



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA



**“EXTRACTOS DE ESPECIES VEGETALES NATIVAS DE SAN LUIS POTOSÍ
PARA CONTROL DEL FITOPATÓGENO *Clavibacter michiganensis* subsp.
michiganensis”**

Por:

I.A.F. Emmanuel Martínez Castro

**Tesis profesional presentada como requisito parcial para obtener el título de
Maestro en Producción Agropecuaria**

Soledad de Graciano Sánchez. S.L.P.

Enero 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA



**“EXTRACTOS DE ESPECIES VEGETALES NATIVAS DE SAN LUIS POTOSÍ
PARA CONTROL DEL FITOPATÓGENO *Clavibacter michiganensis* subsp.
michiganensis”**

Por:

I.A.F. Emmanuel Martínez Castro

**Tesis profesional presentada como requisito parcial para obtener el título de
Maestro en Producción Agropecuaria**

Asesor: Dr. José Pablo Lara Ávila

Asesor: Dr. Ramón Jarquin Gálvez

Asesor: Dr. Moisés Roberto Vallejo Pérez

Asesor Externo: Dr. Juan Gualberto Colli Mull

Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.

Enero 2018

El trabajo “**EXTRACTOS DE ESPECIES VEGETALES NATIVAS DE SAN LUIS POTOSÍ PARA CONTROL DEL FITOPATÓGENO *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***” fue realizado por **Emmanuel Martínez Castro** como requisito parcial para obtener el título de **Maestro en Producción Agropecuaria**, fue revisado y aprobado por el suscrito comité de Tesis.

Dr. José Pablo Lara Ávila.

Asesor

Dr. Ramón Jarquin Gálvez.

Asesor

Dr. Moisés Roberto Vallejo Pérez

Asesor

Ejido Palma de la Cruz, Municipio de Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P. a los 31 días del mes de Enero de 2018.

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Interacción Planta-Microorganismo (LIPM) de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Laboratorio de Microbiología Aplicada en Agricultura y Salud Ambiental ubicado en la Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y Tecnología (CIACyT-UASLP) y en el Laboratorio de Fitoquímica instalado en el Edificio de Zonas Desérticas también perteneciente a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí., bajo la asesoría del Dr. José Pablo Lara Ávila y Co-asesorías de los Doctores: Ramón Jarquín Gálvez, Moisés Roberto Vallejo Pérez. Este proyecto fue financiado por el fondo SEP-CONACYT de Investigación Científica Básica 2014 (Proyecto 236066).

DEDICATORIA

A MIS PADRES

ENRIQUE MARTÍNEZ MARTÍNEZ y YOLANDA CASTRO MINOR

A ustedes quienes siempre me han apoyado incondicionalmente, Este éxito es parte de ustedes. Gracias por su apoyo, motivación y valores que a lo largo de la vida me han inculcado.

HERMANOS

CRISTIAN MARTÍNEZ CASTRO, HÉCTOR EFRÉN MARTÍNEZ CASTRO, IRIS SARAHÍ MARTÍNEZ CASTRO. Muchas gracias por todo el apoyo, hermana gracias por todo su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**. Por la beca brindada para realizar mis estudios de posgrado en el Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias (PNPC 000972) con el número de apoyo 430859

A la **Facultad de Agronomía y Veterinaria** y a la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí** por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

A la **Dra. Bertha I. Juárez Flores**, gracias por sus asesorías y por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio; **M.C. Xitlalick García**. Gracias por apoyarme incondicionalmente, por el tiempo que me brindaste ya que ese tiempo fue fundamental para que este proyecto se pudiera concluir; **QFB. María Eugenia Reyna Ortega** Gracias por su apoyo incondicional durante mi estancia en zonas desérticas.

A **Dra. Fabiola Villegas Rodríguez** y **Dr. Héctor Aarón Lee Rangel**. Gracias por el apoyo brindado y equipo de laboratorio que nos facilitaron cuando lo requeríamos.

A **Miguel Herrera** Gracias por el buen trato y amabilidad que obtuve de tu parte y por apoyarme con el material de laboratorio que en ocasiones requería.

A **mis Compañeros y Amigos de Laboratorio**. Saúl Medina, Oscar León, Mauro Martínez, Ana Elisa, Silvia, Dra. Claudia Olivia Silva Ortega, Dra. Diana Ortíz Gamino.

Al **Dr. José Marín Sánchez**. Muchas gracias Dr. por todos los consejos y asesorías que usted me brindo de manera incondicional durante mi licenciatura y aun ahora en mi maestría. Muchas gracias.

Al **Dr. Ramón Jarquin Gálvez**, muchas gracias por todo su apoyo, por la oportunidad que me brindo durante sus clases de poder interactuar con productores, de conocer lugares tan interesantes como el Centro Nacional de Referencias de Control Biológico - SAGARPA (CNRCB).

Al **Dr. Moisés Roberto Vallejo Pérez**; por las enseñanzas y asesorías brindadas para la realización de este proyecto, por su amistad y apoyo en todo aspecto.

Dra. Delia Xóchitl Vega Manríquez y **Dr. Gilberto Ballesteros** gracias por su gran apoyo incondicional y por su amistad.

Al **Dr. José Pablo Lara Ávila**, le agradecemos mi familia y yo todo su apoyo y paciencia que ha tenido para conmigo, por darme la oportunidad de trabajar con usted, conocer cosas nuevas e interesantes. Gracias por su confianza, gracias por cada consejo y la motivación para poder continuar con una maestría.

A **Dios**, por darme la oportunidad de venir a esta vida, de realizar un sueño el cual es ser profesionalista. Por darme las fuerzas, sabiduría, paciencia, ánimo, en fin, todo, para que pudiera terminar un grado más de estudios. A Él le debo todo, sin Él nada soy, ni nada pudiera ser o tener. Muchas gracias Dios mío. A si es.

A toda mi **Familia**. Muchas gracias por su cariño, por su apoyo, por cada sonrisa, por cada recomendación y aun por cada reprobación. Por todo. Muchas gracias.

A mis amigos: **Carmen Hernández, Fabián Israel, Azucena Briano, Liliana Piña, Lina, Esmeralda Villaseñor, Javis, Sofía Hernández, Monze Galarza, Lupita Guerrero, Israel Méndez, Sinuhe, Daniel Faz, Daniel Ascencio, Carolina Tovilla, Pedrito, Idriss, Norma Luna, Karen, Tere, Ignacio Tovar, Nadia Galicia, Diack, Mizraim Carreón, Maribel, Lulú, Sarita, Ána Bravo, Emmanuel Ortiz, Zania Martínez, Lina, Benita, Edna ,Ónix, Circe, Fátima, Neritza, Zaira García Chema, Anahí, Angy, Aarón, Josué Prisciliano, Laura Lidia**. La verdad podría escribir decenas de cuartillas con nombres de amigos y personas que me han brindado su apoyo y a quienes agradezco de corazón. Es para mí un verdadero gusto el conocerlos y tenerlos a mi lado. Con gusto les dedico y ofrezco este logro.

!!! GRACIAS A TODOS!!!

CONTENIDO

Página

DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
CONTENIDO.....	vii
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS	2
OBJETIVO GENERAL.....	2
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Importancia del Cultivo de Jitomate.....	3
Fitopatologías Del Jitomate.....	4
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i>	4
Árbol de Pirul (<i>Schinus molle</i>).....	8
Planta de Gobernadora (<i>Larrea tridentata</i>).....	9
MATERIALES Y METODOS.....	13
Ubicación del Experimento.....	13
Extractos Acuósos y Metanólicos de Gobernadora y Pirul.....	13
Reto <i>In vitro</i> de los extractos vegetales de Gobernadora y Pirul.....	14
Cinética Bacteriana.....	15
Maceración y Percolación de Tejido Vegetal de Gobernadora.....	17
Cromatografía de Capa Fina (TLC).....	19
RESULTADOS.....	21
Extractos Metanólicos y Acuósos de Especies Vegetales.....	21
Evaluación <i>In vitro</i> de Extractos Acuósos y Metanólicos de Gobernadora y Pirul.....	21
Cinética Bacteriana.....	23
Maceración y Percolación de Tejido Vegetal de Gobernadora.....	27
Cromatografía de Capa Fina (TLC).....	28
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIONES.....	34
PERSPECTIVAS.....	34
LITERATURA CITADA.....	35
ANEXOS.....	40
Carta de Capacitación Firmada por Productor.....	41
Carta de Capacitación Firmada por Productor.....	42

ÍNDICE DE CUADROS

cuadro		Página
1	Principales Municipios Productores de Jitomate en el Estado de San Luis Potosí.....	3
2	Principales Constituyentes Fitoquímicos de <i>Larrea tridentata</i>	11
3	Halos de Inhibición de los Diferentes Extractos de las Diferentes especies vegetales.....	23
4	Cinética Bacteriana con Diferentes Porcentajes de Extracto Acuoso y Metanólico de Gobernadora (<i>Larrea tridentata</i>).....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Sintomatología del Cáncer Bacteriano del Jitomate.....	6
2	Diseño de la cinética Bacteriana de <i>Cmm</i> con extractos al 20 y 10%	15
3	Diseño de la cinética Bacteriana de <i>Cmm</i> con extractos al 3 y 0.5%.	16
4	Percolación de Planta de Gobernadora.....	18
5	Extracto de Gobernadora Percolado.....	18
6	Extractos Vegetales de Pirul y Gobernadora.....	21
7	Evaluación <i>In vitro</i> de Extractos Acuosos y Metanolicos de Gobernadora y Pirul.....	22
8	Cinética 1: Logaritmo Natural del Control LB y LB + <i>Cmm</i> + EAG 10%.....	24
9	Cinética 2: Logaritmo Natural del Control LB y LB + <i>Cmm</i> + EAG 0.5%.....	26
10	Ensayos de Cromatografía de Capa Fina.....	28
11	Extractos de Percolación.....	29
12	Cromatogramas Bajo Luz UV (260 nm).....	30
13	Cromatogramas del ciclo de percolación 4 Visto Bajo Luz UV (230 nm).....	30
14	Cromatografías de la Cuarta Percolación con los Rfs de los Concentrados y Resina.....	31

RESUMEN

En México, la producción de jitomate creció a una tasa promedio anual de 4.8%. Una de las grandes limitantes para la producción de jitomate han sido las enfermedades ocasionadas por diversos fitopatógenos tales como: virus, hongos, nemátodos y bacterias. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), es una bacteria Gram positivo coriniforme causante de la enfermedad conocida como cáncer bacteriano del jitomate. La enfermedad es de interés cuarentenario nivel internacional. El principal medio por el cual se dispersa esta bacteria es por semillas contaminadas, ya que el patógeno tiene la capacidad de sobrevivir hasta ocho meses en ella, también puede sobrevivir en residuos vegetales, estructuras de invernadero y herramientas de trabajo. La bacteria penetra a la planta a través de heridas o aberturas naturales como los estomas. Los controles más recurrentes contra *Cmm* han sido los químicos, tales como productos cúpricos o estreptomicina los cuales poseen una efectividad limitada o nula. Por otro lado la planta de gobernadora (*Larrea tridentata*) ha sido descrita como una especie vegetal con propiedades bactericidas, fungicidas y una gran cantidad de compuestos bioactivos de los cuales pocos se han caracterizado. Por lo cual el objetivo es identificar metabolitos antimicrobianos de *Larrea Tridentata* contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. El extracto metanólico de *L. tridentata* presentó halos de inhibición de 3.2 cm y el acuoso de 1.0 cm. Las cinéticas bacterianas determinaron la Concentración Mínima Útil Inhibitoria (CMUI) la cual resultó en 5 mL/L para el extracto metanólico y 30 mL/L en el caso del extracto acuoso. Se logró la separación de compuestos orgánicos mediante cromatografía de capa fina (TLC) obteniendo 7 Rfs en la concentración número 1, de igual forma 7 Rfs en la concentración número 2, en el concentrado número 3 (resina) los Rfs de las repeticiones no resultaron similares en ninguno de los tres carriles.

SUMMARY

In Mexico, tomato production grew at an average annual rate of 4.8%. One of the main limitations for tomato production has been the diseases caused by various phytopathogens such as: viruses, fungi, nematodes and bacteria. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), is a coriniform gram-positive bacteria that causes the disease known as tomato bacterial cancer. The disease is an international quarantine interest. The main by which this bacterium is dispersed is contaminating seeds, since the pathogen has the ability to survive up to eight months in it, it can also survive on plant residues, greenhouse structures and work tools. The bacteria penetrate the plant through wounds or natural openings such as stomata. The most recurrent controls against Cmm have been chemicals, such as copper products or streptomycin which are limited or no effectiveness. On the other hand, the governor plant (*Larrea tridentata*) has been described as a plant species with bactericidal, fungicidal properties in a large number of bioactive compounds and which few have been characterized. Therefore, the objective is to identify antimicrobial metabolites of *Larrea tridentata* against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. The methanol extract of *L. tridentata* presented halos of inhibition was 3.2 cm and the aqueous 1.0 cm. The bacterial kinetics determined by the Minimum Inhibitory Useful Concentration (IUGR) which resulted in 5 mL / L for the methanolic extract and 30 mL / L in the case of the aqueous extract. The separation of organic compounds was achieved by thin layer chromatography (TLC) obtaining 7 Rfs in the concentration number 1, likewise 7 Rfs in the concentration number 2, in the concentrate number 3 (resin) the Rfs of the repetitions did not result similar in none of the three lanes.

INTRODUCCIÓN

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los cultivos con mayor importancia económica a nivel mundial, nacional y estatal. Una de las más grandes limitantes para la producción de dicho cultivo es la gran diversidad de fitopatógenos a los que es susceptible, tales como bacterias, virus, hongos y nematodos. Dentro del grupo de bacterias fitopatógenas destaca *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) el cual es un actinomiceto causante de la enfermedad en planta llamada Cáncer Bacteriano del Tomate o Cancro Bacteriano, se han reportado grandes pérdidas económicas debido a que el control químico no ha sido lo suficientemente efectivo para remediar o prevenir esta enfermedad. Dado que con el uso excesivo de ciertos antibióticos y sales de cobre, ha generado cepas de Cmm resistentes. Por otro lado el control biológico de Cmm es una alternativa viable debido a la gran cantidad de microorganismos que se han reportado en los últimos años con efectos antagónicos contra microorganismos fitopatógenos. Un ejemplo claro son las bacterias del género *Pseudomonas* y *Bacillus*. Sin embargo, los ensayos requieren pasos de validación en condiciones reales de campo. La biotecnología es una herramienta basada en el uso de algunas propiedades químicas, bioquímicas, genéticas o metabolómicas de algún ser vivo que genere beneficio, en este caso que logre tener efecto positivo sobre el control de fitopatógenos. En este sentido, algunos estudios científicos reportan que la planta de Gobernadora (*Larrea tridentata*) contiene metabolitos con propiedades antimicrobianas es decir que inhiben el crecimiento de diversas bacterias patógenas tanto Gram- positivos como Gram- negativos y por otro lado el árbol de Pirul (*Schinus molle*) con propiedades bactericidas y alelopáticas a ciertos organismos. Por lo cual el objetivo de este trabajo es detectar y evaluar el efecto antimicrobiano de metabolitos de *Larrea tridentata* y *Schinus molle* contra Cmm.

HIPÓTESIS.

La identificación de metabolitos en especies vegetales con alta variabilidad genética contribuye en generar estrategias para el control de enfermedades en cultivos agrícolas que resulten eficientes y sustentables.

OBJETIVO GENERAL.

Identificar metabolitos antimicrobianos en especies vegetales nativas de San Luis Potosí con actividad bactericida contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar de manera *In vitro* el efecto antimicrobiano de extractos de gobernadora y pirul contra *Cmm*.
- Identificar efectos bactericidas o bacteriostáticos de los extractos de gobernadora y pirul mediante cinéticas de crecimiento.
- Aislar mediante cromatografías de capa fina (TLC) compuestos bioactivos de de gobernadora y pirul contra *Cmm*

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia del Cultivo de Jitomate

La producción y el consumo mundial de jitomate, así como el consumo promedio per cápita, registran tendencia al alza durante la década reciente. China es el más importante productor y consumidor mundial, Estados Unidos es el principal importador, y México el principal exportador de esta hortaliza. En México, la producción de jitomate creció a una tasa promedio anual de 4.8% entre 2006 y 2016, para ubicarse en un máximo histórico de 3.3 millones de toneladas. (FIRA, 2017)

En el 2016, el 56.3 % de la producción nacional de jitomate se concentró en cinco entidades: Sinaloa (27.6%), San Luis Potosí (9.2 %), Michoacán (7.0 %), Baja California (6.7 %), y Zacatecas (5.7 %), de ese 56.3 % el 37.2 % de la producción nacional de tomate se obtuvo en los diez principales municipios productores de esta hortaliza,

Cuadro 1. Principales Municipios Productores de Jitomate en el Estado de San Luis Potosí

No.	Municipio	Producción (Toneladas)	Valor de la producción (Miles de pesos)	Participación %	
				Producción	Valor de la producción
1	Culiacán, Sin.	368,041	1,843,213	11.00%	7.70%
2	Ensenada, B.C.	225,592	2,778,829	6.70%	11.60%
3	Nevolato, Sin.	224,431	1,154,098	6.70%	4.80%
4	Elota, Sin.	102,054	536,163	3.00%	2.20%
5	Mulegé, B.C.S.	94,787	1,147,073	2.80%	4.80%
6	Guadalcázar, S.L.P.	52,433	439,710	1.60%	1.80%
7	Fresnillo, Zac	50,170	207,030	1.50%	0.90%
8	Colón, Qro.	45,900	352,192	1.40%	1.50%
9	Villa de Guadalupe, S.L.P.	45,132	198,382	1.30%	0.80%
10	Moctezuma, S.L.P	36,640	265,506	1.10%	1.10%
11	Otros	2,103,975	14,949,208	62.80%	62.60%
	Total	3,349,154	23,871,404	100%	100%

(SIAP-SAGARPA, 2016; FIRA, 2017)

Fitopatologías Del Jitomate

Una de las grandes limitantes para la producción de jitomate han sido las enfermedades ocasionadas por diversos fitopatógenos tales como: virus (*Mosaico del tabaco*, *Mosaico del pepino*, *Mosaico del tomate*); hongos (*Alternaria tomatophila*, *Oidium neolycopersici*, *Rhizoctonia solani*.); nemátodos (*Globodera* spp, *Meloidogyne* spp, *Pratylenchus* spp.) y bacterias (*Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas corrugata*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas* spp, *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) dentro de las que destaca el actinomiceto *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* causante de la enfermedad conocida como cáncer bacteriano del jitomate (Hadas *et al.*, 2014).

Los avances en torno al estudio de la interacción planta-patógeno en específico bacterias, han sido realizados principalmente con fitopatógenos bacterianos pertenecientes al grupo Proteobacteria (Baltrus *et al.*, 2011; Cai *et al.*, 2011; Mole *et al.*, 2007; Abramovitch *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2006; Abramovitch *et al.*, 2004). Cabe mencionar que existe información limitada con respecto a actinomicetos fitopatógenos, que incluye a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), causante de la enfermedad conocida como cancro bacteriano del tomate, una de las enfermedades cuarentenarias a nivel internacional de mayor relevancia en los últimos años (Sen *et al.*, 2015; Mansfield *et al.*, 2012; Eichenlaub *et al.*, 2011; Chalupowicz *et al.*, 2010; Hogenhout *et al.*, 2008).

***Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*.**

Cmm es un bacilo Gram positivo, coriniforme, no móvil, aeróbico (EPPO 2005; Jones *et al.*, 2001), considerado como un organismo biotrófico que puede sobrevivir por largos periodos de tiempo cuando se asocia a restos vegetales. Jahr *et al.* (2000), Dreier *et al.*, (1997); Meletzus *et al.*, (1993) mencionan que los síntomas característicos en planta ocasionados por este fitopatógeno están asociados con la presencia de los genes *celA* (que codifica una endo- β -1-4 glucanasa) y *pat-1* (que codifica una serin proteasa), los cuales se

encuentran en los plásmidos pCM1 y pCM2 respectivamente. (Jahr *et al.*, 2000; Dreier *et al.*, 1997; Meletzus *et al.*, 1993). El análisis genómico de *Cmm* en la cepa NCPPB382 permitió identificar una región de 129 kb con bajo contenido de G+C, esta se divide en dos subregiones: la subregión *chp*, que contiene genes que codifican diversas enzimas como: serin proteasas; y la subregión *tomA*, que contiene genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos, entre ellos el gen *tomA* que codifica una tomatinasa (endo-1,4-beta glicosidasa), enzima que remueve los residuos de carbohidratos de la α -tomatina, un glicoalcaloide con actividad antifúngica en tomate (Gartemann *et al.*, 2008; Kaup *et al.*, 2005). Gartemann *et al.* (2008) demostraron la importancia de la región genómica en la patogenicidad al generar una cepa mutante de *Cmm* que carece de la región, la cual mostró un fenotipo no virulento, fue incapaz de colonizar tejidos vegetales y, por lo tanto, no desarrolló la sintomatología característica de la enfermedad en tomate. Estudios adicionales sugieren que los genes ubicados en la región genómica de 129 kb, contribuyen en generar una cascada de señalización que permite la manipulación del metabolismo vegetal en favor de *Cmm* (Chalupowicz *et al.*, 2017; Stork *et al.*, 2008; Gartemann *et al.*, 2008; Kaup *et al.*, 2005).

De forma general, la ubicación de factores de patogenicidad en *Cmm* sugiere que pueden ser transferidos horizontalmente, ya que se encuentran localizados en plásmidos y en una región genómica particular. Cabe mencionar que, dado que los genes de patogenicidad en *Cmm* no son compartidos por fitopatógenos Gram-negativos y son poco comunes en otros actinomicetos fitopatógenos; los mecanismos de comunicación entre tomate y *Cmm* que incluyen reconocimiento del hospedero, colonización, evasión/supresión de respuestas de defensa deben ser esclarecidos con la finalidad de generar estrategias para el diagnóstico y control con efectividad a largo plazo (Francis *et al.*, 2010; Hogenhout, 2008). La sintomatología clásica que manifiestan las plantas infectadas por *Cmm* es marchitez unilateral de hojas, manchas circulares en el fruto conocidas como ojo de pájaro y el desarrollo de lesiones corchosas en tallo llamadas chancros (Fig.1).

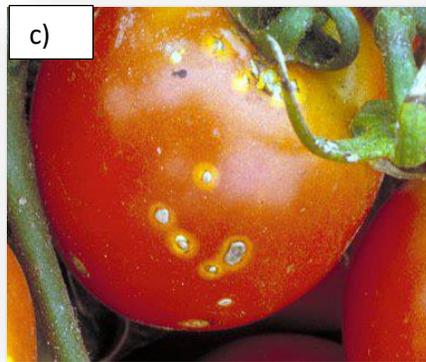


Figura 1. Sintomatología del Cáncer Bacteriano del Jitomate. a) Daño en tallo conocido como chancro. b) Marchitamiento unilateral de hojas, síntoma peculiar de este fitopatógeno en planta, c) puntos en el fruto con halos amarillentos conocidos como ojo de pájaro.

El principal medio por el cual se propaga esta bacteria es por semillas contaminadas, ya que el patógeno tiene la capacidad de sobrevivir hasta ocho meses y son responsables de la ocurrencia de brotes epidémicos, se requieren bajos niveles de contaminación de semilla para iniciar una epidemia, es difícil el diagnóstico oportuno en planta debido a que los síntomas tardan en presentarse. Los primeros indicios del cáncer bacteriano generalmente aparecen entre 30 y 40 días después del trasplante, lo cual dificulta su control, por lo anterior, es necesario contar con métodos confiables y de alta sensibilidad como es el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para realizar un diagnóstico efectivo (Chang *et al.*, 1992; Milijašević *et al.*, 2007; Milijasevic *et al.*, 2012).

La bacteria también puede sobrevivir en residuos vegetales, estructuras de invernadero y herramientas de trabajo, otra forma es mediante heridas o aberturas naturales como estomas (Carlton *et al.*, 1998). La distribución en campo o invernadero se ve ampliamente favorecida por el agua (salpicaduras, vientos, aspersión), así como por las diversas prácticas culturales como podas o tutoros al utilizar herramienta contaminada o aun con las manos. Es por ello que el cáncer bacteriano del jitomate es considerada una de las enfermedades vasculares mas importantes a nivel mundial en las regiones productoras de jitomate (EPPO 2005). Hasta ahora se ha reportado en Israel (Kleitman *et al.*, 2008), Japón (Kawaguchi *et al.*, 2010) España, Canadá (Borboa *et al.*, 2009), Estados Unidos de América (Chang *et al* 1992), Kenia, Chile, Turquía, Australia (Dullaide *et al.*,1983) y México (Holguín *et.al.*, 2006; Borboa *et.al.*, 2009,) en promedio puede ocasionar pérdidas de 80 a 100% (Borboa *et al.*, 2009; EPPO, 2010; De León *et al.*, 2011; NAPPO, 2013).

Los controles más recurrentes contra *Cmm* han sido los químicos, tales como productos cúpricos o estreptomina (Sandoval, 2004), los cuales poseen una efectividad limitada o nula, además del impacto negativo sobre la salud humana, el ambiente y el costo que genera sobre la producción del cultivo.

Sin embargo se implementan estrategias preventivas tales como: saneamiento de estructuras de invernadero, saneamiento de herramientas de trabajo y uso de semilla certificada, debido a todo esto *Cmm* es sujeto a regulaciones de cuarentena internacional por parte de la Unión Europea (Commission Directive 95/4 EC). La European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) la ha clasificado en el grado cuarentenario A2 (EPPO, 2010) y México la tiene catalogada como plaga cuarentenaria por la Hoja de Requisitos Fitosanitarios y la Norma Oficial Mexicana 007 (NOM-007-1998).

También se han realizado investigaciones implementando el control biológico contra fitopatógenos utilizando agentes benéficos tales como *Trichoderma spp* (Guerrero *et al.*, 2017) y el uso de aceites vegetales (Borboa *et al.*, 2010).

Por otro lado, cabe mencionar que algunas especies vegetales como la gobernadora y el pirul, han sido descritas como especies con propiedades bactericidas, fungicidas y una

gran cantidad de compuestos bioactivos de los cuales pocos se han caracterizado (Brinker, 1993; Tequida *et al.*, 2002).

Árbol de Pirul (*Schinus molle* L)

En los últimos años se ha discutido mucho sobre la existencia de mecanismos químicos de eliminación competitiva en las plantas superiores, semejantes a los existentes entre los microorganismos. Todas las plantas producen gran cantidad de sustancias de naturaleza química diversa que pueden almacenarse o excretarse a través de las raíces o las hojas. Las sustancias excretadas al medio ambiente pueden afectar o no a otros organismos y si lo hacen pueden ser benéficas o perjudiciales. En el caso de ser tóxicas constituyen un medio muy eficaz de suprimir a los competidores potenciales y si no lo son, de cualquier manera están alterando el medio ambiente. La antibiosis producida por las fitotoxinas elaboradas por las plantas superiores se llama alelopatía y los antibióticos, alelopáticos. La alelopatía como fenómeno ecológico ha sido muy discutida e incluso rebatida (Bartholomew *et al.*, 1970). En ciertos casos se trata de un hecho fácilmente comprobable tanto en el laboratorio como en el medio ambiente natural (Livingston, 1923).

La diversidad química de los exudados de las plantas es muy grande y a medida que una comunidad se vuelve más compleja, el cambio provocado por estos compuestos en el medio ambiente es cada vez mayor. Si añadimos a estos cambios químicos todas las transformaciones que por efecto directo o indirecto de la vegetación se efectúan dentro de una comunidad, entonces es posible comprender lo difícil que resulta poner en evidencia la alelopatía sin restarle importancia a los otros fenómenos de interrelación biológica y ambiental. Los alelopáticos más comunes son los terpenos y los fenoles. Ambos tienen un efecto nocivo muy marcado sobre el metabolismo celular, especialmente sobre la respiración y la mitosis (Muller *et al.*, 1969). Estas sustancias son excretadas al medio a través de los distintos órganos del vegetal y al llegar al suelo pueden afectar el crecimiento de otros organismos.

Todas las plantas que producen compuestos terpénicos y fenólicos posiblemente ejercen algún efecto nocivo sobre otros organismos. Sin embargo antes de llegar a esta conclusión es muy importante eliminar cualquiera otra posibilidad. La especie *Schinus*

molle L. de la familia de las Anacardiaceae, conocida vulgarmente como "pirúl", es un árbol que se encuentra ampliamente distribuido en la altiplanicie mexicana, que invade con facilidad cualquier tipo de terreno, que se asocia generalmente con pocas especies de plantas y que produce gran cantidad del terpeno felandreno y del alcohol terpenoide carvacol (Moje, 1966), los cuales son acumulados y eliminados a través de hojas y frutos.

Planta de Gobernadora (*Larrea tridentata*)

Las zonas áridas representan un gran potencial porque guardan una riqueza basada no tanto en su densidad, como en su especialización biológica, donde la flora y la fauna son el producto de miles de años de adaptación fisiológica para su sobrevivencia. Un caso típico de estas condiciones lo representa la planta llamada gobernadora la cual es una especie forestal, pertenece a la familia Zygophyllaceae, de porte erecto, ramificado desde la base, perennifolio, de 0.6 a 3 m de altura. Las hojas de este arbusto xerófito están envueltas en una gruesa capa de resina producida por tricomas glandulares durante el desarrollo de las hojas, y puede llegar a formar parte del 20% del peso seco de las hojas (Rhoades, 1977; Lira *et al.*, 2003). La resina tiene la propiedad de hacer menos digestivo el follaje, de manera similar al efecto que producen los taninos (Rhoades, 1977); también se comporta como un antitranspirante ideal debido a que forma una barrera en la superficie de las hojas que disminuye la transpiración más que la tasa de asimilación de CO₂ (Meinzer *et al.*, 1990; González *et al.*, 1994). Se considera que la resina funciona como un filtro contra la radiación solar UV, y protege a la planta contra el herbivorismo de insectos y animales (Barbour *et al.*, 1977; Downum *et al.*, 1988). Los arbustos de *L. tridentata* enfrentan fuertes presiones de animales herbívoros, debido a que las hojas están siempre verdes durante los meses del año sin lluvia, época en que son pocos los recursos vegetales que pueden encontrar insectos y animales; sin embargo, el herbivorismo en *Larrea* es limitado, probablemente debido a los metabolitos secundarios como los biopolímeros fenólicos y el ácido nordihidroguaiaretico (NDGA) que se encuentran presentes en la resina producida en hojas y tallos, los cuales resultan ser defensas bioquímicas para repeler el ataque de animales herbívoros, hongos y otros microorganismos (Valesi *et al.*, 1972; Wisdom *et al.*, 1987; Rundel *et al.*, 1994).

Dado las propiedades que se han reportado en esta planta se han hecho ya estudios en los que se muestra acción antifúngica bajo condiciones *in vitro*, tal es el caso de la resina la cual muestra actividad fungicida contra *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium spp* y otros hongos fitopatógenos (Brinker, 1993). Tequida *et al.* (2002) reportaron que extractos metanólicos y etanólicos de *L. tridentata* inhibieron el crecimiento de *Aspergillus flavus*, *A. níger*, *Penicilium chrysogenum*, *P. expansum*, *Fusarium poae* y *F. moniliforme* en una dilución del 41.5%. La actividad antifúngica del extracto de resina hidrosoluble de gobernadora fue investigada *In vitro* contra *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum coccodes* y *F. oxysporum F. sp licopersici*, aislados de rosas de invernadero y de lotes comerciales de papa y jitomate, respectivamente. El extracto manifestó su efecto fungicida a 1000 y 2000 ppm (Lira *et al.*, 2003). Por otra parte, Araujo (1997) reportó que el extracto de *L. tridentata* en diclorometano inhibió el 92% del crecimiento radial de *A. flavus*. Mientras que Jasso *et al.*, (2007) reportaron que el extracto de esta especie a 4000 ppm presentó inhibición contra *Colletotricum gleosporides* al 100%, en *Alternaria alternata* al 66.4% y 78.9% para *Rhizopus sp*. La actividad antifúngica de los líganos fue evaluada por la inhibición del crecimiento radial de *A. flavus* y *A. parasiticus*. El ácido nordihidroguayarático (NDGA) extraído de *L. tridentata* fue muy efectivo inhibiendo ambos hongos a 300 y 500 ppm. Este compuesto quizá tiene potencial para el control de hongos productores de aflatoxinas (Vargas *et.al.*, 2006). Verástegui *et al.*, (1996) determinaron el efecto de extractos etanólicos de *L. tridentata* en el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias que afectan la salud de humanos y animales. Sus resultados mostraron que los extractos inhibieron diversos actinomicetos tales como *Listeria monocytogenes* , *Clostridium perfringens*. En el cuadro 2 se mencionan algunos de los principales constituyentes químicos de *Larrea tridentata*.

Cuadro 2. Principales Constituyentes Fitoquímicos de *Larrea tridentata* (Tomado de Brinker, 1993).

Porcentaje del Peso Seco	Tipo	Compuesto
16-21	Líganos Fenólicos	Ácido Dihidroguaiarético Hemi-norisoguaiacin Ácido Nordihidroguaiarético Nordihidroguaiacin
5-7.5	Flavonoides	Apigenin Kaempferol
10-15	Saponinas Triterpenos	Larreagenin A Ácido Larretico
0.1-0.2	Monoterpenos volátiles Hidrocarburos 35	Alpha penene Delta-3-carene Limoneno
	Aromáticos	Benzaldehído Benzilacetato Bencilbutano Metil naftaleno
	Esteroides	Beta-sitosterol Colesterol Campesterol
	Taninos	
	Carbohidratos	Glucosa Sacarosa
70.1 (tallos)	Lípidos	Alkil esterres (C46-C56)
16.6	Aminoácidos	Fenilalanina Isoleucina Ácido glutámico Ácido aspártico Glicina
15.6 mg/lb	Vitaminas	Caroteno

19.8 mg/100g		Vitamina C
13.7	Minerales	Sodio
		Potasio
		Calcio
		Magnesio
		Hierro
		Azufre
		Fósforo

La información anterior, enfatiza el gran potencial de compuestos bioactivos que se encuentran en especies vegetales con alta variabilidad genética sobre microorganismos fitopatógenos. Por lo cual en el presente proyecto se pretende estudiar el efecto antimicrobiano de extractos de *Larrea tridentata* y *Schinus molle* L, sobre *Cmm* bajo condiciones *In vitro*.

MATERIALES Y METODOS

Ubicación del Experimento

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Interacción Planta-Microorganismo (LIPM) de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Laboratorio de Microbiología Aplicada en Agricultura y Salud Ambiental ubicado en la Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y Tecnología (CIACyT-UASLP) y en el Laboratorio de Fitoquímica instalado en el Edificio de Zonas Desérticas también perteneciente a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Extractos Acuoso y Metanolicos de Gobernadora y Pirul

La planta de gobernadora y pirul fue recolectada en la comunidad de Maravillas perteneciente al municipio de Mexquitic de Carmona, San Luis Potosí, ubicada en las siguientes coordenadas geográficas 22° 14' 41.0" N-101° 01' 09.0". La primera colecta fue en octubre de 2016 y la segunda en marzo de 2017. La planta fue llevada al "LIPM" donde se pesaron hoja y tallo en fresco en el caso de gobernadora y en el de pirul solo la hoja. El extracto acuoso se realizó de la siguiente manera, por cada 20 g de tejido que se pesó en fresco se añadió 80 ml de agua destilada en un recipiente, sobre este recipiente y con un mortero se realizó la maceración de hoja y tallo dejando partículas vegetales muy finas, posteriormente el recipiente se colocó a baño maría con temperatura de 100°C durante 5 min, el líquido extraído se pasó a tubos falcón de 50ml estériles bajo condiciones de campana de flujo laminar, el líquido fue filtrado con papel filtro del No. 2. Para el extracto metanólico el solvente utilizado fue metanol 20%, los pasos para extracción fueron similares a los utilizados para obtener el extracto acuoso. El protocolo seguido fue determinado por Farjana *et al.*, (2014).

Reto *In vitro* de los extractos vegetales de Gobernadora y Pirul

El reto *In vitro* se realizó con la técnica de agar suave. Previo al reto *In vitro* se dejó en incubación un cultivo de 50 ml de la cepa *Cmm* 1387 en medio de Luria Bertani (LB) líquido (Polipetona de Caseína 10g/L, Extracto de Levadura 5g/L, Cloruro de Sodio 5g/L.), la incubación fue por 48h con temperatura de 28°C con agitación constante de 180 rpm. Una vez que teníamos el crecimiento bacteriano de *Cmm* preparamos medio de LB sólido (Polipetona de Caseína 10g/L, Extracto de Levadura 5g/L, Cloruro de Sodio 5g/L, Agar Bacteriológico 15g/L), el matraz de Erlenmeyer que contenía el medio LB sólido esterilizado fue colocado sobre la campana de flujo laminar hasta que la temperatura disminuyó, al cual se le adicionó el cultivo líquido de *Cmm* previamente incubado, se agitó el matraz para poder mezclar la suspensión bacteriana con el medio de LB hasta lograr una solución homogénea. Las placas de Petri fueron llenadas $\frac{3}{4}$ partes con la suspensión obtenida y se dejaron a temperatura ambiente para solidificación y realizar la prueba del efecto antagónico de los diversos extractos de gobernadora y pirul (en este ensayo se utilizaron los extractos obtenidos de tejido vegetal que se colectó en octubre 2016). Se utilizó un antibiótico comercial de amplio espectro como control positivo (Estreptomicina 0.3g/ml) el cual presenta un mecanismo de acción que se basa en la ocupación de los receptores del ácido paraaminobenzoico (PABA) evitando que las bacterias incorporen a su metabolismo el ácido fólico y los factores del crecimiento que requieren y que no puede sintetizar. Además, inhiben la respiración aerobia y anaerobia bacteriana.

Los pasos para realizar la evaluación fueron los siguientes. Con la parte superior de una puntilla de micropipeta de 1000 µl se realizaron 5 perforaciones en cada caja, en dos de los pozos se colocó el extracto metanólico, en los otros dos el extracto acuoso en una cantidad de 200 µl cada uno y el tercer pozo quedó vacío (control negativo), el ensayo se realizó con 3 repeticiones, cabe señalar que el extracto de cada especie se probó en cajas separadas. Las placas fueron selladas y se incubaron de 24 a 48h a una temperatura de 28° C. Los halos de inhibición fueron medidos con una regla partiendo desde la parte central del pozo hasta la orilla del halo y se les realizó la comparación de medias de Tukey con el paquete estadístico del programa SAS (System for Windows 9.0).

Cinética Bacteriana

Se evaluaron los extractos de gobernadora a las concentraciones 20, 10, 3 y 0.5 % (se utilizaron los extractos del tejido vegetal colectado en marzo 2017) para ello se utilizaron microplacas de 96 pozos.

La cinética se realizó de la siguiente manera: En un tubo falcón de 50 ml se colocó 30 ml de LB líquido y se le agrego una asada de bacteria de *Cmm* y se incubó de 24 a 48h hasta tener una densidad óptica (DO) mayor a 0.1, medido a una longitud de onda de 600nm. Una vez obtenida la OD se diseñó la microplaca de 96 pozos.

Para la cinética, en cada pozo de la microplaca, se colocaron 200 µl del cultivo microbiano ajustado a una DO inicial de 0.1 con medio fresco LB. Y se les agregó el volumen correspondiente de cada extracto (metanólico y acuoso) de tal manera que en el pozo se alcanzaron las concentraciones de 20, 10, 3 y 0.5%. Como blancos se utilizaron el medio LB y el medio LB adicionado con cada concentración del extracto correspondiente. El control positivo fue el crecimiento de *Cmm* en LB (Figs. 2 y 3).

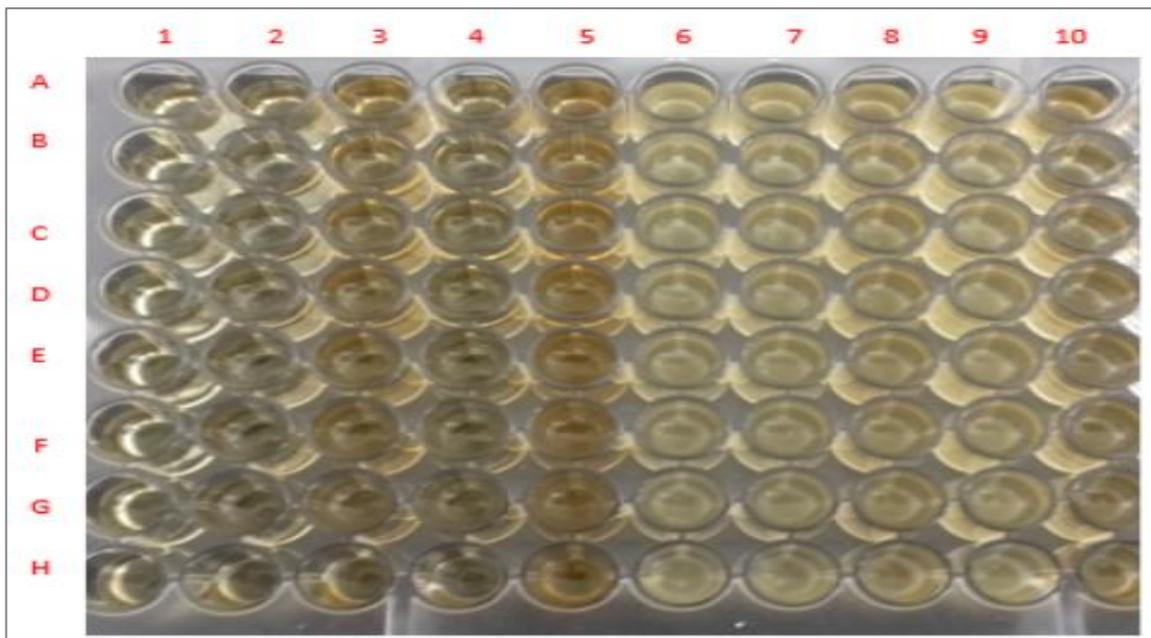


Figura 2. Diseño de la cinética Bacteriana de *Cmm* con extractos al 20 y 10% .Fila 1:control negativo de LB, fila 2: control negativo de LB+EAG 10%, fila 3: LB control negativo + EAG 20%, fila 4: control LB negativo + EMG 10%, fila 5 control LB negativo + EMG 20%, fila 6: LB + *Cmm*, Fila 7:LB + *Cmm* +EAG 10%, Fila 8:LB + *Cmm* + EAG 20%, fila 9: LB + *Cmm* + EMG 10%, fila 10: LB + *Cmm* + EMG 20%.

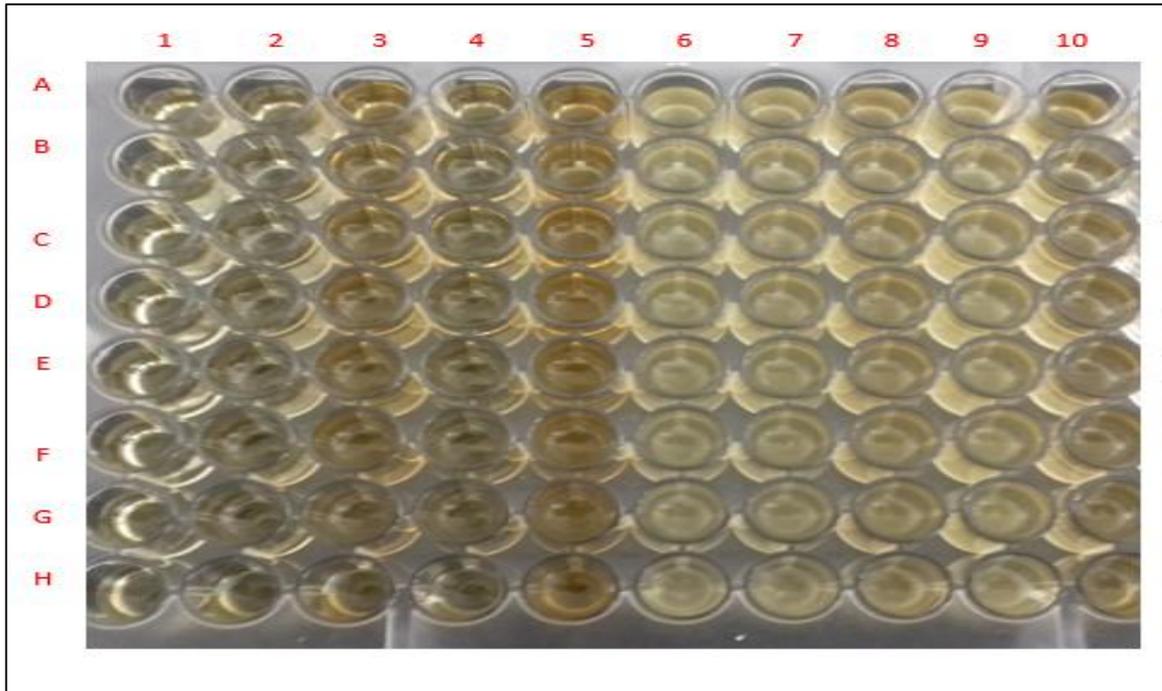


Figura 3. Diseño de la cinética Bacteriana de *Cmm* con extractos al 3 y 0.5%. Fila 1: control negativo de LB, fila 2: control negativo de LB+EAG 3%, fila 3: LB control negativo + EAG 0.5%, fila 4: control LB negativo + EMG 3%, fila 5 control LB negativo + EMG 0.5%, fila 6: LB + *Cmm*, Fila 7:LB + *Cmm* +EAG 3%, Fila 8:LB + *Cmm* + EAG 0.5%, fila 9: LB + *Cmm* + EMG 3%, fila 10: LB + *Cmm* + EMG 0.5%.

Una vez preparadas la microplacas se metieron al equipo lector marca “Multiscan GO” (Thermo Fisher) con versión de software “Skant software 4.1 for Microplate Readers RE, Ver 4.1.0.43”. El equipo se programó para realizar 12 lecturas de Densidad Óptica cada 30 min con agitación continua y velocidad de agitación media, a una longitud de onda de 600nm a temperatura de 28° C. Los resultados fueron analizados mediante la hoja de cálculo Excel en la cual se realizó la transformación logarítmica de los datos de densidad óptica, y se calculó los parámetros de la regresión lineal ($\ln(\text{Abs})$ vs t). Posteriormente se calcularon los parámetros Tasa de crecimiento (μ), Tiempo de duplicación (τ), con las siguientes formulas:

$$\ln(N) = \ln(N_0) + \mu t$$

$$\mu = \ln(2) / \tau$$

Donde:

N_0 = Densidad óptica inicial del cultivo.

N = Densidad óptica final del cultivo.

t = Tiempo.

μ = Tasa de crecimiento, la cual está dada por la pendiente de $\ln(\text{Abs})$ vs t

τ = Tiempo de duplicación.

Maceración y Percolación de Tejido Vegetal de Gobernadora

Se recolectó 1kg de materia vegetal de la planta de gobernadora y se dejó secar durante 7 días a temperatura ambiente. Posteriormente el material se molió utilizando una licuadora comercial de cocina obteniendo partículas vegetales \leq a 1mm. Estas partículas fueron introducidas en un percolador (Fig. 4), al cual se le añadieron 2 L de hexano y se dejó percolando durante 8 días a temperatura ambiente. Transcurridos los ocho días se realizó una primer percolación del tejido vegetal, a los 12 días una segunda percolación, a los 16 días la tercer percolación y a los 21 días la cuarta percolación, en total se realizaron cuatro percolaciones y a cada percolación se le llamo ciclo, el cual consistía en agregar solvente al percolador una vez que se terminaba. El extracto obtenido por cada ciclo se almacenó en 36 tubos de ensayo y de cada ciclo se tiene el concentrado 1-23, 24-36. Cabe mencionar que durante la recolección de las muestras se logró obtener resina la cual también fue analizada (Fig. 5).



Figura 4. Percolación de Planta de Gobernadora. Percolador con tejido vegetal de Gobernadora durante la maceración, en la parte inferior se observa el vaso de precipitado de 1L en el que se recolecto las muestras y resina.



Figura 5. Extracto de Gobernadora Percolado. Se puede observar el vaso de precipitado con la percolación y los treinta y seis tubos de ensayo donde se colocó la percolación de gobernadora

Cromatografía de Capa Fina (TLC)

Las muestras que se concentraron del tubo 1 al 23, 24 al 36 de cada ciclo de percolación y la resina fueron analizadas mediante cromatografía de capa fina (TLC).

Las muestras fueron corridas en cromatofolios de aluminio con gel de sílice 60, F254 con medidas aproximadas de 2.5 cm de ancho y 5 cm de largo. Los cromatofolios fueron rotulados con una línea horizontal marcada por lápiz en la parte inferior como superior a una distancia aproximada de 1 cm de la base. Sobre una de estas líneas se colocaron tres puntos horizontalmente separados cada uno a 0.5 cm. En un solo cromatofolio se colocó la muestra concentrada 1-23, en otro cromatofolio la muestra concentrada 24-36 y en otra la resina; cada cual por triplicado. Cada placa fue corrida por duplicado en el eluyente compuesto por Hexano/Diclorometano a diferentes concentraciones (7:3, 4:3, 6:4, 8:2, 1:1), hasta obtener la mejor resolución

Después de varios ensayos con las concentraciones y la mezcla de eluyente se obtuvo tanto la concentración como la mezcla de eluyente apropiada, los cuales son mencionados en los resultados. A cada placa se le dieron 4 corridas. El duplicado de cada cromatofolio es debido a que uno de ellos se reveló con ácido fosfomolibdico. Para lo cual, el cromatofolio se dejó secar a temperatura ambiente hasta que el solvente se haya evaporado totalmente, se asperjó el revelador de manera homogénea, se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente con el uso de unas pinzas de laboratorio se colocó sobre una placa de calentamiento a una temperatura de 45°C aproximadamente, hasta que aparecieron bandas poniendo en evidencia los compuestos orgánicos en el cromatofolio. A cada banda en el cromatofolio se le determinó la retención de frentes (Rf) la cual es la relación de distancias mediante la siguiente fórmula:

$$(Rf = \frac{x}{y})$$

Donde:

X es la distancia recorrida por el compuesto

Y la distancia recorrida por el eluyente

Los duplicados de cromatofolios se sometieron a luz UV bajo longitudes de onda corta: 230 nm λ , onda larga 260 nm λ , estos mismos cromatofolios se envolvieron con papel aluminio durante 72h para cerciorar que el solvente se haya evaporado por completo.

RESULTADOS

Extractos Metanolicos y Acuoso de Especies Vegetales

En el presente trabajo se realizaron colectas de material vegetal de Pirul (*Schinus molle*), Gobernadora (*Larrea tridentata*), con la finalidad de encontrar efectos antagónicos contra *Cmm*.

Se obtuvieron 30 ml de los extractos acuoso y metanolicos de las plantas de gobernadora y pirul. Los extractos metanolicos entre la misma especie vegetal mostraron un color más intenso (oscuro) en comparación con el acuoso (Fig. 6).



Figura 6. Extractos Vegetales de Pirul y Gobernadora. El primer falcón de izquierda a derecha contiene el extracto metanolicos de pirul, el segundo en el mismo orden el extracto acuoso de pirul, el tercero el extracto acuoso de gobernadora, el cuarto el extracto metanolicos de gobernadora.

Evaluación *In vitro* de Extractos Acuoso y Metanolicos de Gobernadora y Pirul.

Se evaluaron ocho tratamientos con la finalidad de observar efecto antagónico contra el fitopatógeno *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*,. Los tratamientos del 1 al 4 son del extracto de gobernadora y del 5 al 8 del extracto de pirul. Cada ensayo se realizó en cajas de petri con medio LB solido el cual se inoculó previamente con *Cmm*,

en cada caja se evaluó por duplicado los extractos de gobernadora y pirul y cada ensayo por triplicado.

El control negativo, que correspondieron a los solventes utilizados en la extracción, no mostró inhibición en el crecimiento de *Cmm*. El control positivo de inhibición (Sulfametazina) mostró una halo de inhibición de 1.4 cm según la media de Tukey, lo cual indica sensibilidad por parte del microorganismo al antibiótico. En cuanto a los extractos de gobernadora, el extracto acuoso mostró una media del halo de inhibición de 1.0 cm y según la prueba de Tukey no hubo diferencia significativa en comparación con el control positivo. El extracto metanólico presentó halos de inhibición de 3.2 cm, mostrando diferencia significativa en comparación al control positivo, negativo y extracto acuoso. Por lo cual se consideró el mejor tratamiento con mayor actividad antimicrobiana bajo condiciones *In vitro* (Cuadro 3).

En cuanto a los extractos de pirul (Metanólico y Acuoso) ninguno mostró halos de inhibición (Fig. 7).

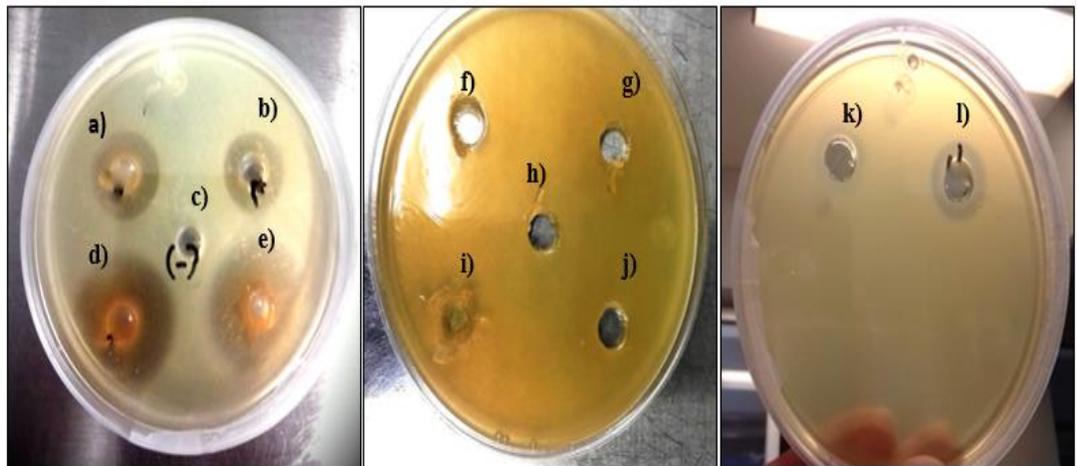


Figura 7. Evaluación *In vitro* de Extractos Acuoso y Metanólicos de Gobernadora y Pirul. a) y b): halos de inhibición causados por el extracto acuoso de gobernadora; c): control negativo sin halo de inhibición; d) y e) halos de inhibición por extracto metanólico de gobernadora; f) y g) extractos acuoso de pirul sin halos de inhibición; h) control negativo sin halo de inhibición; i) y j) extractos metanólicos de pirul sin halos de inhibición; k) e l) halos de inhibición por sulfametazina.

Por lo tanto se determinó que el extracto acuoso y metanolico de pirul no poseen efecto antagónico contra *Cmm* y no fueron considerados para las cinéticas bacterianas, únicamente los extractos acuosos y metanólicos de gobernadora. Cabe mencionar que el metanol no influyó en la inhibición del microorganismo, debido a la baja concentración en que se encontraba diluido. La prueba clara fue el extracto metanólico de pirul y el control negativo.

En el cuadro 3 se ilustra la comparación de medias de los halos de inhibición de cada extracto vegetal y el control positivo.

Cuadro 3. Halos de Inhibición de los Diferentes Extractos de las Diferentes Especies Vegetales.

ESPECIE	EXTRACTO	HALO DE INHIBICIÓN
Gobernadora	Metanolico	3.2 a
	Acuoso	1.0 b
Pirul	Metanolico	0.0 c
	Acuoso	0.0 c
Control Negativo	Metanol 20%	0.0 c
Control Positivo	Sulfametazina	1.4 b

Medias con letras desiguales en la misma columna difieren significativamente para la Prueba de Tukey ($P \geq 0.05$)

Cinética Bacteriana

Ya que los extractos de gobernadora si mostraron efecto antimicrobiano contra *Cmm*, y que el solvente empleado para el extracto metanólico no afecta la viabilidad de *Cmm*, se procedió a determinar la concentración mínima inhibitoria de *Cmm*, mediante el análisis de cinéticas de crecimiento en medio de cultivo LB, bajo diferentes concentraciones de los extractos de gobernadora.

Se evaluaron 8 concentraciones las cuales fueron: 20, 10, 3 y 0.5% del extracto acuoso y metanolico de gobernadora con la finalidad de determinar si el extracto tiene efectos bacteriostáticos o bactericidas contra *Cmm*.

Los controles negativos en los ensayos realizados no mostraron crecimiento, por lo que se consideraron confiables los resultados.

En la cinética número uno donde se probaron las concentraciones del 20 y 10 % de ambos extractos; el control positivo de *Cmm* mostró una R^2 de 0.97 lo cual indica que hay linealidad en el sistema [Ln (Abs) vs t] (Fig. 8). En esta condición *Cmm* tuvo una tasa de crecimiento de 0.12 h^{-1} y un tiempo de duplicación de 5.4 h (Cuadro 4)

Bajo la concentración del 10% del extracto acuoso, el crecimiento de *Cmm* presento una R^2 de 0.94, lo cual indica que hay linealidad en el sistema [Ln (Abs) vs t] (Fig. 8), bajo esta condición la tasa de crecimiento de *Cmm* fue de 0.03h^{-1} con un tiempo de duplicación de 21.92 h. En comparación con el control positivo la tasa de crecimiento disminuyó 4 veces menos lo cual indica que la bacteria tiene poca afinidad con el medio de cultivo con el extracto acuoso al 10%, asimismo el tiempo de duplicación se elevó hasta las 21 h. La prueba de Tukey mostro diferencia significativa entre el control positivo y el extracto al 10% (Cuadro 4).

Las gráficas de la primer y segunda cinética fueron calculadas con los promedios de absorbancia de las ocho lecturas realizadas con la finalidad de mostrar la línea de tendencia en los controles positivos y extractos que mostraron una R^2 superior a 0.9.

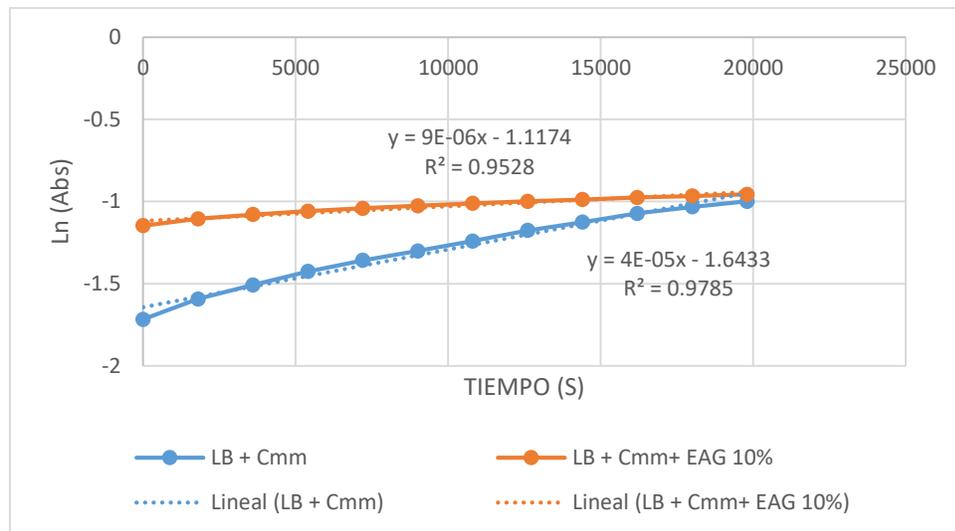


Fig. 8. Cinética de crecimiento microbiano de *Cmm* en medio LB y medio LB suplementado con Extracto acuoso de gobernadora 10%. Cada punto señalado en la recta es el promedio de la absorbancia de las ocho lecturas con respecto al tiempo señalado en la gráfica.

En la concentración de 20% de extracto acuoso, la transformación logarítmica de la absorbancia arrojó valores incalculables, por lo que se determina que no hubo crecimiento bacteriano. Por lo tanto, se determina que el extracto acuoso de gobernadora al 20 % tiene efecto bactericida sobre *Cmm* (Cuadro 4).

En la concentración de 10% y 20% de los extractos metanólico, la R^2 no es lineal por lo que se consideró que no hubo crecimiento bacteriano y que este extracto bajo esas concentraciones presenta efecto bactericida contra *Cmm* (Cuadro 4).

La cinética número 2 con las concentraciones de 3 y 0.5% se realizó en otra placa con el mismo diseño de la placa anterior.

El control positivo de crecimiento de *Cmm*, que fue el medio LB, mostro una R^2 de 0.96 lo cual indica que hay linealidad en el sistema [Ln (Abs) vs t] (Fig. 9). En esta condición *Cmm* tuvo una tasa de crecimiento de 0.61 h^{-1} y un tiempo de duplicación de 1.1h (Cuadro 4).

En la concentración de 0.5% de extracto acuoso si se mostró linealidad en el sistema [Ln (Abs) vs t] con una R^2 de 0.94 (Fig. 9). La tasa de crecimiento fue de 0.53 h^{-1} y el tiempo de duplicación de 1.4 h. Comparando estos datos con el control positivo la prueba de Tukey no mostro diferencia significativa (Cuadro 4)

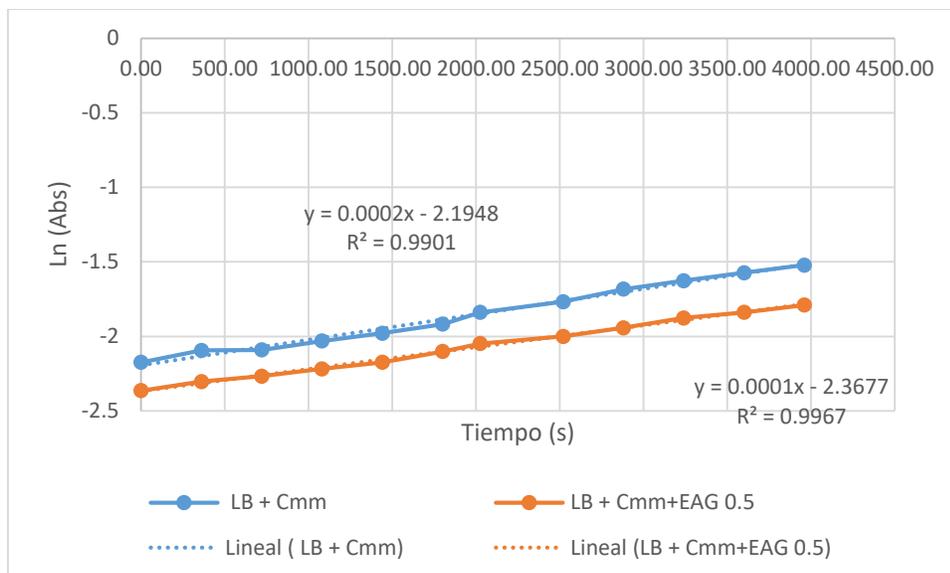


Fig. 9. Cinética de crecimiento microbiano de Cmm en medio LB y medio LB suplementado con Extracto acuoso de gobernadora 0.5%. Cada punto señalado en la recta es el promedio de la absorbancia de las ocho lecturas con respecto al tiempo señalado en la gráfica.

En la concentración de 3% de extractos acuoso la R^2 fue menor a 0.9 lo que indica que no existe linealidad en el sistema ($\text{Ln}(\text{Abs})$ vs t), lo que quiere decir que no hubo crecimiento bacteriano (Cuadro 4).

Las concentraciones de 3 y 0.5% de extractos metanólico obtuvieron datos logarítmicos de absorbancia conforme al tiempo incalculables. Por lo que se determinó que el crecimiento en estos extractos bajo estas concentraciones fue nulo (Cuadro 4).

Cuadro 4. Cinética Bacteriana con Diferentes Porcentajes de Extracto Acuoso y Metanólico de Gobernadora (*Larrea tridentata*).

Medio de cultivo	Coefficiente R ² Ln(Abs) vs t	μ (h ⁻¹)	τ (h)
LB	0.97 ± 0.0	0.12 ± 0.0	5.4 ± 0.3 ^a
LB + EAG 10%	0.94 ± 0.02	0.03 ± 0.0	21.92 ± 2.1 ^b
LB + EAG 20%	D/I	D/I	D/I
LB + EMG 10%	D/I	D/I	D/I
LB + EMG 20%	D/I	D/I	D/I
LB	0.96 ± 0.3	0.6 ± 0.9	1.1 ± 0.19 ^a
LB + EAG 3%	D/I	D/I	D/I
LB + EAG 0.5%	0.94 ± 0.8	0.5 ± 0.1	1.4 ± 0.5 ^a
LB + EMG 3%	D/I	D/I	D/I
LB + EMG0.5%	D/I	D/I	D/I

LB: Medio de cultivo de LB + *Cmm* (Control positivo); LBEAG: LB + *Cmm* y Extracto Acuoso de Gobernadora; LBEMG: LB + *Cmm* y Extracto Metanólico de Gobernadora. (Los números indicados en porcentaje es la concentración del extracto en el medio de cultivo); D/I: Datos Incalculables; (μ) Tasa de crecimiento; (τ) Tiempo Duplicación.

Maceración y Percolación de Tejido Vegetal de Gobernadora

De acuerdo a lo anterior, la evidencia sugiere que los extractos acuosos y metanólicos de gobernadora podrían: 1) tener el mismo metabolito antimicrobiano en diferentes concentraciones o 2) tener diferentes metabolitos antimicrobianos en función de los niveles de polaridad de los solventes utilizados. Por lo cual, se procedió a realizar una extracción exhaustiva de metabolitos de gobernadora mediante percolación, de esta

forma se espera contar con una mayor diversidad y cantidad de metabolitos, entre ellos los que tengan la actividad antimicrobiana contra *Cmm*. Se utilizó una mayor cantidad de muestra, aproximadamente 1.5 kg de tejido vegetal de gobernadora y el solvente (Hexano) durante 30 días a temperatura ambiente.

En la Figura 10, se puede apreciar un cromatofolio que se realizó dentro de los primeros ensayos para determinar la mejor concentración del eluyente, en el cual se aprecia en una de sus filas los compuestos que conforman una mancha indicando que la concentración o la mezcla de eluyente no era la correcta.

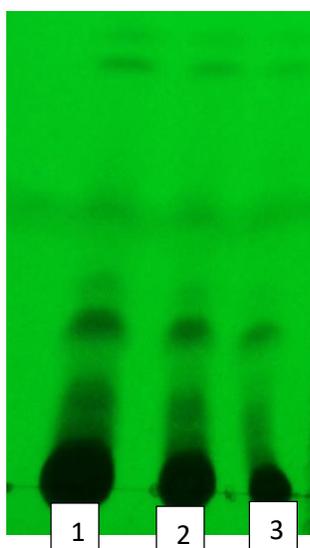


Figura 10. Ensayos de Cromatografía de Capa Fina. En los tres carriles se pueden observar manchones los cuales son compuestos que no lograron separarse correctamente indicando que la metodología implicada no es la adecuada.

En total se obtuvieron 36 muestras de la percolación, el tamaño de cada muestra fue un aproximado de 100 ml. Para poder manejar las diferentes muestras se realizó el concentrado de los tubos 1 al 23 (concentrado 1-23) y de las muestras 24-36 (concentrado 24-36).). El solvente se evaporó de manera natural a temperatura ambiente quedando el concentrado del extracto de gobernadora. (Fig. 11)

De la percolación también se logró obtener resina color negro la cual se recolectó para realizarle cromatografías la cual fue la muestra tres.



Figura 11. Fracciones obtenidas por medio de Percolación de gobernadora. Treinta y seis muestras fueron obtenidas en cada ciclo de percolación del extracto de gobernadora, recolectadas en tubos de ensayo.

Cromatografía de Capa Fina (TLC)

Para poder separar y visualizar los metabolitos se utilizó la técnica de cromatografía de Capa Fina (TLC). Cada concentrado así como la resina fueron cargados tres veces en un cromatofolio, y cada muestra fue corrida por triplicado, con la finalidad de utilizar dos tipos de revelado: UV (260 y 230nm) y con revelador universal ácido fosfomolibdico (Sulfato Cérico y Ácido sulfúrico 5%).

Se realizaron tres cromatografías correspondientes a cada muestra. Las tres muestras fueron expuestas a 2 longitudes de onda UV, larga (260 nm) y corta (230nm). Las placas vistas bajo la luz UV (excepto la placa con la muestra tres) con longitud larga mostraron compuestos fluorescentes color naranja, los cuales se observan a una altura similar en ambas placas, el tamaño de estos fragmentos parecen tener la misma magnitud (Fig. 12).

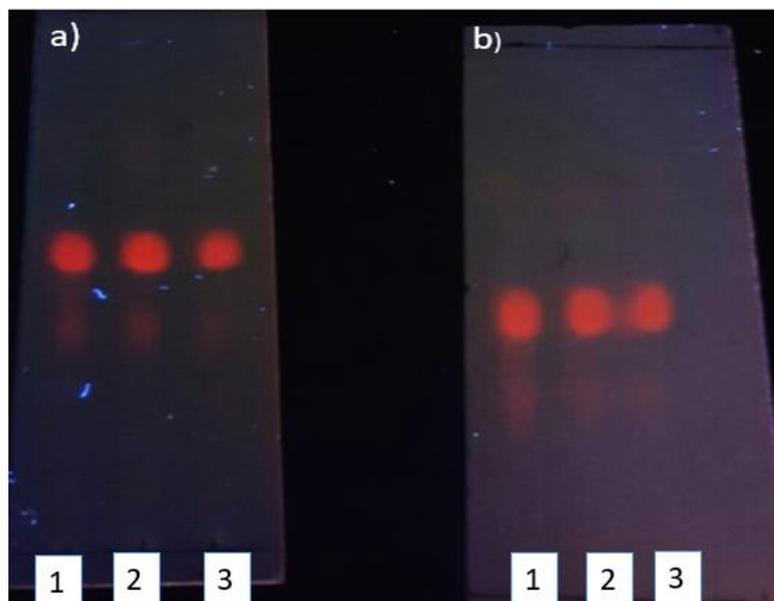


Figura 12. Cromatogramas de fracciones concentradas bajo luz UV (260 nm). a) Corresponde a la muestra del concentrado 1-23 de la primer percolación con tres repeticiones. b) corresponde a la muestra 24-36 de la primer percolación con tres repeticiones. En ambas se puede observar compuestos con fluorescencia color naranja.

Las cromatografías bajo luz UV (230nm λ) mostraron otros compuestos que en 260nm (λ) no se pudieron observar, las placas del concentrado 1-23 y 24-36 mostraron compuestos muy similares en magnitud y tamaño de fragmento. La resina mostro compuestos distintos a los de las corridas anteriores (Fig.13).

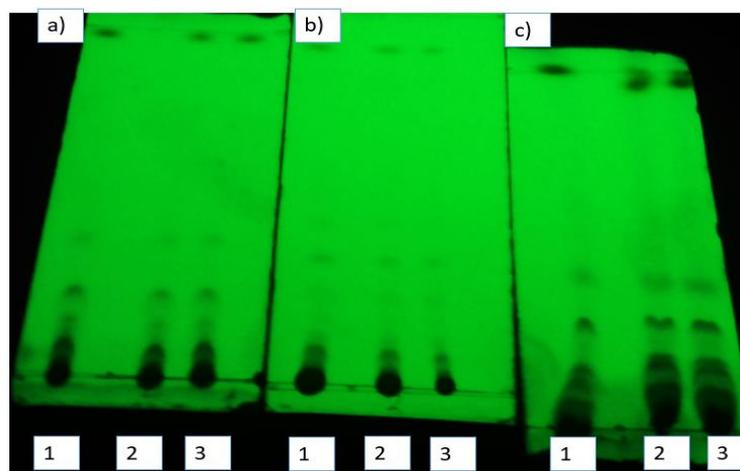


Figura 13. Cromatogramas del ciclo de percolación 4 Visto Bajo Luz UV (230 nm) El cromatograma del a) es del concentrado 1 con tres repeticiones, el cromatograma b) es el concentrado 2 con tres repeticiones, y el cromatograma c) es de la muestra de resina con tres repeticiones.

Los cromatogramas que se revelaron con el ácido fosfomolibdico mostraron la separación de más compuestos los cuales no se lograron observar bajo luz UV. A estos cromatofolios se les determino el Rf obteniendo los siguientes valores.

Concentrado 1 (tubos 1-24, ciclo de percolación 1): las tres repeticiones de esta muestra mostraron siete compuestos orgánicos con los siguientes Rf: 0.33, 0.48, 0.62, 0.64, 0.79, 0.83, 0.96, (Fig. 14).

Concentrado 2 (tubos 25-36, ciclo de percolación 1: las tres repeticiones de esta muestra mostraron siete compuestos orgánicos con los siguientes Rfs: 0.11, 0.30, 0.48, 0.61, 0.63, 0.76, 0.80. (Fig. 14).

Concentrado 3: en este caso los Rfs de las repeticiones no resultaron similares. En el carril 1 se obtuvieron los siguientes Rfs 0.32, 0.40; en el carril 2 no se lograron obtener Rfs y en el carril 3 los siguientes Rfs: 0.29 y 0.36. (Fig. 14).

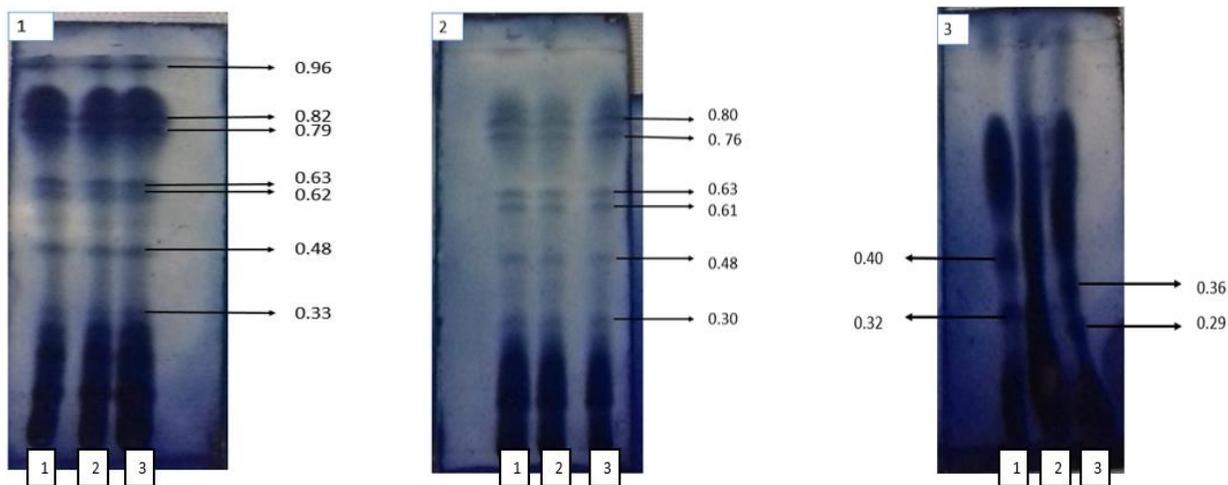


Figura 14. Cromatografías de la Cuarta Percolación revelados con ácido fosfomolibdico de los Concentrados y Resina. El cromatofolio 1 corresponde al concentrado 1-23, el cromatofolio 2 al concentrado 24-36 y el cromatofolio 3 a la muestra de resina. Los números señalados con flecha son los Rf de cada compuesto que se lograron separar en el cromatofolio.

DISCUSIÓN

El uso de las plantas como agentes de control de plagas es una práctica que existe desde los inicios de la especie humana. La etnobotánica es la ciencia que investiga la relación entre las plantas y la cultura humana en diferentes ambientes, la cual surge como un instrumento para rescatar tradiciones milenarias sobre los diversos usos que el hombre le ha dado a estas y como alternativa de dar valor agregado a los recursos vegetales (Pino *et al.*, 2004). Las plantas y sus derivados han mostrado efectos controladores contra ácaros, roedores, nematodos, bacterias, virus, hongos e insectos (Grainge *et al.*, 1988). Especies de plantas como ajo (*Allium sativum*), ají (*Capsicum frutescens*), higuera (*Ricinus comunis*), nim (*Azadirachta indica*), son materia prima de varios insecticidas comerciales (Rodríguez y Nieto, 1997).

En el presente trabajo se realizaron dos ensayos *In vitro* en cajas de agar LB contra el fitopatógeno *Cmm*. Uno de ellos fueron los extractos acuosos y metanólicos de pirul que no mostraron efecto antimicrobiano contra dicho patógeno. Cabe mencionar que Alba *et al.*, (2009) utilizaron aceites esenciales de pirul, y mostraron efecto antimicrobiano contra cepas gram positivos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella pneumonia*. Esto también coincide con los resultados que obtiene Pérez *et al* (2004) al probar aceites esenciales y extractos acuosos. Por lo que se presume que el método empleado para la extracción de compuestos bioactivos de pirul probablemente no fue el apropiado para obtener el o los compuestos con propiedades bactericidas contra *Cmm*.

El segundo extracto probado fue el de gobernadora (acuoso y metanólico), ambos extractos de gobernadora mostraron efecto antimicrobiano contra *Cmm*. El extracto acuoso mostró un halo de inhibición de menor diámetro en comparación con el halo del extracto metanólico sobre el fitopatógeno. Moreno *et al.*, (2011) reportaron diferencia significativa en los controles de extractos de *Larrea tridentata* contra dos hongos fitopatógenos (*Aspergillus flavus* y *Penicillium sp*). En el caso de *A. flavus* el control con agua obtuvo una media de halos de inhibición de 41.66 mm y el metanólico de 48.33 mm en el que se reportó diferencia significativa entre el extracto acuoso y metanólico. Para

Penicillium la media del halo de inhibición con agua fue de 15 mm y en el metanólico de 11 mm, en este caso el metanólico mostro un halo de menor diámetro en comparación con el acuoso.

Referente a las cinéticas bacterianas se obtuvieron resultados favorables con ambos extractos de gobernadora. En el caso del extracto metanólico se determinó una concentración mínima útil inhibitoria contra *Cmm* (CMUI) al 0.5% (5 mL/L) En el caso del extracto acuoso se observó que el efecto bactericida se presenta al 3% (30 mL/L) Estos datos resultan interesantes al compararlos con los que reporta Castro *et al.*, (2011) donde reportan que el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (Gram +) fue inhibido principalmente por extracto de *L. tridentata* 100 mg/mL.

Ya que se conoce que el extracto metanólico tiene una mayor actividad antimicrobiana se procedió a realizar una extracción de metabolitos mediante percolación, para lo cual se requiere una mayor cantidad de material vegetal en contacto con un solvente durante cierto tiempo. Con lo anterior es posible obtener cantidades mayores de metabolitos con la polaridad correspondiente al solvente utilizado. En nuestro proyecto, se logró la estandarización de la fase de percolación con un solvente no polar; así como el análisis de las fracciones obtenidas mediante TLC. En nuestro trabajo, la evidencia sugiere que los extractos acuosos y metanólicos de gobernadora probablemente podrían: 1) tener el mismo metabolito antimicrobiano en diferentes concentraciones o 2) tener diferentes metabolitos antimicrobianos en función de los niveles de polaridad de los solventes utilizados, de allí, que se tengan diferentes halos de inhibición y diferencias en la efectividad de las concentración analizadas mediante cinéticas de crecimiento.

CONCLUSIONES

- Los extractos de pirul empleados en esta investigación no fueron los adecuados para obtener compuestos bioactivos contra *Cmm*, por lo cual se sugiere realizar más ensayos con diferentes solventes y temperaturas.
- La planta de gobernadora (*L. tridentata*) posee compuestos bioactivos los cuales manifiestan actividad antimicrobiana sobre el fitopatógeno *Cmm*.
- El extracto metanólico de *L. tridentata* fue efectivo contra *Cmm* en sus concentraciones 20, 10, 3 y 0.5%.
- El extracto acuoso mostró un efecto bacteriostático al 10% y bactericida al 20%.
- La metodología empleada para la obtención de los extractos de gobernadora es sencillo y de bajo costo, lo cual resulta en beneficio de los productores ya que se les puede capacitar para la realización de los extractos y así controlar este fitopatógeno.
- En el presente trabajo se logró la estandarización de percolación para gobernadora, que permitirá realizar una extracción exhaustiva de metabolitos con diferente polaridad.
- En el presente trabajo se logró la estandarización de la técnica de TLC, que permitirá el aislamiento e identificación de metabolitos antimicrobianos de gobernadora.

PERSPECTIVAS

- Realizar percolaciones de gobernadora con solventes de mayor polaridad
- Aislar metabolitos bioactivos mediante TLC
- Determinar el efecto de los extractos sobre semilla de jitomate infectada por *Cmm*
- Determinar el efecto de los extractos sobre suelos infestados por *Cmm*

LITERATURA CITADA

- Abramovitch R.B., G.B. Martin (2004) Strategies Used By Bacterial Pathogens To Suppress Plant Defenses. *Current Opinion in Plant Biology* 7:356–364.
- Abramovitch R.B. J.C. Anderson, G B. Martin (2006) Bacterial Elicitation And Evasion Of Plant Innate Immunity. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7:601–611.
- Araujo, B.S.R., (1997). “Evaluación de la Actividad Fungicida y Aflatoxigénica de Extractos de Plantas del Estado de Sonora para el control de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*”. Tesis profesional. Universidad Autónoma de Sonora, México
- Baltrus D.A, M.T. Nishimura, A. Romanchuk, J.H. Chang, M.S. Mukhtar, K. Cherkis, J. Roach, S.R. Grant, C.D. Jones and J.L. Dangl. (2011). Dynamic Evolution Of Pathogenicity Revealed By Sequencing And Comparative Genomics Of 19 *Pseudomonas Syringae* Isolates. *LoS Pathogens* 7:e1002132.
- Barbour, M G, Cunningham, G., Oechel, W O, Bamberg, S A (1977). Growth And Development Form And Function. pp. 48-91. In: T.J. Mabry, J.H. Hunziker, D.R.Jr. DiFeo (eds.). Creosote Bush Bush-Biology and Chemistry of Larrea in New World Deserts. US/IBP Synthesis Series 6. Dowden, Hutchinson & Ross Inc., Stroudsburg, PA, USA.
- Bartholomew, B.(1970) Bare zone between California shrub and grassland communities: the role of animals. *Science* 170 (3963): 1210-1212.
- Borboa Flores J, Rueda Puente EO, Acedo Félix E, Ponce JF, Cruz M, Grimaldo Juárez O, García Ortega AM. (2009). Detection of *Clavibacter michiganensis* subspecies *michiganensis* of tomato the state of Sonora, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 32 (4). 319 – 326.
- Borboa J, Rueda EO, Acedo F, Ponce JF, Cruz M, Grimaldo O, García AM. (2009). Detection of *Clavibacter michiganensis* subspecies *michiganensis* of Tomato the State of Sonora, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 32 (4). 319 – 326.
- Brinker F. (1993). “*Larrea tridentata* (D.C) (Chaparral or creosote bush)”. *British Journal of Phytoterapy*, 3: 10-30.
- Castro R, Meza CA, Contreras M de RL, Santos J. (2001). Uso De Fitoextractos En El Control Del Crecimiento In vitro De Bacterias Enteropatógenas. *Chapingo Serie Zonas Aridas.* 96-99.
- Cai R., J. Lewis, S. Yan, H. Liu, C.R. Clarke, F. Campanile, N.F. Almeida, D.J. Studholme, M. Lindeberg, D. Schneider, M. Zaccardelli, J.C. Setubal, N.P. Morales-Lizcano, A. Bernal, G. Coaker, C. Baker, C.L. Bender, S. Leman and B.A. Vinatzer (2011) The plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* is genetically monomorphic and under strong selection to evade tomato immunity. *PLoS Pathogens* 7:e1002130.
- Carlton WM, Braun EJ. Gleason ML. (1998). Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. *Phytopathology*. 88: 525 – 529.
- Chalupowicz L., M. Cohen-Kandli, O. Dror, R. Eichenlaub, K.H. Gartemann, G. Sessa, I. Barash and S. Manulis-Sasson (2010) Sequential expression of bacterial virulence and plant defense genes during infection of tomato with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 3:252-261.
- Chalupowicz L., I. Barash, M. Reuven, O. Dror, G. Sharabani, K.H. Gartemann, R. Eichenlaub, G. Sessa, and S. Manulis-Sasson (2017) Differential contribution of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* virulence factors to systemic and local infection in tomato. *Molecular Plant Pathology* 18:336–346.
- Chang R J, S M Ries, J K Pataky (1992) Local sources of *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. *Phytopathology* 82:553-560.

- De Leon L., F. Siverio, M.M. Lopez and A. Rodriguez (2011) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant Disease* 95:1328–38.
- Dreier J., D. Meletzus and R. Eichenlaub (1997) Characterization of the plasmid encoded virulence region pat-1 of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 10:195-206.
- Downum, K.R., Dole, J, Rodríguez, E. (1988). Nordihydroguaiaretic acid: inter-and intrapopulational variation in the Sonoran Desert creosote bush (*Larrea tridentata*, *Zygophyllaceae*). *Biochemical Systematics and Ecology* 16:551-555.
- Dullahide S R, M L Moffett, J B Heaton, J Giles (1983) Effect of time of inoculation of *Corynebacterium michiganense* subsp. *michiganense* on yield of trellised tomatoes. *Plant Pathology*. 12:15-16.
- Dreier J., D. Meletzus and R. Eichenlaub (1997) Characterization of the plasmid encoded virulence region pat-1 of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 10:195-206.
- Eichenlaub R. and K.H. Gartemann (2011) The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 49:445-64.
- EPPO. (2010). Data Sheet on Data Sheets on Quarantine pests. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. EPPO A2 List No. 50.
- EPPO.(2005). No. 39, Diagnostic protocol for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. – Data sheets on quarantine pests. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 35: 275-283.
- Farjana A, Nagma MD, Kabir S. (2014). Antimicrobial Activity of Medicinal Plant Leaf Extracts Against Pathogenic Bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 4(2): 920-923.Doi:10.1016/S2222-1808(14)60758-1.
- FIRA. Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. (2017). Tomate Rojo. Panorama Agroalimentario.
- Francis I., M. Holsters and D. Vereecke (2010) The Gram-positive side of plant–microbe interactions. *Environmental Microbiology* 12:1–12.
- Gamboa R, Hernández F D, Guerrero E, Sánchez A, Lira R H. (2003). Inhibición del Crecimiento Micelial de *Rhizoctonia solani* kühn y *Phytophthora infestans* mont. (de bary) con Extractos Vegetales Metanólicos de Hojasén (*flourensia cernua* D C). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(1): 13-18
- Gartemann KH, Abt B, Bekel T, Burger A, Engemann J, Flugel M, Gaigalat L, Goesmann A, Grafen I, Kalinowski J, Kaup O, Kirchner O, Krause L, Linke B, McHardy A, Meyer F, Pohle S, Ruckert C, Schneiker S, Zelleremann EM, Pulher A, Eichenlaub R, Kaiser O, Bartels D (2008). The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *J Bacteriol* 190: 2138 – 49.
- Guerrero R, Mónaco C, Stocco M, Rolleri J, Guerrero N. (2010). Selección de aislamientos de trichoderma spp. Para el control del cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) del tomate (*Lycopersicon esculentum* mill.). *Amazónica Ciencia y Tecnología*. 6 (1) 9-20.
- González A, Wisdom C S, Sharifi M R, Rundell, PW. (1994). Water and nitrogen manipulations of the desert shrub *Larrea divaricata* subsp. *tridentata* (*Zygophyllaceae*). *Journal of Arid Environment*. 28:139-146.
- Grainge, M., Ahmed, S. (1988). *Handbook of Plant with Pest-Control Properties*. John Wiley and Sons, USA. 470 p

- Hadas R.G. Kritsman, Klietman F, Gefen T, Manulis S. (2014) Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant pathol.* 54: 643-649
- Hogenhout S.A. and R. Loria (2008) Virulence mechanisms of Gram-positive plant pathogenic bacteria. *Current Opinion in Plant Biology* 11:449–456.
- Holguín Peña RJ, Vázquez Juárez RC, Rueda Puente EO (2006). Bacterial Canker Caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Tomato in the Baja California Peninsula of Mexico. *Phytopathology.* 90: 1550.
- Jahr H, J. Dreier, D. Meletzus, R. Bahro and R. Eichenlaub (2000) The endo-beta-1,4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *Molecular Plant Microbe Interactions* 13:703-14.
- Jones J.D.G. and J.L. Dangl (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323–329.
- INFOAGRO. www.infoagro.com/hortalizas/el_chancro_bacteriano_del_tomate.htm visitado el 24 de enero 2017.
- Kaup O., I. Grafen, E.M. Zeller mann, R. Eichenlaub and K.H. Gartemann (2005) Identification of a tomatinase in the tomato pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Molecular Plant Microbe Interactions* 18:1090 – 1098.
- Kawaguchi A., K. Tanina and K. Inoue (2010) Molecular typing and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouses in Japan. *Plant Pathology* 59:76–83.
- Kleitman F., I. Barash, A. Burger, N. Iraki, Y. Falah, G. Sessa, D. Weinthal, L. Chalupowicz, K.H. Gartemann, R. Eichenlaub and S. Manulis-Sasson (2008). Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel. *European Journal of Plant Pathology* 121:463–475.
- Lira-Saldívar, R.H; Sanchez, M.R; Gamboa, R; Jasso, D; Rodríguez, R. (2003). Fungitoxic effect of *Larrea tridentata* resin extracts from the Chihuahua and Sonora deserts on *Alternaria solani*”. *Agrochimica*, 47: 50-60.
- Livingston, BE. (1923) Some physiological aspects of soil toxicity. *Journ Amer. Soc. Agron.* 15(8): 313-323.
- Mansfield J., S. Genin, S. Magori, V. Citovsky, M. Sriariyanum, P. Ronald, M. Dow, V. Verdier, S.V. Beer, M.A. Machado, I. Toth, G. Salmond and G.D. Foster (2012) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13:614-29.
- Meinzer, F C, Wisdom C S, González A, Rundel, P W, Shultz L. M.(1990). Effects of leaf resin on stomatal behavior and gas exchange of *Larrea tridentata* (D.C.) Cov. *Functional Ecology* 4: 579-584.
- Meletzus D., A. Bermphol, J. Dreier and R. Eichenlaub (1993) Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Journal of Bacteriology* 175:2131-2136.
- Milijasevic S., Gartemna K H, J. Frohwitter, R. Eichenlaub, B. Todorović, E. Rekanović and I. Potočnik (2012) Characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains from recent outbreaks of bacterial wilt and canker in Serbia. *European Journal of Plant Pathology* 134:697–711.
- Mojé, W. (1966) Organic soil toxins. En: H. D. Chapman (Ed.). *Diagnostic criteria for plants and soils.* Univ. of Calif. Div. of Agric. Sc.

- Mole B.M., D.A. Baltrus, J.L. Dangel and S.R. Grant (2007) Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria. *Trends in Microbiology* 15:363–371.
- Moreno S, Gonzales L.N, Salcedo S.M, Cardenas M.L, Peralez A. (2011). Efecto Antifúngico de Extractos de Gobernadora (*Larrea tridentata*) sobre la Inhibición *In vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium sp.* Polibotanica. 32: 193-205.
- Muller W. H., P. Lorber B. Haley, K. Johnson.(1969) Volatile growth inhibitors produced by *Salvia leucophylla*: effect on oxygen up take by mitochondria suspensions. *Bull. Torr. Bot. Club* 96(1):89-96.
- Normas Regionales de la NAPPO (NAPPO). 2013. Organización norteamericana de protección a las plantas sobre medidas fitosanitarias (NRMF):1-8 pp
- NOM-007- FITO, 1995, http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4901141&fecha=30/11/1998, Visitado el 15-10-17.
- Pérez R, Rodríguez C, Lara J, Montes R, Ramírez G. (2004). Toxicidad de Aceites, Esencias y Extractos Vegetales en Larvas de Mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera:Culiciade). *Acta de zoológica Mexicana*. 20: 141-152.
- Pino, N. y H. Valois. 2004. Ethnobotanical of four black communities of municipality of Quibdó, Choco-Colombia. *Lyona, Journal Ecology and Application*: 7(2). 1-9.
- Rhoades DF. (1977). The antiherbivore chemistry of *Larrea*. In: T. J. Mabry, J. H. Hunziker, D. R. Jr. DiFeo (eds.). *Creosote bush biology and chemistry of Larrea in new world deserts*. US/IBP Synthesis Series 6. Dowden, Hutchinson and Ross Inc., Stroudsburg, PA, USA. Pp 135-175.
- Rodríguez, H. C. & D. Nieto A. 1997. Anonáceas con Propiedades Insecticidas. In. *Anonáceas, Produção e Mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimólia)*. Bahia, Brasil. Pp.229-239.
- Rundel, P. W., Sharifi, M. R., and González-Coloma, A. 1994. Resource availability and herbivory in *Larrea tridentata*. In: M. Arianoustsov and R. H. Groves (eds.). *Plant-Animal Interaction in Mediterranean-Type Ecosystems*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. Pp 105-114.
- SAGARPA, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2016). *Avances y cierres de la Producción Agrícola*.
- Sandoval B C (2004) Manual Técnico. Manejo Integrado de Enfermedades en Cultivos Hidropónicos Agricultura y la Alimentación. FAO, Oficina Regional Para América Latina y el Caribe. 53 p.
- Sen Y., J. van der Wolf, R.G. Visser and S. van Heusden (2015) Bacterial canker of tomato: current knowledge of detection, management, resistance, and interactions. *Plant Disease* 99:4-13.
- Stork I., K.H. Gartemann, A. Burger and R. Eichenlaub (2008) A family of serinproteases of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: chpC plays a role in colonization of the host plant tomato. *Molecular Plant Pathology* 9:599 – 608.
- Tequida-Meneses, M., Cortez-Rocha, M., Rosas-Burgos, E.C., López-Sandoval, S., Corrales-Maldonado, C. (2002). Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Revista Iberoamericana Micología*. 19: 84-88.
- Valesi, A. G., Rodríguez, E., Vander-Velde, G., and Mabry, T. J. 1972. Methylated flavonols in *Larrea cuneifolia*. *Phytochemistry*. 11: 2821-2826.
- Vargas-Arispuro, I., Contreras-Valenzuela, A., Hernández-Martínez, J., Martínez- Téllez, A. (2006). “Arielsenofosfatos con acción antifúngica selectiva c o n t r a P h y t o m a t o t r i c h o p s i s o m n i v o r a ”,

Revista de fitotecnia Mexicana. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Chapingo, México.28(002):171-174.

Verastegui, M., C. Sánchez, N.L. Heredia, and J.S. Garcia. 1996. Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahua desert. *J. Ethnopharmacol.* 52:175-177.

Wisdom, C. S., González-Coloma, A., and Rundel, P. W. 1987. Ecological tannin assays: evaluation of proanthocyanidins, protein binding assays and protein precipitating potential. *Oecología*,72: 395-401.

ANEXOS