

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria
Ingeniería Agronómica



Proyecto Especial de Graduación
Métodos de inoculación de bacterias en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo condiciones de invernadero

Estudiantes

Amir Josué De La Cruz Enríquez

María Paula Pineda Sarango

Asesores

Carolina Avellaneda, Ph.D.

Hugo Ramirez, Ph.D.

Honduras, agosto 2022

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

CELIA O. TREJO RAMOS

Directora Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros.....	4
Índice de Figuras	5
Índice de Anexos	6
Resumen	7
Introducción.....	9
Materiales y Métodos	12
Cultivo de Tomate en Invernadero	12
Ampliación de la Fuente de Bacterias.....	14
Inoculación de Bacterias Fitopatógenas	18
Comprobación de la Presencia del Patógeno en las Plantas Inoculadas	18
Condiciones Ambientales Monitoreadas en Invernadero luego de la Inoculación	19
Análisis de Savia Foliar	20
Número en Frutos Comerciales	20
Resultados y Discusión.....	22
Conclusión.....	33
Recomendaciones.....	34
Referencias.....	35
Anexos.....	38

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Dosificaciones De Fertilizantes Para Plántulas En Bandeja De 200 Alveolos, Para Tomate Híbrido Pony Express, Zona tres, Zamorano, Honduras	12
Cuadro 2 Dosificaciones Del Plan De Fertilizaciones Inorgánicas Y Orgánicas, Para Tomate Híbrido Pony Express, Zona tres, Zamorano, Honduras	14
Cuadro 3 Distribución Del Ensayo De Métodos De Inoculación De Bacterias En El Cultivo de Tomate Bajo Condiciones De Invernadero, Zona tres, Zamorano, Honduras.....	21
Cuadro 4 Efecto De Los Métodos De Inoculación De Las Bacterias En La Altura Medida En Centímetros (Cm) Del Cultivo De Tomate Bajo Condiciones De Invernadero, Zona tres, Zamorano, Honduras a los 52 y 80 días después del trasplante (DDT).....	24
Cuadro 5 Efecto De Los Métodos De Inoculación Bacterias En El Número De Frutos Comerciales En El Cultivo De Tomate Bajo Condiciones De Invernadero, Zona tres, Zamorano, Honduras a los 52 y 80 días después del trasplante (DDT)	25
Cuadro 6 Efecto De Los Métodos De Inoculación De Las Bacterias En El Número De Frutos No Comerciales En El Cultivo De Tomate Bajo Condiciones De Invernadero, Zona tres, Zamorano, Honduras a los 52 80 días después del trasplante (DDT)	26
Cuadro 7 Efecto De Los Métodos De Inoculación De Las Bacterias En El Análisis De Savia Foliar De Las Hojas De Plantas De Tomate En Las Variables De pH, Conductividad Eléctrica Y °Brix (SST), Zona tres, Zamorano, Honduras	30

Índice de Figuras

Figura 1 Erwinia spp = Factor de dilución 102.....	17
Figura 2 Ralstonia spp = Factor de dilución 103.....	17
Figura 3 Xanthomonas spp = Factor de dilución 102	17
Figura 4 Registro de la Temperatura (°C) del Invernadero, Zona Tres, Zamorano, Honduras Durante los Días Después de la Inoculación entre abril 28 y mayo 26 del 2022	22
Figura 5 Registro de Humedad Relativa (%) del Invernadero, Zona tres, Zamorano, Honduras entre abril 28 y mayo 26 del 2022.....	22
Figura 6 Efecto Del Método De Punción En Las Bacterias Fitopatógenas Con Base En El Porcentaje De Frutos Afectados Del Cultivo De Tomate Inoculado, Zona tres, Zamorano, Honduras.....	28
Figura 7 Efecto Del Método De Inyección En Las Bacterias Fitopatógenas Con Base En El Porcentaje De Frutos Afectados Del Cultivo De Tomate Inoculado, Zona tres, Zamorano, Honduras.....	28
Figura 8 Efecto Del Método De Filtración En Las Bacterias Fitopatógenas Con Base En El Porcentaje De Frutos Afectados Del Cultivo De Tomate Inoculado, Zona tres, Zamorano, Honduras.....	29
Figura 9 Efecto Del Método De Decapitación En Las Bacterias Fitopatógenas Con Base En El Porcentaje De Frutos Afectados Del Cultivo De Tomate Inoculado, Zona tres, Zamorano, Honduras.....	29

Índice de Anexos

Anexo A Manejo hortícola y preparación del invernadero.....	38
Anexo B Datos ambientales	40
Anexo C Procedimientos en el laboratorio	41
Anexo D Protocolos para el aislamiento y cuantificación de las bacterias.....	43
Anexo E Cálculos de dilución (segunda inoculación)	48

Resumen

El tomate (*Solanum lycopersicum* L) es considerada una de las hortalizas más importantes en todo el mundo. El objetivo de este fue evaluar cuatros métodos de inoculación para bacterias en el cultivo de tomate en condiciones de invernadero. Los métodos fueron punción, inyección, filtración y decapitación; y las bacterias inoculadas fueron *Xanthomonas* spp, *Ralstonia* spp y *Erwinia* spp. Se realizaron dos inoculaciones a los 59 y 73 días después de trasplante (DDT). El diseño experimental fue un Diseño Completo al azar (DCA) con arreglo factorial de 4 × 4 (4 métodos de inoculación y 3 bacterias fitopatógenas más el testigo), seis repeticiones para cada tratamiento y una unidad experimental por cada repetición. Las variables analizadas fueron: número de frutos no comerciales y frutos comerciales, y la altura de la planta. Se analizó la savia foliar para obtener su pH, conductividad eléctrica (CE) y el contenido de solidos solubles totales (SST, grados Brix). Además, se monitoreó las condiciones ambientales de temperatura y humedad relativa dentro del invernadero. En los tratamientos de decapitación e inyección con la bacteria del género *Xanthomonas* spp se evidencia un leve aumento de pH de la savia fuera del rango establecido, al igual que el tratamiento inyección + *Erwinia* spp. Mientras que los métodos de punción y filtración no mostraron un mayor efecto en las variables medidas, el género *Ralstonia* spp demostró poco impacto. El tratamiento decapitación junto con todos los géneros de bacteria, presentó un mayor efecto en el daño del fruto, siendo este método más invasivo para la inoculación de bacterias.

Palabras clave: bacterias fitopatógenas, interacción método-bacteria, métodos de inoculación, postulados de Koch.

Abstract

Tomato (Solanum lycopersicum L) is considered one of the most important vegetables in the world with high economic value. The objective of this study was to evaluate four inoculation methods for bacteria in tomato crops under greenhouse conditions. The methods were puncture, injection, filtration, and decapitation; and the inoculated bacteria were *Xanthomonas* spp, *Ralstonia* spp, and *Erwinia* spp. Two inoculations were performed at 59 and 73 days after transplantation (DAT). The experimental design was a Complete Random Design with a 4x4 factorial arrangement (4 inoculation methods and 3 phytopathogenic bacteria and the control), 6 repetitions for each treatment, and 1 experimental unit for each repetition. The variables analyzed in the impact of yield were non-commercial fruits, commercial fruits, and additionally the height of the plant. Leaf sap was analyzed to obtain its pH, electrical conductivity (EC), and total soluble solids content (TSS, degrees Brix). In addition, the environmental conditions of temperature and relative humidity inside the greenhouse were evaluated. In the decapitation and injection treatments with the bacteria *Xanthomonas* spp, a slight increase in the pH of the sap outside the established range is evident, as is the case with the injection + *Erwinia* spp treatment. While the puncture and filtration methods had no discernible bigger impact on the variables that were being assessed, *Ralstonia* spp. had a significant influence on them. The decapitation treatment together with all the bacteria genera, presents a greater effect on the damage of the fruit, being this method more invasive for the inoculation of bacteria.

Keywords: inoculation methods, Koch's postulates, method-bacteria interaction, phytopathogenic bacteria

Introducción

El tomate *Solanum lycopersicum* L. es considerada una de las hortalizas más importantes en todo el mundo. La especie está adaptada a climas cálidos, su crecimiento se detiene a temperaturas medias por debajo de 10 °C, y no tolera heladas ni condiciones de anegamiento del suelo. La importancia agrícola del cultivo es la gran adaptabilidad que posee para obtener elevadas producciones, tanto en climas tropicales como en templados (Santiago y Borrego 2016). El consumo de tomate ya sea fresco o transformado, aumenta a escala mundial. En Francia, el consumo de tomate fresco es de 13 kg/persona/año, alcanzando el consumo de productos transformados el equivalente a 22kg de tomate fresco. El rendimiento promedio de tomate en Honduras es de 31.6 t.h⁻¹, superado por Guatemala con 38.5 y México 43.3 t.h⁻¹(FAOSTAT 2017 como se citó en FHIA 2018). Se estima que el 30% de tomates producidos son transformados en productos comerciales como salsas, pulpa, concentrado, entre otros (Blancard et al. 2011).

Numerosas y devastadoras enfermedades son una fuerte amenaza para el cultivo y su rendimiento por hectárea, principalmente enfermedades de tipo bacteriana. Las bacterias fitopatógenas son microorganismos que causan enfermedades en plantas, estas son responsables de importantes pérdidas económicas en los cultivos de plantas leñosas, hortícolas y ornamentales (López 2010). 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 (Fernández y González 2017).

Entre las enfermedades más comunes tenemos *Ralstonia solanaceum*, causando marchitez bacteriana en muchos cultivos dando lugar a pérdidas económicas a nivel mundial. Este fitopatógeno se encuentra ampliamente distribuido en climas tropicales, sub-tropicales y templados, y se caracteriza por presentar un rango de hospederos extremadamente amplio. La familia *Solanaceae* es la más afectada por este tipo de bacterias, incluyendo además del tomate varios cultivos de

importancia económica como la papa, los pimientos, la berenjena y el tabaco (Armas 2017). La alta incidencia y severidad está relacionada con factores de alta temperatura y humedad. Se han informado pérdidas en un 29% en la producción de frutos frescos provenientes de los híbridos del tomate. La amplia gama de hospederos, su distribución y alta variabilidad, hacen difícil el manejo de esta enfermedad (González et al. 2009).

Otras de las enfermedades es la mancha bacteriana que es causada por bacterias del género *Xanthomonas* spp. Los cultivos hospederos de esta bacteria son principalmente tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y pimiento (*Capsicum annuum* L.) afectando los órganos aéreos de las plantas y causa manchas acuosas de color verde claro y forma irregular en las hojas, además puede llegar a presentar halo clorótico (Montelongo García 2012). Esta bacteria causa importantes pérdidas en la producción de tomate afectando la calidad y cantidad.

Las pérdidas de rendimiento en tomate alcanzan hasta un 66%, y esto puede deberse a la falta de control químico eficiente y cultivares resistentes comerciales (Sharma y Bhattarai 2019). La amplia variedad genética y la aparición de nuevas razas de este patógeno con nuevas adaptaciones que les permiten crecer a diferentes temperaturas y superar los genes de resistencia, suponen un desafío al momento de establecer un método de control efectivo (Adhikari P et al. 2020).

Además de *Ralstonia* spp y *Xanthomonas* spp; las bacterias del género *Erwinia* spp son de las bacterias más comúnmente observadas en frutos de tomate. Estas bacterias son responsables de podredumbres húmedas con evolución rápida, nauseabundas y a veces muy perjudiciales (Blancard et al. 2011). Puede sobrevivir como bacteria epífita en varias plantas o en el suelo en bajas densidades. También se ha encontrado en el intestino de insectos, propagándose probablemente, de este modo, de la vegetación en descomposición al cultivo en desarrollo (Blancard et al. 2011). De igual manera, se puede encontrar en patógenos secundarios en las plantas que están infectadas por otros patógenos (Lastres y Soza 2009).

En este sentido, es importante estudiar el ciclo epidemiológico de estas enfermedades bacterianas y así poder conocer su impacto en los diferentes cultivos, genotipos (variedades, híbridos), zonas, épocas y sistemas de producción hortícola. Inicialmente estas evaluaciones y diagnósticos de enfermedades se realizan bajo condiciones controladas en laboratorios y unidades experimentales tanto en invernaderos como en campo abierto haciendo diversos tipos de inoculaciones.

En inoculaciones artificiales, las bacterias suelen introducirse en las plantas por heridas, aerosoles aplicados con presión para imitar las lluvias llevadas por el viento, infiltración por vacío, o por inmersión de las semillas en el inóculo. (Vidaver y Lambrecht 2006). Las bacterias pueden inocularse mediante la aspersión de los órganos de la planta con una suspensión de células bacterianas. Es necesario saber ajustar la concentración en la suspensión de bacterias (Mondino 2012). El objetivo de este estudio fue evaluar el método más efectivo para la inoculación de bacterias fitopatógenas en el cultivo de tomate en condiciones de invernadero. De esta manera se logrará establecer el tratamiento más eficiente que podrá servir para futuras investigaciones experimentales para evaluar la resistencia de las nuevas variedades de tomate.

Materiales y Métodos

El estudio se llevó a cabo en el invernadero de Zona 3, y la etapa de laboratorio, fue realizada en el laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación Molecular de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, ubicada en el kilómetro 30 de la carretera Tegucigalpa-Danlí, Honduras. Ubicación y condiciones climáticas, es importante para delimitar el estudio.

Fase de Invernadero

Se utilizó la variedad de tomate Pony Express, ya que es una de las principales variedades cultivadas en la Escuela Agrícola Panamericana por la unidad de Olericultura.

Cultivo de Tomate en Invernadero

Manejo Hortícola y Preparación del Invernadero.

El manejo del cultivo inició el 7 de febrero del 2022. Se usó un semillero de 200 cavidades, con sustrato en la cual las semillas pasaron en un cuarto oscuro durante 3 días. Al pasar los 3 días, las plántulas se fueron cuidando con riego diario para mantener la humedad del sustrato. A los 12 días de edad de las plántulas se comenzó un plan de fertilización a través de riego por sumersión, ya que las plántulas aún se encontraban en la bandeja (Cuadro 1).

Cuadro 1

Dosificaciones De Fertilizantes Para Plántulas En Bandeja De 200 Alveolos, Para Tomate Híbrido Pony Express, Zona tres, Zamorano, Honduras

Aplicaciones DAT		Fecha	Fertilizantes/Dosificación			
			Biocat (mL)	Rootex (g)	Nitrato de Potasio (g)	Agua (L)
1ra	20 DAT	19/02 al 22/02	9	-	-	3
2da	16 DAT	28/02 al 03/03	-	10	20	5
3era	10 DAT	07/02 al 09/03	-	20	40	5
4ta	1 DAT	11/03 al 15/03	-	35	70	5

Nota. DAT indica días antes del trasplante.

Antes de realizar el trasplante se desinfectó el área, para evitar cualquier contaminación presente ya sea por algún virus, hongo o bacteria. En la desinfección se usaron 25 mL – 45 mL de cloro

por barril de 100lt de capacidad, y adicional Vydate (metil 2- (dimetilamino) - N - [(metilcarbamoil) oxil] - 2 - oxoethanimidothioate) es un pesticida carbamato que se recomienda para controlar nematodos, algunos masticadores e insectos chupadores como pulgones y trips (Helal y A Abo-El-Seoud 2015). Al haber transcurrido el tiempo de desinfección del área se procedió a realizar el trasplante, a su vez, empleando una fertilización orgánica para dar un fortalecimiento a las plantas.

El riego se mantuvo constante con una frecuencia de 5 minutos por la mañana y 5 minutos por la tarde. A los 10 días después del trasplante (DDT) se comenzó a hacer fertilizaciones inorgánicas (Cuadro 2), teniendo las plantas una altura de 20 – 25 cm. Se colocó un sensor de medición de condiciones ambientales de temperatura y humedad relativa, para tomar como referencia el ambiente dentro del invernadero, junto con el comportamiento de las plantas y las bacterias, para justificar como las condiciones ambientales podrían afectar durante el desarrollo del experimento. De igual manera, se preparó el tutorado holandés, que consiste en amarrar un hilo/cabuya en la parte basal de la planta, a medida que cada tallo va creciendo se va enrollando en el hilo vertical que sirve de soporte y que, normalmente, cuelga de un alambre sujeto a una estructura (Salas 2002).

Cuando el cultivo tuvo 36 DDT se procedió hacer la práctica de poda de hojas bajas, esta técnica balancea el crecimiento vegetativo y el generativo de la planta, optimizando el número y tamaño de los frutos, dependiendo de la variedad, las condiciones climáticas, el estado de desarrollo de las plantas y el vigor de las mismas (Ubaque 2004). De igual forma la práctica permite una mejor aireación y evita proliferación de enfermedades, asegurándonos de llevar un buen manejo hasta la fecha de la primera inoculación.

Cuadro 2*Dosificaciones Del Plan De Fertilizaciones Inorgánicas Y Orgánicas, Para Tomate Híbrido Pony**Express, Zona tres, Zamorano, Honduras*

Fertilizantes	Aplicaciones/Dosificación								
	1 DDT	10 DDT	14 DDT	17 DDT	21 DDT	24 DDT	31 DDT	38 DDT	45 DDT
Caolinita	200g	-	-	-	-	-	-	-	-
Trichoderma	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fosfato mono potásico	-	113 g	-	30 g	-	30 g	-	30 g	-
Nitrato de potasio	-	-	30 g	-	30g	-	30 g	-	30 g
Nitrato de calcio	-	-	-	100 g	-	40 g	-	40 g	.
Sulfato de potasio	-	35 g	-	30 g	-	50 g	-	50 g	-
Sulfato de magnesio	-	-	30 g	-	30g	-	30 g	-	-
Urea	-	-	20 g	20 g	40g	-	-	-	-
Codamin	-	-	20 mL	-	20 mL				
Melaza	10 mL	25 mL	20 mL						
Acidos fúlvicos (Cator)	10 mL	25 mL	20 mL						
Acidos húmicos (Biocat)	10 mL	25 mL	20 mL						
Agua	15 L	25 L	25 L	25 L	25 L	25 L	25 L	25 L	25 L

Nota. DDT indica días después del trasplante

Fase Laboratorio***Ampliación de la Fuente de Bacterias***

Las muestras de los géneros fitopatógenos fueron obtenidas de un banco de bacterias del Laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación Molecular. Se preparó el medio de cultivo de agar nutriente (AN) para las bacterias del género *Erwinia* spp. y *Ralstonia* spp. Por otro lado, para el género de bacterias *Xanthomonas* spp se preparó medio de cultivo YDC (levadura-dextrosa-carbonato de calcio-agar). Ya que, las colonias son mucoides y convexas, son de color amarillo cuando se desarrollan en este medio de agar no selectivo llamado YDC, gracias al pigmento xanthomonadin que contiene bromo, y la mayoría de ellas crecen muy lentamente (Peña Rodríguez 2017).

Antes de proceder el aislamiento se desinfectó la cámara de flujo laminar con alcohol al 70%. La siembra en los medios de cultivos, se empleó la técnica de estría por agotamiento, esta técnica se utiliza para aislar microorganismos, por eso en los últimos trazos quedan colonias aisladas, de las que con cuidado se puede tomar una, para realizar un cultivo puro (Fernández et al. 2021) . Con respecto a la técnica de siembra, se utilizó el medio de cultivo en placa de Petri, asas bacteriológicas y una muestra de las bacterias, y una vez finalizado este proceso se selló la placa de Petri y se incubaron durante 24 – 72 horas a 37 °C.

Después de obtener el medio de unidades formadoras de colonias aisladas, se preparó los medios de cultivos líquidos a base de agar LB (Luria Broth), ya que, su posición prominente en el campo de la biología molecular, LB también se ha utilizado como un propósito general medio de cultivo bacteriano para una variedad de organismos facultativos.

Nuevamente se desinfectó el área de trabajo para la inoculación en medio líquido. Con los cultivos de las placas de Petri, se tomó una muestra de una colonia que se encuentre aislada con el asa bacteriológica esterilizada, así de esta manera, se introdujo el asa en el medio líquido mientras se realizó leves movimientos con el asa para asegurar que la colonia se inoculó en el medio líquido. Una vez culminado todo el proceso, se llevó a incubación en agitador orbital a 150 rpm por 72 horas.

Posteriormente, los medios fueron llevados a la cámara de flujo laminar donde se llenó cada medio de cultivo de los diferentes géneros en tubos de Falcon de 50 mL de capacidad, llevándolos a centrifugación por 10 minutos a 1000rpm así se obtuvo un pellet de cada solución, se unificó los pellets en un solo tubo de Falcon marcados con su respectivo género de bacteria, y se realizó diluciones de la muestra madre en tubos de PCR con capacidad de 1.5 mL, las diluciones se realizaron con una relación 10^{-1} hasta 10^{-5} , dando paso a la cuantificación de las bacterias.

La cuantificación de bacterias se puede realizar con varios métodos o instrumentos, desde los más costosos hasta los más comunes. Algunos ejemplos son el método visual de la escala de McFarland y la técnica de cuantificación mediante un espectrofotómetro. En esta ocasión, se utilizó la

técnica de recuento microscópico la cual se caracteriza por ser rápida y poco costosa ya que utiliza un equipamiento fácilmente disponible en un laboratorio de microbiología. Para estos recuentos se utilizan generalmente cámaras de recuentos (Ramírez et al. 2017). El conteo de las células bacterianas se utilizó la cámara de Neubauer o hemocitómetro. La cámara de recuento es un aparato de precisión hecho de vidrio óptico especial. Se utiliza para contar células u otras partículas en suspensiones bajo el microscopio. Las cámaras de recuento se utilizan principalmente para contar bacterias, células como espermatozoides o leucocitos y esporas de hongos (Sánchez et al. 2017).

Se siguió el protocolo para el conteo de células con el hemocitómetro (cámara de Neubauer), empleando el cálculo manual se usó la siguiente fórmula para determinar la densidad de células en las bacterias *Erwinia* spp (Figura 1), *Ralstonia* spp (Figura 2) y *Xanthomonas* spp (Figura 3). Como de igual manera otros estudios han utilizado para el conteo de células, como esporas, algas y bacterias (Godoy Sosa 2018)

$$Densidad\ de\ células = \frac{Suma = 18\ cuadros\ pequeños\ contados}{18}$$

$$= \frac{Total * Factor\ de\ dilución}{0.000004ml} = \frac{cells}{ml} \quad [1]$$

Conteo de bacterias:

Figura 1

Erwinia spp = Factor de dilución 10^2

13				13
	11		11	
		14		
	12		15	
12				11

10				13
	11		11	
		13		
	6		12	
9				12

Total de células = 209

$$\text{Densidad de células} = \frac{209}{18} = \frac{11.6\hat{1} * 2}{0.000004\text{ml}} = 5' 805 566 \frac{\text{cells}}{\text{ml}} = 5 * 10^6 \text{ cells/ml} [2]$$

Figura 2

Ralstonia spp = Factor de dilución 10^3

66				75
	61		61	
		63		
	77		65	
67				68

78				89
	77		94	
		86		
	95		85	
93				90

Total de células = 1390

$$\text{Densidad de células} = \frac{1390}{18} = \frac{77.2\hat{2} * 3}{0.000004\text{ml}} = 57' 916 667 \frac{\text{cells}}{\text{ml}} = 5 * 10^7 \frac{\text{cells}}{\text{ml}} [3]$$

Figura 3

Xanthomonas spp = Factor de dilución 10^2

88				89
	82		83	
		89		
	96		93	
102				95

90				91
	96		86	
		91		
	85		102	
98				88

Total de células = 1644

$$\text{Densidad de células} = \frac{1644}{18} = \frac{91.3 \times 2}{0.000004 \text{ ml}} = 45' 666 667 \frac{\text{cells}}{\text{ml}} = 4 * 10^7 \text{ cells/ml [4]}$$

Fase Inoculación

Se realizaron dos inoculaciones a los 59 y 73 DDT. Los métodos para inoculación realizados fueron de punción que consistió en realizar 4 punzadas en el tallo de la planta. Para el método de inyección se utilizó una jeringa para inyectar la planta en tallo de igual manera. Por otro lado, en decapitación se realizó corte transversal en una de las guías de crecimiento de la planta, siendo la solución de bacterias suministrada por medio de la herida. Y en el caso del método de filtración, la solución bacteriana fue aplicada en el sustrato directamente. Cada uno tenía un volumen específico por bacteria de acuerdo con los cálculos realizados previamente.

Inoculación de Bacterias Fitopatógenas

En el presente ensayo, las inoculaciones fueron realizadas a las 8 semanas de germinación y 12 semanas después del trasplante (DDT), contrario a lo que estipula (Chellemi et al. 1994) en su investigación, en la cual las plántulas fueron inoculadas a las cuatro semanas de germinación. Por otro lado, en esta misma investigación la concentración utilizada fue de 5.0×10^8 , mientras que en el presente ensayo se utilizó una concentración de inóculo de 1×10^6 . Por lo tanto, una concentración de inóculo muy baja para una edad avanzada de la plántula no causa efecto notorio durante la observación de síntomas de 14 días. Se procedió a realizar una segunda inoculación a las 14 semanas de edad de las plantas siendo 10 semanas DDT. Con la intención de reforzar las bacterias ya presentes en la planta, se aplicó una segunda dosis de concentración de inóculo de 1×10^6 .

Comprobación de la Presencia del Patógeno en las Plantas Inoculadas

Se extrajeron partes de la planta para comprobar la existencia de los patógenos mediante una práctica experimental basada en los postulados de Koch.

Se recolectaron muestras de hojas jóvenes de 2 plantas al azar de las 6 unidades experimentales existentes por tratamiento. De esta forma, se aislaron 4 explantes por cada planta y fueron colocadas en placas de Petri en medio agar nutriente. El procedimiento para la identificación de la presencia de las bacterias se llevó a cabo dentro de la cámara de flujo laminar.

En las muestras de las hojas recolectadas se realizó cortes de aproximadamente de 0,5mm, con 8 explantes en total por cada bacteria de los diferentes métodos. Cada explante fue colocado en un beaker de agua destilada estéril durante 3 minutos, luego, se pasó al beaker con contenido de hipoclorito al 3% por 5 minutos para desinfectar cualquier agente contaminante, una vez transcurrido el tiempo, se pasó los explantes al otro envase de agua destilada estéril por 2 minutos, realizando un lavado de las muestras. Cada explante se colocó en el papel filtro estéril, para absorber la humedad. Luego se colocaron 4 explantes en placas de Petri en forma de cruz, cada explante distanciado 3 mm a 5 mm uno del otro. Finalmente se sellaron y rotularon las placas de Petri, el sellado se realizó con cinta de parafina. Finalizado el procedimiento, cada placa de Petri se llevó a la incubadora a 28 °C, durante 24 horas a 48 horas.

El tiempo transcurrido, y al observar el crecimiento de las bacterias alrededor de los explantes, se realizó el aislamiento usando la técnica de estría por agotamiento en placas de Petri con agar nutriente, llevadas a incubación por 24 horas – 48 horas con temperatura de 37 °C. Con el objetivo de identificar las bacterias a nivel de género, y de esta manera comprobar la presencia de las bacterias se pueden usar los métodos de tinción de Gram, prueba de catalasa y KOH. En este ensayo se utilizó la prueba de catalasa, que consiste su función en la enzima catalasa se encuentra presente en muchos microorganismos aeróbicos. La catalasa descompone el peróxido de hidrógeno, dando lugar a la formación de oxígeno molecular (Garcés et al. 1996).

Condiciones Ambientales Monitoreadas en Invernadero luego de la Inoculación

Con el registrador de datos HOBO U23 Pro v2 se obtuvieron datos de temperatura en °C y humedad relativa en porcentaje. Se estableció la relación de las condiciones ambientales que presentó

el invernadero con respecto al desarrollo de las bacterias en el cultivo de tomate, de esta manera, permitió sustentar si el ambiente fue favorable para los distintos géneros de bacterias.

Variables Evaluadas

Análisis de Savia Foliar

A los 80 días después de trasplante (DDT) y a los 21 días después de la inoculación con las bacterias se tomaron muestras de hojas intermedias de cada una de las unidades experimentales, obteniendo un total de 96 muestras para el análisis de savia. Con la ayuda de un mortero y un pistilo, se trituraron las hojas para conseguir la savia, y posteriormente fue analizada para obtener datos. Se colocaron de 2 a 3 gotas de savia en el conductímetro (CE) LAQUATwin medida en mS/cm, 2 gotas en el pH-metro (pH) LAQUATwin y de 2 gotas en un refractómetro digital HI 96801® para medir los °Brix (SST).

Número en Frutos Comerciales

La recolecta de datos de número de frutos fue tomada cada 7 días. El primer registro fue realizado a los 52 DDT, 7 días antes de la primera inoculación. Posteriormente, se realizó la toma de datos a los 59 DDT y 66 DDT. Finalmente, los últimos dos registros de datos fueron tomados después de la segunda inoculación correspondiente a los 73 DDT y a los 80 DDT. Con el fin de realizar la toma de datos, se podó todos los frutos que presentaron algún daño, mientras los que se encontraron sanos se mantuvieron en la planta, tanto los que empezaron a formarse como los que estaban ya formados, de esta manera se obtuvo el registro de frutos totales siendo la suma de número de frutos dañados más frutos que no presentaron daño. mientras que en la variable de altura se utilizó un metro para medir desde la base de la planta hasta su parte apical.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se empleó un diseño completamente al azar (DCA), con un arreglo factorial de 4 x 4 (4 métodos de inoculación y 3 bacterias fitopatógenas más el testigo. Se dispusieron 6 repeticiones para

cada tratamiento y 1 unidad experimental por cada repetición (Cuadro 3). Se utilizó la prueba de separación de medias de Duncan para medir el efecto del comportamiento de los tratamientos con los días y el método de mínimos cuadrados para evaluar la interacción de los métodos de inoculación con las diferentes bacterias evaluadas. Los datos fueron analizados mediante el análisis de datos en SAS® 9.4.

Cuadro 3

Distribución Del Ensayo De Métodos De Inoculación De Bacterias En El Cultivo de Tomate Bajo

Condiciones De Invernadero, Zona tres, Zamorano, Honduras

Punción	Inyección	Filtración	Decapitación
C	C	C	C
C	C	C	C
C	C	C	C
X	X	X	X
X	X	X	X
X	X	X	X
X	X	X	X
X	X	X	X
X	X	X	X
X	X	X	X
X	X	X	X
R	R	R	R
R	R	R	R
R	R	R	R
R	R	R	R
R	R	R	R
R	R	R	R
R	R	R	R
R	R	R	R
E	E	E	E
E	E	E	E
E	E	E	E
E	E	E	E
E	E	E	E
E	E	E	E
E	E	E	E
C	C	C	C
C	C	C	C
C	C	C	C

Nota. X: Xanthomonas spp., R: Ralstonia spp., E: Erwinia spp., C: Control spp.

Resultados y Discusión

Registro de Condiciones de Temperatura (°C) y Humedad Relativa (%) con Inoculaciones de las Bacterias en el Cultivo de Tomate Bajo Condiciones de Invernadero

Las Figuras 4 y 5 muestran los datos de las condiciones ambientales recolectadas del sensor HOBO U23 Pro v2 en promedio de cada semana durante el tiempo de inoculación, siendo factible para el desarrollo de ciertos géneros de bacterias.

Figura 4

Registro de la Temperatura (°C) del Invernadero, Zona Tres, Zamorano, Honduras Durante los Días Después de la Inoculación entre abril 28 y mayo 26 del 2022

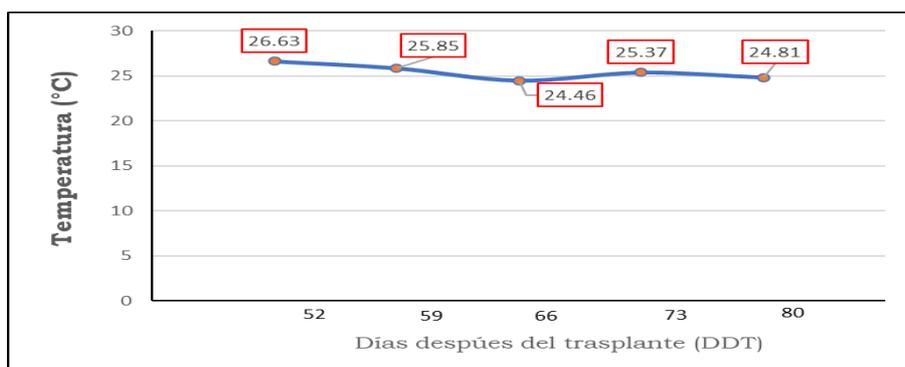
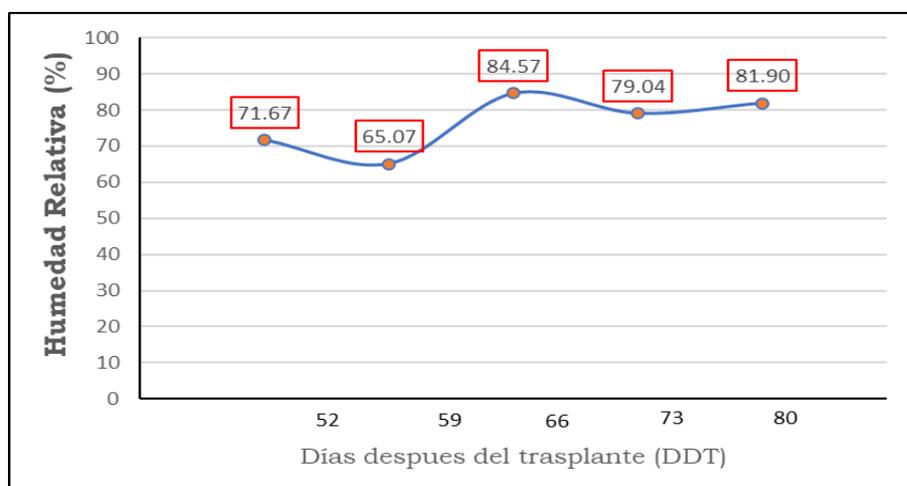


Figura 5

Registro de Humedad Relativa (%) del Invernadero, Zona tres, Zamorano, Honduras entre abril 28 y mayo 26 del 2022



La temperatura dentro del invernadero en promedio osciló entre 24.46 y 26.63 °C durante cinco semanas de la investigación, mientras que la humedad relativa contó con promedios entre 65.07 y 84.57%. De esta manera se relacionó las condiciones ambientes como un ambiente propicio para las bacterias de cada género.

Según Torres (2022) el género de *Xanthomonas* spp se desarrolla a temperaturas de 25 °C a una humedad relativa cercana o superior al 80%, siendo factibles las condiciones presentadas dentro del invernadero, como se observa en el (Cuadro 4) este género presentó diferencia en cuanto al control en el análisis de la savia foliar, demostrando que la planta presentó un agente fitopatógeno. Para el género de *Ralstonia* spp según Cho H et al. (2020) la temperatura ideal es de 29-35 °C, y con una humedad relativa mayor a 70%. A pesar de que, tuvo una condición de humedad relativa favorable esta estuvo en una forma latente, estando de manera epífita en la planta como se puede observar en el (Cuadro 3) expresándose en poca severidad, cuando las condiciones ideales lo permitían (Alvarado et al. 2013). Por último, en el género de *Erwinia* spp a partir de temperaturas mayores de 22 °C es favorecido el crecimiento, y una elevada humedad relativa como se presenta en el gráfico, siendo óptimo su propagación según (Marcelo Correa et al. 2017).

Efecto de los Métodos de Inoculación de las Bacterias en la Altura del Cultivo de Tomate Bajo

Condiciones de Invernadero

El Cuadro 4, muestra los resultados en cuanto a altura obtenido en el día 52 DDT y 80 DDT. Estos no muestran una diferencia significativa entre sus valores por lo que el crecimiento se mantuvo constante.

Cuadro 4

Efecto De Los Métodos De Inoculación De Las Bacterias En La Altura Medida En Centímetros (Cm) Del Cultivo De Tomate Bajo Condiciones De Invernadero, Zona tres, Zamorano, Honduras a los 52 y 80 días después del trasplante (DDT)

Método de inoculación	Bacterias	52 DDT	80 DDT
Punción	Control	104.29	128.29
	<i>Xanthomonas</i>	102.17	124.78
	<i>Ralstonia</i>	95.17	116.28
	<i>Erwinia</i>	101.50	126.11
Inyección	Control	95.29	120.71
	<i>Xanthomonas</i>	95.33	128.28
	<i>Ralstonia</i>	86.17	116.61
	<i>Erwinia</i>	95.00	114.11
Filtración	Control	94.71	117.29
	<i>Xanthomonas</i>	91.84	119.78
	<i>Ralstonia</i>	100.34	122.95
	<i>Erwinia</i>	104.67	127.11
Decapitación	Control	83.57	120.00
	<i>Xanthomonas</i>	88.84	118.57
	<i>Ralstonia</i>	98.33	136.95
	<i>Erwinia</i>	91.34	119.61
Probabilidad		0.1939	0.5560
C.V. %		13.87	12.78
R ²		0.76	0.70

Nota. DDT: días después de trasplante

La altura es un factor que no fue afectado ya que la probabilidad nos indica que esta variable no cumple una tendencia en cuanto a un efecto sobre esta. Esto se puede atribuir a las condiciones ambientales dentro del invernadero, promoviendo un mejor desarrollo metabólico en la planta.

Estos resultados concuerdan con FHIA 2014 (Ávila 2014) ya que en su informe anual reportan que la altura de variedad Pony Express 71 DDT fue de 101cm en condiciones de campo, mientras que en el presente ensayo la altura 77 DDT llegó hasta los 136.08 cm bajo las condiciones de invernadero.

Efecto de las Bacterias en el Número de Frutos Comerciales y Frutos No Comerciales

Se realizó el análisis del número de los frutos comerciales (Cuadro 5) y no comerciales (Cuadro 6) con la finalidad de evaluar el efecto que tuvieron los distintos métodos de inoculación de las bacterias fitopatógenas en la producción de frutos de tomate. Los resultados muestran que existen

diferencia significativa a medida que pasaron las semanas de toma de datos, con un aumento gradual. Según Urquia (2007) en su proyecto de investigación con relación a la producción de frutos en el cultivo de tomate bajo condiciones de invernadero las plantas produjeron alrededor de 35 frutos. Acorde a los datos del cuadro 4 se muestra en el método de decapitación hubo un gran efecto con la producción de, siendo un número mínimo de frutos comerciales. Mientras que las plantas control al no haber sido afectada por alguna bacteria o método mantuvieron una producción constante con promedios entre 28 y 33 frutos producidos.

Cuadro 5

Efecto De Los Métodos De Inoculación Bacterias En El Número De Frutos Comerciales En El Cultivo De Tomate Bajo Condiciones De Invernadero, Zona tres, Zamorano, Honduras a los 52 y 80 días después del trasplante (DDT)

Método de inoculación	Bacterias	52 DDT	80 DDT
Punción	Control	17.00 ^{de}	32.43 ^{ab}
	<i>Xanthomonas</i>	18.82 ^{cde}	32.59 ^{ab}
	<i>Ralstonia</i>	16.32 ^{de}	26.42 ^{bcd}
	<i>Erwinia</i>	19.99 ^{bcd}	23.92 ^{cde}
Inyección	Control	19.99 ^{bcd}	33.43 ^{ab}
	<i>Xanthomonas</i>	19.86 ^{de}	18.76 ^{efg}
	<i>Ralstonia</i>	14.99 ^e	23.09 ^{cdefg}
	<i>Erwinia</i>	23.15 ^{abc}	19.09 ^{efg}
Filtración	Control	23.57 ^{ab}	30.86 ^{ab}
	<i>Xanthomonas</i>	25.65 ^a	21.26 ^{defg}
	<i>Ralstonia</i>	17.15 ^{de}	18.76 ^{efg}
	<i>Erwinia</i>	23.65 ^{ab}	22.92 ^{cdefg}
Decapitación	Control	15.86 ^{de}	28.14 ^{abc}
	<i>Xanthomonas</i>	14.49 ^{ef}	16.76 ^g
	<i>Ralstonia</i>	10.15 ^f	17.92 ^{efg}
	<i>Erwinia</i>	22.15 ^{abc}	16.92 ^{fg}
Probabilidad		<.0001	<.0001
C.V. %		21.06	22.26
R ²		0.57	0.60

Nota. ^{a-g}: Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas (P<0.05). DDT: días después de trasplante

Cuadro 6

Efecto De Los Métodos De Inoculación De Las Bacterias En El Número De Frutos No Comerciales En El Cultivo De Tomate Bajo Condiciones De Invernadero, Zona tres, Zamorano, Honduras a los 52 80 días después del trasplante (DDT)

Método de inoculación	Bacterias	52 DDT	80 DDT
Punción	Control	3.14 ^d	13.73 ^{cd}
	<i>Xanthomonas</i>	3.20 ^d	15.07 ^{abcd}
	<i>Ralstonia</i>	3.36 ^d	14.07 ^{bcd}
	<i>Erwinia</i>	4.03 ^d	14.57 ^{bcd}
Inyección	Control	4.14 ^d	14.74 ^{bcd}
	<i>Xanthomonas</i>	7.70 ^a	16.29 ^{abc}
	<i>Ralstonia</i>	6.87 ^a	16.29 ^{abc}
	<i>Erwinia</i>	5.53 ^{bc}	16.74 ^{abc}
Filtración	Control	3.71 ^d	14.40 ^{bcd}
	<i>Xanthomonas</i>	3.70 ^d	16.00 ^{abcd}
	<i>Ralstonia</i>	3.86 ^d	16.07 ^{abcd}
	<i>Erwinia</i>	4.20 ^d	15.90 ^{abcd}
Decapitación	Control	4.29 ^{cd}	13.07 ^d
	<i>Xanthomonas</i>	6.53 ^{ab}	16.90 ^{ab}
	<i>Ralstonia</i>	7.53 ^a	16.74 ^{abc}
	<i>Erwinia</i>	6.86 ^a	17.71 ^a
Probabilidad		<.0001	0.0599
C.V. %		24.49	17.14
R ²		0.71	0.80

Nota. ^{a-d}: Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas (P<0.05). DDT: días después de trasplante.

Los resultados presentados reflejan que el método de decapitación juntos con las 3 bacterias, muestran los valores más elevados en cuanto a daño de frutos sobre los otros métodos. Esto concuerda con López-Vázquez et al. (2016) en su investigación respecto al cultivo de caña de azúcar en donde menciona que el método de inoculación por decapitado registró la incidencia de 6.87% con diferencias significativas respecto a otros métodos, superando el método de inyección de 3.6 %. Por otro lado, el método de punción registra los valores más bajo en daño de frutos. Y en cuanto a los

testigos, mantuvieron un rango alrededor de 13-14.7, en estos la pérdida de frutos fue leve ya que el cultivo no se encontraba inoculado.

Efecto De Los Métodos De Las Bacterias En El Rendimiento Con Base Al Porcentaje De Frutos

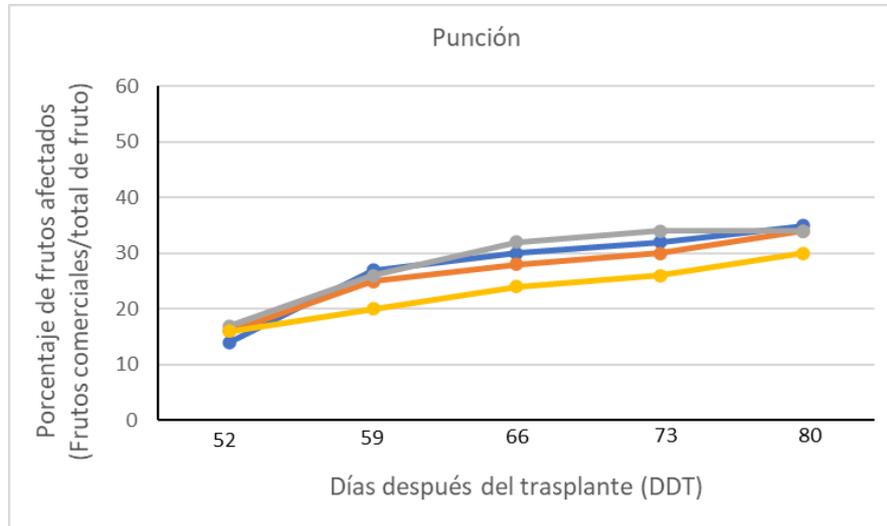
Afectados

El rendimiento en el cultivo de tomate con base al porcentaje de frutos afectados a través de 5 semanas como se puede observar en las siguientes Figuras 6, 7, 8 y 9. El efecto en el rendimiento del fruto en el cultivo de tomate se ve reflejado más en los métodos de inoculación de inyección (Figura 7) por la facilitación de la translocación de las bacterias en los haces vasculares de la planta y el método de decapitación (Figura 9) al ser el más invasivo, ya que, la planta recibió un corte siendo de igual manera la fácil translocación de las bacterias, debido a que estos métodos otorgaron un rápido desarrollo de las bacterias dentro de la planta, las figuras representan el efecto para tomar en cuenta la incidencia y severidad de las bacterias fitopatógenas, siendo de esta manera respaldado por la complicación que se presentó de observación de síntomas en el cultivo por los agentes externos que presentaron el estudio.

El método de punción (Figura 6) no se ve un gran efecto debido a que fueron solo pequeñas punzadas, y no fue tan invasivo como los antes mencionados, mientras que para el método de filtración (figura 8) es semejante al comportamiento del método de punción, este pudo ser afectado por el drenaje de las bolsas con sustrato, por los tiempos de riego, siendo un gran requerimiento de fuentes hídricas para la etapa del cultivo. Cabe mencionar que, en los métodos de punción y filtración, el rendimiento en el cultivo fue afectado por el plan de manejo hortícola de fertilización que se suprimió una semana antes de la inoculación. Mientras que, para los métodos de inyección y decapitación, resultó un mayor efecto ocasionando a la planta más susceptibilidad.

Figura 6

Efecto Del Método De Punción En Las Bacterias Fitopatógenas Con Base En El Porcentaje De Frutos Afectados Del Cultivo De Tomate Inoculado, Zona tres, Zamorano, Honduras

**Figura 7**

Efecto Del Método De Inyección En Las Bacterias Fitopatógenas Con Base En El Porcentaje De Frutos Afectados Del Cultivo De Tomate Inoculado, Zona tres, Zamorano, Honduras

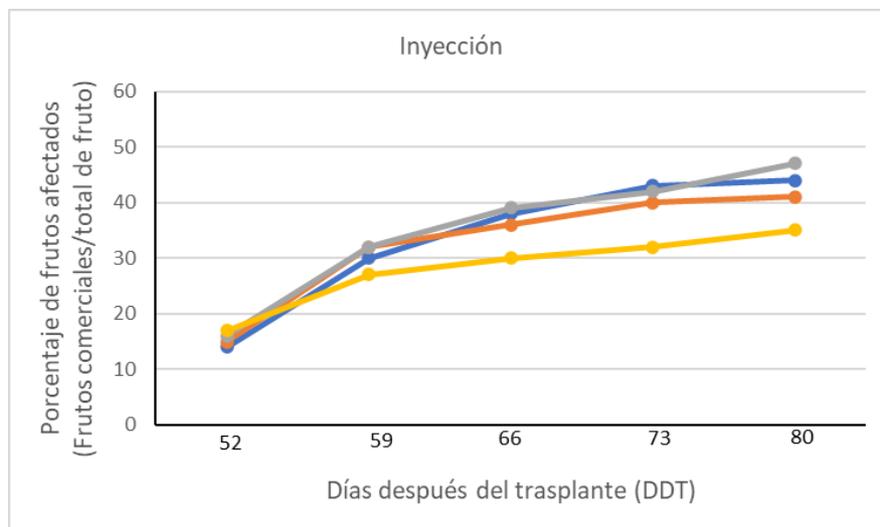
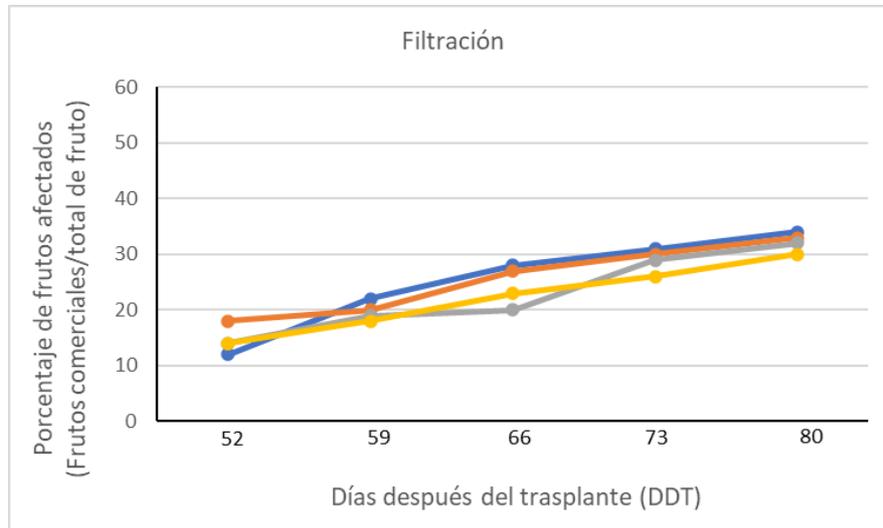
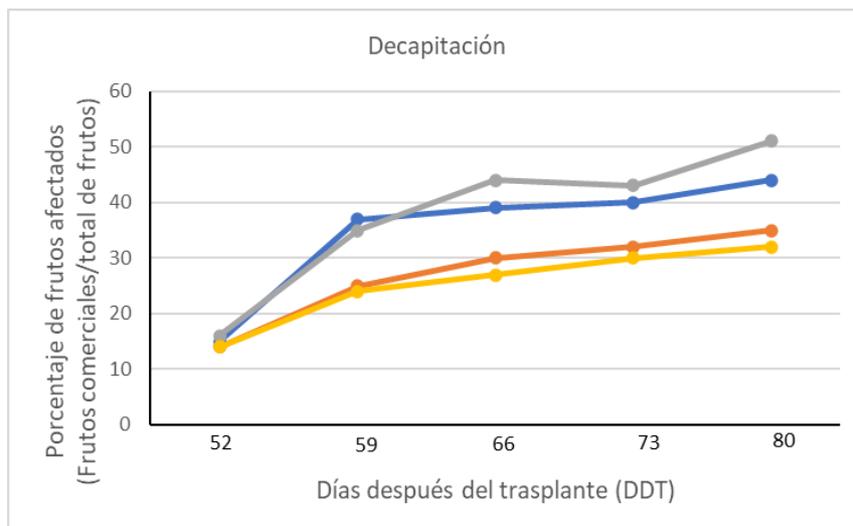


Figura 8

Efecto Del Método De Filtración En Las Bacterias Fitopatógenas Con Base En El Porcentaje De Frutos Afectados Del Cultivo De Tomate Inoculado, Zona tres, Zamorano, Honduras

**Figura 9**

Efecto Del Método De Decapitación En Las Bacterias Fitopatógenas Con Base En El Porcentaje De Frutos Afectados Del Cultivo De Tomate Inoculado, Zona tres, Zamorano, Honduras



Análisis De Savia Foliar

El análisis de savia foliar permitió establecer la relación de los métodos de inoculación con las distintas bacterias fitopatógenos con las variables de pH, conductividad eléctrica y grados Brix.

Cuadro 7

Efecto De Los Métodos De Inoculación De Las Bacterias En El Análisis De Savia Foliar De Las Hojas De Plantas De Tomate En Las Variables De pH, Conductividad Eléctrica Y °Brix (SST), Zona tres, Zamorano, Honduras

Método de inoculación	Bacterias	pH	Conductividad eléctrica	°Brix
Punción	Control	5.74 ^{defg}	5.53 ^{ab}	14.09 ^b
	<i>Xanthomonas</i>	6.02 ^{bcdef}	6.09 ^a	11.02 ^{def}
	<i>Ralstonia</i>	5.55 ^g	5.15 ^{abc}	12.74 ^{bc}
	<i>Erwinia</i>	5.65 ^{fg}	4.96 ^{bcd}	14.32 ^b
Inyección	Control	5.73 ^{efg}	5.82 ^{ab}	13.93 ^b
	<i>Xanthomonas</i>	6.35 ^{bc}	4.31 ^{cde}	9.24 ^{fg}
	<i>Ralstonia</i>	5.82 ^{defg}	5.23 ^{abc}	14.24 ^b
Filtración	<i>Erwinia</i>	6.45 ^b	3.94 ^e	9.94 ^{defg}
	Control	5.73 ^{efg}	5.75 ^{ab}	13.86 ^b
	<i>Xanthomonas</i>	6.17 ^{bcde}	4.00 ^{de}	10.55 ^{defg}
	<i>Ralstonia</i>	5.98 ^{cdefg}	4.48 ^{cde}	11.55 ^{cd}
Decapitación	<i>Erwinia</i>	5.60 ^{fg}	4.36 ^{cde}	11.37 ^{cde}
	Control	5.67 ^{fg}	5.97 ^a	13.69 ^b
	<i>Xanthomonas</i>	6.20 ^{bcd}	3.68 ^e	9.57 ^{efg}
	<i>Ralstonia</i>	5.88 ^{cdefg}	4.57 ^{cde}	17.35 ^a
	<i>Erwinia</i>	7.00 ^a	2.66 ^f	8.75 ^g
Probabilidad		<.0001	<.0001	<.0001
C.V. %		6.71	17.43	13.28
R ²		0.5359	0.6272	0.7259

Nota. ^{a-g}: Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas (P<0.05).

De acuerdo con Cadahía López (1964) en su investigación indica que el pH de la savia del cultivo de tomate oscila entre 4,8 - 6. En los resultados presentados, se observó que los tratamientos en lo que se utilizó la bacteria del género *Xanthomonas* spp se evidencia un leve aumento de pH fuera del rango establecido, al igual que el tratamiento inyección + *Erwinia* spp que son estadísticamente iguales. Mientras que el tratamiento con las bacterias de género *Erwinia* spp inoculado por el método

de decapitación resultó en un aumento del pH siendo estadísticamente diferentes a los demás resultados. Un pH entre 6 – 7.5 es óptimo para el crecimiento de bacterias del género *Xanthomonas spp* (Esgalhado et al. 1995), por lo que, al encontrarse en su medio ideal, su presencia en la savia resultó más evidente. Según Shahbaz et al. 2007 mencionan en su estudio que algunas especies del género *Erwinia spp* prefieren un pH ligeramente alcalino para su crecimiento entre 7-8.

Según Bote Paniagua (2019) indica que los “valores por debajo de 12 mS/cm nos indica que la planta no se encuentra correctamente fertilizada y por encima de 15 mS/cm nos está indicando una sobre fertilización.” Contrario a lo que establece la literatura, en los resultados presentados, todos los valores de conductividad eléctrica fueron inferiores a 12 mS/cm. Como fue explicado en la metodología, el manejo hortícola empezó desde 1 DAT hasta 45 DDT, siendo este suspendido en su totalidad 8 días antes de la fecha de la primera inoculación. Por otro lado, según Pérez et al. (1998) comenta que la necrosis apical en tomate está relacionada con una disminución en la absorción y translocación del Ca, por lo que la CE baja dificulta de igual manera la absorción de nutrientes por la planta.

Según Syrový y Prasad (2010), los grados brix representan la sanidad de una planta, estableciendo rangos de excelente estado del cultivo de la familia de las Solanáceas en grados brix de la savia alrededor de 14%, mientras que para un estado promedio son alrededor de 8-10%. Como en los resultados se observaron que en el género de *Xanthomonas spp* y *Erwinia spp*, con los métodos de inoculación de inyección y decapitación, la planta en su savia representa tener un desbalance, debido a que ciertos factores están afectando su porcentaje de grados brix, de esta manera, se asume a la presencia de estos géneros que se encuentra en la planta, pero debido a su concentración de inoculación, no hubo una gran expresión como efecto para presenciar los síntomas de estas bacterias.

Postulados de Koch

En la práctica experimental basada en los postulados de Koch, empleados para poder validar la existencia de un microorganismo y una enfermedad. Siendo posible re aislar las bacterias,

evidenciando la presencia de estas en la planta. En la posterior prueba de catalasa, se encontró que las placas de Petri donde se encontraron aisladas las bacterias de género *Erwinia* spp y *Xanthomonas* spp, resultaron ser catalasa positiva. Estos resultados concuerdan con lo establecido en el libro de Identificación de bacterias fitopatógenas (Garcés et al. 1996), en las que se menciona que las bacterias de género *Erwinia* spp y *Xanthomonas* spp son Gram negativas y su reacción a la catalasa es positiva.

De igual manera *Ralstonia* spp mostraron ser catalasa positiva al presentar formación de burbuja. En la investigación de Fornos Blanco et al. (2021) comprobó que estas bacterias presentan reacciones positivas a la prueba de catalasa.

Conclusión

El tratamiento decapitación demostró ser el método más efectivo de inoculación para las bacterias de *Erwinia* spp, *Ralstonia* spp y *Xanthomonas* spp. ya que, en la muestra de los frutos no comerciales este método tuvo un mayor efecto en el daño del fruto, siendo este el más invasivo en el cultivo de tomate.

Recomendaciones

Emplear en futuras investigaciones una concentración de inóculo de 1×10^8 – 1×10^9 , acorde a la etapa fenológica en que se encuentre el cultivo.

Aplicar los tratamientos estudiados en diferentes variedades de tomate para comprobar la eficiencia del método de inoculación por decapitación.

Se recomienda utilizar otros métodos de inoculación para bacterias, como la aspersión con aerosoles para imitar la lluvia llevada por el viento, la inmersión de la semilla o inmersión de las raíces en la concentración del inóculo en distintas variedades de tomate.

Realizar investigaciones a edades tempranas del cultivo, utilizando diferentes bacterias fitopatógenas y distintos métodos de inoculación observando un efecto anticipado de la inoculación.

Referencias

- Adhikari P, Adhikari TB, Louws FJ, Panthee DR. 2020. Advances and challenges in bacterial spot resistance breeding in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *International Journal of Molecular Sciences*. 21(5):1734.
- Alvarado A, Edgar, Rueda-Puente 2. 2013. Detección de *Ralstonia solanacearum* *Solanum tuberosum* L. en el Estado de Sonora, México. *FCA UNCUYO*. 45(2):29–45. <http://www.scielo.org.ar/pdf/refca/v45n2/v45n2a03.pdf>.
- Armas S de. jul. 2017. Desarrollo de ensayos *in vitro* para evaluar resistencia a *Ralstonia solanacearum* en germoplasma de papa [Tesis]. Uruguay: Universidad de la República Uruguay; [consultado el 2 de jul. de 2022]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/19147/1/uy24-18710.pdf>.
- Ávila G. 2014. Comportamiento agronómico de 32 cultivares de tomate saladete y 10 de bola cultivados de diciembre a abril en el CEDEH-FHIA, valle de Comayagua, Honduras.
- Blancard D, Laterrot H, Marcheoux G, Candresse T. 2011. Enfermedades del tomate: Identificar, conocer, controlar. 2ª ed. [sin lugar]: Ediciones Mundi-Prensa. ISBN: 9788484764274. <http://repositorio.dl-e.es/viewer.vm?id=0000042977.pdf>.
- Bote Paniagua JA. 2019. La savia como índice de fertilización. España: Fertibox. https://www.google.com/search?q=Jose+Abel+B.P.+24+mar+2019+La+savia+como+%C3%ADndice+de+fertilizaci%C3%B3n&sxsrf=ALiCzsagR2MDdUnIsXGWmoLE5iaQNfzSg%3A1655366133965&source=hp&ei=9eGqYui2N9zmkvQPqsWz0AI&iflsig=AJiK0e8AAAAAYqrwBUgjcq7EbVZvz6La6Gju683fujQs&ved=0ahUKEwiOhYqv7H4AhVcs4QIHariDCoQ4dUDCac&uact=5&aq=Jose+Abel+B.P.+24+mar+2019+La+savia+como+%C3%ADndice+de+fertilizaci%C3%B3n&gs_lcp=Cgdnd3Mtd2l6EAMyBAgjECdQAFgAYN0CaABwAHgAgAH7AYgB-wGSAQMyLTGYAQCgAQKgAQE&sclient=gws-wiz.
- Cadahía López C. 1964. El análisis de savia como índice de fertilización para las plantas de tomate. [sin lugar]: ProQuest (vol. 33940). ISBN: 1369347545.
- Chellemi DO, Dankers HA, Olson SM, Hodge NC, Scott JW. 1994. Evaluating bacterial wilt-resistant tomato genotypes using a regional approach. *JASHS*. 119(2):325–329. en_US. <https://journals.ashs.org/jashs/view/journals/jashs/119/2/article-p325.xml>. doi:10.21273/JASHS.119.2.325.
- Cho H, Song E-S, Heu S, Baek J, Lee YK, Lee S, Lee S-W, Park DS, Lee T-H, Kim J-G, et al., editores. 2020. Plant disease management in the post-genomic: Prediction of host-specific genes by pan-genome analyses of the Korean. [sin lugar]: Frontiers Media SA (vol. 10). ISBN: 2889635600. eng.
- Esgalhado M, Roseiro J, Collaço M. 1995. Interactive effects of pH and temperature on cell growth and polymer production by *Xanthomonas campestris*. *Process Biochemistry*. 30(7):667–671. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0032959294000441>. doi:10.1016/0032-9592(94)00044-1.
- Fernández, González 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.

- Fernández G, Perrotta L, Gil MA. 2021. Trabajo práctico de laboratorio N°4 medios de cultivo: Formulación y preparación para el aislamiento de microorganismos [Guía de trabajo]. Argentina: Universidad Nacional de San Luis; [consultado el 10 de ago. de 2022].
- [FHIA] Fundación Hondureña de Investigación Agrícola. 2018. Programa de Hortalizas: Informe Técnico 2017. La Lima, Cortés: FHIA ; [consultado el 10 de ago. de 2022]. http://www.fhia.org.hn/descargas/informes_tecnicos/inf_Programa_de_Hortalizas-2017.pdf.
- Fornos Blanco JA, Rivera Mora JC, Sánchez Gómez IE, Monzón Centeno AJ, Ramírez Reynoza DJ. 2021. Razas, biovares y mecanismos de resistencia de aislados de *Ralstonia solanacearum* en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Nicaragua. La Calera. 21(37):100–105. es. <https://www.lamjol.info/index.php/calera/article/view/12821>. doi:10.5377/calera.v21i37.12821.
- Garcés E, Coba de Gutierrez B, Castillo O. NI. 1996. Identificación de bacterias fitopatógenas. 1ª ed. Colombia: Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Ciencias - Departamento de Biología (Facultad de Ciencias). ISBN: 9586281280. spa. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/53386>.
- Godoy Sosa MF. 2018. Resistencia sistémica inducida para el control de *Pestalotia* sp. y *Colletotrichum* sp. en fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) por medio de tres agentes de control biológico [Tesis]. Honduras: Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana.
- González I, Arias Y, Peteira B. 2009. Interacción planta-bacterias fitopatógenas: Caso de estudio *Ralstonia Solanacearum* - plantas hospedante. Revista de Protección Vegetal. 24:69–80.
- Helal I, A Abo-El-Seoud M. 2015. Fungal biodegradation of pesticide vydate in soil and aquatic system. ESRSA. 2015:87–94. https://www.researchgate.net/profile/ismail-helal/publication/324221863_fungal_biodegradation_of_pesticide_vydate_in_soil_and_aquatic_system.
- Lastres L, Soza F. 2009. Sanidad Vegetal. [sin lugar]: [sin editorial] ; [consultado el 10 de ago. de 2022]. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/6fe3d270-db9e-451d-8970-17000fd29bdd/content>.
- López MM. 2010. Bacterias fitopatógenas exóticas y emergentes: riesgos de introducción y diseminación en España. Phytoma España. (222):76–80. es. <http://redivia.gva.es/handle/20.500.11939/7497>.
- López-Vázquez JJ, Valdez-Balero A, Silva-Rojas HV, Flores-Revilla C, Rangel-Ortega CA. 2016. Evaluación de tres métodos de inoculación de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, en caña de azúcar (*Saccharum* spp.). AGROProductividad. 9(7):62–68.
- Marcelo Correa A, Ordóñez-Vásquez A, Trespalcios AA, Suárez-Obando F. 2017. Inhibición del crecimiento de *Erwinia chrysanthemi* a diferentes concentraciones de ácido fólico: posible uso del ácido fólico como agente bacteriostático y fortificante de la papa *Solanum tuberosum*. Universidad y Salud. 19(1):140–148. <https://doi.org/10.22267/rus.171901.77>.
- Mondino P. 2012. Métodos de inoculación. [sin lugar]. 10 p. http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursometodosfito/08-Metodos_inoculacion_Cuantif_inoculo.pdf.
- Montelongo García MJ. 2012. Caracterización de *Xanthomonas* spp. causantes de la mancha bacteriana del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Uruguay [Tesis]. Uruguay: Universidad de la República Uruguay; [consultado el 10 de ago. de 2022]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/9793/1/0139mon.pdf>.

- Peña Rodríguez MdR. 2017. Caracterización bioquímica, microbiológica, molecular y estudios fenotípicos de *Xanthomonas campestris* M2044, con fines biotecnológicos [Tesis]. Venezuela: Universidad de Los Andes, VE. spa. <https://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/3017989>.
- Pérez P, A. Durán, J. A. Franco. 1998. Calcio para corregir la necrosis apical en tomate. España: [sin editorial] (vol. 126). https://www.researchgate.net/profile/j-franco/publication/28274879_calcio_para_corregir_la_necrosis_apical_en_tomate.
- Ramírez J, Parra J, Alvarez Aldana A. 2017. Análisis de técnicas de recuento de microorganismos. *Mente Joven*. 6:1–8. es. https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/mente_joven/article/view/3665. doi:10.18041/2323-0312/mente_joven.0.2017.3665.
- Salas M. 2002. Densidades de plantación, poda y entutorado en cultivo de tomate protegido: Informe sobre la industria hortícola. *Extra*. 1(1):98–108. https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/101142/mod_resource/content/0/cherry_HortInt.pdf.
- Sánchez MC, Vergara V, Polo LD, Álvarez Aldana A. 2017. Primer acercamiento del estudiante de microbiología a las técnicas de recuento en superficie, profundidad y cámara De Neubauer. *Universidad Libre*. 6:71–76. spa. <http://repository.unilibre.edu.co/handle/10901/17612>.
- Santiago J, Borrego F. 2016. Evaluación de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) en invernadero: criterios fenológicos y fisiológicos. 1. 9(1):59. es. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/24633>. doi:10.15517/am.v9i1.24633.
- Shahbaz TS, M U Ghazanfar, M N Tahir. 2007. Physiology of *erwinias* associated with black leg of potato. *Agri Sci*. 44(2):259–265. https://www.researchgate.net/profile/shahbaz-sahi/publication/267992709_physiology_of_erwinias_associated_with_black_leg_of_potato.
- Sharma S, Bhattarai K. 2019. Progress in developing bacterial spot resistance in tomato. *Agronomy*. 9(1):26.
- Syrový L, Prasad R. 2010. Brix manipulation for reducing pest pressure: Literature Review. ES Cropconsult Ltd.
- Torres A. 2022. Producción de brotes meristemáticos en bajas concentraciones de citocininas para la propagación in vitro de tomate, *Solanum lycopersicum*. [sin lugar]: La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2022. spa. <https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/7538>.
- Ubaque HW. 2004. Buenas prácticas agrícolas en sistemas de producción de tomate bajo invernadero. Bogotá: Editorial UTADEO. 36 p. ISBN: 9789589029718. es.
- Urquia L. 2007. Proyecto: Producción de tomates utilizando tecnología de invernadero en el municipio de Cane, departamento de La Paz, para ser comercializados en los supermercados del Distrito Central de Honduras (marco teórico, estudio de mercado, estudio técnico) [Tesis]. Honduras: Universidad Nacional Autónoma de Honduras; [consultado el 10 de ago. de 2022]. <https://tzibalnaah.unah.edu.hn/xmlui/bitstream/handle/123456789/5950/T-MFep00030.pdf?sequence=2>.
- Vidaver AK, Lambrecht PA. 2006. Las bacterias como patógenos vegetales. *PHI*. 10. doi:10.1094/PHI-I-2006-0601-01.

Anexos

Anexo A

Manejo hortícola y preparación del invernadero

Nota. Manejo hortícola de fertilización por sumersión y desarrollo del crecimiento de las plántulas



Nota. Preparación del área de la investigación antes del trasplante



Nota. Primeras dosificaciones del plan de fertilización y tutorado de las plantas



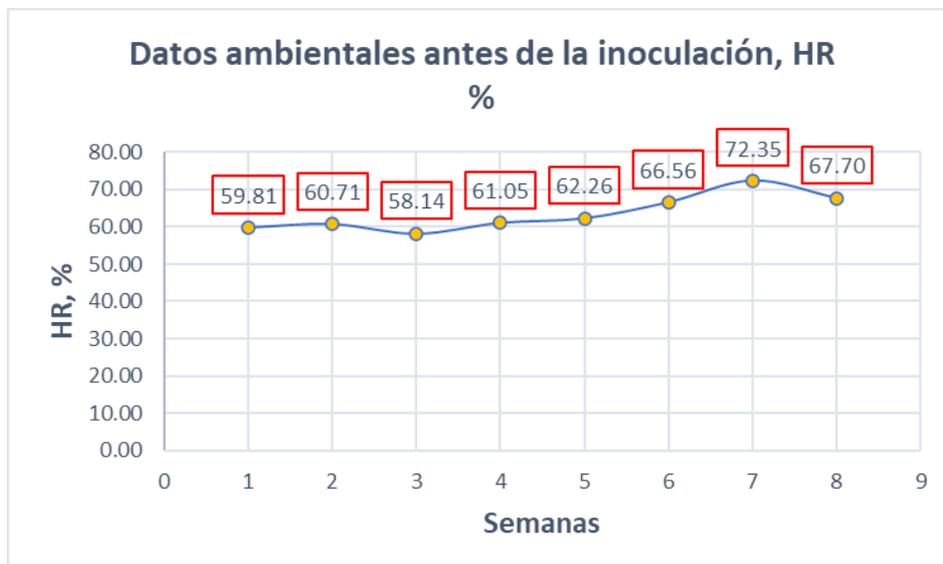
Nota. Manejo hortícola de poda de hojas bajas y brote de primeras flores

Anexo B

Datos ambientales



Nota. Datos ambientales de temperatura °C y HR del invernadero, día antes de las inoculaciones



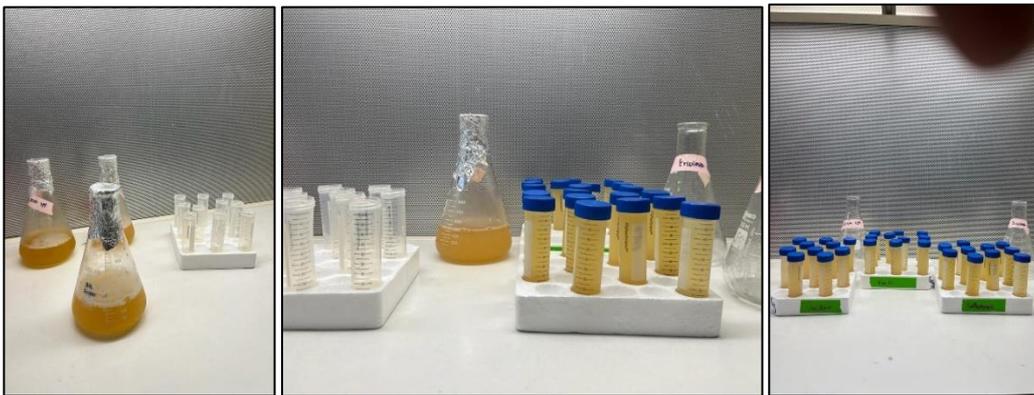
Nota. Datos ambientales de temperatura °C y HR del invernadero, día antes de las inoculaciones

Anexo C

Procedimientos en el laboratorio



Nota. Incubación en órbita del medio líquido Luria Broth a 150 rpm durante 3 días (aproximadamente 72hr)



Nota. Llenado del medio líquido Luria Broth en tubos de Falcon



Nota. Centrifugación de los tubos de Falcon a 1000 rpm por 10min para obtención de pellets bacterianos



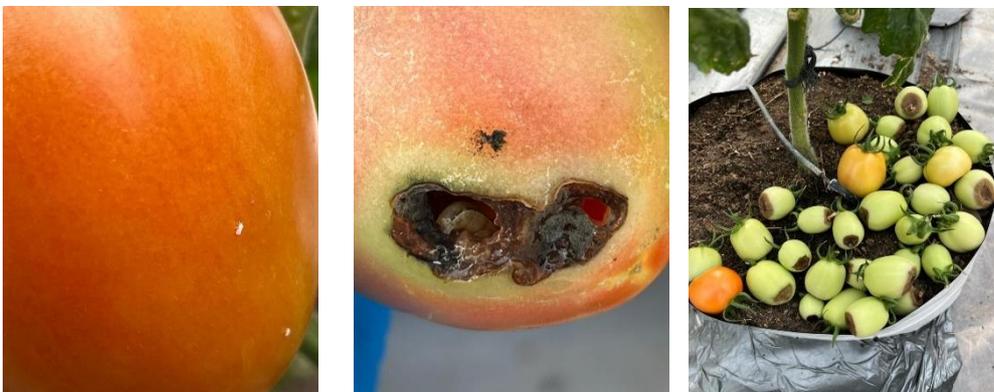
Nota. Dilución de solución madre, posterior para la cuantificación de bacterias por medio del uso de un hemocitómetro



Nota. Preparación y diluciones de muestras para la primera inoculación



Nota. Inoculación de los diferentes géneros de bacterias por cada método de inoculación



Nota. Frutos afectados por otros agentes causales mosca blanca, mascarilla u deficiencia

Anexo D

Protocolos para el aislamiento y cuantificación de las bacterias

La preparación del medio de agar nutriente se procedió con los siguientes pasos:

1. Pesar 23g de agar agar nutriente
2. Añadir ~980 mL de agua destilada
3. Hervir para disolver
4. Autoclavar

Preparación para el medio de cultivo YDC sólido (levadura-dextrosa-carbonato de calcio-agar):

1. Aforar 935 mL de agua destilada
2. Pesar 10 g de extracto de levadura
3. Pesar 20 g de carbonato de calcio
4. Pesar 20 g de dextrosa
5. Añadir 15 g de bacto-agar
6. Remover
7. Autoclavar

Nota: Al plaquear agitar constantemente, para evitar que se sedimente el carbonato de calcio.

La preparación para la inoculación en medio líquido de LB, se la realizó a base de:

1. Pesar 7.5 g de LB (Luria Broth)
2. Añadir ≈500 mL de agua destilada
3. Remover
4. Autoclavar

Nota: No se utilizó agar, debido a que nuestro medio es líquido y se requería evitar la solidificación.

Protocolo para el conteo de células con el hemocitómetro:

1. Preparar los materiales: microscopio, cubreobjetos, pipetas y muestras de la suspensión del cultivo.
2. Tomar el hemocitómetro y colocar un cubreobjetos en la parte superior, colocar 10 μL de la suspensión celular.
3. Introducir las muestras con cuidado en los 2 espacios entre el cubreobjetos y el hemocitómetro (a muestra subirá a la cámara por capilaridad)
4. Ir al microscopio, observar el primer cuadrado grande y orientarse hacia los pequeños del centro (ver con 10x y luego en 40x)
5. Elegir qué celdas se van a contar dependiendo del tamaño de células. Siendo la cuantificación en forma "X", contando un total de 9 cuadros por cada espacio del hemocitómetro. Se tomó en cuenta los siguientes datos: número de células vivas, número de células muertas, número de cuadrados contados, volumen inicial (mL), factor de dilución y contar si los cuadros contados fueron los grandes o los pequeños.

Cálculos para cantidades de inóculo por cada método:

$$V_1 C_1 = V_2 C_2$$

$$V_1 = \frac{V_2 C_2}{C_1}$$

$$V_1 + H_2O = ?$$

Método de filtración

Erwinia spp

$$V_1 = \frac{108 \text{ ml} * (1 * 10^6)}{(5 * 10^6)} = 21.6 \text{ ml de Solución madre}$$

$$108 \text{ ml} - 21.6 \text{ ml} = 86.4 \text{ ml } H_2O \text{ destilada}$$

$$V_1 + H_2O \text{ destilada} = 21.6 \text{ ml} + 86.4 \text{ ml} = 108 \text{ ml}$$

Ralstonia spp

$$V_1 + H_2O \text{ destilada} = 2.16 \text{ ml solución madre} + 105.84 \text{ ml} = 108 \text{ ml}$$

Xanthomonas spp

$$V_1 + H_2O \text{ destilada} = 2.7 \text{ ml solución madre} + 105.3 \text{ ml} = 108 \text{ ml}$$

Método de inyección y decapitación

Erwinia spp

$$V_1 + H_2O \text{ destilada} = 1.2 \text{ ml solución madre} + 4.8 \text{ ml} = 6 \text{ ml}$$

Ralstonia spp

$$V_1 + H_2O \text{ destilada} = 0.12 \text{ ml solución madre} + 5.88 \text{ ml} = 6 \text{ ml}$$

Xanthomonas spp

$$V_1 + H_2O \text{ destilada} = 0.15 \text{ ml solución madre} + 5.85 \text{ ml} = 6 \text{ ml}$$

Método de punción: A diferencia de la concentración de los métodos anteriores, para este caso, se usó una suspensión del tubo de Falcon de la solución madre, porque se requirió de una solución mínima de la punta de la herramienta. Se realizó alrededor de 4 punciones por cada una experimental.

El conteo de las bacterias, y los cálculos de las diluciones para la segunda inoculación fueron los siguientes datos.

Conteo de bacterias:

Erwinia spp: Factor de dilución 10^2

16				21
	20		13	
		16		
	22		15	
15				21

15				18
	14		18	
		23		
	20		17	
13				15

Total de células = 312

$$\text{Densidad de células} = \frac{312}{18} = \frac{17.3 * 2}{0.000004 \text{ ml}} = 8'666'666 \frac{\text{cells}}{\text{ml}} = 8 * 10^6 \text{ cells/ml}$$

Ralstonia spp: Factor de dilución 10^3

45				60
	53		63	
		44		
	51		47	
64				61

52				54
	47		70	
		49		
	60		41	
59				56

Total de células = 976

$$\text{Densidad de células} = \frac{976}{18} = \frac{54.2 * 3}{0.000004 \text{ml}} = 40'666\,666 \frac{\text{cells}}{\text{ml}} = 4 * 10^7 \text{ cells/ml}$$

Xanthomonas spp: Factor de dilución 10^3

20				19
	29		30	
		43		
	31		40	
38				38

38				24
	40		41	
		48		
	39		46	
37				36

Total de células = 637

$$\text{Densidad de células} = \frac{637}{18} = \frac{39.38 * 3}{0.000004 \text{ml}} = 26'541\,666 \frac{\text{cells}}{\text{ml}} = 2 * 10^7 \text{ cells/ml}$$

Método de filtración:

Erwinia spp:

$$V_1 + H_2O \text{ destilada} = 13.5 \text{ ml solución madre} + 94.5 \text{ ml} = 108 \text{ ml}$$

Ralstonia spp:

$$V_1 + H_2O \text{ destilada} = 2.7 \text{ ml solución madre} + 105.3 \text{ ml} = 108 \text{ ml}$$

Xanthomonas spp

$$V_1 + H_2O \text{ destilada} = 5.4 \text{ ml solución madre} + 102.6 \text{ ml} = 108 \text{ ml}$$

Método de inyección y filtración

Erwinia spp

$$V_1 + H_2O \text{ destilada} = 0.75 \text{ ml solución madre} + 5.25 \text{ ml} = 6 \text{ ml}$$

Ralstonia spp

$$V_1 + H_2O \text{ destilada} = 0.15 \text{ ml solución madre} + 5.85 \text{ ml} = 6 \text{ ml}$$

Xanthomonas spp

$$V_1 + H_2O \text{ destilada} = 0.3 \text{ ml solución madre} + 5.7 \text{ ml} = 6 \text{ ml}$$

Ralstonia spp

$$V_1 = \frac{108 \text{ ml} * (1 * 10^6)}{(5 * 10^7)} = 2.16 \text{ ml de Solución madre}$$

$$108 \text{ ml} - 2.16 \text{ ml} = 105.84 \text{ ml } H_2O \text{ destilada}$$

$$V_1 + H_2O \text{ destilada} = 2.16 \text{ ml} + 105.84 \text{ ml} = 108 \text{ ml}$$

Xanthomonas spp

$$V_1 = \frac{108 \text{ ml} * (1 * 10^6)}{(4 * 10^7)} = 2.7 \text{ ml de Solución madre}$$

$$108 \text{ ml} - 2.7 \text{ ml} = 105.3 \text{ ml } H_2O \text{ destilada}$$

$$V_1 + H_2O \text{ destilada} = 2.7 \text{ ml} + 105.3 \text{ ml} = 108 \text{ ml}$$

Método de inyección y decapitación

Erwinia spp

$$V_1 = \frac{6 \text{ ml} * (1 * 10^6)}{(5 * 10^6)} = 1.2 \text{ ml de Solución madre}$$

$$6 \text{ ml} - 1.2 \text{ ml} = 4.8 \text{ ml } H_2O \text{ destilada}$$

$$V_1 + H_2O \text{ destilada} = 1.2 \text{ ml} + 4.8 \text{ ml} = 6 \text{ ml}$$

Ralstonia spp

$$V_1 = \frac{6 \text{ ml} * (1 * 10^6)}{(5 * 10^7)} = 0.12 \text{ ml de Solución madre}$$

$$6 \text{ ml} - 0.12 \text{ ml} = 5.88 \text{ ml } H_2O \text{ destilada}$$

$$V_1 + H_2O \text{ destilada} = 0.12 \text{ ml} + 5.88 \text{ ml} = 6 \text{ ml}$$

Xanthomonas spp

$$V_1 = \frac{6 \text{ ml} * (1 * 10^6)}{(4 * 10^7)} = 0.15 \text{ ml de Solución madre}$$

$$6 \text{ ml} - 0.15 \text{ ml} = 5.85 \text{ ml } H_2O \text{ destilada}$$

$$V_1 + H_2O \text{ destilada} = 0.15 \text{ ml} + 5.85 \text{ ml} = 6 \text{ ml}$$

Anexo E

Cálculos de dilución (segunda inoculación)

Método de filtración:

Erwinia spp:

$$V_1 = \frac{108 \text{ ml} * (1 * 10^6)}{(8 * 10^6)} = 13.5 \text{ ml de Solución madre}$$

$$108 \text{ ml} - 13.5 \text{ ml} = 94.5 \text{ ml } H_2O \text{ destilada}$$

$$V_1 + H_2O \text{ destilada} = 13.5 \text{ ml} + 94.5 \text{ ml} = 108 \text{ ml}$$

Ralstonia spp:

$$V_1 = \frac{108 \text{ ml} * (1 * 10^6)}{(4 * 10^7)} = 2.7 \text{ ml de Solución madre}$$

$$108 \text{ ml} - 2.7 \text{ ml} = 105.3 \text{ ml } H_2O \text{ destilada}$$

$$V_1 + H_2O \text{ destilada} = 2.7 \text{ ml} + 105.3 \text{ ml} = 108 \text{ ml}$$

Xanthomonas spp

$$V_1 = \frac{108 \text{ ml} * (1 * 10^6)}{(2 * 10^7)} = 5.4 \text{ ml de Solución madre}$$

$$108 \text{ ml} - 5.4 \text{ ml} = 102.6 \text{ ml } H_2O \text{ destilada}$$

$$V_1 + H_2O \text{ destilada} = 5.4 \text{ ml} + 102.6 \text{ ml} = 108 \text{ ml}$$

Método de inyección y filtración

Erwinia spp

$$V_1 = \frac{6 \text{ ml} * (1 * 10^6)}{(8 * 10^6)} = 0.75 \text{ ml de Solución madre}$$

$$6 \text{ ml} - 1.2 \text{ ml} = 5.25 \text{ ml } H_2O \text{ destilada}$$

$$V_1 + H_2O \text{ destilada} = 0.75 \text{ ml} + 5.25 \text{ ml} = 6 \text{ ml}$$

Ralstonia spp

$$V_1 = \frac{6 \text{ ml} * (1 * 10^6)}{(4 * 10^7)} = 0.15 \text{ ml de Solución madre}$$

$$6 \text{ ml} - 1.2 \text{ ml} = 5.85 \text{ ml } H_2O \text{ destilada}$$

$$V_1 + H_2O \text{ destilada} = 0.15 \text{ ml} + 5.85 \text{ ml} = 6 \text{ ml}$$

Xanthomonas spp

$$V_1 = \frac{6\text{ml} * (1 * 10^6)}{(2 * 10^7)} = 0.3 \text{ ml de Solución madre}$$

$$6 \text{ ml} - 1.2 \text{ ml} = 5.7 \text{ ml } H_2O \text{ destilada}$$

$$V_1 + H_2O \text{ destilada} = 0.3 \text{ ml} + 5.7 \text{ ml} = 6 \text{ ml}$$