



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

**“EFECTO DE EXTRACTOS VEGETALES SOBRE
BACTERIAS CAUSANTES DE MARCHITEZ EN
JITOMATE”**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

Presenta:

SUSANA GARCÍA GONZÁLEZ

Bajo la supervisión de: Dr. Dimas Mejía Sánchez



APROBADA



Chapingo, Estado de México, junio de 2022

**"EFECTO DE EXTRACTOS VEGETALES SOBRE BACTERIAS CAUSANTES
DE MARCHITEZ EN JITOMATE".**

Tesis realizada por Susana García González, bajo la supervisión del comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

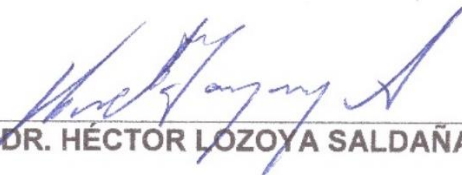
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:



DR. DIMAS MEJÍA SÁNCHEZ

ASESOR:



DR. HÉCTOR LOZOYA SALDAÑA

ASESOR:



M.C. LUIS EMILIO CASTILLO MÁRQUEZ

CONTENIDO

CONTENIDO	I
LISTA DE CUADROS	II
LISTA DE FIGURAS	III
ABREVIATURAS USADAS	IV
DEDICATORIAS	V
AGRADECIMIENTOS	VI
DATOS BIOGRÁFICOS	VII
RESUMEN GENERAL	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo general	2
1.2 Objetivos particulares	2
1.3 Hipótesis	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Generalidades del cultivo de jitomate	4
2.2 Botánica y taxonomía del jitomate	4
2.3 Manejo de bacterias fitopatógenas en el cultivo de jitomate	5
2.4 Marchitez bacteriana del jitomate	6
2.4.1 <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	6
2.4.2 <i>Ralstonia solanacearum</i> raza 1	9
2.5 Manejo de la marchitez bacteriana del jitomate	10
2.6 Productos vegetales en el manejo de la marchitez bacteriana del jitomate	11
2.7 Literatura citada	17
CAPÍTULO 1. EFECTO DE EXTRACTOS VEGETALES CONTRA <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> y <i>Ralstonia solanacearum</i> raza 1	24
CAPÍTULO 2. EVALUACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES Y DE LA ASOCIACIÓN DE CULTIVOS SOBRE LA MARCHITEZ BACTERIANA DEL JITOMATE	46

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Metabolitos secundarios extraídos con diferentes solventes.....	12
Cuadro 2. Aceites esenciales probados <i>in vitro</i> contra <i>R. solanacearum</i> raza 1	15
Cuadro 3. Mezcla de reacción para la amplificación del gen que codifica el ARN 16S bacteriano empleando los iniciadores 8F y 1492 R.	31
Cuadro 4. Tratamientos para la evaluación de extractos vegetales aplicados al suelo en el manejo de marchitez bacteriana en jitomate.	34
Cuadro 5. Diámetro de inhibición (mm) de distintos extractos vegetales sobre bacterias fitopatógenas al cabo de 24 y 48 horas de incubación.....	38
Cuadro 6. Tratamientos para la evaluación de extractos vegetales aplicados vía foliar en el manejo de marchitez bacteriana en jitomate.	53
Cuadro 7. Tratamientos para la evaluación de extractos vegetales aplicados al suelo en el manejo de marchitez bacteriana en jitomate.	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aislamientos de agentes causales de marchitez en jitomate	35
Figura 2. Reproducción de síntomas de marchitez..	36
Figura 3. Electroforesis de productos de PCR	37
Figura 4. Inhibición agentes causales de marchitez en jitomate como efecto del aceite esencial de orégano después de 48 horas de incubación.....	39

ABREVIATURAS USADAS

Cmm. Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*

Pal. Pseudomonas amygdali pv. *lachrymans*

Psa. Pseudomonas syringae pv. *apii*

Rsr1. Ralstonia solanacearum raza 1

DEDICATORIAS

A mis padres, Ma. Aurora González Ramos y Pedro García Villalpando.

A mis hermanos, María del Rocío, Magdalena, Fátima Anahí y Pedro Javier.

A mis amigos.

A todos los trabajadores del campo mexicano.

En espera de que éste trabajo sea un aporte para la mejora de los procesos productivos y uso óptimo de los recursos naturales.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la Universidad Autónoma Chapingo por otórgame los recursos económicos y humanos para la realización de este proyecto de investigación. Este trabajo tiene el propósito de contribuir a los PRONACES, principalmente a la búsqueda de Soberanía Alimentaria y Conservación del Medio Ambiente.

A la Coordinación General de Posgrado de la Universidad Autónoma Chapingo.

A la Coordinación de la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, en especial al M. C. Antonio Segura Miranda[†], por todo el apoyo profesional y emocional brindado durante mi estancia en la maestría y para la conclusión del presente trabajo y a la C. Maribel Espejel Cervantes.

A mis asesores de tesis: Dr. Dimas Mejía Sánchez, M.C. Antonio Segura Miranda[†], M.C. María de Lourdes Rodríguez Mejía, Dr. Héctor Lozoya Saldaña y M.C. Luis Emilio Castillo Márquez.

A mis profesores y compañeros de la Maestría.

A los laboratoristas Adrián y Poli, por el apoyo brindado.

A mi familia, que siempre ha estado para mí y por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi recorrido profesional.

A mis amigos, que fueron un apoyo fundamental en el proceso de la maestría.

DATOS BIOGRÁFICOS

Nombre: Susana García González

Fecha de nacimiento: 15 de abril de 1994

Lugar de nacimiento: Aguascalientes, Aguascalientes

Profesión: Ing. en Agroecología

Cédula profesional: 11003541

Desarrollo académico.

Preparatoria Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. 2009 – 2012.

Ingeniería en Agroecología: Universidad Autónoma Chapingo. 2012 – 2016.

Maestría en Ciencias en Protección Vegetal. Universidad Autónoma Chapingo. 2020 – 2022.

RESUMEN GENERAL

EFFECTO DE EXTRACTOS VEGETALES SOBRE BACTERIAS CAUSANTES DE MARCHITEZ EN JITOMATE ¹

Una de las enfermedades más devastadoras en el cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*) es la marchitez bacteriana ocasionada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Ralstonia solanacearum* raza 1. El manejo de esta enfermedad está basado principalmente en prácticas preventivas pues una vez en el área de producción su manejo es complicado por la falta de medidas curativas. Como alternativa frente a la generación de resistencia y a la vez segura para el ambiente, el potencial de recursos vegetales se ha comenzado a explorar. Con el fin de testear el efecto de la aplicación de extractos vegetales *in vitro* y en invernadero y de la asociación del cultivo con plantas conocidas por la producción de compuestos orgánicos con propiedades antibacterianas en el presente trabajo se evaluó *in vitro* el efecto inhibitorio de extractos etanólicos, hexánicos y acuosos de romero (*Rosmarinus officinalis*), orégano (*Origanum vulgare*), albahaca (*Ocimum basilicum*), ruda (*Ruta graveolens*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y hierba blanca (*Walteria americana*) sobre ambas bacterias. En invernadero se evaluó el efecto de la aplicación de los extractos al suelo y vía foliar, previo y posterior a la inoculación artificial para ambas bacterias; además del efecto de la asociación con plantas de romero, orégano, albahaca y ruda sobre la severidad en plantas de jitomate inoculadas artificialmente para ambas bacterias. Se empleó aceite esencial de orégano al 100 y 10% como control positivo para las pruebas *in vitro* y bajo invernadero respectivamente y agua como control negativo. Se corroboró el efecto inhibitorio del aceite esencial de orégano contra ambas bacterias *in vitro*. Bajo las condiciones experimentales del presente trabajo ninguno de los extractos ni asociaciones evaluadas redujo significativamente la severidad de la enfermedad bajo invernadero.

Palabras clave. *Solanum lycopersicum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Ralstonia solanacearum* raza 1, extractos vegetales, compuestos orgánicos

¹ Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Susana García González
Director de Tesis: Dimas Mejía Sánchez

ABSTRACT

EFFECT OF VEGETABLE EXTRACTS AGAINST BACTERIA CAUSING WILT ON TOMATO²

One of the most devastating diseases affecting tomato production (*Solanum lycopersicum*) is bacterial wilt caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Ralstonia solanacearum* race 1. The management of this disease is mainly based on preventive practices, because once in the production area, its management is complicated by the lack of curative measures. As an alternative to resistance generation and at the same time environmentally safe, the potential of plant resources has started to be explored. To test the effect of applying plant extracts *in vitro* and under greenhouse conditions, and the effect of intercropping with plants known to produce organic compounds with antibacterial properties, in this study the inhibitory effect of ethanolic, hexanic and aqueous extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis*), oregano (*Origanum vulgare*), basil (*Ocimum basilicum*), rue (*Ruta graveolens*), thyme (*Thymus vulgaris*) and barulad (*Walteria americana*) was evaluated *in vitro* against both bacteria. Under greenhouse, the effect of the foliar and soil applications of extracts, before and after artificial inoculation of both bacteria was evaluated, like as the effect of the association with rosemary, oregano, basil and rue plants against the severity in artificially inoculated tomato plants for both bacteria. Oregano essential oil at 100 and 10% was used as a positive control for *in vitro* and greenhouse tests respectively and water was used as a negative control. The *in vitro* inhibitory effect of oregano essential oil against both bacteria was confirmed. Under the experimental conditions of the present work, none of the extracts or associations evaluated significantly reduced the severity of the disease under greenhouse.

Keywords. *Solanum lycopersicum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Ralstonia solanacearum* race 1, plant extracts, organic compounds.

² Thesis. Universidad Autónoma Chapingo
Author: Susana García González
Advisor: Dimas Mejía Sánchez

1. INTRODUCCIÓN

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), es uno de los principales cultivos a nivel mundial (Costa & Heuvelink, 2018). Originario de América del Sur y domesticado en México (Jenkins, 1948), actualmente tiene un alto impacto a nivel nacional debido al valor de su producción y a la demanda de mano de obra que genera (Rodríguez, 2010) ya que, entre otras cosas, México es el país que actualmente exporta en mayor cantidad esta hortaliza (FAO, 2022).

El jitomate es afectado por una gran diversidad de bacterias fitopatógenas, entre ellas *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Ralstonia solanacearum* raza 1, agentes causales de marchitez bacteriana, y que llegan a ocasionar pérdidas de hasta de 100% (Rodríguez, 2010; Rodríguez, 2013); por lo general suelen emplearse antibiótico sin mucho éxito; no obstante, la generación de resistencia a estos productos es relevante ya que existen pocos antibióticos disponibles para uso sobre bacterias fitopatógenas, además que existe un riesgo potencial de transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos a patógenos humanos (Sundin *et al.*, 2016; Sundin & Wang, 2018), sin mencionar los efectos ambientales colaterales (Yuliar *et al.*, 2015).

Una de las alternativas para el manejo de la marchitez bacteriana en jitomate, es el uso de metabolitos secundarios de plantas, puros o en aceites esenciales (Borboa *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2005; Pradhanang *et al.*, 2003); no obstante, su uso no siempre es accesible, por lo que diferentes métodos de extracción de metabolitos a partir de diferentes plantas han sido probados (Belgüzar *et al.*, 2016; Benali *et al.*, 2020; Cai *et al.*, 2019; Talibi *et al.*, 2011), en su mayoría dirigidos a la inhibición o supresión de los agentes patógenos. Un campo menos explorado es el uso de metabolitos secundarios en la inducción de resistencia (González *et al.*, 2013).

Entre las especies vegetales cuyo aceite esencial ha sido estudiado sobre *C. michiganensis* o *R. solanacearum*, están: romero (*Rosmarinus officinalis*; Hosseini *et al.*, 2012; Rueda *et al.*, 2018), orégano (*Origanum vulgare*; Orzali *et*

al., 2020), albahaca (*Ocimum basilicum*; Rojas *et al.*, 2012), ruda (*Ruta graveolens*; Pino *et al.*, 2014) y tomillo (*Thymus vulgaris*; Abd-Elrahim *et al.*, 2022; Borboa *et al.*, 2010; Hosseini *et al.*, 2012), por lo que aparecen como especies potenciales para la exploración del efecto de extractos a partir de diferentes métodos de extracción más accesibles para los productores, tanto sobre bacterias causantes de marchitez como posibles inductores de defensas en plantas de jitomate. Así mismo, la hierba blanca (*Walteria americana*), empleada para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por *Candida albicans* y *Escherichia coli* (Zongo *et al.*, 2013), aparece como una especie potencial para el mismo fin.

Esta investigación se ha orientado en la búsqueda de alternativas de manejo a base de productos vegetales, que puedan emplearse a futuro para el desarrollo de nuevas y mejores estrategias de manejo de la marchitez bacteriana en jitomate.

1.1 Objetivo general

Evaluar el potencial mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* de seis especies vegetales como estrategia potencial para el manejo de la marchitez bacteriana en jitomate.

1.2 Objetivos particulares

Determinar *in vitro* el efecto bactericida o bacteriostático de los extractos etanólicos, hexánicos y acuosos de seis plantas aromáticas sobre los agentes causales de marchitez bacteriana del jitomate como base de una estrategia potencial para su manejo.

Evaluar el efecto de los extractos etanólicos, hexánicos y acuosos de seis plantas aromáticas bajo condiciones de invernadero sobre marchitez bacteriana en jitomate como alternativa para su manejo.

Evaluar el efecto de la asociación de cuatro plantas aromáticas y el cultivo de jitomate bajo condiciones de invernadero sobre marchitez bacteriana como alternativa para su manejo.

1.3 Hipótesis

H1. Al menos una de las plantas aromáticas evaluadas en alguna de sus presentaciones afecta el desarrollo de marchitez causada por bacterias en jitomate.

H0. Ninguna de las plantas aromáticas evaluadas en alguna de sus presentaciones afecta el desarrollo de marchitez causada por bacterias en jitomate.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades del cultivo de jitomate

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), se ubica entre los principales frutos a nivel mundial, tanto fresco como procesado, y su importancia como hortaliza cultivada se ubica sólo detrás de la papa (Costa y Heuvelink, 2018). Es originario de América del Sur y tiene como principal sitio de diversificación a México (Jenkins, 1948), país que actualmente es el principal exportador de esta hortaliza (FAO, 2022).

Para 2020 en México se produjeron 3,370,826.65 ton, la superficie total sembrada fue 45,284.92 ha y los principales productores fueron Sinaloa, San Luis Potosí y Michoacán (SIAP, 2022). De acuerdo con lo reportado por el SIAP (2021) San Luis Potosí lideró la producción nacional para el ciclo primavera verano 2019 -2020, mientras que Sinaloa lo hizo para el ciclo otoño invierno 2021.

La superficie destinada a producción orgánica a nivel nacional ha ido en aumento; para 2021 se reportó una producción de 68,496.39 ton bajo esta modalidad, lo cual correspondió al 2.03 % de la producción nacional. De manera general también se observa que tanto producción y rendimiento se encuentran en aumento (SIAP, 2022).

2.2 Botánica y taxonomía del jitomate

El jitomate es una especie herbácea con comportamiento anual y perenne. Presenta raíz fibrosa de hasta 1.5 m; hojas compuestas y pinadas con 7 a 11 folíolos cubiertas con tricomas, flores amarillas de 1 a 3 cm de ancho en plena floración dispuestas en inflorescencias de ramificación variada. La fruta es una baya cuya composición es de 93 a 97% de agua y cuya materia seca se compone principalmente de azúcares (40-60%), proteínas y aminoácidos (15-20%) y ácidos orgánicos (4-10%). Las semillas son rugosas, aplanadas y discoidales (Pavan *et al.*, 2009). De acuerdo con Jones (2007) el tiempo aproximado desde la siembra hasta la maduración comercial va de 50 a 65 días en variedades tempranas y de 85 a 95 días en variedades tardías.

Taxonómicamente, la EPPO (2022) lo clasifica de la siguiente manera:

Dominio: Eukarya

Filo. Magnoliophyta

Clase. Angiospermae

Categoría. Lamiids

Orden. Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Solanum*

Especie: *lycopersicum*

2.3 Manejo de bacterias fitopatógenas en el cultivo de jitomate

El jitomate es una especie que es atacada por una gran diversidad de bacterias fitopatógenas (Rodríguez, 2010). Entre las prácticas generales implementadas para reducir el riesgo de infección en el área de cultivo se cuentan tanto preventivas como de manejo: tratamiento de semilla, uso de semilla y plantas libres de bacterias, empleo de variedades resistentes como Shanty, Katya y Betty de la marca Hazera, siembra directa, aislamiento o eliminación de plantas infectadas, aplicación de bactericidas a base de cobre, uso de fosfitos y fosfonatos para estimular la resistencia del hospedante, uso de biopesticidas a base de bacteriófagos y hongos, colocación de tapetes sanitarios, manejo adecuado del riego y la fertilización, desinfección de herramientas, ventilación, limpieza profunda previo al establecimiento de un nuevo cultivo (en invernadero), destrucción de residuos vegetales, eliminación de malezas del grupo de las solanáceas, rotación de cultivos y manejo adecuado durante la cosecha; así como evitar el riego por gravedad (preferiblemente riego por goteo), el manejo de la planta cuando esté mojada y el consumo de tomate fresco en el área de producción (Bernal, 2010; López, 2017; Hazera, 2022; Rodríguez, 2010).

La generación de resistencia a antibióticos es relevante ya que en general existen pocos antibióticos disponibles para uso sobre bacterias fitopatógenas y estos en ocasiones son sólo preventivos, además que existe un riesgo potencial de transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos a patógenos humanos (Sundin y Wang, 2018; Sundin *et al.*, 2016), sin mencionar los posibles efectos ambientales colaterales. Por ello la investigación se ha orientado en la búsqueda de nuevas alternativas de manejo, entre las cuales se han desarrollado trabajos que permitan conocer el efecto de productos vegetales sobre bacterias fitopatógenas del jitomate.

2.4 Marchitez bacteriana del jitomate

La marchitez bacteriana en jitomate es causada por dos agentes principalmente: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) y *Ralstonia solanacearum* raza 1, (Rsr1) aunque también existen reportes de *Burkholderia glumae* como agente causal (Rodríguez, 2010).

2.4.1 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

C. michiganensis subsp. *michiganensis* es un patógeno de alta importancia económica. Su clasificación taxonómica de acuerdo con CABI (2021a) es la siguiente:

Dominio: Bacteria

Filo: Actinobacteria

Clase: Actinobacteria

Subclase: Actinobacteridae

Orden: Actinomycetales

Suborden: Micrococccineae

Familia: Microbacteriaceae

Género: *Clavibacter*

Especie: *michiganensis*

Se identificó por primera vez en Michigan (E.U.A.) en 1909, pero actualmente se encuentra distribuida en los cinco continentes principalmente gracias al comercio de semillas (CABI, 2021b). En México hay reportes no oficiales de su presencia en Baja California Sur, Baja California Norte, Sonora, Sinaloa, Coahuila, Tamaulipas, Nuevo León, Jalisco, Michoacán, San Luis Potosí, Zacatecas, Guanajuato, Puebla, Edo. de México, Hidalgo, Morelos, Guerrero, Querétaro, Oaxaca y Chiapas, llegando a ocasionar pérdidas de hasta el 100 % (Rodríguez, 2013). Aunque el jitomate es su principal hospedero, se ha reportado en otras hortalizas solanáceas como pimiento (*Capsicum annum*), y en hospedantes alternativos como *Solanum nigrum* L., *Solanum triflorum*, *Lycopersicon pimpinellifolium*, *Solanum carolinense*, *Datura stramonium* y *Solanum eleagnifolium* (Agrios, 1999; CABInt, 2021; Evtushenko y Takeuchi, 2006; Rodríguez, 2010).

Cmm es una bacteria gram positiva de forma bacilar de aproximadamente 0.4–0.75 × 0.8–2.5 µm, no formadora de esporas, no mótil, aeróbica, positiva a catalasa y con una pared celular conformada de peptidoglucano tipo B2γ; se desarrolla bajo temperaturas de 25 – 28°C (Agrios, 1999; EPPO, 2016; Evtushenko y Takeuchi, 2006; Janse, 2005). Las colonias en medios generales son lisas, enteras, convexas, semifluidas recién aisladas y de coloración amarillo pálido a amarillo (Rodríguez, 2010; Yim *et al.*, 2012).

Cmm se transmite a través de semilla, pero también lo puede hacer mediante el manejo de plantas enfermas. Se caracteriza por causar un marchitamiento unilateral en la planta o en los folíolos, así como manchas blancas elevadas con centro necrótico, también conocidas como ojo de pájaro, en la superficie de los frutos. Cuando la infección es avanzada se puede identificar una coloración del tejido vascular blanco lechoso, amarillo o marrón rojizo al hacer cortes en tallos peciolos y pedúnculos (CABI, 2021a), no obstante, los síntomas variarán según el tipo de producción (bajo cobertura o a campo abierto), edad de la planta al ser

infectada, prácticas culturales, tipo de infección, etc (EPPO, 2016). También se ha aislado de plántulas asintomáticas (Gitaitis *et al.*, 1991).

Cuando la infección es sistémica, en fases iniciales se reconocen zonas aceitosas color verde opaco entre las nervaduras de las hojas, después aparecen zonas necróticas frecuentemente en el margen. Dichas zonas pueden unirse y generar manchas necróticas mayores. Frecuentemente los folíolos de un lado se vuelven flácidos en hojas inferiores y, en condiciones favorables, pocos días son necesarios para que hojas enteras se marchiten y la planta, finalmente, se seque. Los frutos en ocasiones no se desarrollan, lo hacen de manera desigual o se caen, también pueden presentar estrías cloróticas longitudinales y colorearse de blanco internamente, en tejidos vasculares y circundantes (EPPO, 2016).

Cuando la bacteria se multiplica superficialmente, la planta puede mostrar un aspecto harinoso y en hojas, principalmente en bordes, manchas marrones oscuro, rodeadas de un halo amarillo anaranjado por infección a través de hidátodos. Llega a observarse un rallado amarillo en tallos y formación de canchales en los nudos. Hay crecimiento deficiente de las plantas y pueden llegar a secarse completamente (EPPO, 2016).

Cmm puede sobrevivir en residuos vegetales enterrados hasta siete meses donde compite con otros microorganismos, siendo aquellas poblaciones de la bacteria que sobreviven en el suelo fuente de inóculo primario en posteriores ciclos (Gleason *et al.*, 1991).

Se han desarrollado protocolos para detección por inmunofluorescencia (IF) y/o reacción en cadena de la polimerasa (PCR; EPPO, 2016). En el caso de detección en semillas, la Federación Internacional de Semillas (ISF, 2020) tiene disponibles protocolos que incluyen dilución en placa, identificación por PCR y pruebas de patogenicidad.

Existen diferentes opciones para el tratamiento a semilla que aseguran la eliminación interna de la bacteria con una merma en la germinación inferior al 15%, entre ellos remojo en agua a 52 °C por 20 min o a 56 °C por 30 min, o bien,

en una solución de NaOCl a 1.05% a 52 °C por 40 min (Fatmi *et al.*, 1991). En el caso de plantas enfermas, Rodríguez (2010) recomienda retirar completamente y tratar las plantas aledañas con derivado de cobre, gentamicina o estreptomicina.

2.4.2 *Ralstonia solanacearum* raza 1

R. solanacearum es un complejo de especies clasificado en razas según el rango de hospederos, siendo la raza 1 capaz de infectar a la mayoría de las solanáceas (Rodríguez, 2010). Su clasificación taxonómica de acuerdo a CABI (2021b) es la siguiente:

Dominio: Bacterias

Filo: Proteobacteria

Clase: Betaproteobacteria

Orden: Burkholderiales

Familia: Ralstoniaceae

Género: *Ralstonia*

Especie: *solanacearum*

De acuerdo con la adaptación de Safni *et al.* (2014), se describe a *Rsr1* como una bacteria gram negativa, que posee o no movilidad, positiva a catalasa y oxidasa, capaz de desarrollarse a 28°C en medio CPG. Siendo el contenido G+C, 66% en moles, mediante el método HPLC, en la cepa tipo.

Es una bacteria que se adapta a diferentes nichos como suelo, agua y plantas; en estas últimas al xilema cuando se trata de hospederas, mientras que se aloja en la rizosfera en caso contrario (Lebeau *et al.*, 2010). La transmisión por semilla es moderada, sin embargo, el agua de riego representa una vía importante de diseminación del patógeno (CABI, 2021b).

Penetra por el sistema radicular y prolifera en el xilema. El inicio de la enfermedad se manifiesta como flacidez en las hojas más jóvenes durante el día y, si las

condiciones son favorables, se da una marchitez general irreversible (EPPO, 2018; Lebeau *et al.*, 2010). A diferencia de la marchitez causada por *C. michiganensis*, no se expresa como manchas blancas con centro necrótico y en su lugar se observa la formación de raíces adventicias, además la decoloración vascular es menos amarilla (CABI, 2021b).

Para su identificación se han desarrollado diversas pruebas serológicas, moleculares como PCR en sus diferentes modalidades, bioensayos y pruebas de patogenicidad (EPPO, 2018).

Huet (2014) en una revisión sobre resistencia a *Rsr1*, concluyó que debido a la gran diversidad genética del patógeno resulta inviable pensar en resistencias universales, señalando como lo más factible buscar fuentes de resistencia a ecosistemas dados, según los patógenos presentes; además recalca que es necesaria la elaboración de estrategias que contemplen por un lado la resistencia de los cultivares y por el otro, el control directo del patógeno. Alternativas sobre el patógeno incluyen el uso de microorganismos y cepas avirulentas (Zheng *et al.*, 2019), la transferencia de genes de resistencia (Kunwar *et al.*, 2018) y uso de metabolitos derivados de hongos (Guo *et al.*, 2021), entre otros.

2.5 Manejo de la marchitez bacteriana del jitomate

Para reducir el riesgo de infección en el área de cultivo existen diversas prácticas dependiendo del agente causal; en el caso de *Cmm*, al no existir cultivares resistentes ni bactericidas eficientes, esto se logra evitando la entrada del patógeno al área de cultivo con uso de semilla, injertos y plantas libres de bacterias y tapetes sanitarios; cuando ya se encuentra presente se debe prestar singular atención en evitar la diseminación, preferiblemente aislando o eliminando plantas infectadas y monitoreando constantemente el cultivo para identificar posibles focos de infección; el uso de bactericidas como estreptomicina, gentamicina y derivados de cobre, sólo es preventivo (Rodríguez, 2013; Rodríguez, 2010).

En el caso de *Rsr1*, una de las principales alternativas de manejo ha sido la búsqueda de resistencia (Kunwar *et al.*, 2018; Yuliar *et al.*, 2015); no obstante, Huet (2014) concluyó que debido a la gran diversidad genética del patógeno resulta inviable pensar en resistencias universales, señalando como lo más factible buscar fuentes de resistencia a ecosistemas dados según los patógenos presentes; además recalca que es necesaria la elaboración de estrategias que contemplen por un lado la resistencia de los cultivares y por el otro, el control directo del patógeno. Prácticas dirigidas directamente al control del patógeno incluyen agentes de control biológico a base de cepas avirulentas (Zheng *et al.*, 2019), metabolitos derivados de hongos (Guo *et al.*, 2021), comunidades microbianas mejoradas y desinfestación del suelo con sustratos que liberen compuestos volátiles, además de productos bactericidas (Yuliar *et al.*, 2015).

Frecuentemente los productores utilizan productos químicos ineficientes (Aloyce *et al.*, 2019) que resultan costosos, además que tienen efectos dañinos al medio ambiente (Yuliar *et al.*, 2015); sin mencionar que existe un riesgo potencial de transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos a patógenos humanos (Sundin *et al.*, 2016; Sundin y Wang, 2018).

2.6 Productos vegetales en el manejo de la marchitez bacteriana del jitomate

Las plantas sintetizan una gran cantidad y diversidad de compuestos. A los envueltos en los procesos vitales básicos se les ha denominado metabolitos primarios; no obstante, a aquellos que anteriormente no se les había identificado funcionalidad y se creía que eran residuos del metabolismo, intermediarios o productos finales del metabolismo primario, se les denominó metabolitos secundarios y más tarde se reconoció su papel en la interacción de las plantas con su entorno (Lal *et al.*, 2018). Entre los últimos encontramos los compuestos orgánicos volátiles (COV's), compuestos cuyo peso molecular va de 50 a 300 Da y que se encuentran principalmente en forma gaseosa en la naturaleza (Wolkoff, 1995).

En el Cuadro 1 se muestra una clasificación de los metabolitos secundarios de plantas que se pueden extraer según el solvente empleado.

Cuadro 1. Metabolitos secundarios extraídos con diferentes solventes (Azmir *et al.*, 2013; adaptado de Cowan, 1999).

Solvente	Metabolitos por extraer
Agua	Antocianinas
	Taninos
	Saponinas
	Terpenoides
Etanol	Taninos
	Polifenoles
	Flavonoides
	Terpenoides
Metanol	Alcaloides
	Antocianinas
	Terpenoides
	Saponinas
	Taninos
	Flavonoides
Cloroformo	Polifenoles
	Terpenoides
	Flavonoides
Diclorometano	Terpenoides
Éter	Alcaloides
	Terpenoides
Acetona	Flavonoides

Actualmente el uso de metabolitos secundarios de plantas en el manejo de bacterias, también denominados fitoantimicrobianos, aparece como un recurso potencial para hacer frente a la resistencia a antibióticos generada en bacterias fitopatógenas (Tiwari *et al.*, 2021). Aquellos que han sido estudiados para el manejo de bacterias causantes de marchitez se pueden clasificar en tres grandes grupos: aceites esenciales, extractos de compuestos solubles y compuestos bioactivos.

Entre los estudios de aceites esenciales empleados sobre *Cmm*, Borboa *et al.* (2010) reportaron diámetros de inhibición de entre 50.3 y 59.5 mm empleando aceite esencial de orégano (*Lippia palmeri*) y de tomillo (*Tymus vulgaris*), bajo condiciones *in vitro*. Como parte de sus resultados, demostraron que, a menor

concentración de compuestos como timol, carvacrol y γ -terpineno, menor fue la inhibición. Sobre la misma bacteria, Rojas *et al.* (2012) reportaron una inhibición total bajo condiciones *in vitro* (90 mm) empleando aceite esencial de *Ocimum basilicum* y *O. basilicum* var. *genovese*, cuyos componentes principales fueron los terpenos linalol, eugenol, safrol y eucaliptol; mientras que Pino *et al.* (2014) reportaron que el aceite esencial de *Ruta chalepensis* inhibió totalmente su crecimiento *in vitro*, identificando como componentes principales del aceite las cetonas alifáticas 2-undecanona y 2-nonanona. En todos estos estudios, la evaluación se realizó por difusión en agar en caja Petri de 90 mm.

Otras especies vegetales cuyos aceites esenciales se han estudiado y han mostrado efecto inhibitorio o bactericida sobre *Cmm* bajo condiciones *in vitro* son té limón (*Cymbopogon flexuosus*) y orégano (*Origanum vulgare*) cuyos compuestos principales son geraniol y carvacrol, respectivamente (Todorovic *et al.*, 2016), cilantro (*Coriandrum sativum* L.), integrado principalmente por linalol e hinojo (*Foeniculum vulgare* Miller var. *vulgare*) que contiene (e)-anetol (Lo Cantore *et al.*, 2004); tomillo (*Thymus vulgaris*; Belguzar *et al.*, 2016) y tomillo del Mediterráneo (*Thymbra spicata* L. var. *spicata*), para el cual se comprobó inhibición tanto por contacto como de la fase volátil (Basim *et al.*, 2000)

En cuanto al uso de aceites esenciales para manejo de *Cmm* en semilla, Yilmaz *et al.* (2021) estudiaron películas de recubrimiento de aceite esencial de *O. vulgare* y concluyeron que el remojo de la semilla en sulfóxido de dimetilo (10%) con una concentración de aceite esencial de 1000 ppm, protegió completamente a la semilla; además confirmaron la interacción del carvacrol presente en el aceite con la proteína PDB4JJO propia de *Cmm*. Sin embargo, Della Pepa *et al.* (2019) al estudiar aceites esenciales de orégano (*Origanum heracleoticum*) y mejorana (*Origanum mejorana*) y sus componentes principales, reportaron efecto herbicida por parte del carvacrol y del terpineno-4-ol sobre *S. lycopersicum* al inhibir la germinación y la elongación de las raíces.

Para la obtención de extractos estudiados sobre *Cmm*, uno de los solventes más comunes ha sido agua. Bajo condiciones *in vitro*, empleando difusión en agar,

Belgüzar *et al.* (2016) reportaron una inhibición del 100% con el extracto acuoso de *T. vulgaris* al 8%, mientras que Talibi *et al.* (2011) reportaron un diámetro de inhibición de 48.8 ± 1.9 mm al emplear extracto acuoso de lavanda (*Lavandula coronopifolia*), que resultó ser la especie más prometedora entre 40 plantas estudiadas.

Cai *et al.* (2019) emplearon etanol como solvente para la extracción de cordón de cardenal (*Persicaria orientalis* L. Spach) y reportaron que las condiciones óptimas de extracción fueron 10 horas de permanencia a 60°C en una proporción de 1:20 g/mL sólido a líquido, gracias a la cual se obtuvo un diámetro de inhibición de *C. michiganensis* igual a 24.72 mm, reportando además su acción sobre la pared celular y la reducción de la actividad de la ATP'asa a nivel intracelular.

Benali *et al.* (2020) probaron extractos etanólicos, metanólicos y acuosos de jara (*Cistus ladaniferus* L.) y mastranzo (*Mentha suaveolens*) obteniendo para la primera una mayor actividad *in vitro* con el extracto acuoso y para la segunda con el extracto metanólico. Además, se probó su efecto sobre la germinación de semillas de jitomate infectadas con *Cmm*, siendo el extracto metanólico de *C. ladaniferus* el que presentó mayor porcentaje de germinación (77.77%). Para ambas plantas, los extractos estuvieron conformados mayoritariamente por compuestos fenólicos.

Considerando a los compuestos fenólicos como relevantes en el manejo de *Cmm*, Zárate-Martínez *et al.* (2018) realizaron aplicaciones de ácidos fenólicos en plantas de jitomate para evaluar su efecto en la severidad de la enfermedad causada por la bacteria, encontrando que ésta se redujo considerablemente con relación al testigo y atribuyéndolo a su función como agentes protectores y antimicrobianos.

Rsr1 es una bacteria sobre la que se ha estudiado una gran variedad de aceites esenciales bajo condiciones *in vitro*, empleando la metodología de difusión en agar por discos, mostrando efectos favorecedores que los colocan entre las posibles alternativas en la búsqueda de ingredientes activos para su manejo. En el Cuadro 2, se presenta un listado de las plantas que han sido estudiadas, la

concentración a que han mostrado mayor inhibición y el diámetro de inhibición que se ha obtenido con dichas concentraciones. Además, en algunos estudios, se incluye el resultado del análisis de la composición de los aceites, señalando los de mayor proporción como posibles causantes del efecto.

Cuadro 2. Aceites esenciales probados *in vitro* contra *R. solanacearum* raza 1

Especie	Concentración del esencial	Inhibición ac. (% o mm)	Compuestos involucrados	Referencia
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Dilución 1:1 y en la cantidad de 15 µl.	70.4%	-	Rueda <i>et al.</i> (2018)
	100%	11.8 mm		Hosseini <i>et al.</i> (2012)
<i>Lippia vulgaris</i>	Dilución 1:1 y en la cantidad de 15 µl.	70.2%		Rueda <i>et al.</i> (2018)
<i>Pimpinella anisum</i> L	0.14%	66.7 mm		Abd-Elrahim. (2022)
<i>Thymus vulgaris</i> L	0.14 %	52 mm		Abd-Elrahim. (2022)
	100%	34.8		Hosseini <i>et al.</i> (2012)
<i>Syzigium aromaticum</i> L	0.14 %	30.3 mm		Abd-Elrahim. (2022)
<i>Foeniculum vulgare</i> L	0.14 %	17.3 mm		Abd-Elrahim. (2022)
<i>Cymbopogon flexuosus</i> L	0.14 %	40.7 mm		Abd-Elrahim. (2022)

<i>Eruca sativa</i> L	0.14 %	10.3 mm		Abd-Elrahim. (2022)
<i>Corymbia citriodora</i>	5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	14.33 mm	α -citronelal α -citronelal	Mohamed et al. (2019)
<i>Cupressus sempervirens</i>	5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	13.00 mm	cedrol Δ^3 -careno	Mohamed et al. (2019)
<i>Lantana camara</i>	5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	17.50 mm	Trans-cariofileno α -humuleno	Mohamed et al. (2019)
<i>Brassica juncea</i>	10 $\mu\text{L L}^{-1}$	100 %	isotiocinato de alilo	de Carvalho et al. (2019)
<i>Tithonia diversifolia</i>	100%	12.61 mm	Linolenato de etilo	Opondo et al. (2022)
<i>Coriandrum sativum</i>	100%	9.1 mm		Hosseini et al. (2012)
<i>Cuminum cyminum</i>	100%	9.6 mm		Hosseini et al. (2012)
<i>Eucalyptus globulus</i>	100%	7.6 mm		Hosseini et al. (2012)
<i>Pimenta racemosa</i> var. <i>racemosa</i>	0.14%	100%		Deberdt et al. (2017)

Otras modalidades en que se han probado productos vegetales sobre *Rsr1* es en extractos, por ejemplo, empleando metanol, hexano, etanol (Do et al., 2021) o agua (Kumar et al., 2017), *in vitro* y como biofumigantes previo a la siembra (Huang y Lakshman, 2010) en forma de microcápsulas para evitar la volatilidad de los compuestos (Tu et al., 2020), e incluso intercalados con quitina, cuya mezcla probó mejorar el efecto de extractos sobre la inhibición de la bacteria, pero también redujo la severidad al ser aplicada previo a la inoculación de plantas

de jitomate (Gatahi *et al.*, 2022). O bien el uso de la planta frescas como enmienda a suelos (Pradhanang *et al.*, 2003).

Se ha propuesto que la capacidad de inhibición está directamente relacionada con la concentración de los aceites y los extractos (Mohamed *et al.*, 2019; Hosseini *et al.*, 2012; Deberdt *et al.*, 2012), no obstante, la presencia de compuestos y su proporción, deriva de factores como el quimiotipo de la especie vegetal y condiciones ambientales durante su desarrollo (Deberdt *et al.*, 2017), y de la cepa bacteriana involucrada (Mohamed *et al.*, 2019).

Se han estudiado compuestos bioactivos como citrol, limoneno, alcanfor, carvoneno (Mohamed *et al.*, 2019), isotiocinato de alilo (de Carvalho *et al.*, 2019), baicaleína (Do *et al.*, 2021) y timol (Pradhanang *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2011), directamente sobre *Rsr1 in vitro*, o *in vivo*, aplicados a suelo. Además, se ha propuesto a especies vegetales como promotoras de crecimiento vegetal y elicitores de defensas (Orzali *et al.*, 2020).

2.7 Literatura citada

- Abd-Elrahim, R., Tohamy, M. R., Atia, M. M., Elashtokhy, M. M., & Ali, M. A. (2022). Bactericidal activity of some plant essential oils against *Ralstonia solanacearum* infection. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(4), 2163-2172.
- Agrios, G. 1999. 12. Enfermedades de las plantas causadas por procariontes. En: Agrios, G. 1999. Fitopatología. Segunda edición, quinta reimpresión. Editorial Limusa-Grupo, Noriega Editores. México. pp. 531-634.
- Aloyce, A., Ndakidemi, P. A., & Mbega, E. R. 2019. Survey and conventional management methods of bacterial wilt disease in open fields and greenhouses in Tanzania. *Journal of Plant Pathology*, 101(4), 1107-1114.
- Azmir, J, Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M. Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N. and Omar, A.K.M. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* 117: 426–436.
- Basim, H., Yegen, O. and Zeller, W. 2000. Antibacterial effect of essential oil of *Thymbra spicata* L. var. *spicata* on some plant pathogenic bacteria. *Journal of Plant Diseases and Protection* 279(3): 279-284.

Belgüzar, S., Yilar, M., Yanar, Y., Kadioğlu, I. and Doğar, G. 2016. Antibacterial activities of *Thymus vulgaris* L. (Thyme) extract and essential oil against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Turkish Journal of Weed Science 19(2): 20-27.

Benali, T., Bouyahya, A., Habbadi, K., Zengin, G., Khabbach, A., and Hammani, K. 2020. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Cistus ladaniferus* subsp. *ladanifer* and *Mentha suaveolens* against phytopathogenic bacteria and their ecofriendly management of phytopathogenic bacteria. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 28: 101696.

Borboa, J., Rueda, E., Acedo, E., Ponce, J., Cruz, M., García, J. & M. Ortega. 2010. Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales contra *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. Tropical and Subtropical Agroecosystems 12(3):539-547.

Cai, J., Gao, Y., Wang, M., Zhang, J., Zhang, Y., Wang, Q., & Liu, J. 2019. Antibacterial activity of *Polygonum orientale* extracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the agent of bacterial canker of tomato disease. Brazilian Archives of Biology and Technology, 62: e19180021

Centre for Agricultural Bioscience International (CABI). 2021a. Datasheet *Clavibacter michiganensis* (bacterial canker of tomato). Disponible en: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/15338> Fecha de consulta: 22 de abril, 2022.

Centre for Agricultural Bioscience International (CABI). 2021b. Datasheet *Ralstonia solanacearum* (bacterial wilt of potato). Disponible en: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/45009> Fecha de consulta: 25 de abril, 2022.

Centre for Agricultural Bioscience International (CABI). 2021c. Datasheet *Solanum lycopersicum* (tomato). Disponible en: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/31837#totaxonomicTree> Fecha de consulta: 22 de abril, 2022.

Costa, J. M., and Heuvelink, E. 2018. The global tomato industry. *In*: Tomatoes. Heuvelink E. (ed.). CABI. Boston, USA. pp: 1–26.

de Carvalho Pontes, N., Yamada, J. K., Fujinawa, M. F., Dhingra, O. D., and de Oliveira, J. R. 2019. Soil fumigation with mustard essential oil to control bacterial wilt in tomato. European Journal of Plant Pathology 155(2): 435-444.

Deberdt, P., Perrin, B., Coranson-Beaudu, R., Duyck, P. F. and Wicker, E. 2012. Effect of *Allium fistulosum* extract on *Ralstonia solanacearum* populations and tomato bacterial wilt. Plant disease 96(5): 687-692.

Deberdt, P., Davezies, I., Coranson-Beaudu, R. and Jestin, A. 2017. Efficacy of leaf oil from *Pimenta racemosa* var. *racemosa* in controlling bacterial wilt of tomato. Plant Disease 102(1): 124-131.

Della Pepa, T., Elshafie, H. S., Capasso, R., De Feo, V., Camele, I., Nazzaro, F., Scognamiglio, M. R and Caputo, L. 2019. Antimicrobial and phytotoxic activity of *Origanum heracleoticum* and *O. majorana* essential oils growing in Cilento (Southern Italy). *Molecules* 24(14): 2576.

Do, H. T. T., Nguyen, T. H., Nghiem, T. D., Nguyen, H. T., Choi, G. J., Ho, C. T., & Le Dang, Q. 2021. Phytochemical constituents and extracts of the roots of *Scutellaria baicalensis* exhibit in vitro and in vivo control efficacy against various phytopathogenic microorganisms. *South African Journal of Botany* 142: 1–11.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). 2016. PM 7/42 (3) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Boletín EPPO. 46(2): 202-225.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). 2018. PM 7/21 (2) *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* y *R. syzygii* (complejo de especies de *Ralstonia solanacearum*). Boletín EPPO. 48(1): 32-63.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). 2022. EPPO Global Database. *Solanum lycopersicum*.

Evtushenko, L. I. and Takeuchi, M. 2006. The Family Microbacteriaceae. The Prokaryotes 3: 1020–1098.

Fatmi, M., Schaad, N. W. and Bolkan, H. A. 1991. Seed treatments for eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from naturally infected tomato seeds. *Plant Disease* 75(4): 383-385.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2022. FAOSTAT Statistical Database.

Gatahi, D., Kihurani, A., and Wanyika, H. 2022. Control of bacterial wilt in tomato using chitosan intercalated with tea extracts. *African Journal of Horticultural Science* 19:1-12

Gitaitis, R. D., Beaver, R. W. and Voloudakis, A. E. 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Disease* 75 (8): 834-838.

Gleason, M. L., Braun, E. J., Carlton W. M. and Peterson, R. H. 1991. Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology* 81(12): 1519-1523.

Gorlenko, C. L., Kiselev, H. Y., Budanova, E. V., Zamyatnin, A. A., and Ikryannikova, L. N. 2020. Plant secondary metabolites in the battle of drugs and drug-resistant bacteria: new heroes or worse clones of antibiotics?. *Antibiotics* 9(4): 170.

Guo, Y., Fan, Z., Yi, X., Zhang, Y., Khan, R. A. A., and Zhou, Z. 2021. Sustainable Management of Soil-Borne Bacterium *Ralstonia solanacearum* *In Vitro* and *In Vivo* through Fungal Metabolites of Different *Trichoderma* spp. *Sustainability* 13 (3): 1491.

Hazera. 2022. Catálogo de variedades de tomate. Disponible en: <https://mx.hazera.com/en/crop/tomato/> Fecha de consulta: Marzo, 2022.

Hong, J. C., Momol, M. T., Ji, P., Olson, S. M., Colee, J., and Jones, J. B. 2011. Management of bacterial wilt in tomatoes with thymol and acibenzolar-S-methyl. *Crop Protection* 30(10): 1340-1345.

Hosseini N., Alamshahi, M. L. and Panjehkeh, N. 2012, November. Biocontrol efficiency of medicinal plants against *Pectobacterium carotovorum*, *Ralstonia solanacearum* and *Escherichia coli*. *The Open Conference Proceedings Journal* 3 (Suppl 1-M8): 46-51.

Huang, Q. and Lakshman, D. K. 2010. Effect of clove oil on plant pathogenic bacteria and bacterial wilt of tomato and geranium. *Journal of Plant Pathology*, 701-707.

Huet, G. 2014. Breeding for resistances to *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in Plant Science*: 00715

International Seed Federation (ISF). 2020. ISHI-Veg Protocols. Disponible en: <https://worldseed.org/our-work/phytosanitary-matters/seed-health/ishi-veg-protocols/> Fecha de consulta: 02 de mayo, 2022.

Janse, J. D. 2005. *Phytopathology: principles and practice*. CABI. Wallingford, UK. 360 p.

Jenkins, J.A. 1948. The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany* 2: 379–392.

Ji, P., Momol, M. T., Olson, S. M., Pradhanang, P. M. and Jones, J. B. 2005. Evaluation of thymol as biofumigant for control of bacterial wilt of tomato under field conditions. *Plant disease* 89(5): 497-500.

Jones, J. J. B. 2007. Plant Characteristics and Physiology. *In*: Jones, J. J. B. *Tomato Plant Culture: In the Field, Greenhouse, and Home Garden*. pp. 55–80.

Kumar, N. K., Kumar, V. S., Manjunatha, S. E. and Mallikarjuna, N. 2017. Effect of botanicals on *Ralstonia solanacearum* and bacterial wilt incidence in tomato. *International Journal of Chemical Studies* 5(6): 737-740.

Kunwar, S., Iriarte, F., Qiurong, A., Evaristo da S., E., Ritchie, L., Nguyen, N. S., Freeman, J. H., Puesto, R. E., Jones, J. B., Minsavage, G. V., Cole, J., Scott, J. W., Vallad, G. E., Zipfel, C., Horvath, D., Westwood, J., Hutton, S. F. and Paret, M. L. 2018. Transgenic Expression of EFR and Bs2 Genes for Field Management of Bacterial Wilt and Bacterial Spot of Tomato. *Phytopathology* 108:1402-1411.

Lal, M., Kathpalia, R., Sisodia, R. and Shakya, R. 2018. Biotic Stress. *En*: Bhatla, S. y M. Lal. 2018. *Plant Physiology, Development and Metabolism*. Springer Nature Singapore. Delhi, India. pp: 1029 – 1095.

Lebeau, A., Daunay, M. C., Frary, A., Palloix, A., Wang, J. F., Dintinger, J., Chiroleu, F., Wicker, E. and Prior, P. 2011. Bacterial wilt resistance in tomato,

pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in *the Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology* 101: 154–165.

Lo Cantore, P., Iacobellis, N. S., De Marco, A., Capasso, F. and Senatore, F. 2004. Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller var. *vulgare* (Miller) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(26): 7862–7866.

Mohamed, A. A., Behiry, S. I., Younes, H. A., Ashmawy, N. A., Salem, M. Z., Márquez-Molina, O., and Barbabosa-Pilego, A. 2019. Antibacterial activity of three essential oils and some monoterpenes against *Ralstonia solanacearum* phylotype II isolated from potato. *Microbial pathogenesis* 135: 103604.

Mouden, S., Klinkhamer, P. G., Choi, Y. H. and Leiss, K. A. 2017. Towards eco-friendly crop protection: natural deep eutectic solvents and defensive secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews* 16(5): 935-951.

Opondo, F. A., K'owino, I. O., Chepkwony, S. C. and Kosgei V. J. 2022. *In Vitro* antibacterial activity of essential oils from *Tithonia diversifolia* leaves and flowers against *Ralstonia solanacearum*. *European Journal of Applied Sciences* 10(2): 523-539.

Orzali, L., Valente, M. T., Scala, V., Loreti, S. and Pucci, N. 2020. Antibacterial activity of essential oils and *Trametes versicolor* extract against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Ralstonia solanacearum* for seed treatment and development of a rapid in vivo assay. *Antibiotics* 9(9): 628.

Pavan, S., van Heusden, A. W., A. W. and Bai, Y. 2009. *Solanum lycopersicum* (Tomato). *Encyclopedia of Life Sciences*. 4 p.

Pino, O., Sánchez, Y., Rojas, M., Abreu, Y., Correa, T., Martínez, D. & Montes, R. 2014. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ruta chalepensis* L. *Revista de Protección Vegetal*. 29(3):220-225.

Pradhanang, P. M., Momol, M. T., Olson, S. M. and Jones, J. B. 2003. Effects of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. *Plant disease* 87(4): 423-427.

Rodríguez, M. D. L. 2010. Enfermedades bacterianas en hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México, México. 306 p.

Rodríguez, M. D. L. 2013. Biogeografía, Diagnóstico y Manejo Integrado de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Vol. 31 (Suplemento): 22-23.

Rojas, M., Sánchez, Y., Abreu, Y., Espinosa, I., Correal, T. y Pino, O. 2012. Caracterización química y actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. y *Ocimum basilicum* var. *genovese* L. *Revista de Protección Vegetal*. 27 (2): 130-134.

Rueda, E., Juvera, J., Romo I. y Holguín, R. 2018. Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales de orégano y tomillo contra *Ralstonia solanacearum*. Revista mexicana de ciencias agrícolas. Vol. esp. 20: 4251-4261.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2022. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola.

Safni, I., I. Cleenwerck, P. De Vos , M. Fegan , L. Sly and U. Kappler. 2014. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to amend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64: 3087–3103.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2022. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> Fecha de consulta: Abril, 2022.

Sundin, G. W., Castiblanco, L. F., Yuan, X., Zeng, Q. and Hong, Y. 2016. Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects. Challenges in Bacterial Molecular Plant Pathology. Molecular Plant Pathology 17 (9): 1506-1518. DOI: 10.1111 / mpp.12436

Sundin, G. W. and Wang, N. 2018. Antibiotic Resistance in Plant-Pathogenic Bacteria. Annual Review of Phytopathology, 56(1). doi:10.1146/annurev-phyto-080417-045946.

Talibi, I., Amkraz, N., Askarne, L., Saadi, B., Boudyach, E. H., Boubaker, H. and Bouizgarne, B. 2011. Antibacterial activity of moroccan plants extracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomatoes bacterial canker. Journal of Medicinal Plants Research 5(17): 4332-4338.

Tiwari, P., Khare, T., Shriram, V., Bae, H. and Kumar, V. 2021. Plant synthetic biology for producing potent phyto-antimicrobials to combat antimicrobial resistance. Biotechnology Advances 48: 107729.

Todorović B., Potočnik, I., Rekanović, E., Stepanović, M., Kostić, M., Ristić, M. and Milijašević-Marčić, S. 2016. Toxicity of twenty-two plant essential oils against pathogenic bacteria of vegetables and mushrooms. Journal of Environmental Science and Health, Part B. DOI: 10.1080/03601234.2016.1208462.

Tu, Q. B., Wang, P. Y., Sheng, S., Xu, Y., Wang, J. Z., You, S. and Wu, F. A. 2020. Microencapsulation and antimicrobial activity of plant essential oil against *Ralstonia solanacearum*. Waste and Biomass Valorization 11(10): 5273-5282.

Wolkoff, P. 1995. Volatile organic compounds. Indoor Air, Suppl. 3: 1-73.

Yılmaz, M., Baysal, Ö., and Silme, R. S2021. The effect of a seed coating with *Origanum vulgare* essential oil on *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Plant Protection Science 57(3): 217–225.

Yim, K. O., Lee, H. I., Kim, J. H., Lee, S. D., Cho, J. E. and Cha, J. S. 2012. Characterization of phenotypic variants of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolated from *Capsicum annuum*. European Journal of Plant Pathology 133: 559–575.

Yuliar, Nion, Y. A., and Toyota, K. 2015. Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. Microbes and environments 30: 1-30.

Zárate-Martínez, W., González-Morales, S., Ramírez-Godina, F., Robledo-Olivo, A., & Juárez-Maldonado, A. 2018. Efecto de los ácidos fenólicos en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) inoculadas con *Clavibacter michiganensis*. Revista mexicana de ciencias agrícolas 9: 4367-4379.

Zheng, X., Zhu, Y., Wang, J., Wang, Z., and Liu, B.. 2019. Combined use of a microbial restoration substrate and avirulent *Ralstonia solanacearum* for the control of tomato bacterial wilt. Scientific Reports 9: 20091.

Zongo, F., Ribuot, C., Boumendjel, A. and Guissou, I. 2013. Botany, traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Waltheria indica* L. (syn. *Waltheria americana*): a review. Journal of Ethnopharmacology 148(1): 14-26.

CAPÍTULO 1. EFECTO DE EXTRACTOS VEGETALES CONTRA *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Ralstonia solanacearum* raza 1

García González Susana³, Mejía Sánchez Dimas³, Rodríguez Mejía María de Lourdes³, Lozoya Saldaña Héctor³, Castillo Márquez Luis Emilio³

RESUMEN

Una de las enfermedades más devastadoras en el cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*), es la marchitez bacteriana, ocasionada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Ralstonia solanacearum* raza 1, bacterias transmitidas por semilla, y diseminadas por suelo, agua y prácticas agrícolas, principalmente y se alojan en el xilema, impidiendo el transporte de agua y llegando a ocasionar la marchitez total y muerte de la planta. El manejo de esta enfermedad está basado principalmente en prácticas preventivas ya que una vez en el área de producción, su manejo es complicado al no existir variedades resistentes ni antibióticos eficientes. Los aceites esenciales de plantas aparecen como una alternativa para hacer frente a dichos patógenos, no obstante, el uso de equipos sofisticados para su obtención, los vuelven un recurso muchas veces inaccesible para los productores. Con el objetivo de explorar alternativas más accesibles, en el presente estudio se evaluaron extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), orégano (*Origanum vulgare*), albahaca (*Ocimum basilicum*), ruda (*Ruta graveolens*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y hierba blanca (*Walteria americana*). Las condiciones de extracción se diferenciaron por temperatura

³ Maestría en Ciencias en Protección Vegetal. Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo.

(24°C y >45°C) y solventes como etanol, hexano y agua destilada. La evaluación *in vitro* se realizó mediante difusión en agar nutritivo empleando discos de papel filtro esterilizados e impregnados con los extractos; se empleó agua destilada esterilizada como control negativo, aceite esencial de orégano como control de referencia y *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* y *Pseudomonas syringae* pv. *apii* como controles bacterianos, empleando cuatro repeticiones por tratamiento. Se midió el halo de inhibición después de 24 y 48 horas de incubación. No hubo inhibición para *C. michiganensis* ni para *R. solanacearum* con ninguno de los extractos evaluados; en cambio con el aceite esencial a las 48 horas se presentó un halo de inhibición de 21.87 mm y 19.75 mm, respectivamente. Extractos de romero, ruda y hierba blanca mostraron inhibición sobre los controles bacterianos.

PALABRAS CLAVE

Marchitez bacteriana, *Clavibacter michiganensis*, *Ralstonia solanacearum*, extractos vegetales, inhibición.

INTRODUCCIÓN

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), se ubica entre los principales frutos a nivel mundial, tanto fresco como procesado, y su importancia como hortaliza cultivada se ubica sólo detrás de la papa (Costa y Heuvelink, 2018). Es originario de América del Sur y tiene como principal sitio de diversificación a México (Jenkins, 1948), país que actualmente es el principal exportador de esta hortaliza (FAO, 2022).

Para 2020 en México se produjeron 3,370,826.65 ton, la superficie total sembrada fue 45,284.92 ha y los principales productores fueron Sinaloa, San Luis Potosí y Michoacán (SIAP, 2022). De acuerdo con lo reportado por el SIAP (2021) San Luis Potosí lideró la producción nacional para el ciclo primavera verano 2019-2020, mientras que Sinaloa lo hizo para el ciclo otoño invierno 2021.

Una de las enfermedades bacterianas más devastadoras que ataca al jitomate es la marchitez, cuyos principales agentes causales son: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) y *Ralstonia solanacearum* raza 1 (Rsr1), aunque también se ha reportado a *Burkholderia glumae* como agente causal. Ambas bacterias son de alta importancia ya que llegan a causar pérdidas de hasta el 100 % y para las cuales no existen variedades resistentes ni antibióticos eficientes (Aloyce *et al.*, 2019; Huet, 2014; Rodríguez, 2013), por lo cual se hace necesaria la búsqueda de alternativas para su manejo, una vez presente en el área de cultivo.

Entre las alternativas de manejo, el uso de metabolitos secundarios de plantas, también denominados fitoantimicrobianos, aparece como un recurso potencial para hacer frente a la resistencia a antibióticos generada en bacterias fitopatógenas (Tiwari *et al.*, 2021). Los grupos más importantes con compuestos antimicrobianos en plantas son: fenoles y polifenoles, quinonas, flavonoides, taninos, cumarinas, terpenos, alcaloides, lectinas y polipéptidos (Cowan, 1999), los cuales pueden obtenerse seleccionando solventes y metodologías, de acuerdo con los compuestos de interés (Azmir *et al.*, 2013).

Algunas especies vegetales cuyos productos se han estudiado frente a bacterias causantes de marchitez bacteriana del jitomate son: romero (*Rosmarinus officinalis*; Rueda *et al.*, 2018; Hosseini *et al.*, 2012), orégano (*Origanum vulgare*; Orzali *et al.*, 2020), albahaca (*Ocimum basilicum*; Rojas *et al.*, 2012), ruda (*Ruta graveolens*; Pino *et al.*, 2014) y *Thymus vulgaris* (Borboa *et al.*, 2010; Abd-Elrahim *et al.*, 2022; Hosseini *et al.*, 2012). No obstante, la mayoría de los estudios están centrados en aceites esenciales que no siempre resultan accesibles a los productores.

En la búsqueda de nuevos productos con propiedades antimicrobianas, un primer paso es su análisis bajo condiciones *in vitro*, a fin de evaluar su efecto directo sobre los microorganismos. En el presente trabajo se evaluaron *in vitro* extractos etanólicos, hexánicos y acuosos de romero, orégano, albahaca, ruda, tomillo y hierba blanca (*Walteria americana*) sobre *Cmm* y *Rsr1*, bacterias causantes de marchitez bacteriana en jitomate a fin de conocer su potencial como productos inhibidores.

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE MUESTRAS CON SÍNTOMAS

Se realizó un recorrido por invernaderos con producción de jitomate en el municipio de Tehuacán, Puebla en febrero de 2021. Se tomaron muestras de hojas y tallos con presencia de marchitez, se colocaron en una bolsa resellable y se trasladaron al laboratorio de Bacteriología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE LA MARCHITEZ

Las muestras se cortaron en trozos de 2 cm, se desinfectaron superficialmente con una solución de NaClO al 1% durante un minuto y se enjuagaron con agua destilada estéril por tres veces. Se maceraron en mortero con buffer TBE, se tomó una gota de la suspensión con el asa bacteriológica y se sembró por estría cruzada en agar nutritivo. Las colonias con morfología semejante al agente causal de marchitez (*Cmm* y *Rsr1*) se sembraron nuevamente en agar nutritivo. Para el caso de bacterias blanquecinas, se sembraron en medio TTC, para detección de colonias virulentas de *R. solanacearum* (Denny & Hayward, 2001).

PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

La patogenicidad de los morfotipos aislados se corroboró siguiendo los postulados de Koch. Colonias bacterianas con desarrollo de 48 hrs. en agar nutritivo a temperatura de 25-28°C se suspendieron en agua destilada esterilizada para obtener una concentración de 1×10^7 UFC/mL, que corresponde a una $OD_{400} = 0.3$ para *C. michiganensis* y 1×10^8 UFC/mL, con una $OD_{600} = 0.1$ para *R. solanacearum* (Denny & Hayward, 2001; Van den Bulk *et al.*, 1991). La OD se midió en un espectrofotómetro Jenway 6405UV/Vis. Se inocularon cuatro plantas de jitomate con seis a ocho hojas con cada bacteria y cuatro plantas con sólo agua destilada esterilizada como control y se mantuvieron bajo cámara húmeda empleando bolsas de polipapel; al presentarse los síntomas se reaisló el agente causal y se repitió el procedimiento. La inoculación se realizó por el método de inyección, incorporando 10 µL de suspensión bacteriana (EPPO, 2018).

CORROBORACIÓN DE LA IDENTIDAD DE BACTERIAS AISLADAS DE PLANTAS DE JITOMATE CON SÍNTOMAS DE MARCHITEZ

La identificación de los morfotipos se realizó por aspectos fenotípicos de acuerdo con Rodríguez (2010) y se corroboró por la secuenciación directa del 16s DNAr. Se tomaron colonias de supuestas *Cmm* y *Rsr1* en etapa de crecimiento logarítmico para extracción de ADN (Dellaporta and Hicks, 1983; Marmur, 1961 con modificaciones): Se tomaron muestras de colonias bacterianas puras (5 mL de una suspensión bacteriana de 1×10^6 UFC mL⁻¹) y se maceraron en mortero esterilizado y conservado en ultracongelador a -70°C añadiendo 1 mL de buffer de lisis (Urea 3M, NaCl 0.35 M, Tris Base 0.05M, EDTA 0.02 M y sarcosina al 1%). El producto se llevó a un tubo Eppendorf y se mantuvo a -70°C por 12 horas. Las muestras se llevaron a temperatura ambiente y se agitaron en vortex durante un minuto, posteriormente se centrifugaron durante un minuto a 12,000 rpm. El sobrenadante se colocó en un tubo esterilizado y se le adicionaron 500 µL de fenolcloroformo (12:4); las muestras se homogeneizaron realizando cinco movimientos de campana y se centrifugaron durante tres minutos a 12,000 rpm. El contenido de los tubos se dividió en tres fases, se recuperó las fases acuosas (superficiales) y se colocaron en tubos esterilizados a los cuales se agregaron 200 µL de cloroformo y se centrifugaron por diez minutos a 12,000 rpm. Se recuperaron los sobrenadantes en nuevos tubos y se añadieron 500 µL de isopropanol y 50 µL de acetato de sodio (10 M), a continuación, se incubaron en frío durante cinco minutos. Se centrifugaron por diez minutos a 12,000 rpm, se eliminaron los sobrenadantes cuidadosamente y se dejaron secar invirtiendo los

tubos sobre una toalla de papel por aproximadamente 15 minutos. Las pastillas obtenidas y concentradas al fondo de los tubos se lavaron con 50 µL de etanol al 70 % dando ligeros golpes al tubo. Se centrifugaron durante cinco minutos a 12,000 rpm. Se eliminaron los sobrenadantes y se adicionaron 50 µL de agua grado PCR.

Se verificó la calidad del ADN a través de electroforesis en gel de agarosa al 1%, empleando Gel Red como colorante (Huang *et al.*, 2010).

Para la amplificación del gen que codifica el ARNr 16S se emplearon los iniciadores universales 8F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492 R (5'- CGGTTACCTTGTTACGACTT -3'; EzBioCloud, 2019). Y se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de acuerdo con el siguiente procedimiento:

La mezcla de reacción se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Mezcla de reacción para la amplificación del gen que codifica el ARN 16S bacteriano empleando los iniciadores 8F y 1492 R.

Reactivo	Concentración de trabajo	Concentración de trabajo	Volumen por reacción
Buffer	5X	1X	5 µL
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5 µL
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.5 µL
Iniciador directo 8F	10 mM	0.6 mM	1.5 µL
Iniciador reverso 1492 R	10 mM	0.6 mM	1.5 µL
TaqPolimerasa	5 u/µL	1.5 u/ µL	0.3 µL
Agua PCR			12.7 µL
ADN			2 µL
Total			25 µL

Condiciones de PCR: Desnaturalización inicial de 5' a 95 °C seguida de 35 ciclos de 50" a 94 °C, 30" a 57 °C y 1':30" a 72 °C y una amplificación de 5' a 72 °C.

Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % colocando un marcador de 100 pb y empleando GelRed como colorante. Posteriormente se acondicionaron las muestras para enviarlas al laboratorio MacroGen en Korea para su secuenciación mediante el método Sanger.

Las secuencias se limpiaron empleando el programa DNA Baser Assembler v5.15.0 y se compararon con las disponibles en la biblioteca de referencia GenBank, del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES

Se adquirieron plantas de romero, orégano, albahaca y ruda en el estado de Morelos. Se mantuvieron en el invernadero de Bacteriología de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) hasta su procesamiento, recibiendo riego diario y un tratamiento inicial con Hidróxido de cobre para el manejo de hongos. Además, se obtuvieron en el mercado local muestras secas para infusión de tomillo y hierba blanca.

Se colectaron y lavaron con agua corriente hojas y tallos de romero, orégano, albahaca y ruda en fresco, así como hojas de tomillo y hierba blanca en seco, se dejaron escurrir y secar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se cortaron en trozos de 1 cm. Con el objetivo de extraer diferentes metabolitos secundarios, de acuerdo con su polaridad, se emplearon como solventes etanol (J.T. Baker; polar), hexano grado reactivo (Karal; apolar) y agua destilada (bipolar).

Se obtuvieron un total de 36 extractos. Para los extractos obtenidos a temperatura ambiente, se colocaron 10 g de muestra de las seis especies vegetales con cada solvente en matraces Erlenmeyer individuales con tapón de vidrio y sellados con Parafilm ajustando el volumen a 200 mL, con la finalidad de obtener una mezcla al 5% p/v, y se agitaron durante 24 horas en un agitador magnético (Thermolyne); posteriormente se filtraron con papel Whatman No. 1.

Para extractos obtenidos empleando calor, para etanol y hexano (200 mL), las seis especies vegetales (10 g) se procesaron individualmente con equipo Soxhlet durante dos horas, calentando el reactivo mediante un transformador (Staco) con un voltaje de 120 v al 60 %; y para agua se colocaron las seis especies vegetales (10 g) en matraces Erlenmeyer individuales, se ajustó el volumen a 200 mL para obtener una mezcla al 5% p/v, se llevó a punto de ebullición durante cinco minutos y se filtró con papel Whatman No. 1 (Azwanida, 2015; Azmir *et al.*, 2013).

Obtenidos los extractos se eliminó el solvente en un rotavapor (Buchi RE121) a 20 rpm y baño de agua (Buchi 461) a una temperatura de 45°C para etanol, 35°C para hexano y 70°C para agua; los extractos se ajustaron a una concentración de 2 mg mL⁻¹ empleando el solvente de extracción. La concentración se obtuvo considerando el peso del material original del cual se hizo la extracción.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS *In vitro*

Se evaluaron los 36 extractos bajo condiciones *in vitro* empleando las diluciones a una concentración de 2 mg mL⁻¹ en el solvente de extracción contra *Cmm* y *Rsr1* mediante el método de difusión en agar (Reyes-Jurado *et al.*, 2014). Para ello las bacterias se sembraron de forma masiva en caja Petri con agar nutritivo tomando con un isopo muestra de una dilución a 1x10⁷ UFC mL⁻¹ de *Cmm* y 1x10⁸ UFC mL⁻¹ en el caso de *Rsr1* y distribuyendo de forma homogénea por todo el medio. Posteriormente se colocaron discos de 5 mm de papel filtro Whatman No. 1 impregnados con los extractos. Se incubaron a una temperatura de 25 - 28 °C y se midieron los diámetros de inhibición a las 24 y 48 horas. Se

empleó como testigo agua destilada esterilizada y como control de referencia aceite esencial de orégano al 100%. Además, se emplearon dos testigos bacterianos, *P. syringae* pv. *apii* (*Psa*) y *P. amygdali* pv. *lachrymans* (*Pal*). Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones. Se consideró como tratamiento a la combinación entre bacteria, planta, solvente y extracción, según se muestra en el cuadro 4.

Cuadro 4. Tratamientos para la evaluación de extractos vegetales aplicados al suelo en el manejo de marchitez bacteriana en jitomate.

Bacteria	Planta	Solvente	Método
<i>Cmm</i>	Romero	Etanol	Maceración 24 horas
<i>Rsr1</i>	Orégano		Soxhlet 2 horas
<i>Psa</i>	Albahaca	Hexano	Maceración 24 horas
<i>Pal</i>	Ruda		Soxhlet 2 horas
	Tomillo	Agua	Maceración 24 horas
	Hierba blanca		Decocción 5 minutos

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se empleó un diseño experimental completamente al azar, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para ver si existía diferencia entre los tratamientos y con una separación de medias de Tukey ($p < 0.01$) se determinó el tratamiento que resultó en una mayor inhibición.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE MARCHITEZ

Después de las 48 horas de haber realizado los aislamientos de los agentes causales de las plantas de tomate con síntomas de marchitez, se observaron colonias convexas, fluidas y de coloración amarillo que se acuerdo a la sintomatología, corresponden a *Cmm* (Yim *et al.*, 2012). En otra de las muestras se obtuvieron colonias blanquecinas, mucoides y convexas, que en medio TTC se presentaron blancas, fluidas y con centro rojo, coincidiendo la identificación fenotípica con colonias virulentas de *Rsr1* (Denny & Hayward, 2001), los aislamientos se muestran en la Figura 1. Ambas colonias presentaron organismos de forma bacilar no móviles, los primeros positivos a la tinción de gram y los segundos teñibles con safranina.



Figura 1. Aislamientos de agentes causales de marchitez en jitomate. A) *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en agar nutritivo; B) *R. solanacearum* raza 1 en medio TTC.

PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

A los doce y catorce días después de la inoculación comenzó a detectarse acucharamiento en las hojas basales de plantas de jitomate inoculadas con *Rsr1*

y *Cmm* respectivamente y mantenidas bajo cámara húmeda. Posteriormente comenzó a visualizarse marchitamiento comenzando en el margen de los folíolos. A los 35 días después de la inoculación las plantas inoculadas con *Cmm* presentaron marchitez en el 60% de sus hojas, manteniéndose en su mayoría restringida a los folíolos sin ocasionar marchitez completa de las hojas, mientras que en las plantas inoculadas con *Rsr1* el 85% de las hojas presentaron marchitez, en su mayoría ocasionando la marchitez completa de las hojas que llegaron a desprenderse de la planta. El testigo no presentó síntomas como puede apreciarse en la Figura 2.



Figura 2. Reproducción de síntomas de marchitez. A) Planta testigo B) Planta inoculada con *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* y C) Planta inoculada con *R. solanacearum* raza 1.

CORROBORACIÓN DE LA IDENTIDAD DE BACTERIAS AISLADAS DE PLANTAS DE JITOMATE CON SÍNTOMAS DE MARCHITEZ

Se obtuvo la amplificación de un producto de 1500 pb para las muestras bacterianas, que corresponde al gen que codifica al ARNr 16S (Figura 3).

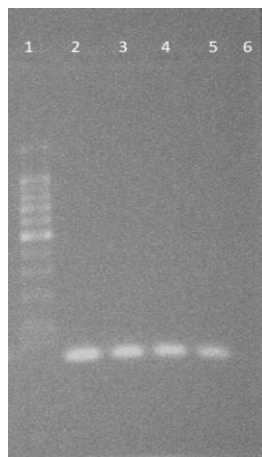


Figura 3. Electroforesis de productos de PCR 1) Marcador molecular de 100 pb 2 y 3) Producto de PCR de 1500 pb derivado del morfotipo de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, 4) Producto de PCR de 1500 pb derivado del morfotipo de *R. solanacearum* raza 1, 5) Testigo positivo y 6) Testigo negativo.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS *in vitro*

No hubo inhibición por ninguno de los 36 extractos probados sobre bacterias causantes de marchitez en jitomate. El único efecto se observó en el control positivo empleando aceite esencial de orégano: para *Cmm* el diámetro de inhibición fue de 22.75 y 21.87 mm a las 24 y 48 horas de incubación, respectivamente y para *Rsr1* fue de 20.37 y 19.75 mm a las 24 y 48 horas de incubación. El mayor diámetro de inhibición ocasionado por aceite esencial de orégano se obtuvo sobre la bacteria testigo *Psa* con 25.62 y 24.75 mm, mientras que el menor efecto se observó en *Pal* con 8.75 y 8.75 mm al cabo de 24 y 48 horas, respectivamente (Cuadro 5). Con estos resultados se confirma la actividad antibacteriana del aceite esencial de orégano sobre bacterias causantes de marchitez en jitomate, antes reportado por Orzali *et al.* (2020), y por Todorovic *et*

al. (2021). En la Figura 4 se muestra la inhibición para *C. michiganensis* y *R. solanacearum*, empleando aceite esencial de orégano.

Cuadro 5. Diámetro de inhibición (mm) de distintos extractos vegetales sobre bacterias fitopatógenas al cabo de 24 y 48 horas de incubación.

	<i>Clavibacter</i>		<i>Ralstonia</i>		<i>Pseudomonas</i>		<i>P. amygdali pv.</i>	
	<i>michiganensis</i>		<i>solanacearum</i>		<i>syringae pv. apii</i>		<i>lachrymans</i>	
	raza 1							
	24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs
Romero A	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	10.87 ^c	10.62 ^{bc}	13.12 ^b	12.87 ^b
Romero B	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	11.50 ^c	11.25 ^b	8.87 ^c	8.00 ^c
Romero C	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	8.87 ^d	8.75 ^c	0 ^d	0 ^d
Romero D	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	18.25 ^b	17.37 ^a	0 ^d	0 ^d
Ruda B	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	8.75 ^d	8.50 ^c	0 ^d	0 ^d
H. blanca E	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^e	0 ^d	11.50 ^{bc}	9.87 ^{bc}
H. blanca F	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^e	0 ^d	22.50 ^a	20.75 ^a
Orégano G	22.75 ^a	21.87 ^a	20.37 ^a	19.75 ^a	25.62 ^a	24.75 ^{bc}	8.75 ^c	8.75 ^c

Medias con la misma letra minúscula en la misma columna no son estadísticamente diferentes a una probabilidad menor a 0.01 (α)
A=Etanol maceración 24 horas; B= Etanol soxhlet dos horas; C= Hexano maceración 24 horas; D= Hexano soxhlet dos horas; E=Agua maceración 24 horas; F=Agua decocción 5 minutos; G=Aceite esencial.

La actividad inhibitoria al emplear aceite esencial de orégano posiblemente se deba al carvacrol ya que varios autores han analizado el aceite esencial de orégano, y lo han encontrado como el principal compuesto (Todorovic *et al.*, 2021; Yilmaz *et al.*, 2021; Della Pepa *et al.*, 2019); es definido como un monoterpeno de peso molecular igual a 150.22 g mol⁻¹, líquido a temperatura ambiente y de incoloro a amarillo pálido (PubChem, 2022).

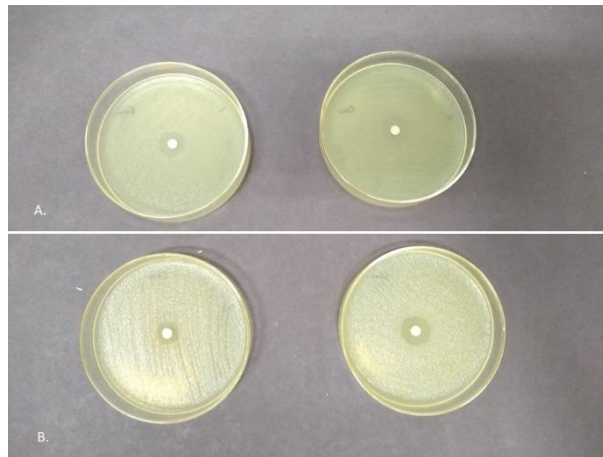


Figura 4. Inhibición de agentes causales de marchitez en jitomate como efecto del aceite esencial de orégano después de 48 horas de incubación. A) *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* y B) *R. solanacearum* raza 1,

Posiblemente el aceite esencial de orégano, a través del carvacrol es capaz de interferir en la integridad de la membrana celular bacteriana pues este compuesto se caracteriza por su calidad hidrófoba, atribuida al grupo -OH, y a su capacidad de intercambio de protones (Liu *et al.*, 2019), además que se ha señalado su papel en la modificación de los ácidos grasos de la membrana celular (Siroli *et al.*, 2018).

Su actividad sobre *Cmm*, además, probablemente se deba a la interacción que se da entre el carvacrol y la proteína PDB4JJO, perteneciente a las expansinas e importante en el proceso de invasión del xilema pues Yilmaz *et al.* (2021) señalan que esta interacción puede ser una de las causas de la inhibición causada por el aceite esencial de orégano.

Aunque en el presente estudio no se tuvo efecto con los extractos evaluados sobre bacterias causantes de marchitez, existen otros estudios con resultados

diferentes. Belgüzar *et al.* (2016) obtuvieron una inhibición del 100% sobre *R. solanacearum* al emplear extracto acuoso al 8% de *T. vulgaris* mientras que Siddique *et al.* (2020) reportaron una inhibición de *Cmm* bajo condiciones *in vitro* de 14.40 y 13.00 mm en la evaluación de extractos acuosos al 10% de *Peganum harmala* y *Mentha piperita* respectivamente. Por otro lado, Ichim *et al.* (2017) evaluaron el extracto metanólico de *R. officinalis* con resultados favorecedores. Esto puede deberse a la mayor concentración de los extractos, ya que varios autores coinciden en que a mayor concentración de los extractos evaluados o de los compuestos presentes en ellos, mayor es la inhibición causada (Deberdt *et al.*, 2012; Rueda *et al.*, 2018; Todorovic *et al.*, 2021).

No obstante, igualmente podría deberse a que el metaboloma de las plantas varía según el quimiotipo (Deberdt *et al.*, 2017; Telci *et al.*, 2006), las condiciones ambientales y el tipo de suelo en que se desarrollan (Cecilia *et al.*, 1989), la fertilización (Ibrahim *et al.*, 2011) o incluso la concentración de dióxido de carbono presente en el ambiente (Ibrahim y Jaafar, 2012).

Otra causa posible de no haber encontrado actividad inhibitoria de los extractos evaluados sobre bacterias causantes de marchitez en jitomate es la exposición al calor que tuvieron durante el procesamiento, pues el tiempo de extracción y las temperaturas influyen en la extracción de compuestos antibacterianos (Cai *et al.*, 2019), por lo que futuros estudios podrían estar enfocados en la evaluación de extractos obtenidos sólo mediante maceración.

En el presente estudio se presenta a los extractos etanólicos y hexánicos de romero y etanólico de ruda como posibles recursos en el manejo de *P. syringae*

pv. *apii*, causante de mancha foliar del apio, además a extractos etanólicos de romero y acuosos de *hierba* blanca, en el manejo de *P. amygdali* pv. *lachrymans*, por lo que el siguiente paso podría ser evaluarlos directamente en planta.

CONCLUSIONES

Extractos acuosos, hexánicos y etanólicos al 5%, no tienen efecto *in vitro* sobre bacterias causantes de marchitez en jitomate, no obstante, se corrobora el efecto inhibitorio del aceite esencial de *O. vulgare* sobre *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* y *R. solanacearum*.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para el primer autor.

LITERATURA CITADA

- Abd-Elrahim, R., M. R. Tohamy, M. M. Atia, M. M., Elashtokhy and M. A. Ali. 2022. Bactericidal activity of some plant essential oils against *Ralstonia solanacearum* infection. Saudi Journal of Biological Sciences 29(4): 2163-2172.
- Aloyce, A., P. A. Ndakidemi and E. R. Mbega, 2019. Survey and conventional management methods of bacterial wilt disease in open fields and greenhouses in Tanzania. Journal of Plant Pathology 101(4): 1107-1114.
- Azmir, J, I.S.M. Zaidul, M.M. Rahman, K.M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M.H.A. Jahurul, K. Ghafoor, N.A.N. Norulaini and A.K.M. Omar. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. Journal of Food Engineering 117: 426–436.
- Azwanida, N.N. 2015. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. Medicinal & Aromatic Plants 4:196.
- Barth R. L., M. P. Weinstein, C. A. Petti. 2007. Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing. Clinical Infectious Diseases 44 (8): 1108–1114.

- Belgüzar, S., M. Yılar, Y. Yanar, İ. Kadioğlu and G. Doğar. 2016. Antibacterial activities of *Thymus vulgaris* L. (Thyme) extract and essential oil against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Turkish Journal of Weed Science 19(2): 20-27.
- Borboa, J., E. Rueda, E. Acedo, J. Ponce, M. Cruz, J. García y M. Ortega. 2010. Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales contra *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. Tropical and Subtropical Agroecosystems 12(3):539-547.
- Cai, J., Y. Gao, M. Wang, J. Zhang, Y. Zhang, Q. Wangm and J. Liu. 2019. Antibacterial activity of *Polygonum orientale* extracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the agent of bacterial canker of tomato disease. Brazilian Archives of Biology and Technology 62: e19180021.
- Cecilia, S., F. Carceller, G. Regleroy and J. Sanz. 1989. Estudio de la composición del aceite esencial de romero procedente de plantas recogidas en diferentes épocas del año en distintas zonas de la Comarca del Moncayo. Turiaso IX: 519-535.
- Costa, J. M., and E. Heuvelink. 2018. The global tomato industry. *In*: Tomatoes. Heuvelink E. (ed.). CABI. Boston, USA. pp: 1–26.
- Cowan, M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. American Society for Microbiology. 12: 564-565.
- Deberdt, P., B. Perrin, R. Coranson-Beaudu, P. F. Duyck and E. Wicker. 2012. Effect of *Allium fistulosum* extract on *Ralstonia solanacearum* populations and tomato bacterial wilt. Plant disease 96(5): 687-692.
- Deberdt, P., I. Davezies, R. Coranson-Beaudu and A. Jestin. 2017. Efficacy of leaf oil from *Pimenta racemosa* var. *racemosa* in controlling bacterial wilt of tomato. Plant Disease 102(1): 124-131.
- Della Pepa, T., H. S. Elshafie, R. Capasso, V. De Feo, I. Camele, F. Nazzaro, Scognamiglio, M. R. and L. Caputo. 2019. Antimicrobial and phytotoxic activity of *Origanum heracleoticum* and *O. majorana* essential oils growing in Cilento (Southern Italy). Molecules 24(14): 2576.
- Dellaporta, S. J. and J. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep. Plant Molecular Biology Reporter 1: 19-21.
- Denny, T.P. & A. C. Hayward. 2001. Gram-negative bacteria. *Ralstonia*. En: Schaad, N. W., J. B. Jones, and W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of plant pathogenic bacteria. The American Phytopathological Society. Minnesota. pp. 151 – 174.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). 2018. PM 7/21 (2) *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* y *R. syzygii* (complejo de especies de *Ralstonia solanacearum*). Boletín EPPO. 48(1): 32-63.

EzBioCloud. 2019. 16S rRNA and 16S rRNA Gene. Disponible en: <https://help.ezbiocloud.net/16s-rna-and-16s-rna-gene/> Fecha de consulta: 05 de mayo, 2022.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2022. FAOSTAT Statistical Database.

Guest, D. and J. Brow. 1997. Plant defenses against pathogens. En: Brown, J. and H. Ogle (eds.). 1997. Plant pathogens and plant diseases. Australasian Plant Pathology Society Inc. Australia. pp: 263 – 286.

Hosseini N., M. L. Alamshahi and N. Panjehkeh. 2012, November. Biocontrol efficiency of medicinal plants against *Pectobacterium carotovorum*, *Ralstonia solanacearum* and *Escherichia coli*. The Open Conference Proceedings Journal 3 (Suppl 1-M8): 46-51.

Huang, Q., L. Baum and W. L. Fu. 2010. Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis. Clinical Laboratory Journal For Clinical Laboratories And Laboratories Related 56: 149-152.

Huet, G. 2014. Breeding for resistances to *Ralstonia solanacearum*. Frontiers in Plant Science: 00715.

Ibrahim, M., H. Jaafar, A. Rahmat, and Z. Rahman, 2011. Effects of nitrogen fertilization on synthesis of primary and secondary metabolites in three varieties of kaci fatimah (*Labisia pumila* Blume). International Journal of Molecular Sciences. 12 (8): 5238 – 5254.

Ibrahim, M. y Jaafar, H. 2012. Impact of elevated carbon dioxide on primary, secondary metabolites and antioxidant responses of *Eleais guineensis* Jacq.(Oil Palm) seedlings. Molecules 17 (5): 5195 – 5211.

Ichim, E., L. Marutescu, M. Popa and S. Cristea. 2017. Antimicrobial efficacy of some plant extracts on bacterial ring rot pathogen, *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. The EuroBiotech Journal 1(1): 85-88.

Lal, M., R. Kathpalia, R. Sisodia, and R. Shakya, 2018. Biotic Stress. En: Bhatla, S. y M. Lal. 2018. Plant Physiology, Development and Metabolism. Springer Nature Singapore. Delhi, India. pp: 1029 – 1095.

Liu, Q., K. Qiao and S. Zhang. 2019. Potential of a small molecule carvacrol in management of vegetable diseases. Molecules 24(10): 1932.

Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. Journal of Molecular Biology 3: 208-218.

Orzali, L., M. T. Valente, V. Scala, S. Loreti and N. Pucci. 2020. Antibacterial activity of essential oils and *Trametes versicolor* extract against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Ralstonia solanacearum* for seed treatment and development of a rapid in vivo assay. Antibiotics 9(9): 628.

Pino, O., Y. Sánchez, M. Rojas, Y. Abreu, T. Correa, D. Martínez y R. Montes. 2014. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ruta chalepensis* L. Revista de Protección Vegetal. 29(3):220-225.

PubChem. 2022. Carvacrol. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10364> Fecha de consulta: 15 de mayo, 2022.

Reyes-Jurado, F., E. Palou y A. López-Malo. 2014. Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 8(1): 68-78.

Rodríguez, M. D. L. 2013. Biogeografía, Diagnóstico y Manejo Integrado de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en México. Revista Mexicana de Fitopatología, Vol. 31 (Suplemento): 22-23.

Rojas, M., Y. Sánchez, Y. Abreu, I. Espinosa, T. Correal y O. Pino. 2012. Caracterización química y actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. y *Ocimum basilicum* var. *genovese* L. Revista de Protección Vegetal. 27 (2): 130-134.

Rueda, E., J. Juvera, I. Romo y R. Holguín. 2018. Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales de orégano y tomillo contra *Ralstonia solanacearum*. Revista mexicana de ciencias agrícolas. Vol. esp. 20: 4251-4261.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2021. Escenario mensual de productos agroalimentarios: Tomate rojo (Jitomate). Dirección de Análisis Estratégico. México. 2 p.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2022. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> Fecha de consulta: Abril, 2022.

Siroli, L., G. Braschi, A. de Jong, J. Kok, F. Patrignani and R. Lanciotti. 2018. Transcriptomic approach and membrane fatty acid analysis to study the response mechanisms of *Escherichia coli* to thyme essential oil, carvacrol, 2-(E)-hexanal and citral exposure. Journal of applied microbiology 125(5): 1308-1320.

Telci, I., E. Bayram, G. Yilmaz and B. Avci. 2006. Variability in essential oil composition of Turkish basils (*Ocimum basilicum* L.). Biochemical Systematics and Ecology 34(6): 489-497.

Todorović, B., I. Potočnik, E. Rekanović, M. Stepanović, M. Kostić, M. Ristić and S. Milijašević-Marčić. 2016. Toxicity of twenty-two plant essential oils against pathogenic bacteria of vegetables and mushrooms. Journal of Environmental Science and Health, Part B 51(12): 832-839.

Van den Bulk, R. W., J. Jansen, W. H. Lindhout and H. J. M. Löffler. 1991. Screening of tomato somaclones for resistance to bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). Plant breeding 107(3): 190-196.

Yılmaz, M., Ö. Baysal and R. S. Silme. 2021. The effect of a seed coating with *Origanum vulgare* essential oil on *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Plant Protection Science 57(3): 217–225.

Yim, K. O., H. I. Lee, J. H. Kim, S. D. Lee, J. E. Cho and J. S. Cha. 2012. Characterization of phenotypic variants of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolated from *Capsicum annuum*. European Journal of Plant Pathology 133: 559–575.

Zongo, F., C. Ribuot, A. Boumendjel and I. Guissou. 2013.. Botany, traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Waltheria indica* L. (syn. *Waltheria americana*): a review. Journal of Ethnopharmacology 148(1): 14-26.

CAPÍTULO 2. EVALUACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES Y DE LA ASOCIACIÓN DE CULTIVOS SOBRE LA MARCHITEZ BACTERIANA DEL JITOMATE

García González Susana⁴, Mejía Sánchez Dimas⁴, Rodríguez Mejía María de Lourdes⁴, Lozoya Saldaña Héctor⁴, Castillo Márquez Luis Emilio⁴

RESUMEN

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* y *Ralstonia solanacearum* son dos bacterias causantes de marchitez en el cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*) y capaces de ocasionar pérdidas de hasta 100%. Con el fin de testear el efecto de la aplicación de extractos vegetales y de la asociación del cultivo con plantas conocidas por la producción de compuestos orgánicos con propiedades antibacterianas, sobre el desarrollo de marchitez bajo invernadero y su posible papel en la inducción de resistencia, en el presente trabajo se evaluó la severidad de la enfermedad en plantas de jitomate luego de la inoculación artificial de ambas bacterias y de la aplicación al suelo y vía foliar, previa y posterior a la inoculación, de extractos acuosos, etanólicos y hexánicos de romero (*Rosmarinus officinalis*), orégano (*Origanum vulgare*), albahaca (*Ocimum basilicum*), ruda (*Ruta graveolens*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y hierba blanca (*Walteria americana*); además, en plantas de jitomate inoculadas artificialmente con ambas bacterias y asociadas desde el trasplante con romero, orégano, albahaca y ruda. Se empleó aceite esencial de orégano al 10% como control

⁴ Maestría en Ciencias en Protección Vegetal. Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo.

positivo y agua como control negativo. Cada tratamiento tuvo 4 repeticiones. La severidad de la enfermedad se evaluó semanalmente a partir de la inoculación y de acuerdo con una escala de seis categorías. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para el análisis de los datos obtenidos. No hubo diferencias estadísticas entre ninguno de los tratamientos, respecto al testigo, sugiriendo que, mediante el procedimiento experimental empleado, la aplicación al suelo o foliar de los extractos empleados, la asociación con las plantas productoras de metabolitos secundarios seleccionadas o el aceite esencial de orégano al 10% no tienen ningún efecto sobre la severidad de marchitez causada por *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ni *R. solanacearum* ni como inductores de resistencia frente a estas bacterias.

PALABRAS CLAVE

Solanum lycopersicum, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Ralstonia solanacearum* raza 1, resistencia, extractos vegetales, asociación de cultivos.

INTRODUCCIÓN

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) es un cultivo de alta importancia económica a nivel nacional, para 2020 en México se produjeron 3,370,826.65 ton, la superficie total sembrada fue 45,284.92 ha y los principales productores fueron Sinaloa, San Luis Potosí y Michoacán (SIAP, 2022). No obstante, es un cultivo susceptible a marchitez bacteriana, una enfermedad que puede llegar a producir la muerte de la planta y pérdidas de hasta 100% de la producción y es

ocasionada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) y *Ralstonia solanacearum* raza 1 (Rsr1; Rodríguez, 2013; Rodríguez, 2010).

Las prácticas de manejo para esta enfermedad están basadas en la prevención ya que su manejo es complicado una vez establecida en el cultivo al no existir antibióticos eficientes ni variedades resistentes (Huet, 2014; Sharabani *et al.*, 2012).

La demanda de hortalizas producidas bajo esquemas respetuosos con el medio ambiente cada día es mayor, por lo que la oferta debe adecuarse a dichos requerimientos. En México la superficie sembrada de jitomate bajo manejo orgánico ha ido en incremento en las últimas décadas, al igual que la producción y el rendimiento por unidad de superficie (SIAP, 2022), lo que nos lleva a la necesidad de desarrollar más y mejores alternativas para el manejo de la marchitez bacteriana del jitomate.

Entre las alternativas que han surgido para el manejo de marchitez bacteriana, el uso de productos vegetales como aceites esenciales, extractos de compuestos solubles y compuestos bioactivos se ha explorado en los últimos años, dirigidos principalmente a la inhibición o supresión directa de las bacterias (Borboa *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2005; Pradhanang *et al.*, 2003), no obstante, un campo menos explorado es su uso como inductores de resistencia, que puede representar una alternativa ambientalmente amigable y contribuir al desarrollo de una agricultura sostenible (González *et al.*, 2013).

Ejemplo de esto, es el extracto de Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), que ha sido evaluado sobre la severidad de la mancha amarilla (*Drechslera tritici-repentis*) y marrón (*Bipolaris sorokiniana*) en plantas de trigo, encontrando un índice de severidad estadísticamente menor al testigo al emplear el extracto (Acuña y Grabowski, 2012) así como sobre *Xanthomonas campestris* pv. *sesami* (Álvarez y Grabowski, 2013). En ambos estudios el extracto no presentó inhibición del crecimiento de los patógenos *in vitro*, concluyendo que puede ser considerado como un inductor de resistencia.

Por otra parte, al considerar la señalización planta a planta en la inducción de resistencia, la literatura consultada menciona sólo el caso de interacciones entre plantas de la misma especie, donde plantas afectadas por algún agente generan compuestos volátiles que, al recibidos por plantas sanas, generan la activación de su sistema de defensa (Billi *et al.*, 2019; Sugimoto *et al.*, 2014; Yoneya y Takabayashi, 2014;) generalmente a un bajo costo energético (Luna-Diez, 2016). En este sentido, parece prometedor el desarrollo de investigación que permita el estudio de la interacción de plantas de diferente especie en la inducción de resistencia a enfermedades bacterianas.

En el presente estudio se evaluó la severidad de marchitez bacteriana causada por *Cmm* y *Rsr1* al ser inoculada de forma artificial en plantas de jitomate tratadas con extractos acuosos, etanólicos y hexánicos de romero (*Rosmarinus officinalis*), orégano (*Origanum vulgare*), albahaca (*Ocimum basilicum*), ruda (*Ruta graveolens*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y hierba blanca (*Walteria americana*), así como en plantas de jitomate asociadas a romero, orégano,

albahaca y ruda con el fin de testear su posible efecto en la inducción de resistencia contra esta enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

CULTIVOS BACTERIANOS

Las cepas utilizadas en este estudio fueron *Cmm* y *Rsr1* aisladas de plantas de jitomate con síntomas de marchitez en producción bajo invernadero en el municipio de Tehuacán, Puebla en febrero de 2021, para las cuales se realizaron pruebas de patogenicidad siguiendo los postulados de Koch, así como caracterización morfológica e identificación molecular.

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES

A partir de plantas de romero, orégano, albahaca y ruda se obtuvieron muestras de material vegetal fresco. En el mercado local se obtuvieron muestras secas de tomillo y hierba blanca. Se lavó el material y se dejó escurrir a temperatura ambiente durante 30 minutos para después cortarlo en trozos de hasta 1 cm de largo.

Se expusieron a etanol, hexano y agua, de forma individual, 10 g de hojas y tallos de cada planta durante 24 horas en matraces sellados en un agitador magnético (Thermolyne) y se filtraron las mezclas con papel Whatman No. 1. Además, empleando etanol y hexano, las seis especies vegetales se procesaron por separado con equipo Soxhlet durante dos horas calentando el reactivo mediante un transformador (Staco) con un voltaje de 120 v al 60 %. Por otro lado, empleando agua, las seis especies vegetales se llevaron a punto de ebullición

durante cinco minutos, las mezclas se filtraron con papel Whatman No. 1. Para cada extracción, se emplearon 10 g de muestra en 200 mL de mezcla (Azwanida, 2015; Azmir *et al.*, 2013).

Obtenidos los extractos se eliminó el solvente con rotavapor (Buchi RE121) a 20 rpm y baño de agua (Buchi 461) a una temperatura de 45°C para etanol, 35°C para hexano y 70°C para agua; y se dividió en submuestras cuya concentración se ajustó de la siguiente manera: Suspensión 1) concentración de 500 mg mL⁻¹, empleando el solvente inicialmente utilizado para la extracción y Suspensión 2) concentración de 100 mg mL⁻¹, empleando agua como solvente y adicionando 10µL de Tween 20 por cada 10 mL de mezcla. La concentración se obtuvo considerando el peso del material original del cual se hizo la extracción. Los extractos se conservaron en refrigeración a 4°C en envases color ámbar.

PLANTAS DE TOMATE.

Las plantas de jitomate se desarrollaron bajo condiciones de invernadero durante los meses de Diciembre – Abril, 2022. Se hizo un tratamiento con agua a 50°C durante 10 minutos a la semilla. Cuando las plántulas contaban con dos pares de hojas verdaderas se trasplantaron a bolsas de plástico. Se empleó suelo esterilizado durante 1:20 horas con vapor de agua. Las bolsas se colocaron a una distancia de 50 cm entre planta y 50 cm entre líneas. Se realizó poda y tutorio según la necesidad del cultivo y se fertilizó con UltraSol (15-30-15 + micros), empleando 28 g planta⁻¹ diferido en cuatro aplicaciones para cumplir con los requerimientos del cultivo (Ankerman and Large, 2019). Para el manejo de

mosquita blanca se empleó el producto comercial Muralla ®, según las indicaciones de la etiqueta.

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES EN EL DESARROLLO DE MARCHITEZ BACTERIANA

Plantas de jitomate con 16 hojas fueron asperjadas en tallos y hojas (haz y envés) con aproximadamente 2 mL de la Suspensión 1 de los extractos correspondientes a romero, orégano, albahaca y ruda empleando atomizador genérico. Siete días posteriores a la aplicación fueron inoculadas con *Cmm* o *Rsr1* por el método de inyección empleando 5 µL de una suspensión bacteriana con una concentración de 1×10^7 UFC/mL, que corresponde a una $OD_{400} = 0.3$ para *Cmm* y 1×10^8 UFC/mL, con una $OD_{600} = 0.1$ para *Rsr1* (Denny & Hayward, 2001; Van den Bulk *et al*, 1991) y siete días después, asperjadas nuevamente. Se empleó una suspensión de agua con 10µL de Tween 20 por cada 10 mL como testigo y una suspensión de aceite esencial de orégano al 10% emulsionada con 10µL de Tween 20 por cada 10 mL de suspensión como control positivo siguiendo el mismo patrón de aplicación que para los extractos vegetales. La severidad se evaluó semanalmente durante ocho semanas a partir de la semana posterior a la inoculación empleando una escala de seis categorías: sin síntomas = 0; una hoja parcialmente marchita = 1; marchitez en más de una hoja, pero menos del 50% = 2; entre 50% y 75% de hojas marchitas = 3; más del 75% de hojas marchitas, pero no el 100% = 4; planta completamente marchita y muerta = 5 (Van den Bulk *et al.*, 1991). Se consideró como tratamiento la combinación entre bacteria, planta, solvente empleado y método de extracción de acuerdo con el Cuadro 6.

Cuadro 6. Tratamientos para la evaluación de extractos vegetales aplicados vía foliar en el manejo de marchitez bacteriana en jitomate.

Bacteria	Planta	Solvente	Método
<i>Cmm</i>	Romero	Etanol	Maceración 24 horas
Rs	Orégano		Soxhlet 2 horas
	Albahaca	Hexano	Maceración 24 horas
	Ruda		Soxhlet 2 horas
		Agua	Maceración 24 horas
			Decocción 5 minutos

En plantas de jitomate con dos hojas verdaderas se aplicaron al suelo 0.25 mL de la Suspensión 1 para los extractos de romero, orégano, albahaca, ruda, tomillo y hierba blanca después de 7 días se inocularon siguiendo la metodología mencionada y, posteriormente de forma semanal se aplicaron 0.25 mL de la misma suspensión hasta tener un total de cinco aplicaciones. Se emplearon los mismos controles que para la aplicación foliar. Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones. Posterior a la inoculación, se realizó una evaluación semanal de la severidad de la enfermedad durante cinco semanas, Se consideró como tratamiento la combinación entre bacteria, planta, solvente empleado y método de extracción de acuerdo con el cuadro 7.

Cuadro 7. Tratamientos para la evaluación de extractos vegetales aplicados al suelo en el manejo de marchitez bacteriana en jitomate.

Bacteria	Planta	Solvente	Método
<i>Cmm</i>	Romero	Etanol	Maceración 24 horas
Rs	Orégano		Soxhlet 2 horas
	Albahaca	Hexano	Maceración 24 horas
	Ruda		Soxhlet 2 horas
	Tomillo	Agua	Maceración 24 horas
	Hierba blanca		Decocción 5 minutos

EFFECTO DE LA ASOCIACIÓN DE CULTIVOS EN EL DESARROLLO DE MARCHITEZ BACTERIANA

Desde el trasplante, plantas de jitomate se intercalaron con plantas productoras de COV's (romero, orégano, albahaca y ruda) que se podaron de forma semanal para mantener un área foliar de 30 cm. Se colocó a las productoras de COV's en el centro y cuatro plantas de jitomate alrededor a una distancia de 50 cm. Se utilizaron plantas no expuestas como control. Al contar con 16 hojas, fueron inoculadas y evaluadas como se citó en los casos anteriores.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se empleó un diseño completamente al azar, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía para ver si existía diferencia entre el grado de severidad

para cada uno de los tratamientos y una separación de rangos empleando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon con una probabilidad del 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bajo condiciones de invernadero las temperaturas mínimas y máximas durante el experimento oscilaron de 6.3 a 8.7 y de 34.6 a 39 °C respectivamente, mientras que la humedad relativa mínima y máxima varió de 20.8 a 22.8 y de 77.3 a 82.3 respectivamente.

Las plantas de jitomate tratadas de manera foliar al contar con 16 hojas e inoculadas con *Cmm* comenzaron a presentar acucharamiento luego de dos semanas de la inoculación, en la tercera semana se comenzó a apreciar marchitez en los márgenes de los folíolos de las hojas inferiores que posteriormente llegó a toda la hoja. A partir de la sexta semana después de la inoculación la severidad alcanzó el grado 2 en la escala de evaluación durante el periodo de evaluación.

Respecto a las plantas de jitomate tratadas de manera foliar al contar con 16 hojas e inoculadas con *Rsr1* los síntomas se comenzaron a identificar a partir de la semana 3 después de la inoculación comenzando a mostrar amarillamiento y marchitez en las hojas basales. Al igual que con *Cmm* la severidad alcanzó el grado 2 en la escala de evaluación luego ocho semanas posteriores a la inoculación.

No hubo diferencias entre los tratamientos respecto al testigo cuando se aplicaron los extractos vía foliar para ninguna de las dos bacterias ni tampoco

respecto al control positivo. Hubo un 100 % de incidencia en todos los tratamientos.

En las aplicaciones a suelo en plántulas con dos hojas verdaderas el grado máximo después de cinco semanas fue de 1, con un 100% de incidencia en todos los tratamientos no existiendo diferencias significativas entre los tratamientos, el testigo y el control positivo en la severidad de la enfermedad al término de la evaluación.

Estos resultados son diferentes a los reportados en otros estudios respecto al uso de extractos vegetales en la reducción de la severidad de enfermedades a pesar de no tener un efecto inhibitorio sobre los agentes patógenos *in vitro*, como lo reportaron Acuña y Grabowski (2012) y Álvarez y Grabowski (2013), donde el extracto de *Stevia rebaudiana* redujo la severidad de mancha amarilla (*Drechslera tritici-repentis*) y marrón (*Bipolaris sorokiniana*) en plantas de trigo, así como sobre mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *sesami*) en plantas de sésamo respectivamente.

Tanto de forma foliar como aplicados a suelo, los extractos no redujeron la severidad de la enfermedad, a pesar de que las aplicaciones se realizaron previo y posterior a la inoculación (Draz *et al.*, 2019; Kagale *et al.*, 2004) y que las aplicaciones a suelo se realizaron de manera periódica, como lo indican Graham y Myers (2011). Por lo anterior, se asume que los extractos evaluados no representan una posible alternativa en el manejo de la marchitez bacteriana del jitomate.

Posiblemente la falta de efecto se deba a la pérdida de volátiles durante el proceso de destilación para la eliminación del solvente empleando baño María y rotavapor al momento de concentrar los productos para aquellos extractos obtenidos mediante maceración por 24 horas, mientras que también pudieron perderse durante el procesamiento por método soxhlet y la decocción pues Anzwar *et al.* (2013) señala que el uso de calor puede ser contraproducente al momento de extraer compuestos que pueden llegar a volatilizarse o transformarse. Esto a su vez coincide con Abo-Elyousr y Asran (2009) quienes señalaron que extractos vegetales acuosos extraídos en frío fueron más efectivos contra *R. solanacearum* que aquellos extraídos empleando calor, cuando fueron aplicados a suelo.

En plantas de jitomate asociadas con romero, orégano, albahaca y ruda no hubo diferencias en el avance de la enfermedad respecto al testigo, alcanzándose un máximo de severidad de grado 2 en la escala de la evaluación para todos los tratamientos.

En este sentido, se asume que las plantas asociadas no produjeron metabolitos capaces de inducir resistencia a marchitez en jitomate o al menos, no en la cantidad suficiente. Esto puede deberse a que de manera *per se* no cuentan con dichos compuestos o las condiciones en que se desarrollaron no fueron las propicias, pues la cantidad y el tipo de compuestos que una planta puede llegar a producir depende en gran medida del quimiotipo (Deberdt *et al.*, 2017; Telci *et al.*, 2006), pero también de las condiciones ambientales y el tipo de suelo en que se desarrollan (Cecilia *et al.*, 1989), la fertilización (Ibrahim *et al.*, 2011) o la

concentración de dióxido de carbono presente en el ambiente (Ibrahim y Jaafar, 2012).

Otra posible causa de la falta de efecto de las asociaciones sobre la severidad de marchitez bacteriana es el alcance que pueden llegar a tener los compuestos volátiles al ser liberados (Brilli *et al.*, 2019) o a que dichos compuestos sólo son capaces de promover una señalización en la planta receptora al ser liberados por plantas que previamente han sido infectadas, como se ha estudiado en variadas ocasiones (Baldwin *et al.*, 2006; Maffei *et al.*, 2012; Meena *et al.*, 2017;), por lo que futuras investigaciones deberán considerar estos factores.

CONCLUSIONES

Bajo los protocolos de la presente investigación, ninguno de los extractos aplicados de manera foliar o al suelo ni ninguna de las asociaciones con plantas productoras de compuestos con propiedades antibacterianas propuestas redujeron significativamente la severidad de marchitez bacteriana en jitomate causada por *Clavibacter michinagensis* subsp. *michiganensis* o *Ralstonia solanacearum* raza 1.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para el primer autor.

LITERATURA CITADA

Abo-Elyousr, K. A. M. and M. R. Asran. 2009. Antibacterial activity of certain plant extracts against bacterial wilt of tomato. Archives of Phytopathology and Plant Protection 42(6): 573-578.

- Acuña, E. y C. Grabowski. 2012. Inducción de resistencia en plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) a la mancha amarilla (*Drechslera tritici-repentis*) y marrón (*Bipolaris sorokiniana*). *Investigación Agraria* 14 (2): 71-79.
- Álvarez, F. y C. Grabowski. 2013. Inducción de resistencia en plantas de sésamo (*Sesamum indicum* L.) a la mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *sesami*). *Investigación Agraria*. 15 (2): 97-105.
- Ankerman, D. and R. Large. 2019. *Agronomy Handbook*.
- Azmir, J, I.S.M. Zaidul, M.M. Rahman, K.M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M.H.A. Jahurul, K. Ghafoor, N.A.N. Norulaini and A.K.M. Omar. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* 117: 426–436.
- Azwanida, N. N. 2015. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants* 4(196): 2167-0412.
- Baldwin, I. T., R. Halitschke, A. Paschold, C. C. Von Dahl and C. A. Preston. 2006. Volatile signaling in plant-plant interactions: "talking trees" in the genomics era. *Science*, 311(5762), 812-815.
- Borboa, J., E. Rueda, E. Acedo, J. Ponce, M. Cruz, J. García y M. Ortega. 2010. Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales contra *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12(3): 539-547.
- Brilli, F., F. Loreto and I. Baccelli. 2019. Exploiting plant volatile organic compounds (VOC's) in agriculture to improve sustainable defense strategies and productivity of crops. *Frontiers in Plant Science*. 10: 264.
- Cecilia, S., F. Carceller, G. Regleroy and J. Sanz. 1989. Estudio de la composición del aceite esencial de romero procedente de plantas recogidas en diferentes épocas del año en distintas zonas de la Comarca del Moncayo. *Turiaso IX*: 519-535.
- Deberdt, P., I. Davezies, R. Coranson-Beaudu and A. Jestin. 2017. Efficacy of leaf oil from *Pimenta racemosa* var. *racemosa* in controlling bacterial wilt of tomato. *Plant Disease* 102(1): 124-131.
- Denny, T.P. & A. C. Hayward. 2001. Gram-negative bacteria. *Ralstonia*. En: Schaad, N. W., J. B. Jones, and W. Chun. 2001. *Laboratory Guide for Identification of plant pathogenic bacteria*. The American Phytopathological Society. Minnesota. pp. 151 – 174.
- Draz, I. S., A. A. Elkhwaga, A. A. Elzaawely, H. M. El-Zahaby and A. W. A. Ismail. 2019. Application of plant extracts as inducers to challenge leaf rust of wheat. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 29(1): 1-8.
- González, I., Y. Arias, Y. Sánchez, M. M. Rojas, E. González, O. Pino y B. Peteira. 2013. Inducción de mecanismos de defensivos en plantas de tomate (*Solanum*

lycopersicum L. cv. Amalia) con el uso de aceites esenciales. Revista de Protección Vegetal 28(3): 185-191.

Graham, J. H. and M. E. Myers. 2011. Soil application of SAR inducers imidacloprid, thiamethoxam, and acibenzolar-S-methyl for citrus canker control in young grapefruit trees. Plant Disease 95(6): 725-728.

Hong, J. C., M. T. Momol, P. Ji, S. M. Olson, J. Colee, J. B. Jones. 2011. Management of bacterial wilt in tomatoes with thymol and acibenzolar-S-methyl. Crop Protection 30(10): 1340-1345.

Ibrahim, M., H. Jaafar, A. Rahmat, and Z. Rahman, 2011. Effects of nitrogen fertilization on synthesis of primary and secondary metabolites in three varieties of kacip fatimah (*Labisia pumila* Blume). International Journal of Molecular Sciences. 12 (8): 5238 – 5254.

Ibrahim, M. y Jaafar, H. 2012. Impact of elevated carbon dioxide on primary, secondary metabolites and antioxidant responses of *Eleais guineensis* Jacq.(Oil Palm) seedlings. Molecules 17 (5): 5195 – 5211.

Ji, P., M. T. Momol, S. M. Olson, P. M. Pradhanang and J. B. Jones. 2005. Evaluation of thymol as biofumigant for control of bacterial wilt of tomato under field conditions. Plant disease 89(5): 497-500.

Kagale, S., T. Marimuthu, B. Thayumanavan, R. Nandakumar and R. Samiyappan. 2004. Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Physiological and Molecular Plant Pathology 65(2): 91-100.

Luna-Diez, E. 2016. Using green vaccination to brighten the agronomic future. Outlooks on Pest Management 27, 136–140.

Maffei, M. E., G. I. Arimura and A. Mithöfer. 2012. Natural elicitors, effectors and modulators of plant responses. Natural product reports 29(11): 1288-1303.

Meena, R. K., S. Jangra, Z. Wadhwa, M. Wati and L. Wati. 2017. Role of plant volatiles in defense and communication. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 6: 300-313.

Pradhanang, P. M., M. T. Momol, S. M. Olson and J. B. Jones. 2003. Effects of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. Plant disease 87(4): 423-427.

Rodríguez, M. D. L. 2010. Enfermedades bacterianas en hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México, México. 306 p.

Rodríguez, M. D. L. 2013. Biogeografía, Diagnóstico y Manejo Integrado de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en México. Revista Mexicana de Fitopatología, Vol. 31 (Suplemento): 22-23.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2022. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> Fecha de consulta: Abril, 2022.

Sugimoto, K., K. Matsui, Y. Iijima, Y. Akakabe, S. Muramoto, R. Ozawa, et al. 2014. Intake and transformation to a glycoside of (Z)-3-hexenol from infested neighbors reveals a mode of plant odor reception and defense. *Proceedings National Academy of Sciences USA* 111, 7144–7149.

Telci, I., E. Bayram, G. Yılmaz and B. Avcı. 2006. Variability in essential oil composition of Turkish basils (*Ocimum basilicum* L.). *Biochemical Systematics and Ecology* 34(6): 489-497.

Van den Bulk, R. W., J. Jansen, W. H. Lindhout and H. J. M. Löffler. 1991. Screening of tomato somaclones for resistance to bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). *Plant breeding* 107(3): 190-196.

Yoneya, K. and J. Takabayashi, 2014. Plant–plant communication mediated by airborne signals: ecological and plant physiological perspectives. *Plant Biotechnology* 31(5): 409–416.