

Uso de sensores infrarrojos para la detección temprana de
Ralstonia solanacearum en plantas de tomate.

Rubén Alfonso Calderón Cerdas

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AGRÓNOMO CON EL GRADO DE LICENCIATURA EN AGRONOMÍA

Escuela de Agronomía
Facultad de Ciencias Agroalimentarias
Universidad de Costa Rica

2013

ACTA DE APROBACIÓN

Uso de sensores infrarrojos para la detección temprana de *Ralstonia solanacearum* en plantas de tomate.


Rubén Alfonso Calderón Cerdas

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGRÓNOMO
CON EL GRADO DE LICENCIATURA EN AGRONOMÍA



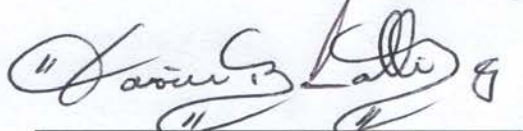
Oscar Castro Zúñiga, M. Sc.

DIRECTOR DE TESIS.



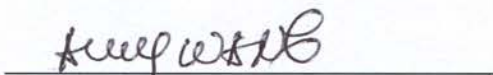
Luis Felipe Arauz Cavallini, Ph. D.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



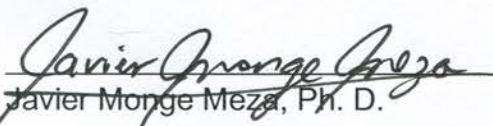
Javier Bonatti González. Dr. Rer. Nat.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



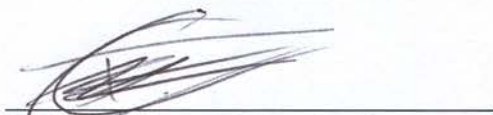
Amy Wang Wong, M. Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Javier Monge Meza, Ph. D.

DIRECTOR DE ESCUELA



Rubén Alfonso Calderón Cerdas

SUSTENTANTE.

2013

DEDICATORIA

A mi madre Irene Cerdas por toda la dedicación incondicional, amor y sacrificio brindado durante todos los años de mi vida.

A mi padre Luis Calderón, quien responsablemente proveyó para que nunca me faltase nada, admiro su espíritu de superación y su abnegación al trabajar.

A un gran amigo y abuelo, el señor Beto Zurdo, cuyo nombre honro con orgullo, quien además de ser un padre, fue un mentor. Fue un hombre sabio e inteligente como ninguno, de él mi afinidad a la tierra.

A mi segunda madre y abuela, Celia Brenes, me enseñó la humildad, la honradez, y le agradezco el tiempo, esfuerzo y sacrificio que tuvo para mí.

A mis hermanos Decia, Silvia y Sebastián; a mis primos hermanos Santi, Gugi, Fabi y Sergio quienes de alguna u otra manera estuvieron ahí cuando se les necesitaba.

A mis amigos y amigas.

A mis tíos y tías

Y finalmente a mis sobrinos Ivanna y Mariano quienes dan a mi vida una luz que brilla más que el sol.

AGRADECIMIENTOS

Un profundo agradecimiento a *mis padres*, ellos siempre me brindaron su máximo apoyo y comprensión, se esforzaron por brindarme las mejores condiciones para que estudiara.

A mi director de tesis el Ingeniero *M. Sc. Oscar Castro Zúñiga*, quien creyó en la propuesta y me brindó su todo su apoyo, dirigiendo acertadamente la investigación. Agradezco sus enseñanzas, sus consejos, su amistad y permitirme crecer profesionalmente a su lado.

A mis compañeros de estudio *kimberly Mora, Nadiezda Serrano, Natalia Vargas, Alejandro Ureña, Alejandro Morales, Claudio Vargas, José González y Mauricio Cornejo*, por la amistad brindada durante varios años y por esas largas noches de estudio. Además las recomendaciones de algunos fueron vitales en la preparación de este trabajo.

A la señora *M. Sc. Amy Wang Wong* por su amistad, valiosos aportes y sugerencias.

Al *Dr Luis Felipe Arauz* quien creyó en la propuesta de trabajo, orientándome desde el principio y haciéndola realidad. Agradezco su amistad y sus consejos tan acertados.

Al *Dr. Javier Bonnati* por el aporte imprescindible de conocimientos, su gran disposición y colaboración brindada.

Al ingeniero *Carlos Ramírez* quien aportó, sin dudarle ni un segundo, su experiencia y conocimiento en la captura de imágenes infrarrojas.

A la señora *M. Sc. Lidieth Uribe* por sus asesoría en la parte de aislamiento, conservación e inoculación en bacterias. Tampoco, dudó ni un segundo en brindar su ayuda y conocimiento.

Al *Dr. Paul Esker* quien resolvió, de manera sencilla algunos retos metodológicos del trabajo, él también aportó su experiencia sin dudar.

A la señorita Tatiana Arguedas quien guió las labores microbiológicas y bioquímicas del aislamiento y clasificación de las bacterias.

A la *Doctora Mónica Blanco Meneses*, por su apoyo en la parte de clasificación molecular y las implicaciones fisiológicas pos-inoculación.

Al *Doctor Marco Vinicio Gutiérrez* por su incondicional apoyo y su aporte en temas fisiológicos. Agradezco sus enseñanzas y permitirme crecer profesionalmente a su lado.

En general al departamento de Fitopatología, la Ing. Vanesa Vargas, a *M. Sc. Milagro Granados*, y la Lic. Andrea Quesada.

TABLA DE CONTENIDOS

PORTADA	i
ACTA DE APROBACIÓN	ii
DIDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
TABLA DE CONTENIDOS	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE CUADROS.....	xii
LISTA DE ANEXOS	xii
RESUMEN	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Patógeno: <i>Ralstonia solanacearum</i>	2
1.2 Manejo de la enfermedad	4
1.2.1 Uso de variedades tolerantes	4
1.2.2 Aplicación de inductores de resistencia.....	4
1.2.3 Rotación de cultivos	4
1.2.4 Descarte de plantas marchitas	5

TABLA DE CONTENIDOS

1.2.5 Uso de agroquímicos para el combate de la enfermedad.....	5
1.2.6 Desinfección de herramientas, equipo y maquinaria.....	5
II. OBJETIVOS	6
2.1 General	6
2.2 Específicos	6
III. CAPITULO I. AISLAMIENTO E INOCULACION DE LA BACTERIA	
3.1 Introducción	7
3.2 Materiales y método	8
3.2.1 Aislamiento y purificación de la bacteria	8
3.2.2 Selección del método de inoculación	10
3.2.2.1 Corte de raíces	10
3.2.2.2 Infiltración al tallo	11
3.2.3 Selección de la hoja a muestrear.....	11
3.2.3.1 Temperatura de las distintas hojas de la planta.....	12
3.2.3.2 Conductividad estomática de las distintas hojas.....	12
3.3 Resultados y discusión	13
3.3.1 Identificación de la bacteria	13
3.3.2 Selección del método de inoculación	14
3.3.2.1 Corte de raíces	14
3.3.2.2 Inyección del tallo	15
3.3.3 Hoja a muestrear	16
3.3.3.1 Temperatura.....	16
3.3.3.2 Transpiración: conductividad estomática.....	17

TABLA DE CONTENIDOS

IV. CAPITULO II. IMPLEMENTACIÓN DE LA TECNOLOGÍA INFRAROJA

4.1	Introducción.....	19
4.1.1	Tecnología infrarroja	19
4.1.2	Primeros usos de la tecnología en la agricultura.....	20
4.1.3	Uso en la detección temprana de enfermedades	20
4.2	Materiales y métodos	21
4.2.1	Material vegetal	21
4.2.2	Manejo del cultivo	22
4.2.3	Diseño experimental	23
4.2.4	Medición de la temperatura foliar de las plantas	24
4.2.4.1	Termómetro infrarrojo	24
4.2.4.2	Cámara infrarroja	25
4.2.5	Análisis estadístico	26
4.2.5.1	Entre tratamientos	26
4.2.5.2	Comparación entre los dos equipos utilizados	27
4.3	Resultados y discusión.....	27
4.3.1	Porcentaje de plantas que se enfermaron	27
4.3.2	Comportamiento térmico de las plantas.....	28
4.3.2.1	Primera repetición: días cálidos	28
4.3.2.2	Segunda repetición: días fríos	30
4.3.3	Comparación entre los dos equipos utilizados	32

TABLA DE CONTENIDOS

V. DISCUSIÓN GENERAL.....	34
VI. CONCLUSIONES	36
VII. RECOMENDACIONES	36
VIII. LITERATURA CITADA	37
IX. ANEXOS	44

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I.

Figura 1. Patrón 0,5 McFarlan.	10
Figura 2. Escala pictórica de cuatro estados de marchitez de plantas de tomate enfermas con la marchitez bacterial. El estado 0: corresponde a una planta sana, 1: levemente marchita, 2: planta moderadamente marchita y 3: planta con síntomas severos de marchitez.	11
Figura 3. Planta de tomate para la medición de la conductividad estomática y la temperatura. Se muestran las cuatro hojas evaluadas.	12
Figura 4. Detección de ADN, resultado de la prueba molecular. Línea 1, 2 y 3: aislamientos bacteriales de distintas plantas de tomate. Líneas Esc: marcadores de peso molecular. Además se muestra el control positivo (+) y el control negativo (-).	13

Figura 5.	Progreso en la aparición de los síntomas de marchitez bacterial posterior a la inoculación de las plantas mediante el corte de raíces. Línea sólida: corte de raíz + inóculo. La línea punteada es el testigo.	14
Figura 6.	Progreso en la aparición de marchitez bacterial, posterior a la inoculación mediante la inyección al tallo. Línea solida: inyección con inóculo. Línea punteada: testigo (inyección con agua destilada).	15
Figura 7.	Imagen de una planta de tomate capturada mediante una imagen digital y una imagen térmica.	16
Figura 8.	Ciclo diurno de la temperatura de distintas hojas de tomate.	17
Figura 9.	Conductividad estomática de distintas hojas de una planta de tomate.	18
 CAPITULO II		
Figura 10.	Área de evaluación de dos plantas en un sistema pareado, una de ellas fue inoculada, mientras que la otra está sana.	23
Figura 11.	Distribución espacial de las plantas de tomate, se muestra la distancia entre pares y entre hileras.	24
Figura 12.	Manera de medir la temperatura con el termómetro infrarrojo	25
Figura 13.	Capacidad de la cámara infrarroja de medir la temperatura de un área específica, en este caso un punto y un círculo de 1 cm de diámetro.	26

Figura 14.	Diferencias en la temperatura foliar de plantas infectadas con <i>R. solanacearum</i> , durante los seis días posteriores a la inoculación.	29
Figura 15.	Diferencias en la temperatura foliar de plantas infectadas con <i>R. solanacearum</i> , durante los nueve días posteriores a la inoculación.	31
Figura 16.	Plantas de tomate, a: sana y b: planta inoculada con <i>R. solanacearum</i> al 6 DPI. La primera imagen corresponde a imágenes digitales, mientras que la segunda imagen es térmica.	32
Figura 17.	Regresión entre la temperatura medida con la cámara térmica y el termómetro infrarrojo (R=0,921)	33

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Diferencia de temperatura entre plantas sanas e infectadas durante las dos repeticiones en el tiempo.	28
------------------	---	-----------

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Preparación del medio de cultivo MacConkey agar	44
Anexo 2.	Tinción de Gram	44
Anexo 3.	Preparación del medio de cultivo Agar Tetrazolium (TZC)	45
Anexo 4.	Plan de fertilización	46
Anexo 5.	Aplicaciones fitosanitarias realizadas	47

Anexo 6.	Análisis estadístico de la primera repetición	48
Anexo 7.	Análisis estadístico de la segunda repetición	49
Anexo 8.	Análisis estadístico: regresión	50

RESUMEN

Con el fin de analizar una técnica para la detección temprana de la marchitez bacterial, provocada por *Ralstonia solanacearum*, se evaluó su efecto sobre la temperatura foliar de plantas de tomate inoculadas con el patógeno. Dichas plantas fueron tratadas con una suspensión bacterial de 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC), y su temperatura fue medida utilizando dos sensores infrarrojos, un termómetro de luz infrarroja de bajo costo, y una cámara térmica. La prueba contó con dos repeticiones en el tiempo; durante la primera repetición, la incidencia fue del 62%, y se encontró que los primeros cuatro días después de la inoculación (DPI), la temperatura entre plantas sanas y enfermas no varió, sin embargo, a partir del quinto día la temperatura de las plantas inoculadas fue 0,9 °C mayor que las plantas sanas, siendo esto, estadísticamente significativo, ya para el sexto día la diferencia aumentó a 1,9 °C. En la segunda repetición, que coincidió con condiciones de tiempo más frías, la incidencia de la enfermedad fue de un 38% y tardó 10 días en expresar la aparición de los síntomas. La diferencia entre tratamientos se halló a partir del séptimo DPI. Esta metodología permitió reconocer diferencias de temperatura con un 30% de antelación a la aparición de los síntomas, lo que permite tomar decisiones de manejo y de combate de la enfermedad.

I. INTRODUCCIÓN

El tomate es la hortaliza de mayor consumo en Costa Rica, según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (2011), Costa Rica produjo en el 2011 cerca de 61 560 toneladas métricas de fruto fresco, las cuales fueron consumidas, en su mayoría a lo interno de la población. En cuanto al área, en el mismo año se sembraron 1 026 hectáreas y el 60,9% se ubicó en la provincia de Alajuela y un 13% en Cartago (Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), 2009).

El tomate producido se consume mayoritariamente como fruto fresco, mientras que otra parte es procesada como salsa. También se exportan tomates tipo uva, cherries y variedades de fruto ovalado, siendo los Estados Unidos el principal mercado, lo que significó para el 2010 \$1,8 millones (Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica (PROCOMER), 2011).

Por lo general, en la producción a campo abierto se utilizan microtúneles de plástico transparente, que evita que la planta se moje. El rendimiento bajo este sistema ronda las 40 tm/ha, mientras que en ambientes protegidos se ha superado las 200 tm/ha. Por otra parte, esta actividad mantiene cerca de 5 000 empleos directos y más de 20 000 indirectos, generando 3 000 millones de colones al año (López 2009).

Algunos factores bióticos, entre ellos los patógenos, limitan severamente el rendimiento de los cultivos (Agrios 2005). El porcentaje de pérdida depende de algunos factores como la agresividad del patógeno, las condiciones climáticas, cualquier tipo de estrés que debilite la plantación, entre otros (Strange y Scott 2005). La lista de enfermedades del tomate es encabezada por la marchitez bacteriana o mayra de las solanáceas, causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum*, enfermedad que resulta difícil de combatir.

1.1 Patógeno: *Ralstonia solanacearum*.

R. solanacearum E. F. Smith, conocida anteriormente como *Pseudomonas solanacearum*, es una bacteria bacillus *Gram negativo* y aeróbica obligada (Schell 2000; Jones 2001) que afecta cientos de especies vegetales, entre ellas al tomate, el chile, la papa, el tabaco y el banano (Hayward 2000). Dentro de la especie *solanacearum*, existe una variedad de razas y biovares, las cuales son específicas a un cultivo. Dicha clasificación depende del potencial que tiene cada una para oxidar azúcares y polisacáridos, siendo la raza 3 biovar 2 la que afecta los cultivares de tomate (Álvarez *et al.* 2008b).

Esta bacteria es habitante del suelo e ingresa a la planta a través de las heridas naturales que ocurren durante la emergencia de las raíces, de los pelos radicales, a través de las lenticelas, o cualquier daño mecánico (Hernández *et al.* 2005), así como a través de las heridas provocadas por nematodos (Singh y Siddiqui 2011).

Luego de ingresar a la planta, la bacteria coloniza el xilema, donde se reproduce hasta obstruirlo, alcanzando poblaciones de hasta 10^{10} UFC por cada centímetro de tallo (Von Bodman *et al.* 2003). Después de alojarse en el xilema, la bacteria invade el floema y el parénquima del córtex (Jones 2001). A pesar de ser una bacteria flagelada, su propia movilidad dentro de la planta es limitada (Tans-Kersten *et al.* 2001).

En cuanto a la sintomatología, se asocia la marchitez como el principal síntoma; sin embargo, se puede presentar clorosis foliar y la necrosis de los haces vasculares. Inicialmente, las hojas jóvenes, al estar expuestas al sol, se marchitan (Champoiseau y Jones 2009); horas o días después el síntoma se generaliza a toda la planta debido a una pérdida en la conductividad hidráulica (Chávez *et al.* 2012). Según Cook y Sequeira (1994). La incidencia en plantaciones de tomate puede alcanzar un 75%.

Al igual que otras enfermedades bacteriales, la distribución en campo de *R. solanacearum* suele presentarse en parches. En el suelo, la bacteria tiene poca movilidad, la cual depende de la salpicadura y de la esorrentía del agua llovida (Tans-Kersten *et al.* 2001). El suelo juega un rol importante en la infección de las plantas, pues provee las condiciones ambientales para que ocurra la interacción planta-patógeno (Arauz 2011), pues la patogénesis es un proceso complejo donde interactúan el ambiente y la fisiología de la planta (Genin y Denny 2012). El aumento de la cantidad de materia orgánica, la textura y la microfauna del suelo, puede impedir, en algunos casos, que ocurra la infección (Uribe 2012, comunicación personal)¹.

Fortnum y Kluepfel (2005) mostraron que una reducción considerable en la producción de tabaco fue provocada por la infección de *R. solanacearum*. Dicha disminución pasó en 17 años de 0,2 a 7,2 %; estos autores también encontraron que la remoción de las flores, práctica común en el manejo de ese cultivo, dispersa la bacteria. Un 47% de las plantas resultaron infectadas cuando las flores fueron separadas manualmente, mientras que al realizar la corta mecanizada un 78% de las plantas fueron contaminadas. Lo anterior ocurrió porque las cuchillas transmitieron más eficientemente la enfermedad. También, se debe tener en cuenta que la aparición de los síntomas ocurre hasta quince días después de iniciar la infección, tiempo en que la transmisión del inóculo secundario pasa desapercibida.

Normalmente, las plantas enfermas son diagnosticadas cuando la infección es avanzada, intervalo de tiempo que permite a la bacteria su diseminación (Swanson *et al.* 2005). La invasión pareciera irreversible y una vez que aparecen los síntomas, el manejo cultural y las aplicaciones fitosanitarias resultan ineficaces. Por dicha razón, *R. solanacearum* es considerada una bacteria de alta nocividad que causa un importante impacto económico a nivel global (Elphinstone

(1) Ph. D. Lidieth Uribe. Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA). Universidad de Costa Rica.

2005). Debido a lo anterior, la detección temprana constituye una herramienta valiosa que permitiría realizar un manejo fitosanitario oportuno, evitando la propagación del patógeno.

1.2 Manejo de la enfermedad.

1.2.1 Uso de variedades tolerantes.

Sin duda alguna, el uso de variedades con resistencia genética es el mecanismo más eficaz y económico para el manejo de la enfermedad. La tolerancia a *R. solanacearum* es de carácter poligénico (Thoquet *et al.* 1996) lo que representa un reto al tratar de fijar los genes. Actualmente, la selección de líneas tolerantes ha logrado disminuir la incidencia a menos de un 15%, aun cuando sean sembradas en campos altamente infestados (Echandi 2012, comunicación personal)².

1.2.2 Aplicación de inductores de resistencia.

Pradhanang *et al.* (2005) encontraron que el azibenzolar, un inductor de la Respuesta Sistémica Inducida (RSI), disminuye la incidencia de la enfermedad cuando es aplicado a las plantas, ya sea en drench o por aspersión foliar. Así mismo, recomienda complementar esto con variedades tolerantes, pues en trabajos realizados encontraron que al combinar ambas estrategias, se puede lograr hasta un 99% de plantas libres de la enfermedad.

1.2.3 Rotación de cultivos.

Esta práctica cultural ha resultado efectiva para el combate de la marchitez bacteriana causada por *R. solanacearum* (Lemaga *et al.* 2001). En este caso se debe considerar la persistencia del inóculo en campo que podría extenderse hasta por dos años, dependiendo de las condiciones y la presencia de especies hospederas (Granada y Sequeira 1983).

(2) M. Sc. Carlos Echandi. Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno (EEAFBM). Universidad de Costa Rica.

Álvarez *et al.* (2008a) informan que la alfalfa, la cebada, el rábano, la zanahoria, el culantro, los guisantes, y el zucchini son cultivos no hospederos de *R. solanacearum*. El maíz no es hospedero, pero funciona como reservorio de la bacteria. Se debe evitar la rotación con cultivos de la familia Solanaceae como el chile y la papa. Otro punto importante es el combate de arvenses, pues la bacteria logra persistir en ellas y de allí pasar al cultivo (Jones 2001).

1.2.4 Descarte de plantas marchitas.

Tan pronto se descubran plantas marchitas, estas se deben descartar de la parcela y llevarlas lejos del campo de cultivo, evitando depositarlos cerca de los reservorios acuíferos, pues el agua de riego es una de las principales fuentes del inóculo (van Elsas *et al.* 2001). Lo anterior, es una práctica común entre los productores, sin embargo, la efectividad resulta parcialmente satisfactoria y se limita a lotes con baja incidencia de *R. solanacearum* (Priou *et al.* s f)

1.2.5 Uso de agroquímicos para el combate de la enfermedad.

Cuando la planta presenta síntomas, es difícil revertir la condición y el uso de agroquímicos resulta poco efectivo, siendo la aplicación preventiva de bactericidas sistémicos la mejor estrategia a la hora de utilizar agroquímicos.

La aparición de la marchitez se debe a la obstrucción vascular (Jones 2001), y por esto los productos bactericidas sistémicos ven limitada su movilidad dentro de la planta y no pueden llegar hasta el sitio de infección.

1.2.6 Desinfección de herramientas, equipo y maquinaria.

Es común que las enfermedades sean acarreadas desde un lote infestado a través de terrones y porciones de suelo que llegan adheridos a la maquinaria (French 1995) y por ello, es preciso que los tractores e implementos de labranza lleguen debidamente lavados. Por su parte, al realizar labores como la deshija, se debe evitar el uso de herramientas, utilizando preferiblemente las manos (Fortnum y Kluepfel 2005).

II. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Detectar si existen cambios de temperatura entre plantas sanas e infectadas por *R. solanacearum*, mediante el uso de dos distintos sensores infrarrojos; esto con el fin de ser utilizados como una herramienta de detección temprana de la marchitez bacterial en el cultivo de tomate.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar una metodología de inoculación de *R. solanacearum* en plantas de tomate que se asemeje a la patogénesis de la enfermedad en el campo.
- Detectar cambios en la temperatura entre tejido foliar sano e inoculado durante la fase asintomática de la patogénesis de *R. solanacearum*.
- Comparar la medición de temperatura de dos equipos infrarrojos utilizados en la detección de cambios de temperatura de las plantas infectadas con *R. solanacearum*.

III. CAPITULO I. Aislamiento e inoculación de la bacteria

3.1 Introducción

El aislamiento de las bacterias es un proceso complejo, que comprende desde la recolección de plantas presuntamente afectadas, hasta la obtención de un caldo puro de bacterias patogénicas, pasando por la purificación, pruebas bioquímicas y la identificación molecular (Zourob *et al.* 2008).

A partir del tejido vegetal proveniente de campo, se logran aislar múltiples bacterias, muchas de ellas resultan saprófitas, no patogénicas (Schaad *et al.* 2001). El medio de cultivo con tetrazolium (TZC) es selectivo al género *Ralstonia* y permite discriminar otras bacterias, inclusive es posible separar cepas de *Ralstonia* patogénica de las no patogénica, esto, dependiendo del tipo de crecimiento sobre el medio de cultivo, siendo el crecimiento circular, elevado, con bordes blancos y rojiza hacia el centro y lechoso no patogénico. Además, existen pruebas bioquímicas que permiten clasificar taxonómicamente las bacterias, basándose en el consumo de oxígeno, tolerancia a medios salinos, presencia de oxidasa, catalasa, reducción de nitritos, la no producción de almidón, entre otras (Stall 2001).

Por su parte, las pruebas moleculares son una herramienta más en la identificación, y se basa en la replicación de una secuencia de bases del ADN, el cual es específico para cada especie.

En cuanto a los métodos de inoculación, existen múltiples técnicas de inoculación tales como la infiltración de tallos, de hojas, inyecciones, superposición de tejido enfermo, inoculación mecánica, infestación del suelo y de semillas, entre otras (Mehrotra y Aggarwal 2003). Cartín (1995), quien estudió la susceptibilidad de diferentes genotipos tolerantes a *R. solanacearum*, inoculó las plantas por medio del corte de raíces, seguida por la aplicación de una suspensión bacteriana.

Tans-Kersten *et al.* (2001) describen metodologías menos invasivas como la inyección de una pequeña cantidad de suspensión bacteriana en el primer peciolo

de la planta. Por su parte, Kishun y Chand (1990) obtuvieron la mayor incidencia de marchitez bacterial cuando infiltraron la suspensión dentro de la axila de la cuarta hoja verdadera de la planta, cuantificando al cuarto día un 66% de plantas mayadas. En dicho trabajo se utilizó una concentración bacterial de 1×10^5 UFC.

Un aspecto a considerar cuando se establece el método de inoculación es la movilidad del patógeno dentro de la planta. En el caso de *R. solanacearum*, a pesar de tener flagelos, es prácticamente inmóvil, transportándose por el acarreo del flujo xilemático (Tans-Kersten *et al.* 2001).

Anteriormente, las concentraciones bacteriales se ajustaban con ayuda de patrones McFarland, que consiste en equiparar la suspensión bacterial con una solución de una turbidez determinada, la cual es proporcional a una concentración de bacterias. La turbidez de la solución se logra al mezclar distintas concentraciones de cloruro de bario y ácido sulfúrico. Hoy en día, el espectrofotómetro, instrumento de la química analítica, permite calcular la turbidez de una suspensión y por tanto la concentración, de forma más precisa y rápida (Aneja 2003).

El objetivo de este capítulo fue establecer el método de inoculación más conveniente y consistente, que logre simular la incidencia y duración de aparición de los síntomas. Además, establecer la hoja más sensible a los cambios en la temperatura que sirviera para ser evaluada.

3.2 Materiales y métodos.

3.2.1 Aislamiento y purificación de la bacteria.

El proceso de aislamiento e identificación de la bacteria siguieron los postulados de Koch, los cuales permiten, no solo identificar al patógeno, sino también conocer la virulencia del patógeno; para ello se deben seguir los siguientes pasos.

1. Identificar la asociación recurrente entre un microorganismo y la enfermedad.

2. Aislar el organismo en un cultivo puro.
3. Inocular el posible patógeno a un hospedero completamente sano, y que se reproduzcan los síntomas.
4. Re aislar el microorganismo.

La etapa de aislamiento se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas, el Laboratorio de Fitopatología y el Laboratorio de Técnicas Moleculares; todos ellos de la Universidad de Costa Rica.

La cepa de *R. solanacearum* fue aislada a partir de plantas de tomate que presentaban los síntomas característicos de la enfermedad. Dichas plantas fueron colectadas en una finca productora ubicada en la provincia de Cartago. En el laboratorio, se cortaron pequeños trozos de tejido xilemático, que fueron colocados en medio de cultivo Mc Conkey (medio selectivo para bacterias Gram negativas).

La purificación del patógeno consistió en ir seleccionando aquellas colonias que resultaran positivas en las pruebas bioquímicas, hasta obtener un cultivo limpio. Finalmente, la identidad de la bacteria se confirmó por medio de una prueba de PCR (polymerase chain reaction).

Posterior a esta preselección, las bacterias fueron transferidas al medio de cultivo TZC preparado según French *et al.* (1995), el cual contiene tetrazolium (selectivo para *R. solanacearum*). Todas las incubaciones se realizaron a 32°C.

Además, se realizaron pruebas de catalasa y oxidasa, tomando una pequeña muestra de bacterias y colocándolas sobre el papel indicador, el cual vira a morado si posee actividad oxidativa. Posteriormente, las bacterias fueron colocadas dentro de una gota de peróxido de hidrógeno para evidenciar, por medio de un burbujeo, si contienen catalasa.

Finalmente, se realizaron pruebas moleculares en el Laboratorio de Técnicas Moleculares del Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos (CIPROC) con un cebador específico para *Ralstonia* sp. El caldo bacterial fue almacenado a -86° dentro de crioviales con solución nutritiva y glicerol.

3.2.2 Selección del método de inoculación

Se probaron dos métodos distintos de inoculación como lo es el corte de raíces y la infiltración al tallo. En ambos casos, se utilizó una suspensión bacterial de 1×10^8 UFC/mL, la cual se ajustó con un espectrofotómetro calibrado a 625 nm, obteniendo una absorbancia de 1,09 (valor aceptado para un patrón Mc Farlan 0,5).

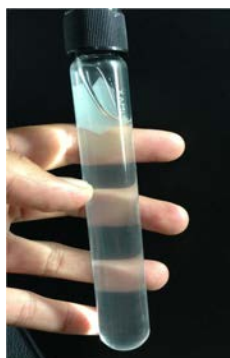


Figura 1. Patrón 0,5 McFarlan

Las plantas fueron trasplantadas a partir de un almácigo y sembradas en macetas con una capacidad de 1,5 L y rellenas con suelo desinfectado mediante caldera a 80°C por 24 horas. Al momento de la inoculación, las plantas se encontraban en la etapa fenológica de prefloración, que en este caso ocurrió a los 28 días después de haber sido trasplantadas.

3.2.2.1 Corte de raíces.

Para el primer método, se cortaron las raíces insertando la hoja de un bisturí alrededor del tallo de la planta, circunscribiendo un círculo de 2,5 cm de

diámetro (Cartín 1995), posteriormente se agregó al suelo 30 mL de la suspensión bacteriana. El daño proporcionó un lugar para el ingreso de las bacterias.

Se evaluó el grado de marchitez durante los seis días posteriores a la inoculación, utilizando para ello una escala pictórica (Figura 2), donde el 0 corresponde a una planta sana, 1 y 2 a una marchitez leve y 3 a una marchitez marcada.

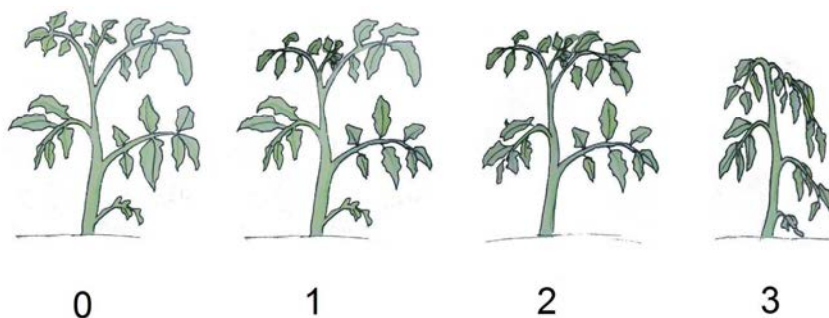


Figura 2. Escala pictórica de cuatro estados de marchitez de plantas de tomate enfermas con la marchitez bacteriana. El estado 0: corresponde a una planta sana, 1: levemente marchita, 2: planta moderadamente marchita y 3: planta con síntomas severos de marchitez.

3.2.2.2 Infiltración al tallo.

El segundo método de inoculación consistió en inyectar la suspensión bacteriana en el tallo, cerca de la axila de la primera hoja verdadera. Dicha infiltración se realizó con una aguja hipodérmica de 0,4 mm de diámetro, realizando tres pinchazos, inyectando en total por planta 0,2 mL de la suspensión.

De igual manera, se evaluó el grado de marchitez durante los seis días posteriores a la inoculación y se utilizó la misma escala pictórica descrita anteriormente (Figura 2).

3.2.3 Selección de la hoja a muestrear.

Se realizaron mediciones continuas de la conductividad estomática y de la temperatura foliar de cuatro hojas distintas de una misma planta de tomate, se

realizaron cuatro repeticiones de estas mediciones. La primera hoja muestreada (a) corresponde a la hoja más joven completamente expandida, la segunda hoja (b) es la hoja consecuente con la hoja a. C está inmediatamente por debajo de la b, mientras que d es la hoja bajera.



Figura 3. Planta de tomate para la medición de la conductividad estomática y la temperatura. Se muestran las cuatro hojas evaluadas.

3.2.3.1 Temperatura de las distintas hojas de la planta

En cuanto a la medición de la temperatura foliar, se colocaron termopares en la cara abaxial de las cuatro distintas hojas, dichos sensores fueron programados para medir durante tres días, realizando una lectura cada cinco minutos. Los termopares se colocaron de tal forma que solo tocaran la hoja.

3.2.3.2 Conductividad estomática de las distintas hojas.

Por su parte, el comportamiento de la conductividad estomática en plantas de tomate está bien documentado, siendo la hoja madura más joven, la que cuenta con las mayores tasas de transpiración.

Esto se corroboró con un porómetro marca licor, modelo SC-1. Las evaluaciones se realizaron cada 30 minutos a partir de las 7:30 y hasta las 14:30 horas.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Identificación de la bacteria

La electroforesis realizada reveló que las bases replicadas corrían 538 pares de bases, al igual que el control positivo, confirmando que la especie purificada pertenece al género *Ralstonia* spp. (Figura 4).

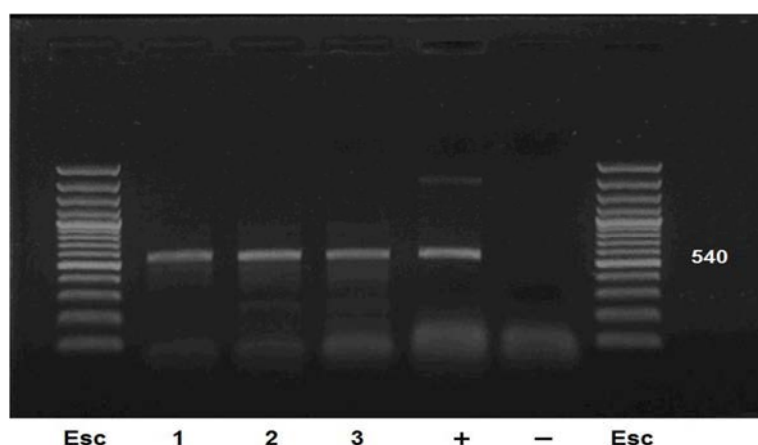


Figura 4. Detección de ADN, resultado de la prueba molecular. Línea 1, 2 y 3: aislamientos bacteriales de distintas plantas de tomate. Líneas Esc: marcadores de peso molecular. Además se muestra el control positivo (+) y el control negativo (-).

Luego de traer las plantas enfermas del campo, se empezó a aislar las bacterias, realizando transferencias consecutivas (nueve ocasiones) en el medio TZC. Esto provocó que, a pesar de haber sido identificado por medio del PCR, la bacteria perdiera su capacidad de infectar las plantas de tomate. *R. solanacearum* es una bacteria que rápidamente pierde su virulencia cuando crece en medios de cultivo (French *et al.* 1995), principalmente cuando se transfiere continuamente de un medio de cultivo a otro (Denny 2006). Esta condición es conocida como conversión fenotípica y se debe al acumulamiento de errores en la replicación del ADN, favorecidos por condiciones de estrés tales como la presencia de sales y la baja concentración de oxígeno (Genin y Denny 2012).

Para los aislamientos subsecuentes, la bacteria, proveniente de plantas de tomate enfermas, se puso a crecer en medio TZC, luego se realizó el PCR de una colonia y si resultaba positiva, se inoculaban plantas de tomate; esto permitió mantener la virulencia de la bacteria. También se recomienda mantener el aislamiento a -80°C (Stall 2001).

3.3.2 Selección del método de inoculación

3.3.2.1 Corte de raíces

Se cuantificó el grado de marchitez de las plantas cuyas raíces fueron cortadas durante la inoculación con *Bacterium*. Todas las plantas, tanto las inoculadas como las plantas testigo, se marchitaron levemente horas después de haber realizado el corte de raíces (Figura 5). Los síntomas de la marchitez bacteriana se hicieron evidentes al séptimo día después de la inoculación.

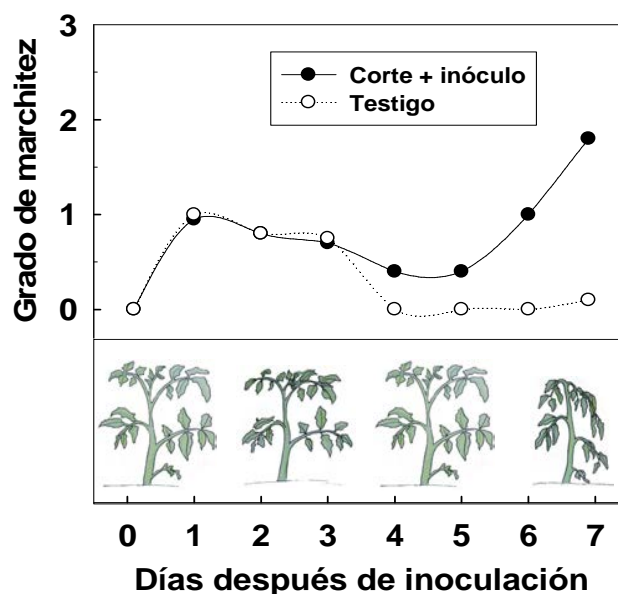


Figura 5. Progreso en la aparición de los síntomas de marchitez bacteriana posterior a la inoculación de las plantas mediante el corte de raíces. Línea sólida: corte de raíz + inóculo. La línea punteada es el testigo.

Para el tercer día la marchitez había desaparecido en todas las plantas. Este fenómeno se debe a que el corte de raíces interrumpió el flujo xilemático, interfiriendo con la transpiración (Riedell 1990) y por ende con la temperatura foliar. Luego del estrés provocado por el corte de las raíces, la planta regenera su volumen radical para recuperar la capacidad de conducir el agua, evitando que la planta colapse ante el estrés hídrico.

3.3.2.2 Inyección al tallo

La inyección en la base del tallo resultó el mejor método de inoculación, logrando, a nivel experimental, una incidencia del 65%, hecho que coincide con Kishun y Chand (1990) quienes obtuvieron un 66% de incidencia utilizando el mismo método. Cabe resaltar que siempre se utilizó una concentración de 1×10^8 UFC de *R. solanacearum*, la cual fue ajustada con el patrón 0,5 McFarland. La aparición de la marchitez provocada por *R. solanacearum* fue visible a partir del quinto día, pero se generalizó al sétimo día (Figura 6).

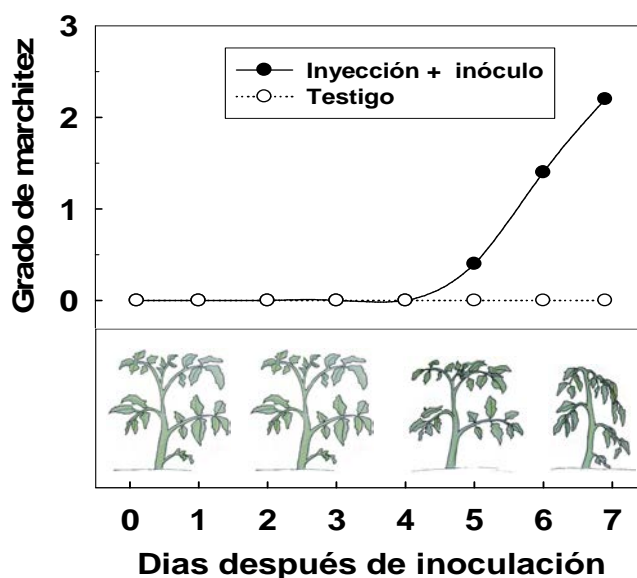


Figura 6. Progreso en la aparición de la marchitez bacterial, posterior a la inoculación mediante la inyección al tallo. Línea sólida: inyección con inóculo. Línea punteada: testigo (inyección con agua destilada).

3.3.3 Hoja a muestrear.

La prueba realizada para medir la conductividad estomática y, por ende la tasa transpiratoria, mostraron que la hoja madura completamente expandida posee la mayor tasa de transpiración, siendo ésta la más sensible a cambios de temperatura inducidas por estrés hídrico.

3.3.3.1 Temperatura.

La hoja madura más joven siempre estuvo más fría que las demás (figura 7); una termografía capturada a las 9:00 horas, muestra cómo la temperatura de la hoja superior (hoja a) fue de 18,1 °C, mientras que las hojas b, c y d estuvieron a 19,1, 19,5, y 20,0 °C respectivamente.

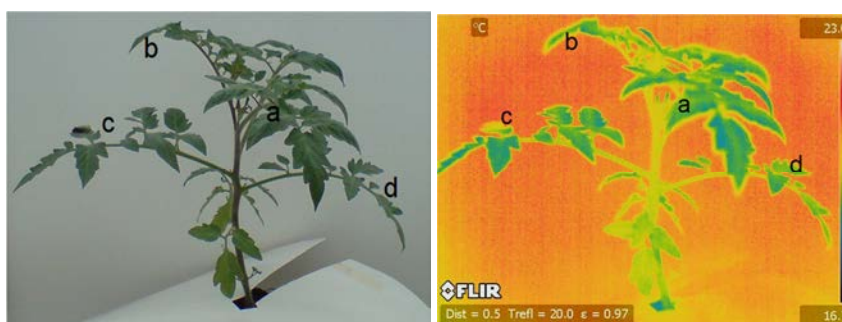


Figura 7. Imagen de una planta de tomate capturada mediante una imagen digital y una imagen térmica.

Este comportamiento es normal pues las hojas jóvenes, además de ser fotosintéticamente más activas, tienen una tasa de transpiración mayor (Villalobos *et al.* 2001), por lo que la temperatura se disipa cuando pierde vapor de agua a través de los estomas. Cabe resaltar que la temperatura del aire (20,7 °C) siempre fue mayor que la temperatura de cualquiera de las hojas.

El comportamiento anterior coincide con las curvas descritas por Vardiman y Bousselot (1998) en trigo y por Lauer (2009) en el cultivo del maíz, donde la temperatura es menor en los primeros centímetros del dosel. Esto ocurre porque

en estos primeros centímetros ocurre el grueso de la transpiración, mecanismo refrigerante de las plantas.

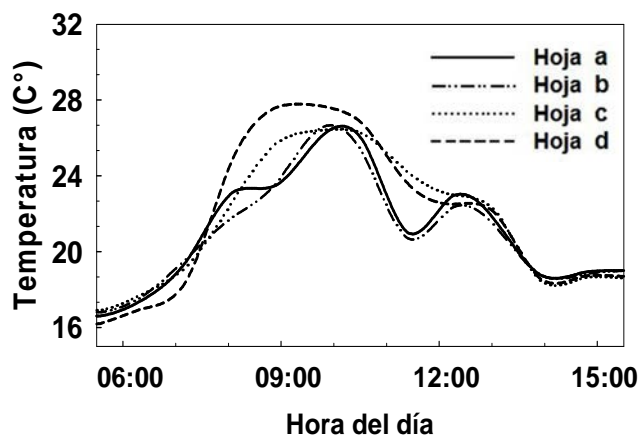


Figura 8. Ciclo diario de la temperatura de distintas hojas de tomate.

Las curvas de temperatura foliar elaboradas (figura 8) demuestran cómo la hoja d (hoja bajera) mantiene, entre las 7:30 y las 10:30, una temperatura mayor que las demás hojas. Cabe recordar que las evaluaciones fueron realizadas dentro de este periodo de tiempo.

3.3.3.2 Transpiración: conductividad estomática.

La hoja madura más joven (hoja a) mostró la mayor tasa de transpiración entre las 7:30 y las 9:00 horas (figura 9). Cerca de las 11:00 horas la CE decreció, volviendo a aumentar levemente después de mediodía para luego caer nuevamente.

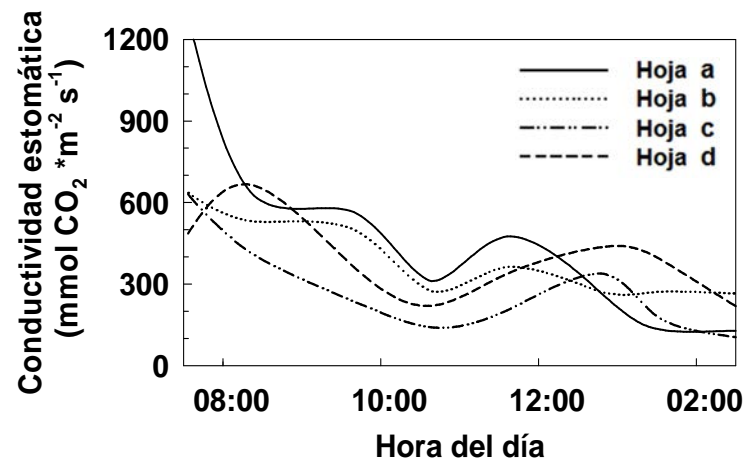


Figura 9. Conductividad estomática de distintas hojas de una planta de tomate.

Cerca del mediodía, la radiación, la temperatura y la demanda evaporativa de la atmósfera provoca un cierre parcial o total de los estomas, esto ocurre para evitar la deshidratación de la planta (Villalobos *et al.* 2001). Sin embargo, no todas las plantas se comportan de esta manera, algunas C4 tienden a aumentar su transpiración y fijación de carbono en horas de alta radiación (Villalobos *et al.* 2013).

VI. CAPÍTULO II. IMPLEMENTACIÓN DE LA TECNOLOGÍA INFRARROJA EN LA DETECCIÓN TEMPRANA DE LA MARCHITEZ BACTERIAL.

4.1 Introducción

4.1.1 Tecnología infrarroja.

La radiación, mecanismo de transferencia de energía calórica, ocurre a través de ondas electromagnéticas (Wilson y Buffa 2003), donde todo cuerpo por encima de los 0 K tiene la capacidad de emitir radiación dependiendo de su temperatura (Longair 2008).

La luz, al chocar contra algún objeto puede reflejarse, transmitirse y absorberse, por lo general estos procesos ocurren simultáneamente, cumpliendo la ley de Kirchhoff, donde la adición de estos tres procesos es igual a 1 (Manickavasagan *et al.* 2005). Un cuerpo negro posee una alta absorción y emisión de la radiación, en otras palabras un cuerpo con poca reflectividad tiene una alta absorbancia.

Por su parte, las cámaras térmicas son dispositivos que captan emisiones infrarrojas, filtrando únicamente aquellas longitudes de onda que estén entre los 3 y los 14 μm . Estos aparatos calculan la temperatura de un cuerpo de acuerdo a la rapidez con que irradian energía, la cual es proporcional a la temperatura absoluta del cuerpo (T), su área (A), la emisividad (e) y a la constante de Stefan-Boltzmann. (que corresponde a $5,67 \times 10^{-8} \text{ W}/(\text{m}^2\text{K}^4)$ y está representada por la letra griega σ).

$$P = \sigma A e T^4 \quad (\text{ecuación 1})$$

La emisividad se refiere a la proporción de la radiación que emite un cuerpo, sus valores van del 0 al 1, valores cercanos a 1 corresponden a cuerpos opacos y que emiten mucha energía, mientras que los cuerpos brillantes y refractivos tienen valores cercanos de 0. Por su parte, las plantas tienen una emisividad de 0,97 (Delrot *et al.* 2010).

4.1.2 Primeros usos de la tecnología infrarroja en la agricultura.

A partir de los años sesenta, investigadores estadounidenses confirmaron que los sensores infrarrojos podían ser usados en la agricultura (Jackson *et al.* 1981). En 1963, Tanner implementó termómetros infrarrojos en la programación del riego de algodón. Él partió del hecho que la temperatura del dosel está directamente relacionada con el estado hídrico de la planta, creando un índice entre la temperatura foliar y la temperatura del aire; dichos cálculos suponían la lámina de riego requerida. Años más tarde, Wiegand y Namken (1966) ajustaron estos cálculos y los correlacionaron con la radiación incidente.

Ehrler (1973) estudió la temperatura del dosel colocando termopares en hojas de algodón. Reafirmó que se puede programar el riego midiendo la temperatura del dosel y la temperatura del aire. Posteriormente, Throssell *et al.* (1987) perfeccionaron estas técnicas por medio de lecturas de sensores infrarrojos en *Poa pratensis* L.

Recientemente, Meron *et al.* (2010), Ballester *et al.* (2013) y Cohen *et al.* (2012) capturaron termografías aéreas de una plantación de algodón, cítricos y palma (*Phoenix dactylifera*) respectivamente; esto les permitió detectar las variaciones de temperatura que existen entre distintos sectores de riego, evaluar el funcionamiento del sistema de irrigación, el consumo de agua, y de manera indirecta conocer el potencial hídrico de las plantas.

4.1.3 Uso en la detección temprana de enfermedades

En la última década, los sensores infrarrojos han sido utilizados en la detección y estudio de la patogenicidad de algunos agentes causales (Lenk *et al.* 2007).

Chaerle *et al.* (2004) estudiaron la patogénesis del virus del mosaico del tabaco (TMV), encontrando diferencias de temperatura 36 horas después de

efectuada la inoculación, mientras que los síntomas fueron visibles pasadas las 108 horas.

Stoll *et al.* (2008) utilizaron imágenes térmicas para monitorear la patogénesis de *Plasmopara viticola* en plantas de uva y concluyeron que las termografías revelan la infección cuatro días después de realizada la inoculación y al menos tres días antes de la aparición de los primeros síntomas.

Lindenthal *et al.* (2005) concluyeron que durante la patogénesis del mildiú velloso (*Pseudoperonospora cubensis*) en plantas de pepino, este hongo biotrófico provocó una disminución progresiva de la temperatura foliar, mostrando 0,8 °C menos que hojas completamente sanas. Caso similar ocurre en remolacha azucarera, donde la infección por *Cercospora beticola*, un hongo necrotrófico, provoca una disminución de la temperatura foliar con respecto a hojas sanas (Chaerle *et al.* 2004). Así mismo, para ambos grupos de autores, la disminución de temperatura del tejido enfermo se debe a la destrucción provocada por el hongo sobre el tejido vegetal.

En plantas de pepino se encontró que la infección por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, provoca que la conductividad hidráulica disminuya, y por tanto, la conductividad estomática, esto hace que la temperatura foliar aumente, pues la planta pierde su capacidad de enfriamiento (Wang *et al.* 2012).

Chiwaki *et al.* (2005) hallaron que plantas asintomáticas de tomate infectadas con *R. solanacearum* estaban 0,8° C más calientes que las plantas sanas. Además, observaron diferencias de hasta 3° C al comparar la temperatura de una planta marchita con respecto a otra sana.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.

4.2.1 Material vegetal.

Se utilizaron plantas de tomate de la línea pura Montaña Fresca Plus, la cual es susceptible a la infección por *R. solanacearum*. Los almácigos se compraron con cuatro semanas de edad e inmediatamente fueron trasplantados a

macetas plásticas de 2,2 L de capacidad, utilizando como sustrato una mezcla (v/v) 80% de un suelo andisol (proveniente de Cervantes, Cartago) y un 20% de granza de arroz. Dicha mezcla fue desinfectada en una caldera a 80 °C por 24 horas. Al momento del trasplante, el tamaño y el grosor del tallo de las plántulas fueron uniformes.

4.2.2 Manejo del cultivo

Las plantas fueron irrigadas todos los días utilizando un sistema de riego por goteo. La programación del mismo se hizo según las condiciones del tiempo y necesidades de las plantas.

Para evitar que otras enfermedades distintas a *R. solanacearum*, infectasen las plantas e interfirieran en las evaluaciones, se elaboró un plan de fertilización (anexo 4), basado en las curvas de absorción del tomate descrito por Bertsch (2003). Los nutrimentos se calcularon para un rendimiento de 40 Tm/ha, para una densidad de 25 000 plantas por hectárea y para suplir las necesidades de las plantas hasta la etapa fenológica R6 (apertura floral), momento en que se realizó la inoculación.

Se utilizaron sales como nitrato de potasio, nitrato de amonio, fosfato monoamónico y nitrato de calcio, los cuales fueron disueltos en agua y aplicadas a través del sistema de riego por goteo. La aplicación de dicho fertilizante se realizó una vez por semana como se detalla en el anexo 4.

Se realizaron aplicaciones fitosanitarias para prevenir el mal de talluelo, usando al trasplante Captan (0,4 kg/ha), otros fungicidas como el pyraclostrobin (0,4 Kg/ha), metiltiofanato (0,7 Kg/ha) y azoxystrobin (0,12 Kg/ha) fueron utilizados para prevenir enfermedades fúngicas en el follaje (anexo 5). Se realizaron deshijas, arrancando manualmente todos los brotes axilares que emergieron.

La inoculación se realizó cuando las plantas entraron a prefloración (50% de las plantas con botones florales visibles). Esto ocurrió alrededor del día 26

después de que las plantas fueran trasplantadas. El día de la inoculación fue designado como día cero pos-inoculación (DPI).

4.2.3 Diseño experimental.

La prueba se repitió dos veces en el tiempo, la primera de ellas durante el mes de octubre en la Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno, Alajuela, mientras que la segunda repetición transcurrió durante el mes de diciembre en San Pedro, San José; ambas repeticiones se hicieron en el año 2012.

La unidad experimental fue una planta de tomate y la prueba contó con dos tratamientos: plantas inoculadas y plantas sanas; cada tratamiento tuvo 50 repeticiones.

Debido a que la temperatura dentro de un invernadero varía en espacio y tiempo, se utilizó un arreglo pareado, el cual consiste en colocar dos plantas contiguas, cada una tratada de forma distinta pero una tan próxima a la otra, que permitiera evaluar ambas en el mismo momento y el mismo espacio (Figura 10). Tal medida responde a la necesidad de que ambos tratamientos tenían que evaluarse en el mismo momento y bajo las mismas condiciones microambientales. Cada par de plantas tiene una planta enferma y la otra sana. Este sistema pareado, además permitió eliminar el error inducido por las diferencias espaciales y temporales de la temperatura del aire.



Figura 10. Área de evaluación de dos plantas en un sistema pareado, una de ellas está inoculada, mientras que la otra está sana.

El área total del experimento fue de 86 m² (8,2 x 10,5 m), 54 m² de parcela útil y 32 m² de borde. Las plantas fueron sembradas a una distancia de 0,2 m entre plantas, 0,4 entre pares y 1 m entre hileras (Figura 11). En total se sembraron 84 pares, 50 de ellos dentro de la parcela útil. La distancia de 0,4 m entre cada planta de un par, permitió que existiese el espacio adecuado para evitar contaminación cruzada, además se colocó un recipiente hondo debajo de cada maceta de poliestireno, que impidió que la contaminación cruzada se diera a través del agua lixiviada del riego.

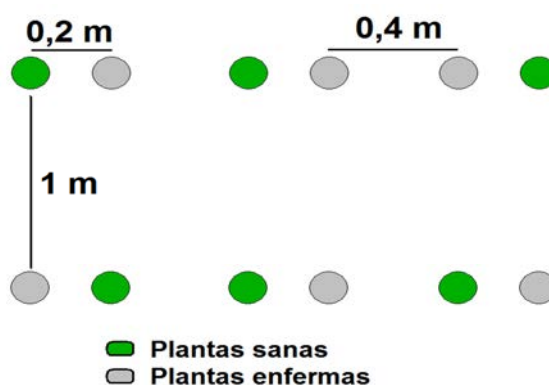


Figura 11. Distribución espacial de las plantas de tomate, se muestra la distancia entre pares y entre hileras.

4.2.4 Medición de la temperatura foliar de las plantas.

La temperatura foliar fue medida con dos sensores remotos, una cámara infrarroja que capta imágenes térmicas y un termómetro infrarrojo. La temperatura de las hojas se midió con el termómetro infrarrojo durante la primera y segunda repetición en el tiempo, mientras que la cámara térmica se utilizó durante la segunda repetición. Con ambos instrumentos se midió la temperatura foliar de la misma hoja y en el mismo instante.

4.2.4.1 Termómetro infrarrojo.

Se utilizó un termómetro infrarrojo marca Kintrex modelo IRT0424 que tiene una precisión de $\pm 1\%$. Este aparato remoto proporciona una medida instantánea,

que se obtiene del promedio de la temperatura de su campo de visión, el cual es un círculo de un centímetro de diámetro si el aparato se utiliza en contacto con el objeto a medir (Figura 12). Al ampliar la distancia entre el termómetro y la hoja representa no solo ampliar el área de medición, sino también medir el cono de aire que está entre el aparato y la hoja, lo que interfiere en la lectura.

Las lecturas fueron realizadas, midiendo en la cara adaxial de la hoja más joven completamente expandida. Las mediciones se realizaron diariamente entre las 8:15 y 9:00 am, las evaluaciones empezaron el día después de haber sido inoculadas y finalizaron hasta que los síntomas de las plantas fueron visibles. La emisividad del aparato se ajustó a 0,97.



Figura 12. Manera de medir la temperatura con el termómetro infrarrojo.

4.2.4.2 Cámara infrarroja.

Las termografías fueron tomadas con un equipo marca Flir SC620-660 P640 que tiene una respuesta espectral que va de los 7,5 a los 13,5 μm . Cuenta con un sistema que capta dos imágenes al mismo momento, la primera de ellas es una termografía, mientras que la segunda corresponde a una fotografía digital; dicho sistema es llamado “sobreposicionamiento de imagen” (Spl) y permite analizar los datos de ambas imágenes.

Entre otras características, este equipo permite medir la temperatura de un área específica que sea seleccionada dentro de la imagen, este podría ser un cuadro, un círculo e inclusive un punto específico (Figura 13).

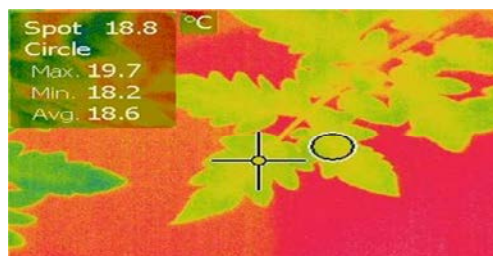


Figura 13. Capacidad de la cámara infrarroja de medir la temperatura de un área específica, en este caso un punto y un círculo de 1 cm de diámetro.

La cámara logra calcular la temperatura considerando cada pixel como una medida individual, posteriormente, promedia la medida de cada pixel. La obtención de la temperatura se calcula a partir de la irradiancia y la longitud de onda emitida por el cuerpo (ecuación 2).

$$\mu = \epsilon \sigma T^4 \quad (\text{ecuación 2})$$

Donde μ es la irradiancia, ϵ es la emisividad y σ es la constante de Stefan-Boltzmann.

4.2.5 Análisis estadístico.

Para el análisis de los datos se tomaron en cuenta únicamente los datos de temperatura de aquellas plantas que mostraron síntomas de marchitez bacterial. Esto quiere decir que las plantas que continuaron sanas no se tomaron en cuenta.

4.2.5.1 Entre tratamientos.

Con el objetivo de comparar los resultados entre ambos tratamientos se realizaron pruebas de normalidad y aditividad, posterior a ello se realizó, como método práctico y sencillo, una prueba T entre la temperatura de las plantas sanas

y la temperatura de las enfermas, calculando los intervalos de confianza para cada fecha de evaluación. Lo anterior se hizo para establecer el día al cual los dos tratamientos empiezan a mostrar diferencias significativas (0,05). Finalmente, se utilizó estadística no paramétrica con la prueba de Kruskal Wallis utilizando EL paquete InfoStat. Cabe resaltar que cada repetición en el tiempo se analizó de manera separada.

4.2.5.2 Comparación entre los dos equipos utilizados.

Se midió la temperatura foliar tanto de las plantas sanas como de las inoculadas con los dos equipos infrarrojos. Estas mediciones se realizaron a la misma hoja y en el mismo momento. Posteriormente, se realizó una regresión con los datos obtenidos. Para el análisis de regresión se utilizó SigmaPlot.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.3.1 Porcentaje de plantas que se enfermaron.

Durante la primera repetición en el tiempo (condiciones cálidas), la marchitez apareció al sexto día después de la inoculación en un 4% de las plantas. Para el día séptimo la cantidad de plantas marchitas aumentó a un 52%, y a un 62% para el noveno día.

La incidencia obtenida demostró que la concentración de la suspensión bacteriana y el método de inoculación permitió simular la patogénesis en campo, donde no todas las plantas que están expuestas al inóculo se enferman (Agrios, 2005), además, la incidencia fue similar al 66% encontrado por Kishun y Chand (1990).

La incidencia durante la segunda repetición en el tiempo (condiciones más frías), al cabo de 11 días fue de 38%, cabe resaltar que la temperatura diurna promedio fue de 16 °C y la aparición de las primeras plantas marchitas ocurrió el décimo día después de la inoculación.

4.3.2 Comportamiento térmico de las plantas.

Ralstonia solanacearum provoca una alteración en el balance hídrico, lo cual se refleja con la marchitez y el aumento de la temperatura foliar.

4.3.2.1 Primera repetición: días cálidos.

Las condiciones del tiempo variaron levemente durante cada evaluación, percibiéndose leves variaciones de temperatura del aire y de humedad relativa. A pesar de ello, el arreglo en pares permitió medir la temperatura de las dos hojas de cada par con escasos dos segundos de diferencia, eliminando así las variaciones de la temperatura en tiempo y espacio.

Durante los cuatro primeros días después de la inoculación, no fue posible detectar ninguna diferencia de temperatura entre tratamientos (Cuadro 1), sin embargo, al quinto día, hubo un leve aumento no significativo de 0,46 °C. A partir del quinto día, las plantas infectadas mostraron un incremento significativo de 0,91 °C, y en términos de detección temprana, es a partir de este día cuando se puede discriminar entre plantas sanas y enfermas.

Cuadro 1. Diferencial de temperatura entre plantas sanas e infectadas en los diferentes días de evaluación, para dos repeticiones en el tiempo.

DPI	Primera repetición		Segunda repetición	
	Delta T	Significancia*	Delta T	Significancia*
1	0,00	A	0,03	A
2	0,05	A	0,00	A
3	0,13	A	0,12	A
4	0,46	A	0,10	A
5	0,91	B	0,06	A
6	1,90	B	0,27	A
7	Aparición de los síntomas		0,58	B
8			0,92	B
9			1,42	B
10			Aparición de los síntomas	

*Los niveles de significancia se utilizan para aceptar o rechazar la hipótesis nula de que la diferencia de temperatura entre plantas infectadas y sanas es igual a cero para cada día de evaluación, donde A se acepta la hipótesis nula y B se rechaza. Prueba de Fisher LSD, letras distintas son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Para el sexto día la diferencia entre tratamientos alcanzó 1,9 °C, esto a pesar que ninguna planta mostraba síntomas (Figura 14). Dichos resultados coinciden con Chiwaki *et al.* (2005) quienes encontraron que las plantas de tomate enfermas con *R. solanacearum* tenían una temperatura superior a los 0,8 °C con respecto a las plantas sanas. Cabe resaltar que la prueba de normalidad, heterocedasticidad y aditividad, resultaron negativas en ambas repeticiones.

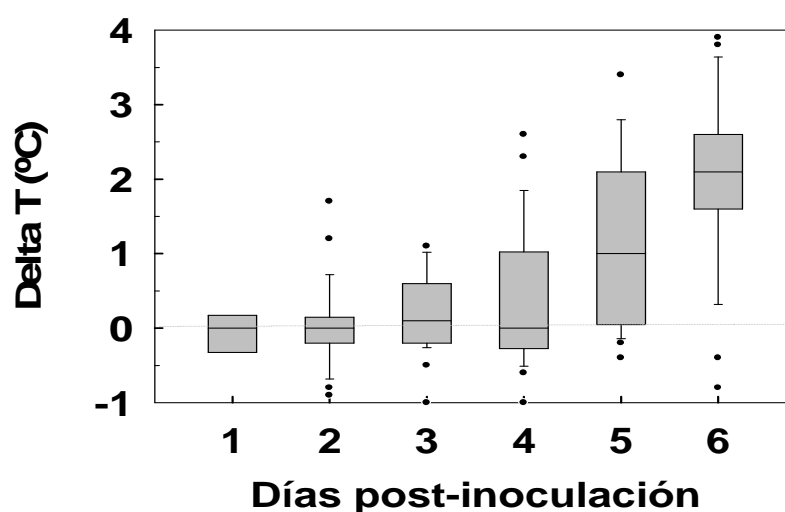


Figura 14. Diferencias en la temperatura foliar de plantas infectadas con *R. solanacearum*, durante los seis días posteriores a la inoculación.

El aumento de la temperatura foliar se debe a que *R. solanacearum* coloniza, de manera paulatina, el xilema de la planta (French *et al.* 1995), conforme esto ocurre la conductividad hidráulica disminuye (Genin y Denny 2012), y con ello aumenta la temperatura foliar.

A nivel hídrico, la conductividad xilemática guarda una estrecha relación con el movimiento dentro del floema, este último depende directamente de la actividad del xilema (Holttá y Nikinmaa 2013). Esta relación se debe a que la concentración de azúcares de un órgano fuente disminuye el potencial hídrico del xilema, generando el ascenso del agua. Posteriormente, el agua pasa al floema, se carga de azúcares y llega hasta el órgano sumidero (Berg 2008). En otras

palabras, al detenerse el flujo xilemático trae consigo una disminución en la tasa de asimilación y la reducción de azúcares, responsables de generar el diferencial osmótico para que ocurra el movimiento dentro del floema (Villalobos *et al.* 2001).

Relacionado con lo anterior, una de las limitantes durante el combate de esta enfermedad, es que los bactericidas recomendados son sistémicos y basípetos (Razdan y Gupta 2009), los cuales dependen del flujo del floema para llegar a la zona de infección. Cuando los síntomas aparecen, la planta ha perdido su conductividad vascular (Buddenhagen y Kelman 1964) por lo que los agroquímicos no logran movilizarse dentro de la planta y mucho menos llegar al sitio de infección.

Si bien, al cuarto DPI la temperatura mostró una media de 0,46 °C por encima de las plantas sanas, se observa que la distribución de los datos es dispersa, y esto hace que no exista una diferencia significativa; es hasta el quinto día cuando sí existe una diferencia entre los tratamientos. A nivel biológico, es en este momento que el crecimiento bacterial alcanza poblaciones capaces de impedir parcialmente la conducción hidráulica (van Elsas *et al.* 2000). En términos prácticos, si se logran detectar cambios significativos de temperatura en plantas de tomate, se sabría que a escasos dos o tres días aparecerán los síntomas (esto bajo las condiciones en que se realizó este trabajo).

4.3.2.2. Segunda repetición: días fríos.

Esta segunda repetición coincidió con condiciones de tiempo más frías, y la aparición de los síntomas tardó diez días desde el momento en que se realizó la inoculación. Según van Elsas *et al.* (2001) *R. solanacearum* raza 3 biovar 2 logra crecer entre los 12 y 36 °C, con un crecimiento óptimo entre los 28 y 32 °C; a temperaturas menores a los 4 ó mayores a 44 °C las bacterias prácticamente no sobreviven.

Según lo anterior, las colonias de *R. solanacearum* que crecen a 16 °C logran multiplicarse pero a una tasa lenta. Van Elsas *et al.* (2000) describe que la tasa de crecimiento de *R. solanacearum* en el suelo disminuye gradualmente al

bajar la temperatura. Cabe resaltar que la temperatura media para esta segunda repetición estuvo entre los 14 y 17°C, lo cual justifica que la aparición de los síntomas necesitara más tiempo. La marchitez bacterial es una enfermedad característica de climas calientes, pues es allí donde la ocurrencia es mayor (Buddenhagen y Kelman, 1964).

La diferencia en temperatura entre plantas sanas e infectadas no varió durante los primeros 7 días después de la inoculación, para el octavo día si se nota un aumento no significativo de 0,9 °C, finalmente, al noveno día existen diferencias de 1,42 °C (Figura 15).

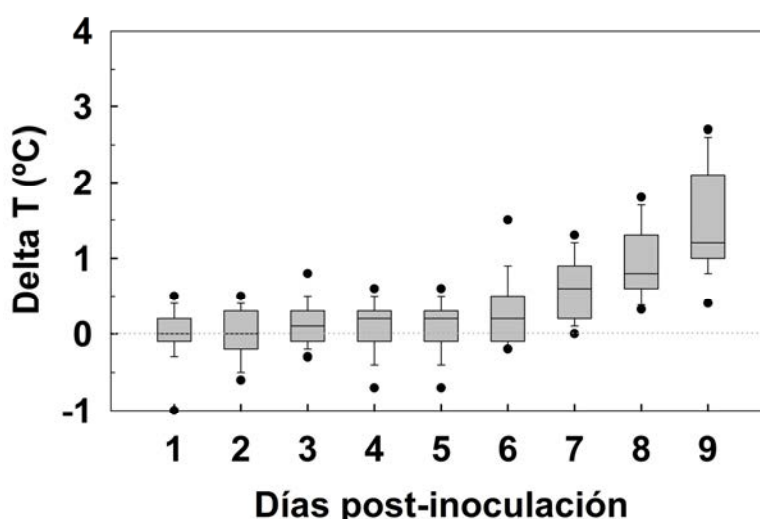


Figura 15. Diferencias en la temperatura foliar de plantas infectadas con *R. solanacearum*, durante los nueve días posteriores a la inoculación.

Al comparar dos plantas, una infectada con 7 días de haber sido inoculada y una sana, se observó que la planta sana (a) con 27,5 °C, estuvo 1,8 °C más fría que la planta enferma (b) que para ese momento tenía cerca de 29,3°C (Figura 16). A pesar de esta diferencia, la planta inoculada aún no evidenciaba síntomas, no fue sino a partir del séptimo día después de la inoculación, que fue posible observar las primeras plantas marchitarse.



Figura 16. Plantas de tomate, a: sana y b: planta inoculada con *R. solanacearum* al 6 DPI. La primera imagen corresponde a imágenes digitales, mientras que la segunda imagen es térmica.

En trabajos de detección temprana de enfermedades con tecnología infrarroja, se logró evidenciar la infección de mildiu en pepino con una antelación del 30% del tiempo antes de la aparición visual de los síntomas (Lindenthal *et al.* 2005), 43% en *Plasmophara viticola* en uva (Stoll *et al.* 2008), 46% en el virus del mosaico del tabaco (Chaerle *et al.* 2004) y un 55% de antelación con *Fusarium oxysporum* en hojas de pepino (Wang *et al.* 2012). En el presente trabajo, se logró detectar cambios de temperatura un 29 % antes de la aparición de los síntomas.

A pesar de haber encontrado diferencias entre tratamientos, se debe tener en cuenta que la alteración en la temperatura foliar depende de una serie de factores abióticos como la concentración de sales en el suelo (Kang *et al.* 1991), sequía, anegamiento o estrés calórico, entre otros, además se puede alterar por la acción de patógenos como la fusariosis, que provoca un estrés hídrico y por ende un aumento en la temperatura (Wang *et al.* 2012).

4.3.3 Comparación entre los dos equipos utilizados.

Se encontró que existe una buena relación entre los dos equipos utilizados para medir la temperatura ($R=0,8485$), siendo factible poder utilizar la pistola infrarroja que además de ser de bajo costo, es fácil de portar y permite tomar la temperatura de manera rápida y muy sencilla.

Las diferentes mediciones realizadas en el mismo momento con ambos equipos, difieren tanto positiva como negativamente (Figura 17); por encima de los

20 °C los datos son más congruentes entre sí que las mediciones por debajo de ese valor.

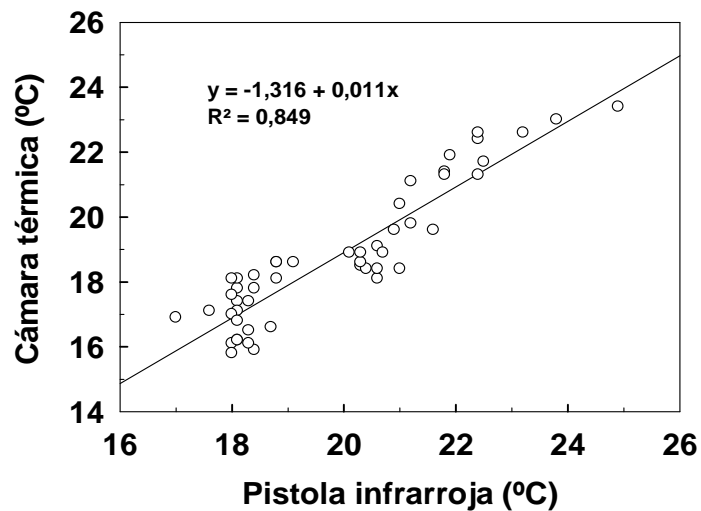


Figura 17. Regresión entre la temperatura medida con la cámara térmica y el termómetro infrarrojo ($R=0,921$).

El coeficiente de determinación (0,8486) permite tener una buena precisión al utilizar la pistola infrarroja, más aún cuando la temperatura es mayor de 20 °C, pues las mediciones entre ambos equipos tienden a ser más precisos, y no tan dispersos.

V. DISCUSIÓN GENERAL

En el presente estudio se corroboraron los postulados de Koch. El primero al aislar la bacteria de una planta infectada, lo que ha sido recurrente en otros estudios. Así mismo, el resto de los postulados se corroboraron al inocular una planta sana con un cultivo puro de la bacteria, obtener los síntomas iniciales y reaislar el patógeno a partir de estas.

Cabe destacar que, en la primera inoculación de la bacteria no resultó en la infección de las plantas, pues las colonias al estar creciendo en un medio de cultivo que provee los nutrientes necesarios, provoca un cambio metabólico de las mismas, creciendo aquellas bacterias no virulentas e incapaces de infectar (Genin y Denny 2012). Para solucionar ese problema, la bacteria se inoculó repetidamente en plantas de tomate para mantener su virulencia.

De los métodos de inoculación evaluados, se concluye que la infiltración al tallo resultó en un método sencillo, práctico y que requiere un bajo volumen de suspensión bacteriana (Kishun y Chand 1990). Por otro lado, la herida al infiltrar al tallo, por si misma, no afecta la conductividad hidráulica de la planta, como si lo hace el corte de raíz.

El aumento de temperatura foliar de plantas infectadas por *R. solanacearum*, se debe a la obstrucción del xilema (Buddenhagen y Kelman 1964), producto del crecimiento bacteriano. Este crecimiento depende en gran medida de la temperatura ambiental (Aneja 2003), provocando que los síntomas aparezcan antes y que la incidencia sea mayor en ambientes más cálidos (figuras 14 y 15). Lo anterior se corroboró en el presente estudio al comparar ambas repeticiones en el tiempo.

En este trabajo, se logró detectar un aumento significativo de la temperatura dos días antes de la aparición de los síntomas (Figura 14). El valor práctico de esto, radica en la posibilidad que, una vez que se haya identificado plantas con una temperatura mayor, estas sean excluidas de la poda y la deshija,

prácticas conducentes a la diseminación del inóculo (Fortnum y Kluepfel 2005). Para este caso, el descarte de plantas no es una alternativa, pues el aumento en la temperatura puede tener varias causas y posiblemente se estarían eliminando plantas sanas.

Si se establece un sistema productivo donde se controle adecuadamente la fertilización, la conductividad eléctrica del sustrato y la uniformidad y dosificación del riego, se estaría incrementando la probabilidad que la diferencia de temperatura se deba a la infección por un patógeno. Bajo estas condiciones de manejo, las plantas pueden ser marcadas y luego descartadas.

Por otro lado, es importante que los datos termográficos obtenidos sean analizados tanto temporal como espacialmente, lo que permitiría identificar si la distribución del daño en el campo corresponde a un problema biótico o abiótico (Agrios 2005). Cabe resaltar que la infección de las plantas, en condiciones de campo, no ocurre en el mismo momento, sino que algunas plantas presentarían los síntomas mientras que otras se infectarían días, e inclusive semanas después.

Por esta razón, el uso de sensores infrarrojos debe integrarse con los análisis de laboratorio, de la conductividad eléctrica, del riego y del reconocimiento de la distribución y patrones de la marchitez bacterial.

Cabe destacar, que este trabajo pionero, es el primero que se realiza en el país; Incluso, se encuentran pocas publicaciones a nivel mundial donde se utilizan sensores infrarrojos como una herramienta de detección temprana de enfermedades en plantas.

Esta investigación abre las puertas para que futuros estudios tomen el relevo necesario para afinar la propuesta metodológica y el de su utilización tecnológica, permitiendo gestar con ello, un uso más efectivo y eficiente de los recursos, aplicado a la producción agrícola.

VI. CONCLUSIONES

La infiltración en la base del tallo, permitió que la incidencia y el tiempo entre la inoculación y la aparición de los síntomas, fueran similares a lo que ocurre en campo.

El tiempo que transcurre entre el momento de la inoculación y la aparición de los síntomas varía de acuerdo a la temperatura ambiental, y ocurre más pronto en días calientes.

La temperatura foliar de plantas de tomate infectadas con *R. solanacearum*, es significativamente mayor que la temperatura de plantas sanas, a partir del quinto día después de haber sido inoculadas en días cálidos y al noveno día bajo condiciones más frías.

El termómetro infrarrojo puede ser utilizado para la medición de la temperatura foliar, es un instrumento preciso comparado con un equipo más sensible y sofisticado como lo es la cámara térmica. Además, es un instrumento fácil de utilizar, capaz de medir la temperatura de manera rápida y es remoto.

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar pruebas en campo que permitan evidenciar si esta metodología es capaz de discriminar entre plantas sanas e infectadas, pues en campo, existe una serie de factores bióticos y abióticos que podrían provocar variaciones de la temperatura mayores que la variación que produce la infección de *R. solanacearum*.

VIII. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. 2005. Plant Phytopathology. Elsevier Academic Press. 5^{ta} edición. EUA. 952 p.
- Álvarez, B; López, MM; Biosca, EG. 2008a. Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms. Microbiology 154:3590–98.
- Álvarez, B; Vasse, J; Le-Courtois, V; Trigalet, D; López, M; Trigalet, A. 2008b. Comparative behavior of *Ralstonia Solanacearum* biovar 2 in diverse plant species. Phytopathology 98:59-68.
- Aneja, K. 2003. Experiments in microbiology, plant pathology and biotechnology. Cuarta edición. New Age International Publisher. 72 p.
- Arauz, F. 2011. Fitopatología: un enfoque agroecológico. 2da Ed. Editorial UCR, Costa Rica 514 p.
- Ballester, C; Jiménez, M; Castel, J; Intrigliolo, D. 2013. Usefulness of thermography for plant water stress detection in citrus and persimmon trees. Agricultural and Forest Meteorology 168:120–129.
- Berg, L. 2008. Introductory botany: plants, people, and the environment. Segunda edición. Thomson Higer Education, EUA. 215 p.
- Bertsch, F; 2003. Absorción de nutrimentos por los cultivos. ACCS, Costa Rica 307 p.
- Buddenhagen, L; Kelman, A. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 2:203-230.
- Cartín, J. 1995. Aislamiento de agentes supresores a *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith en tomate (*Lycopersicon esculentum*). Tesis de Licenciatura, San José, CR, UCR. 49 p.
- Chaerle, L; Hagenbeek, D; De Bruyne, E; Valcke, R; Van Der Straeten, D. 2004. Thermal and chlorophyll-flourescence imaging distinguish plant-pathogen interactions at an early stage. Plant Cell Physiology 45(7):887-896.
- Champoiseau, P; Jones, J. 2009. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties. Plant Health Progress.

- Chávez, P; Yarleque, C; Loayza, H; Mares, V; Hanco, P; Priour, S; Márquez, M; Posadas, A; Zorogastúa, P; Flexas, J; Quiroz, R. 2012. Detection of bacterial wilt infection caused by *Ralstonia solanacearum* in potato (*Solanum tuberosum* L.) through multifractal analysis applied to remotely sensed data. *Precision Agriculture* 13(2):236-255.
- Chiwaki, K; Negamori, S; Inoue, Y. 2005. Predicting bacterial wilt disease of tomato plants using remotely sensed imagery. *Journal of Agriculture Meteorology* 61:153-164.
- Cohen, Y; Alchanatis, A; Levi, A; Soroker, V. 2012. Use of aerial thermal imaging to estimate water status of palm trees. *Precision Agriculture* 13:123–140.
- Cook, D; Sequeira, L. 1994. Strains differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetics methods. Pp: 77-93. In: Hayward A; Hartman G: Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, United Kingdom. 268p.
- Delrot, S; Medrano, H. Or E; Bavaresco; Grando S. 2010. Methodologies and results in grapevine reseach. Springer Science. 139 pp
- Denny, T. 2006. Plant pathogenic *Ralstonia* species. pp: 574. In *Plant-Associated Bacteria*, ed. SS Gnanamanickam, Dordrecht, The Netherlands: Springer. 712 pp.
- Ehrler, W. 1973. Cotton leaf temperatures as related to soil water depletion and meteorological factors. *Agronomy Journal* 65:404-409.
- Elphinstone, JG. 2005. The current bacterial wilt situation: A global overview. pp: 9-28. In: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 510 pp.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2011. FAOStat: Rendimiento y área sembrada del tomate (en línea). Roma, Italia. Consultado 18 mayo 2013. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Fortnum K; Kluepfel, D. 2005. Mechanization has contributed to the spread of bacterial wilt on flue-cured tobacco in the Southeastern USA. p: 54. In: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 510 pp.

- French, E. 1994. Strategies for integrated control of bacterial wilt of potatoes. pp: 199-207. In: Bacterial wilt: the disease and its causative agent *Pseudomonas solanacearum*. CAB International. 259 pp.
- French, E; Gutarra L; Aley P; Elphinstone. 1995. Culture media for *Ralstonia solanacearum* isolation, identification and maintenance. Fitopatología 30(3): 126-130.
- Genin, S; Denny, T. 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. Annual Review of Phytopathology 50 (4):4-23.
- Granada, G; Sequeira L. 1983. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil, rhizosphere, and plant roots. Canadian Journal of Microbiology 29(4): 433-440.
- Hayward, A. 2000. *Ralstonia solanacearum*,. Encyclopedia of microbiology, vol. 4. Academic Press, California, EUA 32–42 p.
- Hernández, Y; Marino, N; Trujillo, G; Urbina, C. (2005). Invasión de *Ralstonia solanacearum* en tejidos de tallos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Revista de la Facultad de Agronomía 22(2):185–194.
- Holtta, T; Nikinmaa, E. 2013. Modelling the effect of xylem and phloem transport on leaf gas exchange. Acta Horticulturae 991:351-358.
- Jackson, R; Idso, S; Rejinato, R; Pinter, P. 1981. Canopy temperature as a crop water stress indicator. Water Resources Research 17(4):1133-1138.
- Jones, J. 2001. Plagas y enfermedades del tomate. Mundi-Presa. Madrid España. 28-29 p.
- Kang, S; Liu, M; Wang, Z. 1991. Relations between leaf water potential, stomatal resistance and transpiration rate of winter wheat, and environmental factors. Irrigation and Drainage. 10(3):1-6.
- Kishun, R; Chand, R. 1990. Efficacy of different methods of inoculation and inoculum concentrations for inducing bacterial wilt in tomato. Plant Disease Research 5 (2):126-131.
- Lauer, J. 2009. What is happening in the corn crop canopy?. Field Crops 28:1-67.
- Lemaga, B; Kanzikwera, R; Kakuhenzire, R ; Hakiza, J; Maniz, G. 2001. The effect of crop rotation on bacterial wilt incidence and potato tuber yield. African Crop Science Journal 9(1):257-266.

- Lenk, S; Chaerle, L; Pfundel, E; Langdorf, G; Van der Straeten, D. 2007. Multispectral fluorescence and reflectance imaging at the leaf level and its possible applications. *Journal of Experimental Botany* 58(4):807-814.
- Lindenthal, M; Steiner, U; Oerke, E. 2005. Effect of downy mildew development on transpiration of cucumber leaves visualized by digital infrared thermography. *Phytopathology* 95(3):233-240.
- Longair, M. 2008. *Galaxy formation*. Springer. Second edition. 735 pp.
- López, L. 2012. Venta de tomate en fresco genera cerca de 30 mil millones de colones a la economía. NotiMAG. Consultado el 20 setiembre 2013 disponible en http://www.mag.go.cr/oficinas/prog-nac-tomate.html#HERMES_TABS_1_2.
- Manickavasagan, A; Jayas, D; White, N; Paliwal, J. 2005. Applications of thermal imaging in agriculture. *The Canadian Society for Engineering in Agricultural, Food, and Biological Systems*. 5(2):1-11 p.
- Mehrotra, R; Aggarwal, A. 2003. *Plant Pathology*. McGraw Hill. Segunda edición. 821 p.
- Meron, M; Tsipris, J; Orlov, V; Alchanatis, J; Cohen, Y. 2010. Crop water stress mapping for site-specific irrigation by thermal imagery and artificial reference surfaces. *Precision Agriculture* 11:148-162.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería, CR (MAG). 2009. Análisis de la situación 2009 (en línea). Consultado el 11 enero 2012. Disponible en: <http://prensamag.blogspot.com/2012/09/venta-de-tomate-en-fresco-genera-cerca.html>
- Pradhanang, P; Ji, P; Momol, M; Olson, S; Mayfield, J; Jones, J. 2005. Application of acibenzolar-S-methyl enhances host resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum*. *Plant Disease* 89:989-993.
- Priou, S; Aley, P; Chujoy, E; Lemaga, B; French, E. s.f. Integrated control of bacterial wilt of potato. 30 pp. Consultado el 15 de enero 2013. Disponible en: http://www.fao.org/sd/erp/toolkit/books/integrated_control_of_bacterial_wilt_in_potato.pdf
- Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica (Procomer). 2011. Las heladas en los Estados Unidos podrían beneficiar a los exportadores de tomate costarricense. Consultado 13 julio 2012. <http://www.procomer.com/contenido/articulos/las-heladas-en-los-estados->

unidos-podr%C3%ADan-beneficiar-a-los-exportadores-de-tomate-costarricense-.html

- Razdan, V; Gupta S. 2009. Integrated pest management: concepts and practices. Springer. 362 p.
- Riedell, W. 1990. Rootworm and mechanical damage effects on root morphology and water relations in maize. *Crop Science* 30(3):628-631.
- Schaad, N; Jones, J; Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Minnesota: Aps Press. 398 pp.
- Schell, M. 2000. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia Solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annual Review of Phytopathology* 38:263-92
- Singh, N; Siddiqui. 2011. Inoculation of tomato with *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, and *Meloidogyne javanica*. *International Journal of Vegetables Science* 18(1):78-86.
- Stall, R. 2001. Plagas y enfermedades del tomate. The American Phytopathology Society. Mundi Prensa. 28-31 p.
- Stoll, M; Schultz, H; Berkelmann, B. 2008. Exploring the sensitivity of thermal imaging for *Plasmopara viticola* pathogen detection in grapevines under different water status. *Functional Plant Biology* 35: 281-288.
- Strange, R; Scott, P. 2005. Plant disease: a threat to global food security. *Annual Review of Phytopathology* 43:83-116.
- Swanson, J; Yao, J; Tans-Kersten, J; Allen. 2005, Behavior of *Ralstonia solanacearum* Race 3 Biovar 2 during latent and active infection of geranium. *Bacteriology* 95(2):136-143.
- Tanner, C. 1963. Plant temperatures. *Agronomy Journal* 55: 210-211.
- Tans-Kersten, J; Huang, H; Allen, C. 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of Bacteriology* 183(12): 3597-3605.
- Thoquet, P; Oliver, J; Sperisen, C; Rogowsky, P; Prior, P; Anaïs, G; Mangin, B; Nazer, B; Grimsley, N. 1996. Polygenic resistance of tomato plants to bacterial wilt in the French West Indies. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 9:837-842.

- Throssell, C; Carrow, R; Milliken, G. 1987. Canopy temperature based irrigation scheduling indices for Kentucky Bluegrass Turf. *Crop Science* 27(1): 126-131.
- Van Elsas, J; Kastelein, P; Van Bekkum, P; Van der Wolf, J; De Vries, P; Van Overbeek, L. (2000). Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and microcosm soils in temperate climates. *Phytopathology*, 90(12): 1358-1366.
- Van Elsas, J; Kastelein, P; De Vries, P; Van Overbeek, L. (2001). Effects of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* bv. 2 in irrigation water. *Canadian journal of Microbiology*, 47(9): 842-854.
- Vardiman, L; Boussetot, K., 1998. Sensitivity studies on vapor canopy temperature profiles. 645-658 pp. In: Proceedings of the 4th International Conference on Creationism, Technical Volume, Creation Science Fellowship, Pittsburgh, PA. 658 pp.
- Villalobos, E; Marín, W; Berninger, F. 2001. Transporte y partición del carbono, Capítulo III In: *Fisiología de la producción de los cultivos tropicales*. Editorial Universidad de Costa Rica. 98 pp.
- Villalobos, J. Testi, L; Orgaz, F. Garcia, O; Lopez, A; Gonzalez, M; Ballester, B; Caste, J; Alarcón, J. Nicolás, E; Girona, J; Marsal, J; Fereres, E. 2013. Modelling canopy conductance and transpiration of fruit trees in Mediterranean areas: A simplified approach. *Agricultural and Forest Meteorology* 171:93-103.
- Von, Bodman; Dietz, W; Coplin, D. 2003. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Plant Science Articles* 41:455-82.
- Wang, M; Ling, N; Dong, X; Zhu, Y; Shen, Q; Guo, S. 2012. Thermographic visualization of leaf response in cucumber plants infected with the soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 61:153-161.
- Wiegand, C; Namken, L.1966. Influences of plant moisture stress, solar radiation, and air temperature on cotton leaf temperatures. *Agronomy Journal* 58: 582-586.
- Wilson, J; Buffa, A. 2003. *Física*. Quinta edición. Pearson Education, México 394 p.

Zourob, M; Elways, S; Turner, A. 2008. Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors, and microsystems. Springer Science. 790 pp.

IX. ANEXOS

Anexo 1.

Preparación del medio de cultivo MacCONKEY AGAR

1. Disolver 51,1 g de MacConkey agar en 1 L de agua destilada.
2. Dejar hervir para disolver completamente.
3. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
4. Verter 20 mL del medio aún caliente en platos Petri.

Anexo 2.

Tinción de Gram

1. Preparar un extendido del cultivo y fijarlo a la llama.
2. Cubrir con cristal violeta y dejar en reposo durante un minuto.
3. Lavar brevemente con agua, escurrir y cubrir la lámina con cristal violeta.
4. Dejar en reposo por dos minutos.
5. Lavar y escurrir.
6. Decolorar con alcohol acetona y lavar inmediatamente con agua. Repetir esta operación hasta que casi no se liberara el cristal violeta.
7. Escurrir el exceso de agua y aplicar la safranina por un minuto.
8. Lavar con agua, escurrir y dejar secar.

Principios asociados a la Tinción de Gram

Tinción inicial: Se tiñen las células con cristal violeta, que es el colorante primario, en este paso todas las células se tiñen de morado.

Mordente: Adicionar lugol, que reacciona con el colorante anterior y forma un complejo violeta-yoduro. Las células continúan moradas.

Decoloración: Agregar un solvente no polar que lava el complejo formado en el paso anterior de las bacterias gram negativas y de este modo éstas quedan incoloras. Este es el paso crítico de la tinción, pues, si se agrega más solvente, se decolora también a las bacterias gram positivas y si se hace muy débil no se decoloran las bacterias gram negativas.

Contratinción: Teñir con un colorante secundario que puede ser safranina o fucsina, que tiñe a las bacterias gram negativas, ya que quedaron sin color, este paso no afecta a las bacterias gram positivas.

Anexo 3.

Preparación del medio de cultivo Agar Tetrazolium (TZC)

- **Solución 2,3,5 Triphenyltetrazolium HCL:** disolver 1 gramo de la sustancia y en 100 mL de agua. Mezclar vigorosamente y autoclavar durante 8 minutos a 121 °C / 15 psi. También se puede esterilizar mediante filtración.
- **Preparación del medio:** Pesar los demás componentes por aparte, y agregar a éstos la infusión de papa anterior. Adicionar agua destilada hasta llegar a un volumen de 990mL. Se mezcló vigorosamente y se calentó hasta ebullición. Se distribuyó en botellas y autoclavó durante 15 minutos a 121°C / 15 psi. Y finalmente, con técnica aséptica, agregar la solución de 10 mL al medio y agitar.

Anexo 4.**Plan de fertilización**

Los valores corresponden a la cantidad de gramos del elemento que se agregaron cada semana

Semana	Aporte de las moléculas (g/planta)					
	N	P₂O₅	K₂O	MgO	S	CaO
1	0,26	0,10	0,12	0,00	0,00	0,01
2	0,32	0,04	0,14	0,00	0,00	0,01
3	0,42	0,04	0,19	0,00	0,00	0,01
4	0,58	0,04	0,26	0,00	0,00	0,01
5	1,06	0,04	0,47	0,01	0,00	0,03
Total (g)	2,63	0,54	2,35	0,03	0,01	0,13

Cantidad del fertilizante comercial aplicado

Semana	Fertilizante agregado (g/planta)			
	K(NO₃)	MAP	Ca(NO₃)₂	NH₄(NO)₃
1	0,5	0,4	0,0	0,6
2	0,6	0,2	0,0	0,8
3	0,9	0,2	0,1	1,0
4	1,2	0,2	0,1	1,4
5	2,1	0,2	0,2	2,6

Anexo 5.

Aplicaciones fitosanitarias realizadas

Ingrediente activo	Dosis (Kg/ha)	Día que fue aplicado	Patógeno a prevenir	Modo de aplicación
Captan	0,40	1	<i>Alternaria solani</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	drench
Abamectin	0,52	3	<i>Lyriomiza</i> spp.	aspersión
Pyraclostrobin	0,40	6 y 32	<i>Alternaria solani</i>	aspersión
Metiltiofanato	0,70	13	<i>Colletotrichum</i> sp.	aspersión
Azoxystrobin	0,12	25 y 43	<i>Phytophthora infestans</i>	aspersión

Anexo 6.

Análisis estadístico de la primera repetición

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	dia	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
delta	1.00	28	0.00	1.02	0.00	65.93	41.16	<0.0001
delta	2.00	28	-0.05	0.76	0.00	59.64		
delta	3.00	28	0.13	0.55	0.05	74.00		
delta	4.00	28	0.46	1.21	0.00	77.27		
delta	5.00	28	0.91	1.41	0.90	99.55		
delta	6.00	28	1.90	1.28	1.95	130.61		

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
delta	168	0.29	0.27	193.61

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	78.51	5	15.70	13.44	<0.0001
dia	78.51	5	15.70	13.44	<0.0001
Error	189.30	162	1.17		
Total	267.81	167			

Analysis of variance

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
RANK DeltaT	186	0.27	0.24	50.05

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model.	71348.91	5	14269.78	10.27	<0.0001
Dia	71348.91	5	14269.78	10.27	<0.0001
Error	197390.09	142	1390.07		
Total	268739.00	147			

Test:Fisher LSD Alpha:=0,05 LSD:=21,86546

Error: 1390,0711 df: 142

Dia	Means	n	S.E.		
1.00	56.75	31	7.05	A	B
2.00	49.04	31	7.05	A	B
3.00	62.91	31	7.05	A	B
4.00	66.91	31	7.05	A	B
5.00	85.54	31	7.05		B
6.00	113.18	31	7.05		C

Means with a common letter are not significantly different (p<= 0,05)

Anexo 7.

Análisis estadístico de la segunda repetición

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
delta t	1.00	19	-0.03	0.34	-0.10	93.99	<0.0001
delta t	2.00	19	0.00	0.31	0.00		
delta t	3.00	19	0.12	0.27	0.10		
delta t	4.00	19	0.10	0.33	0.20		
delta t	5.00	19	0.06	0.32	0.10		
delta t	6.00	19	0.27	0.44	0.20		
delta t	7.00	19	0.58	0.37	0.60		
delta t	8.00	19	0.92	0.44	0.80		
delta t	9.00	19	1.46	0.65	1.20		

Anexo 8.**Análisis estadístico de la regresión.****Linear Regression****Data source:** Data 1 in Correlación

pistola = -1,316 + (1,011 * camara)

N = 50 Missing Observations = 4

R = 0,921 Rsqr = 0,849 Adj Rsqr = 0,845

Standard Error of Estimate = 0,816

	Coefficient	Std. Error	t	P
Constant	-1,316	1,231	-1,069	0,290
camara	1,011	0,0617	16,398	<0,001

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	178,891	178,891	268,887	<0,001
Residual	48	31,935	0,665		
Total	49	210,826	4,303		

Normality Test (Shapiro-Wilk) Failed (P = 0,027)

Constant Variance Test: Passed (P = 0,502)

Power of performed test with alpha = 0,050: 1,000