

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE MICROBIOLOGÍA

Detección del agente bacteriano causal de la pudrición vascular de tallo y hojas en cultivos de tomate riñón (*Solanum lycopersicum*) var. Pietro, en las provincias de Pichincha y Cotopaxi.

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MICROBIÓLOGO

DIANA KAROLINA LASLUIA VELASCO

Quito, 2021

DEDICATORIA

Dedicado a mi querida madre Teresita Velasco por el apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida, por ser un ejemplo de amor y entrega.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi directora de tesis Mgtr. Sonia Estrella por brindar su apoyo, tiempo y paciencia en la realización de esta investigación.

Un especial agradecimiento al Ing. Alexander Toaza por seguir paso a paso el proceso investigativo, por su tiempo, guía y buena voluntad.

Gracias al equipo de trabajo del Laboratorio de Fitopatología en Agrocalidad por facilitar el uso de sus instalaciones, equipos y capacitación.

A todos los docentes de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales que contribuyeron en mi formación académica y personal.

A mi familia por el amor y apoyo para cumplir mis sueños.

Finalmente, un agradecimiento a todos mis amigos y a compañeros especialmente Galo, Brandon, Luis, Kelly, María Fernanda y Esteban, por crecer a mi lado y por los momentos inolvidables.

LISTA DE ABREVIATURAS

AN: Agar nutritivo.

cm: Centímetros.

g: Gramos.

IF-A: líquido sin nutrientes, específico para bacterias aerobias.

mg: Miligramos.

ml: Mililitros.

msnm: Metros sobre el nivel del mar.

µL: Microlitros.

PCR: Reacción en cadena de polimerasa (por sus siglas en inglés).

PROB: Probabilidad de identificación.

SIM: Similitud entre géneros.

TABLA DE CONTENIDOS

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABLAS	II
RESUMEN. -	1
ABSTRACT. -	2
INTRODUCCIÓN. –	3
MATERIALES Y MÉTODOS. -.....	5
Aislamiento de bacterias fitopatógenas.....	5
Caracterización fenotípica de aislamientos bacterianos.....	6
Identificación molecular de aislamientos bacterianos.....	7
Postulados de Koch.....	7
RESULTADOS. -	8
Aislamiento bacteriano.....	8
Caracterización fenotípica de aislamientos bacterianos.....	8
Identificación molecular de aislamientos bacterianos.....	9
Postulados de Koch.....	9
DISCUSIÓN. -	10
CONCLUSIONES. -	14
RECOMENDACIONES. -	15
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. -	16

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Muestreo. Plantas de tomate riñón con sintomatología característica de la enfermedad. A) Manchas pardas y pudrición en ápices y tallos. B) Pudrición generalizada de la planta. C) Marchitamiento, clorosis y decaimiento generalizado..... 27
- Figura 2.** Morfología macroscópica de aislamientos bacterianos en AN a las 48 horas de crecimiento y reacción en la tinción diferencial de Gram (100X). A) *Curtobacterium flaccumfaciens*: color amarillo pálido, borde entero, circulares, convexas, brillantes, pequeñas translúcidas; a) Bacilos, irregulares, cortos, Gram positivos. B) *Pantoea agglomerans*: amarillo, borde entero, circulares, convexas, brillantes, pequeñas, translúcidas; b) Bacilos rectos, medianos, Gram negativos. 28
- Figura 3.** Reacciones bioquímicas. A) Catalasa. B) Oxidasa. C) TSI. D) Citrato. E) MIO. a) *Curtobacterium flaccumfaciens*. b) *Pantoea agglomerans*. c) Control positivo. d) Control negativo..... 29
- Figura 4.** Sintomatología en tallo y hojas. A) Planta control. B) *Curtobacterium flaccumfaciens*. C) *Pantoea agglomerans*. 30

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Muestreo.	31
Tabla 2. Características morfológicas en AN y reacción a la tinción diferencial de Gram de 20 aislamientos procedentes de <i>Solanum lycopersicum</i>	31
Tabla 3. Características diferenciales entre los microorganismos Gram negativos correspondientes a los aislamientos bacterianos procedentes de <i>Solanum lycopersicum</i> frente a microorganismos de interés fitopatógeno en tomate.	32
Tabla 4. Caracterización por el sistema semiautomatizado de identificación MicroStation™ de Biolog.....	33
Tabla 5. Identificación molecular de cepas obtenidas.	33

Detección del agente bacteriano causal de la pudrición vascular de tallo y hojas en cultivos de tomate riñón (*Solanum lycopersicum*) var. Pietro, en las provincias de Pichincha y Cotopaxi.

Diana Lasluisa^{1*}, Sonia Estrella¹ y Alexander Toaza².

¹ Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

² Laboratorio de Fitopatología, Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario, Agrocalidad, Tumbaco, Ecuador.

*dlasluisa220@puce.edu.ec

RESUMEN. -

El tomate riñón (*Solanum lycopersicum*) es una de las hortalizas más importantes a nivel mundial. La producción de tomate es afectada por un sin número de microorganismos y, entre ellos, las bacterias ocupan un lugar significativo al causar enfermedad y producir pérdidas parciales o totales del cultivo. Se han observado esporádicamente síntomas severos similares a marchitamiento y pudrición vascular bacteriana en hojas y tallos en plantaciones en las provincias ecuatorianas de Pichincha y Cotopaxi. Bacterias aisladas a partir de tallos y hojas con sintomatología presentaron colonias circulares, amarillas, translúcidas, convexas, con bordes enteros y no fluorescentes bajo luz ultravioleta, después de ser incubadas a 30 ° C por 24 horas, en agar nutritivo. Los aislamientos mostraron bacterias Gram negativas y Gram positivas, en forma de varilla. Las propiedades fisiológicas, bioquímicas y el sistema semiautomatizado de identificación MicroStation™ de Biolog identificaron a los microorganismos *Pantoea agglomerans* y *Curtobacterium flaccumfaciens*. Las secuencias nucleotídicas fueron comparadas con bases de datos referenciales depositadas en GenBank y su porcentaje de identidad fue del 99,5 % con *Pantoea agglomerans* y 100 % con *Curtobacterium flaccumfaciens*. Finalmente, mediante postulados de Koch, se corroboró la patogenicidad de las bacterias aisladas como agentes causales de marchitamiento y pudrición vascular en plantas de tomate riñón. Este estudio reporta por primera vez la presencia de los microorganismos *C. flaccumfaciens* y *P. agglomerans* como patógenos en cultivos de tomate en Ecuador.

Palabras Clave: *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Pantoea agglomerans*, *Solanum lycopersicum*, pudrición vascular, marchitamiento, bacterias fitopatógenas.

ABSTRACT. -

The tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the most important vegetables worldwide. Tomato production is affected by several microorganisms and, among them, bacteria occupy a significant place by causing disease and producing partial or total losses of the crop. Severe symptoms like bacterial vascular wilt and rot have been sporadically observed in leaves and stems in plantations in the Ecuadorian provinces of Pichincha and Cotopaxi. Bacteria isolated from symptomatic stems and leaves presented circular, yellow, translucent, convex colonies with entire edges and non-fluorescent under ultraviolet light, after being incubated at 30 ° C for 24 hours, on nutrient agar. The isolates showed rod-shaped Gram negative and Gram positive bacteria. The physiological and biochemical properties and the Biolog semiautomated MicroStation™ ID System identified the microorganisms *Pantoea agglomerans* and *Curtobacterium flaccumfaciens*. The nucleotide sequences were compared with reference databases deposited in GenBank and their identity percentage was 99.5 % with *Pantoea agglomerans*, and 100 % with *Curtobacterium flaccumfaciens*. Finally, using Koch's postulates, the pathogenicity of isolated bacteria as causal agents of vascular wilting and rot in tomato kidney plants was corroborated. This study reports for the first time the presence of the microorganisms *C. flaccumfaciens* and *P. agglomerans* as pathogens of tomato crops in Ecuador.

Key Words: *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Pantoea agglomerans*, *Solanum lycopersicum*, vascular rot, wilt, phytopathogenic bacteria.

INTRODUCCIÓN. –

El tomate riñón (*Solanum lycopersicum*), es la hortaliza más cultivada a nivel mundial, después de la papa, y su producción anual ha incrementado de forma exponencial en el último siglo (Blancard 2011). Sus abundantes propiedades benéficas, su diversidad alimentaria y su disponibilidad en el mercado, hacen de este cultivo un ejemplo de alta producción y rentabilidad (AAIC 2003; Bergougnoux 2014; Muniappan, et al. 2012).

El tomate es procedente de América, se cree que se originó a lo largo de la costa oeste central de América del Sur, incluyendo Ecuador, Perú y el norte de Chile (Escobar y Lee 2009; Bergougnoux 2014; Stevens 2017). Esta solanácea puede crecer en una amplia gama de hábitats, al aire libre o en invernadero, puede ser cultivado en zonas tropicales, valles y zonas andinas (AAIC 2003; Stevens 2017). En Ecuador, el cultivo de esta hortaliza se lleva a cabo a lo largo de la región Sierra y en tres provincias de la región Costa, durante todo el año en condiciones de invernadero y la variedad más cultivada por su adaptación, sabor, color y tamaño es Pietro (AAIC 2003; Guerrero 2016; INEC 2018; Leitón 2020). Su producción tiene importancia económica al ser un producto que abastece la demanda interna, contribuye a las exportaciones y es una fuente de ingresos para pequeños y grandes productores (López et al. 2017; MAGAP 2017).

A pesar de la gran producción agrícola de tomate que se registra anualmente, este cultivo transitorio, posee la cifra más alarmante en pérdida de cosecha a causa de enfermedades y plagas, con valores por encima del 70 %, donde la causa principal de enfermedad son las bacterias y hongos (MAGAP 2015; López et al. 2017). Las bacterias se hacen presentes en el cultivo de *Solanum lycopersicum* mediante mecanismos de dispersión como agua de riego, insectos, semillas infectadas y prácticas agrícolas (Bernal 2010). Estos organismos microscópicos penetran tejidos vegetales a través de daño mecánico o por aberturas naturales y son capaces de diseminarse de forma sistemática por tejidos de conducción o mediante acción enzimática dentro o fuera de las células vegetales (Argerich et al. 2011). Las bacterias poseen mecanismos de virulencia que les otorgan la capacidad de adaptación para asegurar su viabilidad en circunstancias adversas, permitiéndoles permanecer de uno a cuatro años en invernaderos, en superficies inanimadas o en la rizosfera de malezas, y mantenerse en grandes extensiones territoriales, donde muchas de ellas, causan pérdida parcial o total de los cultivos de tomate (Agrios 2005; Argerich et al. 2011; Aglave 2019). La presencia de una infección bacteriana en este cultivo se puede distinguir mediante

observación de signos y síntomas en la planta afectada, los más frecuentes y agresivos son la presencia de exudados, marchitez, oscurecimiento de tejidos, clorosis y pudrición vascular (Blancard 2011; Cotes 2018; Aglave 2019). Actualmente, enfermedades bacterianas de alto interés en la producción agrícola de tomate, como: la mancha bacteriana por *Xanthomonas campestris*; la marchitez bacteriana por *Ralstonia solanacearum*; el moteado bacteriano por *Pseudomonas syringae*; el chancro bacteriano por *Clavibacter michiganensis*; y, la pudrición blanda bacteriana por miembros de la familia Erwiniaceae, como *Pectobacterium carotovorum* y *Pantoea* spp., son de suma importancia porque cada una de ellas requiere un control específico e intensivo (Bernal 2010; Blancard 2011; Mansfield et al. 2012; Pernezny et al. 2017; Balamurugan et al. 2020).

Se ha observado la aparición repentina de síntomas severos de marchitamiento, clorosis y pudrición vascular bacteriana en hojas y tallos de tomate riñón en plantaciones, tipo invernadero, ubicadas en las provincias ecuatorianas de Pichincha y Cotopaxi. Estos síntomas concuerdan con la descripción visual asociada a la presencia de bacterias fitopatógenas en *Solanum lycopersicum* descrita por Escobar y Lee (2009) y Blancard (2011). Brotes bacterianos producidos dentro de un invernáculo similares a los observados requieren de la identificación temprana del agente causal y la comprensión de su ecología para evitar pérdida parcial o total del cultivo (Bernal 2010). Un diagnóstico preciso permitirá definir estrategias apropiadas para el control del curso patológico o preventivo de bacterias en este cultivo de importancia económica y alimenticia (Riley et al. 2002; Scala et al. 2018). En Ecuador, las referencias sobre pudrición vascular y marchitez en esta solanácea son escasas por lo que, es imprescindible el reporte de nuevos agentes causales de enfermedades en el cultivo de tomate riñón (Burgos 2014; López et al. 2017; MAGAP 2017).

En este contexto la presente investigación busca conocer ¿Qué bacterias fitopatógenas se pueden aislar de plantas de tomate riñón que presenten marchitez y pudrición vascular en invernaderos de Pichincha y Cotopaxi?, ¿Son las bacterias aisladas los microorganismos causales de dichas enfermedades? y ¿Se encuentran bacterias de interés agrícola entre las bacterias fitopatógenas aisladas?

MATERIALES Y MÉTODOS. -

PROCEDIMIENTO

Aislamiento de bacterias fitopatógenas

El muestreo fue realizado en cuatro plantaciones productoras de tomate riñón, tres de las plantaciones fueron en la provincia de Pichincha, cantón Quito, parroquia Yaruquí y una plantación en la provincia de Cotopaxi, cantón Latacunga, parroquia Tanicuchí. Se colectó, de manera aleatoria, 15 muestras por invernadero (60 muestras en total) comprendidas por tallos y hojas de tomate que presentaban sintomatología de marchitamiento, clorosis, manchas oscuras en ápices y pudrición vascular (Tabla 1). El muestreo y procesamiento de las muestras se llevó a cabo siguiendo los instructivos propuestos por el laboratorio de fitopatología de Agrocalidad (2018), basado en Agrios (2005). Las muestras fueron envueltas en papel absorbente seco, funda de papel y almacenadas en fundas plásticas con cierre hermético para conservar la humedad. Las fundas fueron etiquetadas (código, fecha, hora, cultivo, persona a cargo, localización y georreferencia del muestreo), y transportadas, bajo cadena de frío a 4 °C, al laboratorio de Fitopatología en Agrocalidad para su respectivo procesamiento y análisis en un plazo menor a 48 horas (Argerich et al. 2011; Agrocalidad 2018). Las muestras recolectadas se lavaron con abundante agua retirando material interferente. El material vegetal enfermo fue cortado en pequeños segmentos con ayuda de un bisturí y tijeras estériles. Los segmentos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 2 %, durante 1 minuto; y se enjuagó 3 veces con agua estéril, durante 1 minuto. En cámara de flujo laminar y sobre papel toalla estéril, se seccionaron los segmentos de material vegetal enfermo en trozos de 0,5 cm. Con ayuda de un mortero y agua peptonada estéril, se maceraron los fragmentos vegetales hasta obtener un líquido turbio. Utilizando una pipeta automática calibrada, se transfirió 1 ml del macerado turbio, a un tubo de ensayo de tapa rosca con 9 ml de agua peptonada y se homogenizó la suspensión con agitación en vórtex. A partir de la suspensión, se realizaron tres diluciones seriadas en base 10 en tubos de ensayo de tapa rosca con 9 ml de agua peptonada (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}). 100 μ l de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} fueron inoculados por duplicado en cajas Petri con medio de enriquecimiento agar nutritivo (AN), con la ayuda de un asa de Drigalsky se realizó siembra en superficie y las cajas fueron incubadas a 30 °C por 48 horas. Finalmente, se realizó resiembra por agotamiento en AN en busca de colonias bacterianas puras que presenten morfología macroscópica característica de los géneros bacterianos de interés (Schaad et al. 2001).

Caracterización fenotípica de aislamientos bacterianos

Caracterización tradicional.

Para la caracterización fenotípica se tomó en cuenta la morfología macroscópica de las colonias bacterianas (color, borde, tamaño, elevación y tipo de colonia), reacción en la tinción diferencial de Gram y reacciones bioquímicas a las pruebas catalasa, oxidasa, motilidad indol ornitina (MIO), triple azúcar hierro (TSI) y utilización de citrato (Garcés et al. 1996; Bertheau et al. 1998; MacFaddin 2000; Jiménez et al. 2007).

Caracterización mediante el sistema semiautomatizado de identificación MicroStation™ de Biolog.

La caracterización preliminar a nivel de especie se realizó utilizando los materiales, el equipo y la base de datos de la casa comercial Biolog y se empleó el procedimiento propuesto por el fabricante (Biolog 2019). A partir de cultivos puros bacterianos de 24 horas de crecimiento en AN a 30° C, se prepararon suspensiones bacterianas con densidad celular de 95 a 98 % de transmitancia (calculada mediante turbidímetro) mediante la transferencia de una colonia bacteriana a fluido de inoculación A (IF-A), utilizando un hisopo de algodón estéril. Las suspensiones fueron inoculadas individualmente en microplacas GEN III MicroPlate™, 100 µl por pocillo, utilizando pipeta automática multicanal y se incubaron durante 48 horas a 30 °C. La lectura de cada perfil fue realizada cada 24 horas durante dos días, en el equipo MicroStation Reader™, interpretada y comparada por el programa informático MicroStation GEN III Data Collection Software™. Se conservaron únicamente los aislamientos que presentaban índices de similitud (SIM) y probabilidad (PROB) más cercanos a la identidad de microorganismos fitopatógenos de tomate de la base de datos, es decir índices “SIM” y “PROB” mayores a 0.65 y se descartaron los microorganismos que no mostraron identificación como lo recomienda la bibliografía (Miller y Rhoden 1991; Klinger et al. 1992; Morgan et al. 2009; Wragg et al. 2014).

Preservación de los aislamientos

Los aislamientos bacterianos que mostraron un perfil fenotípico compatible con bacterias fitopatógenas fueron crio preservados a -80 °C en tubos Eppendorf™. Para ello, los aislamientos fueron preparados mediante la transferencia de una colonia de 24 horas de crecimiento en medio sólido (AN) a un medio líquido (caldo nutritivo) y la suspensión fue incubada a 30 °C por 24 horas.

Después de la incubación cada suspensión bacteriana se agitó en vórtex por 3 segundos, se añadió glicerol al 20% (m/v) y se homogenizó la mezcla con agitación en vórtex 5 segundos. Finalmente, se dispensó 1 ml de la suspensión homogénea en tubos EppendorfTM y se almacenó los tubos a -80 °C en el cepario del laboratorio de fitopatología, para posteriores análisis y colección.

Reactivación de las cepas bacterianas

La reactivación de la cepa se realizó por duplicado. Se transfirió 0.5 ml de la muestra a dos tubos con 5 ml de caldo nutritivo, se incubó la suspensión de 24 a 48 horas a 30 °C, y mediante un asa microbiológica, se sembró la muestra por agotamiento en cajas de AN. Se verificó la pureza del cultivo por observación y descripción macroscópica y las cepas microbianas estuvieron listas para su utilización.

Identificación molecular de aislamientos bacterianos

Los aislamientos bacterianos de interés fueron preparados y procesados de acuerdo con los instructivos establecidos por Agrocalidad. Para ello, se prepararon las muestras mediante la transferencia de una colonia de 24 horas de crecimiento en medio sólido (AN) a un medio líquido (caldo nutritivo). La suspensión fue incubada a 30 °C por 24 horas y se tomó 2 ml del cultivo para ser centrifugado en microtubos (10 min, 15 000 rpm); se descartó el sobrenadante conservando el “pellet” y fueron enviadas en cadena de frío a los laboratorios de Biología molecular en Agrocalidad para su identificación a nivel molecular. El análisis fue llevado a cabo por el personal que labora en el área de Biología molecular de Agrocalidad bajo medidas de confidencialidad. Se asume que se manejó el protocolo detallado en Viteri y otros (2020), que consta de extracción de ADN, amplificación, electroforesis, secuenciación e identificación.

Postulados de Koch

Se planteó un diseño experimental completamente aleatorizado donde se utilizaron doce plantas de tomate riñón var. Pietro, de seis semanas de crecimiento obtenidas desde semillero, sin síntomas de deficiencia nutricional y libres de patógenos. Se utilizaron semillas certificadas por Agrocalidad, libres de patógenos y sustrato estéril de vermiculita PRO-MIX® (PGX, Canadá). El ensayo fue compuesto por diez plantas que fueron inoculadas por inyección en tallo, yemas, peciolo y nervaduras con las bacterias obtenidas en campo (*P. agglomerans* y *C. flaccumfaciens*)

a una concentración de 10^8 UFC/ml en escala McFarland; y dos plantas testigo a las que se inyectó agua destilada estéril como control negativo (Diatloff y Imrie 2000; Perea et al. 2011; Sánchez 2011; Sammer y Wagner 2012; Urrea y Harveson 2014). Las plantas usadas en el ensayo fueron sometidas a cámara húmeda, utilizando fundas plásticas, 24 horas antes y 24 horas después de la inoculación (She et al. 2021). Durante cuatro semanas de observación se evaluó el desarrollo de la sintomatología característica de la enfermedad en las plantas inoculadas. Finalmente, a partir del tejido enfermo se recuperaron las bacterias fitopatógenas mediante la metodología referida anteriormente y se confirmó su presencia mediante identificación molecular.

El ensayo fue realizado bajo invernadero con una temperatura aproximada de 28 °C, 34 % de humedad, riego de 30 ml de agua por aspersión tres veces a la semana.

RESULTADOS. -

Aislamiento bacteriano

Se procesaron 30 muestras de tallos y hojas de plantas de tomate riñón con síntomas de marchitez o pudrición vascular (Figura 1). Después de ser maceradas, diluidas y sembradas por duplicado, se descartaron los cultivos correspondientes a las diluciones 10^{-1} al presentar crecimiento bacteriano masivo y se utilizaron los cultivos correspondientes a las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} para su posterior resiembra y purificación. En medio AN, se obtuvieron 30 aislados de colonias bacterianas puras y se seleccionaron 20 colonias bacterianas que compartían características morfológicas similares (color amarillento, translúcidas, borde definido, elevación convexa, pequeñas, y no fluorescentes bajo luz ultravioleta) para su posterior análisis.

Caracterización fenotípica de aislamientos bacterianos

Todos los aislamientos bacterianos inicialmente mostraron crecimiento lento y puntiforme a las 24 horas de incubación a 30 °C en AN. Al transcurso de 48 horas desde la siembra, se pudieron distinguir tonos ligeramente diferentes en la coloración amarillenta y tamaño de las colonias. Todos los aislamientos mostraron colonias translúcidas, brillantes, borde definido, circulares, pequeñas, elevación convexa, cremosas y no fluorescentes bajo luz ultravioleta (Tabla 2; Figura 2). Dieciocho de veinte aislamientos presentaron colonias pequeñas, amarillas y su tinción diferencial Gram mostró bacilos rectos, medianos, Gram negativos. Los dos aislamientos restantes presentaron colonias pequeñas de color amarillo pálido-crema y la tinción Gram mostró bacilos,

irregulares, cortos, Gram positivos (Figura 2). La actividad bioquímica de todos los aislamientos (20) coincidió en la reacción positiva de la prueba catalasa y la reacción negativa en la prueba oxidasa (Figura 3, sección A y B). Los dieciocho aislamientos Gram negativos mostraron bacterias móviles, indol negativo, ornitina descarboxilasa negativo, citrato positivo, K/A en TSI y no productoras de gas ni ácido sulfhídrico (Tabla 3).

Finalmente, por razones presupuestarias, se seleccionaron 10 aislamientos bacterianos: 8 pertenecientes a bacilos Gram negativo y las dos cepas de bacilos Gram positivos, para la lectura de su huella metabólica mediante el ensayo de identificación microbiana del sistema semiautomatizado MicroStation™ de Biolog. Al comparar su similitud y probabilidad de identidad con los microorganismos de la base de datos, se seleccionaron los microorganismos fitopatógenos con valores de similitud y probabilidad más cercanos a la identidad. Se conservaron los aislamientos identificados como *Pantoea agglomerans* (4 cepas), *Curtobacterium flaccumfaciens* (1 cepa), *Clavibacter michiganensis* (1 cepa) con valores de 0.65 a 0.8. (Tabla 4). Se descartaron los microorganismos con números de similitud y probabilidad menores a 0.65, entre ellos *Leifsonia poae* (1 cepa), *Enterobacter amnigenus* (1 cepa) por no considerarse bacterias de interés fitopatógeno (Capdevila et al. 1998; Evtushenko et al. 2000; Davin et al. 2019) y dos aislamientos no identificados por la base de datos.

Identificación molecular de aislamientos bacterianos

Los resultados entregados por el laboratorio de Biología molecular de Agrocalidad indicaron que las cuatro cepas de bacterias Gram negativas presentaron porcentajes de identidad del 95 – 99 % con *Pantoea agglomerans*; mientras que, las dos cepas de bacterias Gram positivas, presentaban identidad del 100 %, con *Curtobacterium flaccumfaciens* (Tabla 5). Por lo tanto, se confirmó la identidad preliminar de las bacterias Gram negativas y se rectificó la identidad de la cepa Gram positiva identificada como *Clavibacter michiganensis* pues fue reportada como *Curtobacterium flaccumfaciens*. La identificación de la cepa de *Curtobacterium flaccumfaciens*, se mantuvo igual.

Postulados de Koch

Las plantas de *S. lycopersicum* var. Pietro utilizadas en el ensayo fueron observadas en busca de signos y síntomas de la enfermedad durante cuatro semanas. Las plantas utilizadas como control negativo no mostraron ningún síntoma (Figura 4, sección A), mientras que sintomatología similar

a la observada en el campo fue evidente en todas las plantas a los 10 y 18 días de ser inoculadas con *Pantoea agglomerans* y *Curtobacterium flaccumfaciens* respectivamente (Figura 4, sección B y C). Las plantas con *P. agglomerans* mostraron sintomatología similar a marchitamiento, clorosis y oscurecimiento en yemas, hojas y tallos. Las plantas con *C. flaccumfaciens* mostraron ligera clorosis y oscurecimiento en yemas. Después de presentar tejido clorótico, formación de manchas de varios tamaños que iban oscureciendo con el paso del tiempo, presencia de marchitez en hojas y tejido necrótico en tallo y peciolo a los 25 días, se aislaron los patógenos implicados siguiendo la metodología antes mencionada, se compararon las características macroscópicas y microscópicas y se verificó su identidad mediante análisis molecular confirmando que los microorganismos *P. agglomerans* y *C. flaccumfaciens* obtenidos de campo eran en efecto los causantes de la enfermedad en la planta de tomate riñón.

DISCUSIÓN. -

Durante los meses de agosto a febrero del 2020, brotes infecciosos fueron reportados en plantaciones de *Solanum lycopersicum*. El diagnóstico visual preliminar registró signos y síntomas característicos de presencia bacteriana, es decir, marchitamiento, clorosis en hojas, manchas, tejido necrótico en ápice y pudrición vascular (Coplin y Kado 2001; Blancard 2011; Pernezny et al. 2017; Scala et al. 2018). La identificación del agente causal de enfermedades bacterianas en plantaciones de tomate es una tarea desafiante cuando los signos y síntomas que manifiesta la planta comparten características muy similares a enfermedades producidas por patógenos altamente dañinos (Blancard 2011; Aglave 2019). En el caso de *Solanum lycopersicum*, la manifestación más común de una infección bacteriana es la marchitez y pudrición vascular donde miembros del género *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, y *Clavibacter*, reconocidos como peligrosos patógenos para el tomate, comparten esta sintomatología y, por ende, su identificación debe ser confirmada en laboratorio (Riley et al. 2002; Bernal 2010; Argerich et al. 2011; Perea et al. 2011; Jonit et al. 2016; Kolomiets et al. 2017; CABI 2020). En este estudio, muestras de plantas de tomate riñón con dicha sintomatología fueron analizadas para identificar la causa de la enfermedad.

A partir de tejido vegetal enfermo de tomate riñón (tallo y hojas), se extrajeron en medio bacteriológico común AN colonias bacterianas de lento crecimiento, que compartían morfología macroscópica a las 24 horas de incubación. Las características observadas fueron colonias

circulares, borde entero, convexas, brillantes, pequeñas, translúcidas, pigmentación crema-amarilla y no fluorescentes bajo luz ultravioleta. Después de 48 horas de incubación, dieciocho de veinte aislamientos mostraron mayor coloración amarilla y ligero cambio en el tamaño, estos cambios podrían asociarse al periodo de adaptación de las bacterias hasta su completo desarrollo y a la producción de pigmentos carotenoides desarrollados por algunas bacterias como mecanismos de virulencia (Mohammadi et al. 2012; Kothari et al. 2016).

Las células bacterianas de cada aislamiento fueron teñidas utilizando la coloración de Gram y su observación al microscopio permitió distinguir la presencia de más de un género bacteriano entre los veinte aislamientos. Se observó en los dieciocho aislamientos de colonias con coloración amarilla, bacterias en forma de bacilos rectos, medianos, Gram negativos; mientras que, en los dos aislamientos con colonias de color crema, bacilos irregulares, cortos, Gram positivos. Las características microscópicas y macroscópicas mencionadas permitieron considerar géneros fitopatógenos del tomate Gram negativos en forma de bacilo como *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas* y *Ralstonia*; y Gram positivos bacilares como *Clavibacter* (Garcés et al. 1996; Prieto 2009; Bernal 2010; Haile et al. 2014; Jonit et al. 2016; Kolomiets et al. 2017). Las pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias fitopatógenas Gram negativas propuestas por Garcés, Coba, Castillo (1996) y Schaad (2001), permitieron la caracterización de los dieciocho aislamientos, obteniendo resultados que coincidían con los géneros *Erwinia* y *Pantoea* en las pruebas de MIO, TSI y utilización de citrato; es decir, bacterias móviles, indol negativo, ornitina descarboxilasa negativa, fermentadoras de glucosa, no fermentadoras de lactosa, y no productoras de ácido sulfhídrico ni gas (Gavini et al. 1989; Holt et al. 2000; Schaad 2001; Loch y Faisal 2007; Islam et al. 2014). A su vez, estas características descartaron al género fitopatógeno *Pectobacterium* al ser un productor de gas en TSI (Gardan et al. 2003; Rafiei et al. 2015; Dadaşođlu y Kotan 2017; Silva et al. 2020), *Xanthomonas* al ser formadoras de indol (Quiroz et al. 2011; Soudi et al. 2011; Narvekar et al. 2019; Ogolla y Neema 2019), *Pseudomonas* al no fermentar los carbohidratos (Ivanović et al. 2017; López 2018) y *Ralstonia* al poseer la enzima oxidasa (Rahman et al. 2013; Seleim et al. 2014; Torres et al. 2014).

La caracterización de los microorganismos se hizo evidente cuando la lectura de los perfiles bioquímicos, por el sistema semiautomatizado de identificación MicroStation™ de la casa comercial Biolog, reveló nombres que coincidían en la base de datos con la identidad de conocidas bacterias fitopatógenas que concordaban con la caracterización preliminar. Por un lado, *Pantoea*

agglomerans, bacteria en forma de bastón recto, Gram negativa que pertenece al Phylum Proteobacterias, Clase Gammaproteobacterias, Orden Enterobacteriales y Familia Erwaniaceae (Gavini et al. 1989; De Boer et al. 2001, ITIS 2012c; Grimont y Grimont 2015; Waltherson y Stavrínides 2015); y por otro, *Curtobacterium flaccumfaciens* y *Clavibacter michiganensis* bacterias en forma de bastón irregulares, Gram positivas que pertenecen al Phylum Actinobacteria, Clase Actinobacteria, Orden Actinomycetales y Familia Microbacteriaceae (ITIS 2012a; ITIS 2012b).

El análisis de la secuencia nucleotídica del gen 16S rRNA de las cepas estudiadas, fueron superiores al 95 % indicando un alto grado de coincidencia con la identidad de los microorganismos (Claverie y Notredame 2007; UNADM 2017). Esto confirmó la identidad de las bacterias Gram negativas como *Pantoea agglomerans* al obtener un porcentaje de identidad del 95 – 99 %. Mientras que, las cepas de *Clavibacter michiganensis* y *Curtobacterium flaccumfaciens*, fueron reconocidas como *Curtobacterium flaccumfaciens* con un porcentaje de identidad del 100 % (Komagata y Suzuki 1986; Saddler et al. 2017; Gonçalves et al. 2019).

Las herramientas de identificación bacteriana utilizadas anteriormente coincidieron en la identificación de los microorganismos Gram negativos, pero no coincidieron completamente en la identidad de los microorganismos Gram positivos. Las pruebas de laboratorio tradicionales permitieron un acercamiento a la identificación bacteriana. El sistema semiautomatizado MicroStation™ de Biolog ofreció una caracterización muy cercana a la correcta, pero, a pesar de considerar los valores límite recomendados de similitud y probabilidad (mayores a 0.65) para catalogar una coincidencia de especies con la base de datos propuestas por el fabricante y varios autores, existió una discrepancia en la identificación de las bacterias Gram positivas (Miller y Rhoden 1991; Klinger et al. 1992; Morgan et al. 2009; Schmidt et al. 2018). La discrepancia antes mencionada puede asociarse a las limitaciones que poseen ciertos sistemas semiautomatizados en la caracterización de microorganismos que han permanecido cambiantes en su taxonomía y que al no concordar con la alineación de la base de datos disponible son asignadas al género y especie más similar o al más estrechamente relacionado, y por tanto, los resultados deben ser considerados con cautela como se ha visto en la bibliografía a lo largo de los años (Klingler et al. 1992; Jones et al. 1993; Olson 1996; Maringoni et al. 2006; Morgan et al. 2009; Schmidt et al. 2018). Por otro lado, el análisis molecular permitió la identificación actual y correcta tanto de las bacterias Gram positivas y Gram negativas a pesar de su reclasificación de género a lo largo de los años (Collins

y Jones 1983; Gavini et al. 1989; Rodicio y Mendoza 2004; Harveson et al. 2006; Morgan et al. 2009; Grimont y Grimont 2015; Bergey 2015; Dow y O'Connell 2017; Saddler et al. 2017; Li et al. 2018).

Los dos géneros bacterianos de origen vegetal detectados en el estudio *Pantoea agglomerans* y *Curtobacterium flaccumfaciens* son reconocidos principalmente por sus propiedades perjudiciales; sin embargo, el género *Pantoea* también posee cualidades benéficas (Dutkiewicz et al. 2016a; Dutkiewicz et al. 2016b). En primer lugar, *Pantoea agglomerans* es una bacteria endofítica, epifita y ubicua, que se cree ha evolucionado a patógeno de plantas, animales y seres humanos por su versatilidad metabólica, así como, por la adquisición de plásmidos patogénicos (Hauben et al. 1998; Weinthal et al. 2008; Delétoile et al. 2009; Walterson y Stavrinides 2015; Dutkiewicz et al. 2016a). En plantas, su principal sintomatología es la clorosis en hojas y podredumbre en tallo y raíz como es el caso de las plantas de nuez, arroz, mango y vid (Dutkiewicz et al. 2016a; Carrer et al. 2018; Aksoy y Boluk 2019; Gutiérrez et al. 2019; CABI 2020). En segundo lugar, *Curtobacterium flaccumfaciens* es una bacteria fitopatógena que representa una peligrosa amenaza por su carácter fitosanitario cuarentenario a nivel mundial ya que ataca a un amplio rango de leguminosas y es conocida por causar enfermedades como la marchitez de hojas y necrosis vascular en plantas de frejol y soya (Hedges 1922; Harveson et al. 2006; EPPO 2011; Sammer y Wagner 2012; Gonçalves et al. 2019; CABI 2020; Osdaghi et al. 2020; EPPO 2020).

Curiosamente, a pesar de ser bacterias conocidas en el campo agrícola y haber sido reportadas previamente a nivel mundial y en diferentes hospederos, ninguna ha sido reportada como patógeno en *Solanum lycopersicum* (Jones et al. 2001; Funke et al. 2005; Jiménez et al. 2007; Bernal 2010; Edelman y Lin 2011; Walterson y Stavrinides 2015; Edelman y Lin 2016; CABI 2020). En Ecuador, no existen referencias oficiales de la presencia de *Curtobacterium flaccumfaciens* en ningún hospedero, mientras que investigaciones llevadas a cabo en Agrocalidad mencionan a *Pantoea agglomerans* como patógeno en sembríos de maíz y gypsophila en la provincia de Pichincha, y resultados preliminares también indican su presencia en sembríos de papa en la región Sierra (Caiza 2019; Vaca 2019; Agrocalidad 2020).

La presencia de *P. agglomerans* en plantaciones de tomate riñón puede estar ligada a la versatilidad y fácil adaptación de su género. En agricultura, puede transportarse por agua, tierra, aire e insectos, puede estar dentro y fuera del hospedero, y es capaz de soportar condiciones ambientales no favorables (Prabhakar et al. 2009; Walterson y Starvinides 2015; Edelman y Lin 2011; Edelman y

Lin 2016; Sawsan et al. 2017). La presencia de *C. flaccumfaciens* en cultivos de tomate riñón podría estar asociada a contaminación cruzada, donde sus mecanismos de virulencia, entre ellos su propiedad de alta resistencia a la desecación, le permite permanecer durante años en el almacén de invernaderos, tutorados, cintas de riego, en restos de cultivos finiquitados, en la superficie de ciertas malezas y hasta 24 años en semillas de ciertas leguminosas (Burkholder 1945; Harveson et al. 2006; Argerich et al. 2011; EPPO 2011; Walterson y Stavrinides 2015; Gonçalves 2018; Nascimento et al. 2020). Se puede considerar su llegada de forma accidental, como ha sucedido en reportes, donde la bacteria fue encontrada de forma epífita en plantas de tomate y otras solanáceas como berenjena y pimiento, o en variedad de malezas (Osdaghi et al. 2018; Nascimento et al. 2020). Su origen podría ser foráneo y su disseminación en Ecuador, como en otros países, podría estar relacionada a la falta de control fitosanitario en el ingreso de semillas extranjeras contaminadas o a labores agrícolas comunes, como es el intercambio de semillas entre agricultores, siendo la propagación por semillas la causa más frecuente de prevalencia de este microorganismo a nivel mundial (Burkholder 1945; Burke 1957; Hsieh et al. 2006; Argerich et al. 2011; Navarrete et al. 2014; Gonçalves et al. 2017; EPPO 2020).

Para verificar si los microorganismos obtenidos en campo e identificados en laboratorio causaban enfermedad, se simuló el mecanismo de entrada más común de estas bacterias (EPPO 2011). Mediante pequeñas lesiones en el tejido de la planta se inoculó concentraciones altas de los microorganismos garantizando su ingreso y colonización (Harveson et al. 2006; CABI 2020). Las plantas sanas, después de ser inoculadas artificialmente, mostraron síntomas similares a los hallados en plantas enfermas de campo, confirmando eficazmente los postulados de Koch (1884) y catalogando a *P. agglomerans* y *C. flaccumfaciens* como nuevos agentes etiológicos de pudrición vascular bacteriana y marchitamiento, de interés fitosanitario, en tomate riñón en Ecuador (Agrios 2005; Sobiczewski 2008).

CONCLUSIONES. -

El desarrollo del presente trabajo investigativo indicó por primera vez en Ecuador, la presencia de las bacterias *Pantoea agglomerans* y *Curtobacterium flaccumfaciens* en tomate riñón variedad Pietro, cultivadas en invernadero en las provincias de Pichincha y Cotopaxi. La patogenicidad de las bacterias fue corroborada mediante postulados de Koch, ubicando a los microorganismos *P.*

agglomerans y *C. flaccumfaciens*, como agentes etiológicos bacterianos productores de marchitez y pudrición vascular de *Solanum lycopersicum*. Los resultados obtenidos aportan nuevas referencias sobre la presencia de bacterias fitopatógenas de importancia en la agricultura, siendo *Curtobacterium flaccumfaciens* un microorganismo de vigilancia fitosanitaria por su carácter cuarentenario.

RECOMENDACIONES. -

Esta investigación promueve el desarrollo de medidas eficaces de prevención y control de los microorganismos *Pantoea agglomerans* y *Curtobacterium flaccumfaciens*, para evitar pérdidas económicas causadas por marchitez y pudrición vascular de tomate riñón en zonas productoras de esta hortaliza y otros cultivos vulnerables. Adicionalmente, los resultados proporcionados por el sistema semiautomatizado de identificación MicroStationTM de Biolog se deberían complementar con análisis molecular para la detección de microorganismos Gram positivos.

Por último, en futuras investigaciones se debería demostrar si los patógenos *P. agglomerans* y *C. flaccumfaciens* son capaces de infectar otras partes de la planta de tomate riñón como frutos y raíces; determinar la severidad de cada agente en diferentes hospederos de interés agrícola; y, buscar microorganismos biocontroladores como posibles tratamientos de los patógenos encontrados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. -

- Agrios G. 2005. *Plant Pathology*. (5ta ed.). San Diego, Estados Unidos: Academic Press.
- Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario. 2018. *Instructivo INT/FP/01: Toma de muestras para el laboratorio de Fitopatología*. Ecuador: Agrocalidad.
- Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario. 2018. *Instructivo INT/FP/02: Preparación de medios de cultivo y pruebas bioquímicas*. Ecuador: Agrocalidad.
- Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario. 2018. *Instructivo INT/FP/10: Preparación de muestras de material vegetal, suelo, agua y abonos orgánicos*. Ecuador: Agrocalidad.
- Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario. 2018. *Instructivo PEE/FP/01: Identificación de bacterias*. Ecuador: Agrocalidad.
- Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario. 2018. *Instructivo PEE/FP/05: Identificación de bacterias hasta género*. Ecuador: Agrocalidad.
- Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario. 2018. *Instructivo PEE/FP/17: Extracción de ADN genómico de bacterias fitopatógenas*. Ecuador: Agrocalidad.
- Aglave B. 2019. *Handbook of plant disease identification and management*. Boca Raton, Estados Unidos: CRC Press. doi: 10.1201/9780429504907.
- Aksoy H, Boluk E. 2019. First report of *Pantoea agglomerans* on *Oryza sativa* in Turkey. *Journal of Plant Pathology* 101, 449. doi: 10.1007/s42161-018-00213-2.
- Argerich C, Troilo L, Rodríguez M, Izquierdo J, Strassera M, Balcaza L, Dal Santo S, Miranda, O, Rivero M, González G, Iribarren M. 2011. *Buenas Prácticas Agrícolas en la Cadena de Tomate*. Argentina: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación – FAO.
- Asociación de Agrónomos Indígenas de Cañar (AAIC). 2003. *Cultivo de tomate riñón en invernadero*. Ecuador: Editorial Abya Yala.
- Balamurugan A, Muthamilan M, Kamalakannan A, Shanthi A, Arumugam T. 2020. Characterization of *Ralstonia solanacearum* Causing Bacterial Wilt Disease of Tomato in Coimbatore District of Tamil Nadu, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 9(2): 3010-3016. doi: 10.20546/ijcmas.2020.902.345.
- Bergougnot V. 2014. The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, 32(1), 170–189. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.11.003.
- Bernal R. 2010. *Enfermedades de tomate (Lycopersicum esculentum Mill) en invernadero en las zonas de Salto y Bella Unión (Serie Técnica, INIA SRL 181: 1-71)*. Montevideo, Uruguay:

Editorial Hemisferio Sur.

- Bertheau Y, Frechon D, Toth I, Hyman L. 1998. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atropsetica* on potatoes. Laboratory Manual. United Kingdom: Scottish Crop Research Institute. doi: 10.13140/RG.2.2.24610.99528.
- Biolog. 2019. *Microbial Identification state of the science performance with unmatched power y versatility*. California, Estados Unidos: Biolog, Inc.
- Blancard D. 2011. *Enfermedades del tomate*. Madrid, España: Mundi Prensa.
- Burgos D. 2014. *Identificación, caracterización y control del agente causal de la enfermedad “mancha negra del tallo”, que ataca al tomate de mesa (Solanum lycopersicum), bajo condiciones de invernadero. Tumbaco, Pichincha*. Ecuador: Universidad Central del Ecuador.
- Burkholder W. 1945. The longevity of the pathogen causing the wilt of the common bean. *Phytopathology*, 35, 743–744.
- Caiza R. 2019. *Caracterización patogénica, bioquímica y molecular del agente causal de la pudrición de tallo del maíz, Variedad iniap-103 mishqui sara* (Tesis de pregrado). Ecuador: Universidad Central del Ecuador.
- Capdevila J, Bisbe V, Gasser I, Zuazu J, Olivé T, Fernández F, Pahissa Berga A. 1998. *Enterobacter amnigenus*. Un patógeno humano inusual [*Enterobacter amnigenus*. An unusual human pathogen]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 16(8): 364-366.
- Carrer R, Rodrigues L, Abreu A, Souza R, Rangel P, Mello R, Rocha G, Cunha M. 2018. Detection of *Pantoea agglomerans* in germplasm rice accessions (*Oryza sativa*) in Brazil. *Plant Disease*. 102 (1), 237-238. doi:10.1094/PDIS-06-17-0905-PDN.
- Centre for Agricultural Bioscience International (CABI). 2020. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. En: Osdaghi E (Rev.). *Invasive Species Compendium* (Ficha de datos). Wallingford, United Kingdom: CAB International.
- Centre for Agricultural Bioscience International (CABI). 2020. *Pantoea agglomerans* (bacterial grapevine blight) (Ficha de datos). Wallingford, United Kingdom: CAB International.
- Claverie J, Notredame C. 2007. *Bioinformatics for dummies* (2a ed.). United States: Wiley Publishing.
- Collins M, Jones D. 1983. Reclassification of *Corynebacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii* and *Corynebacterium poinsettiae* in the genus *Curtobacterium*, as *Curtobacterium flaccumfaciens* comb. nov. *Journal of General Microbiology*. 129:3545-3548. doi: 10.1099/00221287-129-11-3545.

- Cotes A. 2018. *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros*. Colombia: Agrosavia.
- Coplin D, Kado C. 2001. *Pantoea*. n: *Laboratory Guide for Identification of Plant pathogenic bacteria* (3a ed). United States: The American Phytopathological Society.
- Dadaşođlu F, Kotan R. 2017. Identification and characterization of *Pectobacterium carotovorum*. *Journal of Animal and Plant Sciences*. 27(3): 647-654.
- Davin A, Lavigne J, Pagès J. 2019. *Enterobacter* spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clinical microbiology reviews*, 32(4). 19. doi: 10.1128/CMR.00002-19.
- De Boer S, Coplin D, Jones. 2001. *Erwinia* and *Pantoea*. En: *Laboratory Guide for Identification of Plant pathogenic bacteria* (3a ed.). United States: The American Phytopathological Society.
- Delétoile A, Decré D, Courant S, Passet V, Audo J, Grimont P, Arlet G, Brisse S. 2009. Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* 669 strains by multilocus gene sequencing. *Journal of Clinical. Microbiology* 47 (2): 300-310.
- Diatloff A, Imrie B. 2000. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in mungbean cultivars. *Australasian Plant Pathology* 29:24–28. doi: 10.1071/AP00004.
- Dow M, O'Connell A. 2017. Groups of plant pathogenic bacteria and the diseases they incite. In Thomas B. Murray B. Murphy D. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. Academic Press, Elsevier.
- Dutkiewicz J, Mackiewicz B, Kinga Lemieszek M, Golec M, Milanowski J. 2016a. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals, and plants. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23(2):197-205.
- Dutkiewicz J, Mackiewicz B, Lemieszek M, Golec M, Milanowski J. 2016b. *Pantoea agglomerans*: A mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 23(2): 206-222. doi: 10.5604/12321966.1203879.
- Edelman J. Lin Y. 2011. Microbiology of melons, cucumbers, and squash (Cucurbitaceae) and related fruits. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 5(1): 51-65.
- Edelman J. Lin Y. 2016. Microbiology (Endobacteriology) of Fruit and Vegetable Crops: An Expanded and Continuing Study. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*. 5(2): 95. doi: 10.11648/j.ijnfs.20160502.12.

- Escobar H, Lee R. 2009. *Manual de producción de tomate bajo invernadero*. Bogotá: Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). 2011. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (EPPO Bulletin), 41: 320-328.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). 2020. *EPPO A1 and A2 Lists of pests recommended for regulation as quarantine pests* (EPPO Bulletin). Francia: EPPO.
- Evtushenko L, Dorofeeva L, Subbotin S, Cole J, Tiedje J. 2000. *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of '*Corynebacterium aquaticum*' Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al. 1984) gen. nov., comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 50(1): 371-380. doi: 10.1099/00207713-50-1-371.
- Funke G, Aravena M, Frodl R. 2005. First description of *Curtobacterium* spp. isolated from human clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*, 43(3): 1032–1036. doi: 10.1128/JCM.43.3.1032-1036.2005.
- Garcés E, Coba B, Castillo N. 1996. *Identificación de bacterias fitopatógenas*. Colombia: Imprenta Universidad Nacional.
- Gardan L, Gouy C, Christen R, Samson R. 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 53(2), 381–391. doi:10.1099/ijms.0.02423-0
- Gavini F, Mergaert J, Bej A, Mielcarek C, Izard D, Kersters K, Ley J. 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and Description of *Pantoea dispersa* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 39(3): 337-345. doi: 10.1099/00207713-39-3-337.
- Gonçalves R, Schipanski C, Koguishi L, Soman J, Sakate R, Silva T, Maringoni A. 2017. Alternative hosts of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, causal agent of bean bacterial wilt. *European Journal of Plant Pathology*, 148(2): 357-365. doi: 10.1007/s10658-016-1094-4.
- Gonçalves R, Soman J, Krause R, Passos J, Silva T, Maringoni A. 2018. Survival of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in the soil under Brazilian conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 152, 213–223. doi: 10.1007/s10658-018-1466-z.
- Gonçalves R, Balbi-Peña M, Soman J, Maringoni A, Taghouti G, Fischer-le Saux M, Portier P. 2019. Genetic diversity of *Curtobacterium flaccumfaciens* revealed by multilocus sequence analysis. *European Journal of Plant Pathology*, 154(2): 189-202. doi:10.1007/s10658-018-

01648-0.

- Grimont P, Grimont F. 2015. *Pantoea*. En M Trujillo, S Dedysh P DeVos, B Hedlund, P Kämpfer, F Rainey, W Whitman, (Eds.). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Bergey's Manual Trust.
- Guerrero A. 2016. *Evaluación del manejo de postcosecha y características físicas y químicas del fruto del tomate (Solanum lycopersicum) cultivado en condiciones protegidas en clima templado de Ambato (Ecuador)*. Ecuador: Universidad de Guayaquil.
- Gutiérrez J, Cazorla F, Torés J, De Vicente A. 2019. *Pantoea agglomerans* as a New Etiological Agent of a Bacterial Necrotic Disease of Mango Trees. *Phytopathology* (1):17-26. doi: 10.1094/PHYTO-06-18-0186-R.
- Haile B, Adugna G, Handoro F. 2014. Physiological characteristics and pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* strains collected from enset and banana in Southwest Ethiopia. *African Journal of Biotechnology*. 13, 2425-2434. doi:10.5897/AJB2014.13794.
- Harveson R, Schwartz H, Vidaver A, Lambrecht P, Otto K. 2006. New outbreaks of bacterial wilt of dry bean in Nebraska observed from field infections. *Plant Disease*, 90(5): 681-681. doi:10.1094/PD-90-0681A.
- Hauben L, Moore E, Vauterin L, Steenackers M, Mergaert J, Verdonck L, Swings J. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Systematic and applied microbiology*, 21(3): 384–397. doi: 10.1016/S0723-2020(98)80048-9.
- Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J, Williams S. 2000. *Pantoea* En: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9a ed.). Philadelphia, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hsieh T, Huang H, Erickson R. 2006. Bacterial wilt of common bean: Effect of seedborne inoculum on disease incidence and seedling vigour. *Seed Science and Technology*, 34, 57–67.
- Islam M, Alam M, Urmee S, Rahaman M, Razu M, Mazumda R. 2014. Isolation, identification, in vitro antibiotic resistance and plant extract sensitivity of fire blight causing *Erwinia amylovora*. *Journal of Plant Pathology Microbiology*, 5(3): 233. doi:10.4172/2157-7471.1000233.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censo (INEC). 2015. Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua (Boletín de encuesta). Ecuador: Instituto nacional de estadística y censos.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. 2018. *Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua (ESPAC). Superficie según producción y ventas de tomate riñón*

- (*fruta fresca*) (Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua). Ecuador: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos.
- ITIS: The Integrated Taxonomic Information System [Internet]. 2012a. *Clavibacter michiganensis* TSN 960594 from the Integrated Taxonomic Information System (ITIS) on-line database. [cited 2020 Abril 20]. Available from: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=960594#null
- ITIS: The Integrated Taxonomic Information System [Internet]. 2012b. *Curtobacterium flaccumfaciens* TSN 960977 from the Integrated Taxonomic Information System (ITIS) on-line database. [cited 2020 Abril 20]. Available from: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=960977#null
- ITIS: The Integrated Taxonomic Information System [Internet]. 2012c. *Pantoea agglomerans* TSN 964579 from the Integrated Taxonomic Information System (ITIS) on-line database. [cited 2020 Abril 20]. Available from: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=965302#null
- Ivanović, Ž., Perović, T., Popović, T., Blagojević, J., Trkulja, N., & Hrnčić, S. 2017. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, causal agent of citrus blast of mandarin in Montenegro. *The plant pathology journal*, 33(1): 21–33. doi: 5423/PPJ.OA.08.2016.0161.
- Jiménez O, Contreras N, Rodríguez C. 2007. Identificación y caracterización de *Pantoea agglomerans* aislada en plantas de gloxinia (*Gloxinia alba*). *Bioagro*, 19(1): 53-57.
- Jones J, Chase A, Harris G. 1993. Evaluation of the Biolog GN MicroPlate System for Identification of Some Plant-Pathogenic Bacteria. *Plant Disease*, 77(6): 553-558. doi: 10.1094/PD-77-0553.
- Jones J, Stall R, Zitter T. 2001. *Plagas y enfermedades del tomate*. Sociedad Americana de Fitopatología. España: Mundi Persa.
- Jonit N, Low Y, Tan G. 2016. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, biochemical tests, rice (*Oryza sativa*), bacterial leaf blight (BLB) disease, Sekinchan. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 4(3): 63-69. doi: 10.12691/jaem-4-3-3.
- Klingler J, Stowe R, Obenhuber D, Groves T, Mishra S, Pierson D. 1992. Evaluation of the Biolog automated microbial identification system. *Applied and environmental microbiology*, 58(6): 2089–2092. doi: 10.1128/aem.58.6.2089-2092.1992.
- Koch R. 1884. Die Aetiologie der Tuberculose (trad.). *Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*, 2, 1.

- Kolomiets J, Grigoryuk I, Буденко Л. 2017. Bacterial diseases of tomato plants in terms of open and covered growing of Ukraine. *Annals of Agrarian Science*, 15(2): 213-216. doi: 10.1016/j.aasci.2017.05.010.
- Komagata K, Suzuki, K. 1986. Genus *Curtobacterium*. En P Sneath, N Mair, M Sharpe, J Holt (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2: 1313-13172. Baltimore: The Williams & Wilkins Co.
- Kothari V, Joshi C, Patel P. 2016. Colourful Side of Bacteriology: The Pigmented Bacteria. *Advancements in Genetic Engineering*, 5:1. doi: 10.4172/2169-0111.1000i104.
- Kunstmann J, Ciampi L, Böhm L, Barrera S, Collado L. 2006. Determinación de especies de *Erwinia* (grupo carotovora) como agentes causales de pudrición blanda en *Cala* (*Zantedeschia* spp.). *Agricultura Técnica*, 66(3): 247-255.
- Leitón Y. 2020. *Evaluación bajo invernadero de fuentes de fertilización orgánica y química en tomate riñón (Solanum lycopersicum Mill.), en Pichincha*. Ecuador: Universidad Central del Ecuador.
- Li X, Tambong J, Yuan K, Chen W, Xu H, Lévesque C, De Boer S. 2018. Re-classification of *Clavibacter michiganensis* subspecies on the basis of whole-genome and multi-locus sequence analyses. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(1): 234–240. doi: 10.1099/ijsem.0.002492.
- Loch T, Faisal M. 2007. Isolation of *Pantoea agglomerans* from brown trout (*Salmo trutta*) from Gilchrist Creek, Michigan, USA. *Bulletin of The European Association of Fish Pathologists*, 27, 200-204.
- López G, López R, León J. 2017. Análisis de la influencia de factores climatológicos en la pérdida de superficie sembrada de cultivos transitorios en el Ecuador. *Revista Científica Agroecosistemas*, 5(1): 176-183.
- López C. 2018. Aislamiento de bacterias del género pseudomonas desde árboles de Cerezo (*prunus avium*) afectados con cáncer (Tesis de pregrado). Chile: Universidad Andrés Bello.
- MacFaddin J. 2000. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria* (3a ed.). Philadelphia, Estados Unidos: Lippincott Williams and Wilkins.
- Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer S, Machado M, Toth I, Salmond G, Foster G. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(6): 614-629. doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x.
- Maringoni A, Camara R, Souza V. 2006. Semi-selective culture medium for *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* isolation from bean seeds. *Seed Science and Technology*

- 34, 117–124. doi: 10.15258/sst.2006.34.
- Miller J, Rhoden, D. 1991. Preliminary evaluation of Biolog, a carbon source utilization method for bacterial identification. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(6): 1143-1147. doi: 10.1128/JCM.29.6.1143-1147.1991.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca (MAGAP). 2015. *Boletín situacional tomate riñón*. Ecuador, Quito: Gran Minga Nacional Agropecuaria.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca (MAGAP). 2016. *Boletín situacional tomate riñón*. Ecuador, Quito: Gran Minga Nacional Agropecuaria.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca (MAGAP). 2017. *Boletín situacional tomate riñón*. Ecuador, Quito: Gran Minga Nacional Agropecuaria.
- Mohammadi M, Burbank L, Roper M. Biological role of pigment production for the bacterial phytopathogen *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(19): 6859-6865. doi: 10.1128/AEM.01574-12.
- Morgan M, Boyette M, Goforth C, Sperry K, Greene S. 2009. Comparison of the Biolog OmniLog Identification System and 16S ribosomal RNA gene sequencing for accuracy in identification of atypical bacteria of clinical origin. *Journal of microbiological methods*. 79(3): 336-43. doi: 10.1016/j.mimet.2009.10.005.
- Muniappan G, Rajesh M, Solairaj P, Senthilkumar T. 2012. Tomato as a pioneer in health management. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Science*, 2(3): 210-217.
- Narvekar S, Thilakan A, Bhangale M, Yeri A, Pawar V, Kasar N, Shukla P, Trivedi M. 2019. Isolation, identification, and in-vitro antibiotic sensitivity pattern of local isolates of *Xanthomonas* followed by production of xanthan gum using agro-industrial waste, *International Journal of Emerging Technologies and Innovative Research*, 6(5): 181-188.
- Nascimento D, Oliveira L, Melo L, Silva J, Soman J, Girotto K, Eburneo R, Ribeiro M, Sartori M, Silva T, Maringoni A. 2020. Survival of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in weeds. *Plant Pathology*, 69: 1357-1367. doi: 10.1111/ppa.13206.
- Navarrete R, Aranda S, Rodríguez M, Moya S, González M. 2014. Bacterias fitopatógenas en semillas: Su detección y regulación. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32(2):75-88.
- Ogolla F, Neema D. 2019. Cultural, morphological and biochemical identification of *Xanthomonas* spp. the causative agent of bacteria leaf spot in tomatoes in Wanguru, Mwea, Kirinyaga County, Kenya. *International Journal of Research and Innovation in Applied Science*, 4(4): 44-49.
- Olson W. 1996. *Automated Microbial Identification and Quantitation: Technologies for the 2000s*.

- United States: CRC Press.
- Osdaghi E, Taghavi S, Hamzehzarghani H, Fazliarab A, Harveson R, Tegli S, Lamichhane J. 2018. Epiphytic *Curtobacterium flaccumfaciens* strains isolated from symptomless solanaceous vegetables are pathogenic on leguminous but not on solanaceous plants. *Plant Pathology*, 67(2): 388-398. doi: 10.1111/ppa.12730.
- Osdaghi E, Young A, Harveson R. 2020. Bacterial wilt of dry beans caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: A new threat from an old enemy. *Molecular Plant Pathology*, 21(5): 605-621. doi: 10.1111/mpp.12926.
- Perea J, García R, Allende R, Carrillo J, León J, Valdez T, López F. 2011. Identificación de razas y biovares de *Ralstonia solanacearum* aisladas de plantas de tomate. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 29(2):98-108.
- Pernezny K, Davis M, Momol T. 2017. *Tomato Health Management. Chapter 11: Management of Important Bacterial Diseases*, 103-112. doi: 10.1094/9780890544884.011.
- Prabhakar C, Sood, P, Kapoor V, Kanwar S, Mehta P, Sharma P. 2009. Molecular and biochemical characterization of three bacterial symbionts of fruit fly, *Bactrocera tau* (Tephritidae: Diptera). *The Journal of general and applied microbiology*, 55, 479-87. doi: 10.2323/jgam.55.479.
- Prieto V. 2009. *Bacterias fitopatógenas. Clave para la identificación de bacterias fitopatógenas*. Uruguay: Universidad de la República.
- Quiroz C, Botero M, Castaño J. 2011. Etiología de la necrosis de los brotes terminales de la higuerilla (*Ricinus communis* L.). *Revista de la academia colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales*. 35(135): 133-142.
- Rafiei S, Khodakaramian G, Baghaee-Ravari S. 2015. Characterization of *Pectobacterium* species isolated from vegetable crops in north-west of Iran. *African Journal of Agricultural Research*, 10(46): 4258-4267.
- Rahman M, Islam M, Rahman T, Meah B. 2013. Biochemical Characterization of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt of brinjal in Bangladesh. *Progressive Agriculture*, 21(1-2): 9-19. doi:10.3329/pa.v21i1-2.16744.
- Riley M, Williamson M, Maloy O. 2002. Plant disease diagnosis. J Ureta (trad.) 2016. *The Plant Health Instructor*.
- Rodicio M, Mendoza C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(4): 238-245. doi: 10.1157/13059055.
- Saddler G, Guimarães P, Hamada M, Suzuki K. 2017. *Curtobacterium*. En *Bergey's Manual of*

- Systematics of Archaea and Bacteria* (eds M Trujillo, S Dedysh, P DeVos, B Hedlund, P Kämpfer, F Rainey, W Whitman). Bergey's Manual trust.
- Sammer U, Wagner K. 2012. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on soybean in Germany – A threat for farming. *Journal of Phytopathology*, 160:314–316. doi: 0.1111/j.1439-0434.2012.01902.x.
- Sánchez J. 2011. *Introducción al Diseño Experimental*. Ecuador: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Sánchez J. 2016. *Introducción a la estadística en las ciencias biológicas*. Ecuador: Qualityprint.
- Sawsan H, Authman S, Zaid R, Abbas H, Mohammed A, Al-Ezee M. 2017. Temperature effects on growth of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* (An oval isolate from Iraqi soils). *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology*, 8(4): 85-88.
- Scala V, Pucci N, Loreti S. 2018. The diagnosis of plant pathogenic bacteria: A state of art. *Frontiers in bioscience* (Elite ed.). 10: 449-460. doi: 10.2741/e832.
- Schaad N. 1988. *Plant pathogenic bacteria* (3a ed.). United States: The American Phytopathological Society.
- Schaad N. 2001. *Initial identification of common genera. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria* (3a ed.). United States: The American Phytopathological Society.
- Schmidt T, Kock M, Ehlers M. 2018. Identification and characterization of *Staphylococcus devriesei* isolates from bovine intramammary infections in KwaZulu-Natal, South Africa. *BMC Veterinary Research*, 14:324. doi: 10.1186/s12917-018-1655-1.
- Seleim M, Abo-elyousr K, Abd-El-Moneem K, Saeed F. 2014. First Report of Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum* Biovar 2 Race 1 on Tomato in Egypt. *The plant pathology journal*, 30(3): 299-303. doi: 10.5423/PPJ.NT.10.2013.0101.
- Silva A, Luz J, Tebaldi N, Morais T. 2020. Diversity of *Pectobacterium* strains by biochemical, physiological, and molecular characterization. *Bioscience Journal*, 36(2): 316-323. doi: 10.14393/BJ-v36n2a2020-46256
- Sobiczewski P. 2008. Bacterial diseases of plants: Epidemiology, diagnostics, and control. *Zemdirbyste*. 95(3): 151-157.
- Soudi M, Alimadadi N, Ghadam P. 2011. Minimal phenotypic test for simple differentiation of *Xanthomonas campestris* from other yellow-pigmented bacteria isolated from soil. *Iranian journal of microbiology*, 3(2): 84–91.
- Stevens A. 2017. *Tomato Health Management. CHAPTER 1: Introduction*. 1-11.

- Tegli S, Carboneschi M, Vidaver A. 2017. *Detection of Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds and in seeds of other Leguminosae crops. En: *Detection of plant-pathogenic bacteria in seed and other planting material* (2a ed). USA: APS.
- Torres C, Casas M, Ortiz J. 2014. Manejo de *Ralstonia solanacearum* raza 2 a través de productos químicos y biológicos. *ITECKNE Innovación e Investigación en Ingeniería*, 10(2): 217-223. doi: 10.15332/iteckne.v10i2.399.
- Universidad Abierta y a Distancia de México (UNADM). 2017. *Bioinformática. Unidad 2, Análisis computacional de secuencias ADN*. México: Universidad abierta y a distancia de México/División de Ciencias de la Salud, Biológicas y Ambientales.
- Urrea C, Harveson R. 2014. Identification of sources of bacterial wilt resistance in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Disease*, 98: 973–976. doi: 10.1094/PDIS-04-13-0391-RE.
- Vaca V. 2019. *Identificación bioquímica y molecular de Pantoea spp. causante de la formación de agallas en raíces de gypsophila en la Provincia de Pichincha*. (Tesis de pregrado). Ecuador: Universidad de las Américas.
- Viteri A, Regalado H, Toaza A. 2020. Identificación de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas marginalis*, causantes del síndrome de desorden del peridermo “Pink eye” en papa. *Ecuador es calidad*, 7(2): 47-59. doi: 10.36331/revista.v7i2.108.
- Walterson A, Stavrinides J. 2015. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae, *FEMS Microbiology Reviews*, 39(6): 968–984. doi: 10.1093/femsre/fuv027.
- Weinthal D, Barash I, Panijel M, Valinsky L, Gaba V, Manulis-Sasson S. 2008. Distribution and Replication of the Pathogenicity Plasmid pPATH in Diverse Populations of the Gall-Forming Bacterium *Pantoea agglomerans*. *Applied and environmental microbiology*, 73(23): 7552. doi: 10.1128/AEM.01511-07.
- Wragg P, Randall L, Whatmore A. 2014. Comparison of Biolog GEN III MicroStation semi-automated bacterial identification system with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and 16S ribosomal RNA gene sequencing for the identification of bacteria of veterinary interest. *The Journal of Microbiological Methods*, 105:16–21. doi: 10.1016/j.mimet.2014.07.003.

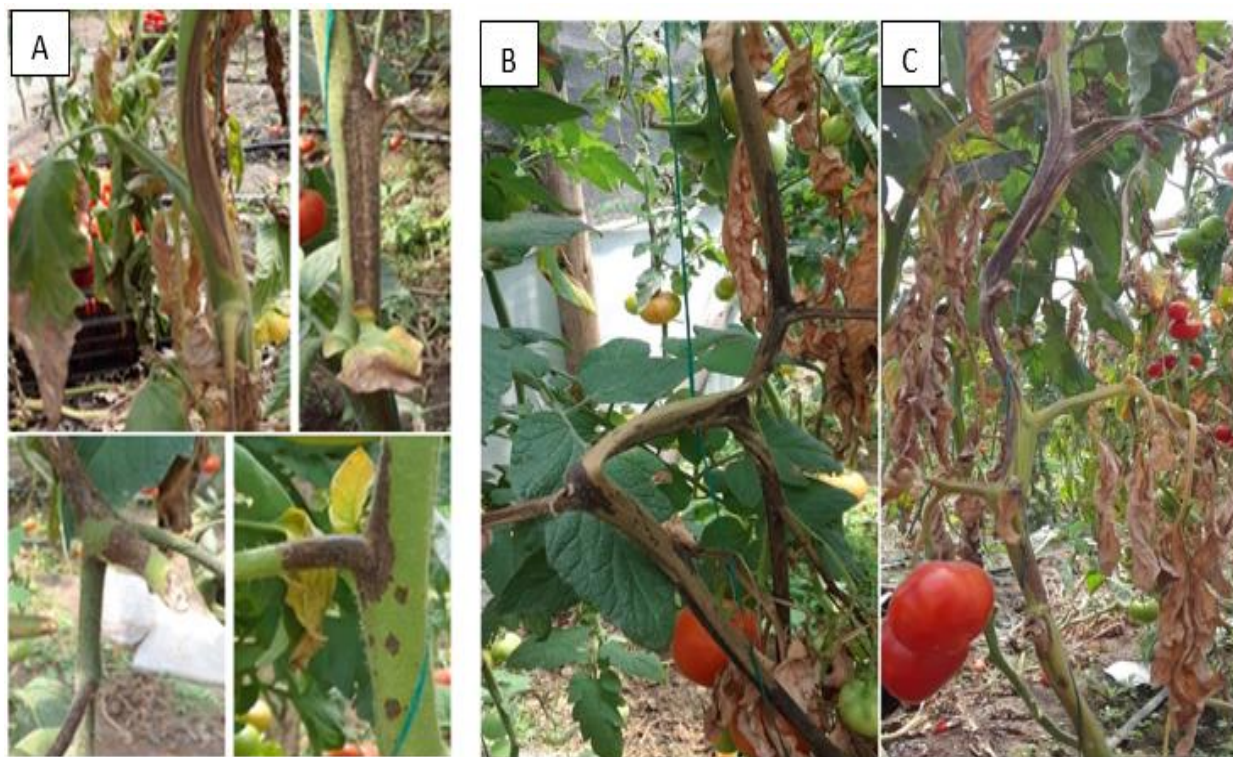
FIGURAS. -

Figura 1. Muestreo. Plantas de tomate riñón con sintomatología característica de la enfermedad. A) Manchas pardas y pudrición en ápices y tallos. B) Pudrición generalizada de la planta. C) Marchitamiento, clorosis y decaimiento generalizado.

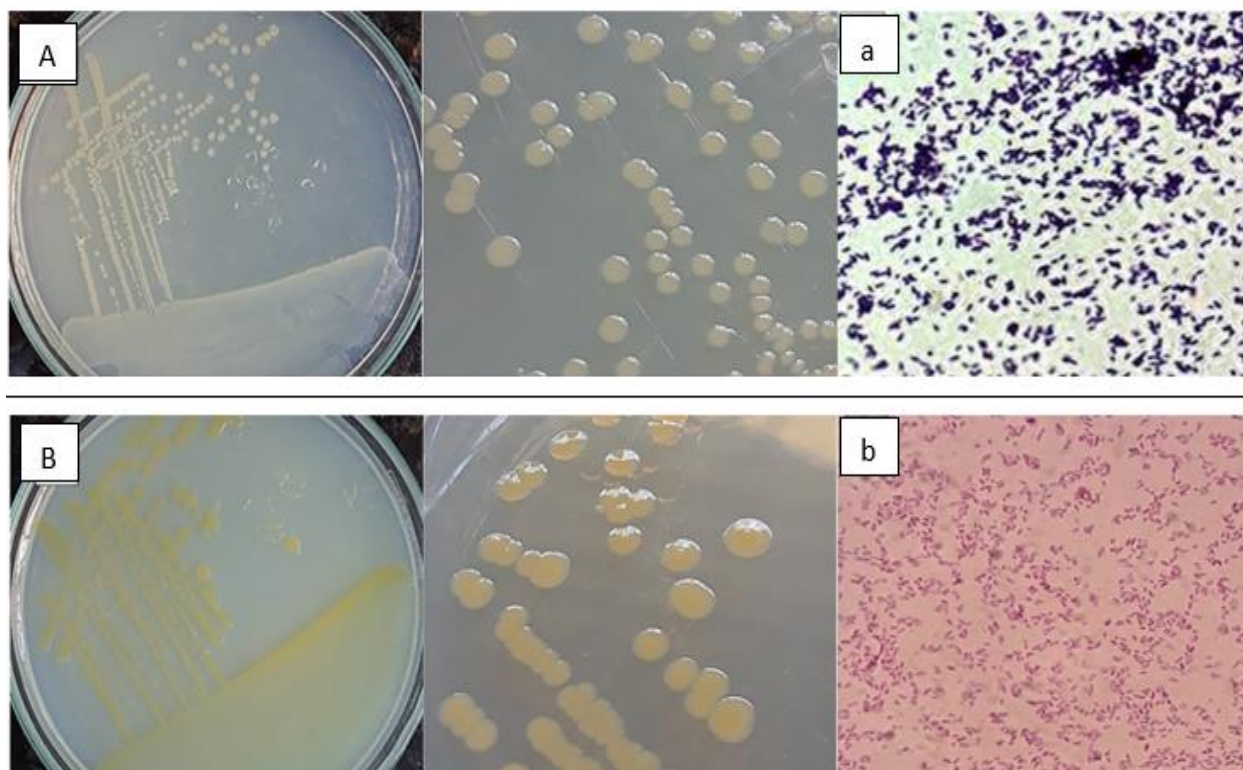


Figura 2. Morfología macroscópica de aislamientos bacterianos en AN a las 48 horas de crecimiento y reacción en la tinción diferencial de Gram (100X). A) *Curtobacterium flaccumfaciens*: color amarillo pálido, borde entero, circulares, convexas, brillantes, pequeñas translúcidas; a) Bacilos, irregulares, cortos, Gram positivos. B) *Pantoea agglomerans*: amarillo, borde entero, circulares, convexas, brillantes, pequeñas, translúcidas; b) Bacilos rectos, medianos, Gram negativos.

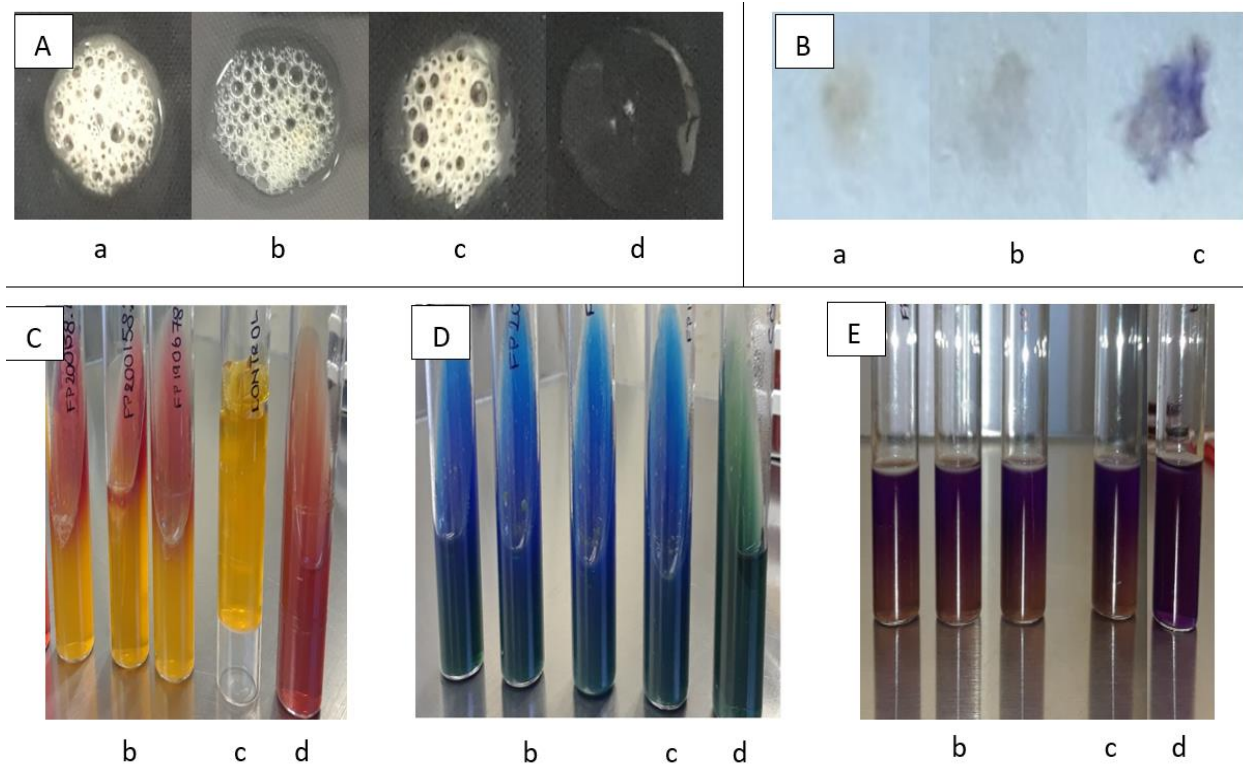


Figura 3. Reacciones bioquímicas. A) Catalasa. B) Oxidasa. C) TSI. D) Citrato. E) MIO. a) *Curtobacterium flaccumfaciens*. b) *Pantoea agglomerans*. c) Control positivo. d) Control negativo.

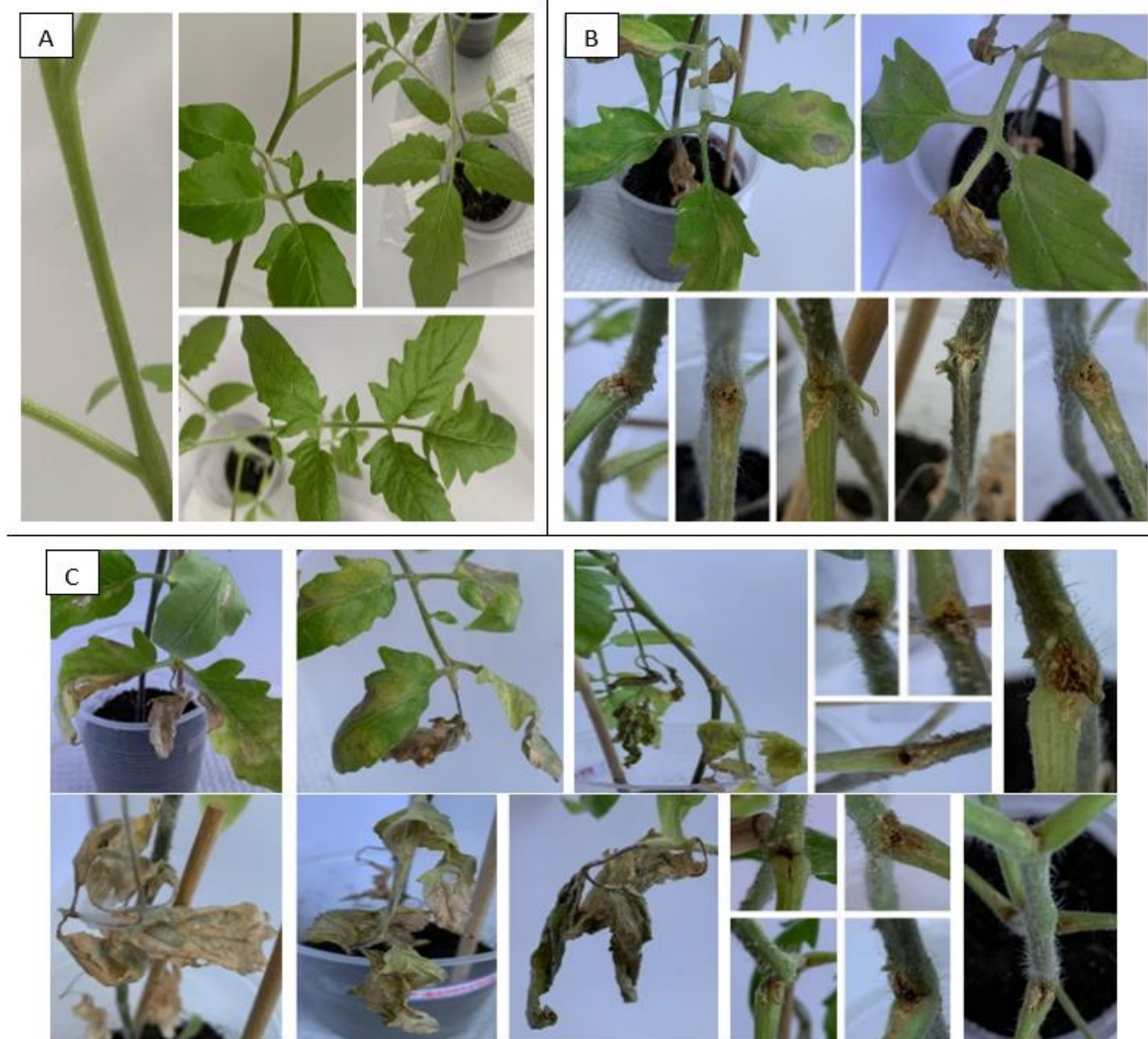


Figura 4. Sintomatología en tallo y hojas. A) Planta control. B) *Curtobacterium flaccumfaciens*. C) *Pantoea agglomerans*.

TABLAS. -

Tabla 1. Muestreo.

Ubicación	Coordenadas	Altitud (msnm)	Tejido vegetal	Número de muestras
Pichincha, Quito, Yaruquí	797302:9981905	2516	Hojas y tallos	15
Pichincha, Quito, Yaruquí	796539:9983258	2470	Hojas y tallos	15
Pichincha, Quito, Yaruquí	794565:9981493	2495	Hojas y tallos	15
Cotopaxi, Latacunga, Tanicuchí	760335:9908232	2918	Hojas y tallos	15

msnm: metros sobre el nivel del mar.

Tabla 2. Características morfológicas en AN y reacción a la tinción diferencial de Gram de 20 aislamientos procedentes de *Solanum lycopersicum*.

	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (2) *	<i>Pantoea agglomerans</i> (18) *
<i>Características</i>		
Tinción Gram	Bacilos cortos, irregulares, Gram (+)	Bacilos rectos, medianos, Gram (-)
Consistencia	Cremosa	Mucoide
Color	Crema- Amarillo pálido	Amarillo
Forma	Circular	Circular
Tamaño	Pequeña	Pequeña
Elevación	Convexa	Convexa
Margen	Entero-definido	Entero-definido

*Número de aislamientos; (+) Positivo, (-) Negativo.

Tabla 3. Características diferenciales entre los microorganismos Gram negativos correspondientes a los aislamientos bacterianos procedentes de *Solanum lycopersicum* frente a microorganismos de interés fitopatógico en tomate.

	<i>Pantoea agglomerans</i> (18)*	<i>Pantoea agglomerans</i> (Holt et al. 2000; Loch y Faisal 2007)	<i>Erwinia spp.</i> (Gavini et al. 1989; Islam et al .2014)	<i>Pectobacterium carotovorum</i> (Gardan et al. 2003; Rafiei et al. 2015; Dadaşoğlu y Kotan 2017; Silva et al. 2020)	<i>Ralstonia solanacearum</i> (Rahman 2013; Seleim et al. 2014; Torres et al. 2014)	<i>Xanthomonas campestris</i> (Quiroz et al. 2011; Soudi et al. 2011; Narvekar et al. 2019; Ogolla y Neema 2019)	<i>Pseudomonas syringae</i> (Ivanović et al. 2017; López 2018)
<i>Características</i>							
Crecimiento en medio común (AN)	+	+	+	+	+	+	+
Coloración en AN	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C
Oxidasa	-	-	-	-	+	-	-/+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Movilidad	+	+	+/-	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-	+	-
Ornitina decarboxilasa	-	-	-	NR	NR	NR	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+
TSI	K/A, gas -, H ₂ S -	K/A, gas -, H ₂ S -	K/A-A/A, gas +/-, H ₂ S -	A/A, gas +, H ₂ S -	NR	K/A, gas+, H ₂ S+	K/K, gas -, H ₂ S -

*Número de aislamientos; (+) Positivo, (-) Negativo, (+/-) Intermedio; NR: No referencia; A: Coloración amarilla. C: Coloración crema.

Tabla 4. Caracterización por el sistema semiautomatizado de identificación MicroStation™ de Biolog.

Codificación	Biolog	PROB	SIM	Tipo de organismo
FP-20-0158	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	0.726	0.726	Bacilo GP
FP-20-0158.1	<i>Clavibacter michiganensis</i>	0.697	0.697	Bacilo GP
FP-20-0158.1.1	<i>Leifsonia poae</i>	0.638	0.638	Bacilo GP
FP-20-0158.2	<i>Pantoea agglomerans</i>	0.805	0.597	Bacilo GN
FP-20-0160	<i>Pantoea agglomerans</i>	0.863	0.621	Bacilo GN
FP-20-0161	<i>Enterobacter amnigenus</i>	0.569	0.569	Bacilo GN
FP-200162	No identificado	-	-	-
FP-200163	No identificado	-	-	-
FP-20-0164	<i>Pantoea agglomerans</i>	0.682	0.682	Bacilo GN
FP-19-0729	<i>Pantoea agglomerans</i>	0.810	0.582	Bacilo GN

FP: Códigos de aislados obtenidos en el laboratorio de Fitopatología-Agrocalidad; PROB: Probabilidad de identificación. SIM: Similitud entre géneros 0.0-0.9 siendo 0.9 la más alta; GP: Gram positivo, GN: Gram negativo.

Tabla 5. Identificación molecular de cepas obtenidas.

Codificación Agrocalidad	Identificación	Código de accesoión	Identidad
FP-20-0158	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	NZ_APJN01000083.1	100 %
FP-20-0158.1	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	NZ_APJN01000083.1	100 %
FP-20-0158.2	<i>Pantoea agglomerans</i>	MH997441.1	95.64 %
FP-20-0160	<i>Pantoea agglomerans</i>	MG733950.1	95.47 %
FP-20-0164	<i>Pantoea agglomerans</i>	NZ_CP046722.1	95.49 %
FP-19-0729	<i>Pantoea agglomerans</i>	-	99.5 %