J.-M., Guillaume, G., Karagouni, A. D., Nikolakopoulou, T. L., & Smalla, K. (2006). Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. *FEMS Microbiology Ecology*, 42(2), 289–302. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb01019.x>
- Khanal, M., Bhatta, B. P., & Malla, S. (2023). Isolation and characterization of bacteria associated with onion and first report of onion diseases caused by five bacterial pathogens in Texas, U.S.A. *Plant Disease*, 107(6), 1721–1729. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-22-2206-SR>
- Kim, H.-S., Lee, D.-H., Lee, S. K., Lee, S.-H., & Seo, S.-T. (2020). First report of walnut blight canker on walnut tree (*Juglans regia*) by *Pseudomonas flavescens* in South Korea. *Journal of Plant Pathology*, 102(3), 943–943. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00520-7>
- Kim, J. S., Dungan, R. S., Kwon, S. W., & Weon, H. Y. (2006). The community composition of root-associated bacteria of the tomato plant. *World Journal*

- of Microbiology and Biotechnology*, 22(12), 1267–1273. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9171-z>
- Kuzmina, L. Y., Gilvanova, E. A., Galimzyanova, N. F., Arkhipova, T. N., Ryabova, A. S., Aktuganov, G. E., Sidorova, L. V., Kudoyarova, G. R., & Melent'ev, A. I. (2022). Characterization of the novel plant rowth-stimulating strain *Advenella kashmirensis* IB-K1 and evaluation of its efficiency in saline soil. *Microbiology*, 91(2), 173–183. <https://doi.org/10.1134/S0026261722020072>
- López, S. M. Y., Pastorino, G. N., Fernández-González, A. J., Franco, M. E. E., Fernández-López, M., & Balatti, P. A. (2020). The endosphere bacteriome of diseased and healthy tomato plants. *Archives of Microbiology*, 202(10), 2629–2642. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01987-9>
- Lyu, Q., Bai, K., Kan, Y., Jiang, N., Thapa, S. P., Coaker, G., Li, J., & Luo, L. (2019). Variation in streptomycin resistance mechanisms in *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology*, 109(11), 1849–1858. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-19-0152-R>
- McGhee, G. C., & Sundin, G. W. (2011). Evaluation of kasugamycin for fire blight management, effect on nontarget bacteria, and assessment of kasugamycin resistance potential in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 101(2), 192–204. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-10-0128>
- Patel, M., Patel, K., Al-Keridis, L. A., Alshammari, N., Badraoui, R., Elsbali, A. M., Al-Soud, W. A., Hassan, M. I., Yadav, D. K., & Adnan, M. (2022). Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria *Curtobacterium oceanosedimentum* improves growth attributes and strengthens antioxidant system in chili (*Capsicum frutescens*). *Sustainability*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/su14074335>
- Preston, G. M. (2000). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: the right pathogen, of the right plant, at the right time. *Molecular Plant Pathology*, 1(5), 263–275. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2000.00036.x>
- Qin, S., Feng, W.-W., Zhang, Y.-J., Wang, T.-T., Xiong, Y.-W., Xing, K., Qin, C., Feng, S., Zhang, W.-W., Wang, Y.-J., Xiong, T.-T., Diversity, X. K. 2018, & Cann, I. (2018). Diversity of bacterial microbiota of coastal halophyte *Limonium sinense* and amelioration of salinity stress damage by symbiotic plant growth-promoting actinobacterium *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(01533–18), e01533-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01533-18>
- Rodríguez, C., Altendorf, K., Smalla, K., & Lipski, A. (2008). Spraying of oxytetracycline and gentamicin onto field-grown coriander did not affect the abundance of resistant bacteria, resistance genes, and broad host

- range plasmids detected in tropical soil bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 44(4), 589–596. <https://doi.org/10.1007/s00374-007-0242-6>
- Rodríguez, C., Lang, L., Wang, A., Altendorf, K., García, F., & Lipski, A. (2006). Lettuce for human consumption collected in Costa Rica contains complex communities of culturable oxytetracycline and gentamicin resistant bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5870–5876. <https://doi.org/10.1128/AEM.00963-06>
- Rodríguez, C., Wachlin, A., Altendorf, K., García, F., & Lipski, A. (2007). Diversity and antimicrobial susceptibility of oxytetracycline-resistant isolates of *Stenotrophomonas* sp. and *Serratia* sp. associated with Costa Rican crops. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2550–2560. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03496.x>
- Scheck, H. J., Pscheidt, J. W., & Moore, L. W. (1996). Copper and streptomycin resistance in strains of *Pseudomonas syringae* from pacific northwest nurseries. *Plant Disease*, 80(9), 1034–1039. <https://doi.org/10.1094/PD-80-1034>.
- Thompson, D. K., & Sharkady, S. M. (2021). Genomic insights into drug resistance determinants in *Cedecea neteri*, a rare opportunistic pathogen. *Microorganisms*, 9(8), 1741. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081741>
- Uribe-Lorío, L., Uribe, L., Rodríguez, C., García, F., & Aráuz, L. F. (2024). Diversidad y resistencia a antibióticos en bacterias asociadas a síntomas de infección bacteriana en cultivos de Costa Rica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 42(2), 13. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2305-5>
- Valenzuela, M., Méndez, V., Montenegro, I., Besoain, X., & Seeger, M. (2019). Streptomycin resistance in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains from Chile is related to an rpsL gene mutation. *Plant Pathology*, 68(3), 426–433. <https://doi.org/10.1111/ppa.12971>
- Yuliar, Asi Nion, Y., & Toyota, K. (2015). Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes and Environments*, 30(1), 1–11. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14144>
- Zhao, M., Gitaitis, R., & Dutta, B. (2023). Characterization of *Pseudomonas capsici* strains from pepper and tomato. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1267395. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1267395>
- Zhao, M., Koirala, S., Chen, H.-C., Gitaitis, R., Kvitko, B., & Dutta, B. (2021). *Pseudomonas capsici* sp. nov., a plant-pathogenic bacterium isolated from pepper leaf in Georgia, USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(8), 004971. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004971>

Zhao, M., Tyson, C., Chen, H.-C., Paudel, S., Gitaitis, R., Kvitko, B., & Dutta, B. (2022). *Pseudomonas alliivorans* sp. nov., a plant-pathogenic bacterium isolated from onion foliage in Georgia, USA. *Systematic and Applied Microbiology*, 45(1), 126278. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126278>

CONCLUSIONES

- El género *Pseudomonas* fue el que se detectó con mayor frecuencia tanto en pruebas de diagnóstico con cebadores específicos a partir de muestras de tejido, como en el análisis filogenético de las secuencias parciales del gen *16S ARNr* a partir de aislamientos puros.
- Se detectó la presencia de especies fitopatógenas como *Pseudomonas mediterranea*, *P. syringae* pv. *tomato* y *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* detectadas mediante la amplificación de ADN con cebadores específicos a partir de muestras de tejido.
- Se determinó que la comunidad de bacterias cultivables asociada a muestras de tomate con síntomas de infecciones bacterianas estuvo dominada por la clase Gammaproteobacteria, seguida de la clase Actinomycetes. Además, se identificaron aislamientos de las clases Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria y Bacilli.
- Se identificaron géneros y especies de interés por su importancia como organismos asociados al control biológico y a la promoción de crecimiento en las plantas, como *Paenibacillus* sp., *Acinetobacter* sp., *Microbacterium* sp., *Glutamicibacter* sp. y *Pantoea vagans*, mediante el análisis de secuencias parciales del gen *16S ARNr*.
- Se identificaron tres cepas de *Pseudomonas* como agentes causales de la necrosis medular en tomate: *Pseudomonas alliivorans* LTM 13.1.2, *P. flavescens* LTM 14.2.2 y *P. capsici* LTM 78.3.2.
- Se identificaron las cepas de *Cedecea neteri* LTM 72.2.1 y *Pseudomonas straminea* LTM 78.2.1 como causantes de la decoloración de tejido interno en tomate.
- El efecto de la necrosis medular sobre el crecimiento de las plantas no es claro y se debe evaluar con más detalle tomando en cuenta otras variables de desarrollo y de rendimiento.
- El crecimiento en presencia de los antibióticos evaluados no estuvo asociado a las características de patogenicidad y virulencia de los aislamientos.

- El antibiótico más eficaz en las pruebas *in vitro* fue la gentamicina, ya que todos los aislamientos presentaron zonas de inhibición de crecimiento en las pruebas de difusión en disco y valores de concentración mínima inhibitoria por debajo del punto de quiebre para cepas susceptibles según el criterio utilizado.
- La kasugamicina presentó valores de concentración mínima inhibitoria mucho mayores en promedio, respecto a los antibióticos estreptomycinina, gentamicina y tetraciclina, y la proporción de aislamientos que crecieron en presencia de este antibiótico fue de 84.62%.
- La validamicina no presentó ningún efecto inhibitorio contra las cepas evaluadas en ninguna de las dos pruebas *in vitro*.
- Se identificaron tres cepas con crecimiento en presencia de la estreptomycinina, incluyendo la cepa de *Pseudomonas allivivans* LTM 13.1.2 categorizada como patogénica muy virulenta, y las cepas no patogénicas de *Pseudomonas* sp. LTM 78.1.1 y *Pantoea deleyi* LTM 78.3.1.
- La cepa de *Pseudomonas flavescens* LTM 14.2.2 y *P. straminea* LTM 78.2.1 categorizadas como patogénicas muy virulenta y virulenta, respectivamente, no presentaron crecimiento frente a todos los antibióticos, excepto la validamicina.
- Se identificaron las cepas no patogénicas de *Stenotrophomonas* sp. LTM 78.2.3, *Serratia* sp. LTM 71.3.2 y LTM 74.3.1 con la capacidad de crecimiento en presencia de tetraciclina.
- Sin tomar en cuenta la validamicina, 46.15% de los aislamientos creció en presencia de múltiples antibióticos, ya sea frente a estreptomycinina-kasugamicina o tetraciclina-kasugamicina. Al tomar en cuenta la validamicina, la proporción de aislamientos con crecimiento ante múltiples antibióticos aumentó al 84.62%.

RECOMENDACIONES

- Realizar los procedimientos consecutivos de colecta, cultivo, purificación y conservación de aislamientos en un periodo inferior a cinco días con el fin de obtener la mayor cantidad de aislamientos viables posible y evitar mutaciones debidas a exceso de pasajes en medio de cultivo o muerte de aislamientos por almacenamiento inadecuado.
- Utilizar medios de cultivo específicos para el crecimiento de géneros o especies objetivo para facilitar el proceso de selección y purificación de aislamientos.
- Utilizar métodos de caracterización bioquímica con sistemas automatizados o semiautomatizados como el sistema VITEK® 2 solamente para la caracterización bioquímica y no para la identificación de los aislamientos debido a las limitaciones con que cuentan sus bases de datos, especialmente para bacterias de origen ambiental. Incluso otros sistemas como el Biolog™ que cuenta con una base de datos más robusta, en muchas ocasiones no es precisa debido a la gran diversidad existente y al descubrimiento de nuevas especies.
- En caso de identificar especies estrechamente relacionadas como algunas especies del género *Pseudomonas*, se recomienda realizar un análisis de secuencias multilocus con varios genes de mantenimiento para obtener una mayor resolución y discriminar entre las especies, o de ser posible, realizar un análisis de genoma completo.
- Realizar estudios dirigidos a evaluar el desarrollo de síntomas, incidencia y severidad de las cepas de *Pseudomonas allivivans* LTM 13.1.2, *Pseudomonas flavescens* LTM 14.2.2, *Pseudomonas capsici* LTM 78.3.2, *Pseudomonas straminea* LTM 78.2.1 y *Cedecea neteri* LTM 72.2.1 durante todo el ciclo de producción del tomate bajo condiciones de campo para determinar su efecto en el rendimiento del cultivo, además de identificar el rango de hospederos con pruebas en cultivos de interés en el país.
- Realizar un análisis de genoma completo de las cepas patogénicas para identificar genes de virulencia y genes de resistencia a antibióticos.

- Evaluar la eficacia de los productos comerciales de antibióticos sobre las cepas patogénicas identificadas en este estudio, bajo condiciones de invernadero y de campo para determinar su efecto real en presencia de factores ambientales y de cultivo propios de las zonas de producción del tomate en Costa Rica.
- Evaluar la eficacia de alternativas a los antibióticos, como microorganismos antagonistas sobre las cepas patogénicas identificadas en este estudio, mediante pruebas de confrontación *in vitro*, así como la respuesta a inoculaciones preventivas y post-inoculación en condiciones de invernadero y de campo.
- A los productores se les recomienda utilizar todas las medidas culturales disponibles para reducir las fuentes de inóculo y la dispersión del patógeno, así como implementar monitoreos periódicos para la detección de infecciones bacterianas en sus fincas, y llevar un registro de todos los productos, dosis y frecuencia de aplicación.