

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



POTENCIALIZACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES EN EL MANEJO DE  
FITOPATOGENOS EN EL CULTIVO DE CHILE

Tesis

Que presenta MARISOL SANTOS FERNÁNDEZ  
como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila

Junio 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



POTENCIALIZACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES EN EL MANEJO DE  
FITOPATOGENOS EN EL CULTIVO DE CHILE

Tesis

Que presenta MARISOL SANTOS FERNÁNDEZ  
Como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

  
Dra. Yisa María Ochoa Fuentes  
Director UAAAN

  
Dr. Gerardo de Jesús Sosa Santillán  
Director Externo

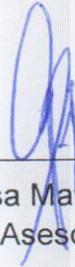
Saltillo, Coahuila

Junio 2018

POTENCIALIZACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES EN EL MANEJO DE  
FITOPATOGENOS EN EL CULTIVO DE CHILE

Tesis

Elaborada por MARISOL SANTOS FERNÁNDEZ como requisito parcial para  
obtener el grado de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola con la  
supervisión y aprobación del Comité de Asesoría:



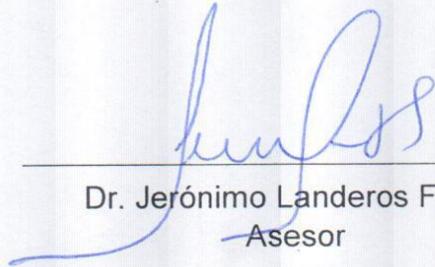
---

Dra. Yisa María Ochoa Fuentes  
Asesor Principal



---

Dr. Ernesto Cerna Chávez  
Asesor



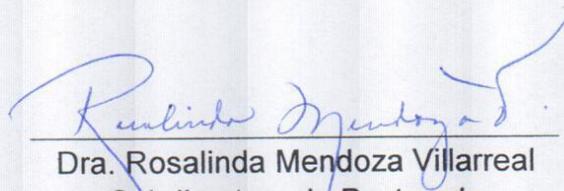
---

Dr. Jerónimo Landeros Flores  
Asesor



---

Dr. Gerardo de Jesús Sosa Santillán  
Asesor Externo



---

Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal  
Subdirectora de Postgrado  
UAAAN

## **Agradecimientos**

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de este proceso de enseñanza, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo de felicidad.

Le agradezco de manera especial y sincera a la Dra. Yisa M. Ochoa Fuentes por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección, por su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas que ha sido invaluable. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

Le agradezco la confianza, apoyo y dedicación de tiempo a mis asesores: Dr. Ernesto Cerna Chávez, Dr. Jerónimo Landeros Flores y Dr. Gerardo de Jesús Sosa Santillán.

A mis amigos por confiar y creer en mí y por haber hecho de esta etapa un trayecto de vivencias que nunca olvidaré.

A CONACYT por la beca otorgada para realizar este proyecto.

Y a todas las personas que de una u otra forma me ayudaron a culminar este trabajo, Juan Carlos, Mariana, Gibran, Sonia.

**¡Gracias a todos ustedes!!!**

## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo:

A mi madre que ha sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado a salir adelante en los momentos más difíciles.

A mi padre, que pesar de nuestra distancia física, siento que está conmigo siempre y sé que este momento hubiera sido tan especial para él como lo es para mí.

A mi hermano que siempre ha estado junto a mí y brindándome su apoyo, muchas veces poniéndose en el papel de padre.

A mis hermanas y a mi familia en general, porque me han brindado su apoyo en todo momento y por compartir conmigo buenas y malas circunstancias.

Y a mi prometido Mateo, por su apoyo incondicional en el transcurso de la maestría, por compartir momentos de alegría, tristeza y demostrarme que siempre podré contar con él.

## Índice General

Resumen .....	x
Abstrac.....	xi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
Objetivo General.....	2
Objetivos Específicos .....	2
Hipótesis.....	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Cultivo de Chile.....	3
2.2 Plagas del chile.....	3
2.2.1 Marchitez del chile.....	4
2.2.1.1 <i>Fusarium oxysporum</i> .....	4
2.2.2 Pudrición blanda.....	5
2.2.2.1 Género <i>Erwinia</i> .....	6
2.2.3 Mancha bacteriana.....	6
2.2.3.1 Género <i>Xanthomonas</i> .....	6
2.2.4 Cancro bacteriano.....	7
2.2.4.1 Género <i>Clavibacter</i> .....	7
2.3 Control químico.....	8
2.4 Metabolitos Secundarios.....	11
2.4.1 Eucalipto ( <i>Eucaliptos globulus</i> ).....	12
2.4.3 Yerbanis ( <i>Tagetes lucida</i> ).....	13
2.4.4 Cenizo ( <i>Hyptis emoryi</i> ).....	14
2.5 Mecanismos de acción de los extractos vegetales.....	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
3.1 Obtención de los extractos vegetales .....	16
3.1.1 Gravimetría.....	17
3.2 Obtención de las cepas.....	18
3.2.1 Identificación del hongo.....	20
3.2.2 Identificación de las bacterias: Pruebas bioquímicas.....	21
3.3 Bioensayos en microplaca: Extractos vegetales.....	21
3.4 Bioensayos en microplaca: Productos Químicos.....	24
3.5 Bioensayos en microplaca: Mezclas .....	26

3.6	Calculo del porcentaje de inhibición.....	29
3.7	Análisis estadístico.....	30
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
4.1	Extractos.....	31
4.2	Obtención de cepas.....	31
4.2.1	Identificación del hongo.....	31
4.2.2	Identificación de las bacterias: Pruebas bioquímicas.....	32
4.3	Bioensayos.....	33
4.3.1	Bioensayos extractos.....	33
4.3.2	Bioensayos con productos químicos.....	36
4.3.3	Bioensayos con mezclas.....	39
5.	CONCLUSIONES.....	45
6.	REFERENCIAS .....	46

## Lista de tablas

Tabla 1. Programa para amplificación ADN de hongos. ....	21
Tabla 2. Concentraciones de los principios activos en cada tratamiento para los géneros bacterianos. ....	25
Tabla 3. Concentraciones de los principios activos en cada tratamiento para <i>Fusarium oxysporum</i> . ....	25
Tabla 4. Concentraciones de los principios activos en cada tratamiento para los géneros bacterianos. ....	28
Tabla 5. Concentraciones de los principios activos en cada tratamiento para <i>Fusarium oxysporum</i> . ....	28
Tabla 6. Concentración de cada uno de los extractos vegetales. ....	31
Tabla 7. Características usadas para diferencias géneros de patógenos procariontes de plantas que crecen en medios comunes. ....	33
Tabla 8. Comparación de medias de los porcentajes de inhibición. ....	34
Tabla 9. Concentración inhibitoria media de cada extracto. ....	36
Tabla 10. Comparación de medias de los porcentajes de inhibición de las bacterias contra los antibióticos. ....	37
Tabla 11. Comparación de medias de los porcentajes de inhibición del hongo contra los fungicidas. ....	38
Tabla 12. Concentración inhibitoria media de cada extractor para los géneros bacterianos. ....	39
Tabla 13. Comparación de medias de los porcentajes de inhibición de las bacterias contra la mezcla de antibióticos y extractos. ....	40
Tabla 14. Comparación de medias de los porcentajes de inhibición del hongo contra la mezcla de fungicidas y extracto. ....	41
Tabla 15. Concentración inhibitoria media de cada extractor para los géneros bacterianos. ....	41
Tabla 16. Índices de Co-toxicidad para la mezcla de antibióticos y extractos. .	43
Tabla 17. Índices de Co-toxicidad para la mezcla de fungicidas y extractos. ...	44

## Lista de figuras

Figura 1. Extracción por soxhlet y concentración en el rotavapor.....	17
Figura 2. Proceso de gravimetría.....	18
Figura 3. Muestreo en Zacatecas. ....	19
Figura 4. Algunos cortes de las muestras.....	19
Figura 5. Esquema de la distribución general en la microplaca. ....	22
Figura 6. Bioensayo con extractos.....	23
Figura 7. Bioensayo productos químicos (Carbendazim). ....	26
Figura 8. Placa de Erwinia sp sin crecimiento en los tratamientos. ....	29
Figura 9. Geles de agarosa.....	32
Figura 10. Pruebas bioquímicas. ....	32

## Resumen

### “Potencialización de extractos vegetales en el manejo de fitopatógenos en el cultivo de chile”

**Introducción.** El cultivo de chile (*Capsicum* sp) en el estado de Zacatecas tiene pérdidas hasta el 80% de la producción debido a plagas como la marchitez del chile (*Fusarium oxysporum*), la pudrición blanda (*Erwinia carotovora*), la mancha bacteriana (*Xanthomonas* sp) y el cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis*). Los agricultores han evitado estas pérdidas incrementando las aplicaciones de plaguicidas que dañan el entorno y la salud humana. Por lo antes mencionado, se buscan alternativas para el control de las enfermedades, siendo los extractos vegetales un campo de oportunidad. **Objetivo.** Potenciar la eficacia biológica de los extractos vegetales de cuatro plantas regionales eucalipto (*Eucalyptus globulus*), altamisa (*Artemisia vulgaris*), cenizo (*Hyptis emoryi*) y yerbanis (*Tagetes lucida*) con la agregación de productos químicos. **Metodología.** Se utilizó el método de microdilución en placa en todos los bioensayos. **Resultados.** Las  $CI_{50}$  menores fueron para *Xanthomonas* sp de 33.33 ppm con el extracto de eucalipto, para *Clavibacter* sp de 33.55 ppm con el extracto de altamisa, para *Erwinia* sp de 198.41 ppm y *Fusarium oxysporum* de 44.26 ppm ambos con el extracto de cenizo. La mayoría de las combinaciones tuvo un efecto sinergista excepto tres: altamisa con eritromicina, altamisa con kasugamicina y eritromicina con eucalipto. La combinación del extracto de cenizo con azoxistrobina para el control del *F. oxysporum* tuvo el mayor ICT (4,973). **Conclusión.** Los extractos potencian el efecto biológico de los productos químicos lo que puede reducir el daño ambiental y a la salud humana por el uso de estos.

**Palabras clave:** extractos vegetales; sinergismo; *Clavibacter* sp; *Xanthomonas* sp; *Erwinia* sp; *Fusarium oxysporum*.

## Abstrac

### "Potentialization of plant extracts in the control of phytopathogens in the cultivation of pepper"

**Introduction.** The cultivation of pepper (*Capsicum* sp) in the state of Zacatecas has lost up to 80% of production due to pests such as pepper wilt (*Fusarium oxysporum*), soft rot (*Erwinia carotovora*), bacterial blotch (*Xanthomonas* sp) and bacterial canker (*Clavibacter michiganensis*). Farmers have avoided these losses by increasing pesticide applications that harm the environment and human health. Therefore, they look for alternatives for the control of diseases, with plant extracts being a field of opportunity. **Objective.** Enhance the biological effectiveness of the plant extracts of four regional plants eucalipto (*Eucalyptus globulus*), altamisa (*Artemisia vulgaris*), cenizo (*Hyptis emoryi*) and yerbanis (*Tagetes lucida*) with the aggregation of chemical products. **Methodology.** The plate microdilution method was used in all bioassays. **Results.** The lowest IC<sub>50</sub> were for *Xanthomonas* sp 33.33 ppm with eucalyptus extract, for *Clavibacter* sp 33.55 ppm with the extract of altamisa, for *Erwinia* sp 198.41 ppm and *Fusarium oxysporum* 44.26 ppm both with the ash extract. Most of the combinations had a synergistic effect except three: altamisa with erythromycin, altamisa with kasugamycin and erythromycin with eucalyptus. The combination of ash extract with azoxystrobin for the control of *F. oxysporum* had the highest CTI (4,973). **Conclusion.** Extracts enhance the biological effect of chemical products, which can reduce environmental damage and human health using these.

**Keywords:** plant extracts; synergism; *Clavibacter* sp; *Xanthomonas* sp; *Erwinia* sp; *Fusarium oxysporum*.

## 1. INTRODUCCIÓN

México es el primer exportador de chile verde a nivel mundial y ocupando a su vez el sexto lugar en la exportación de chile seco (SIAP, 2013), resultando ser el estado de Zacatecas el tercer lugar a nivel nacional con 37,877 ha sembradas y una producción de 288,125 toneladas anuales con pérdidas hasta del 80 % de la producción por plagas. Dentro de las principales enfermedades fitosanitarias del cultivo de chile en el estado de Zacatecas se encuentran la marchitez del chile, el ahogamiento de plántulas o Damping-off, la cenicienta polvorosa y la mancha bacteriana (Velásquez y Amador, 2009). Las enfermedades son causadas por hongos y bacterias, siendo los más destacados *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia* spp, *Fusarium* spp, *Verticillium* spp, *Alternaria* spp, *Oidiopsis* spp, *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Melgar et al., 2012; Velásquez-Valle et al., 2013).

Es común realizar el control de estas enfermedades con productos químicos; sin embargo, su uso inconsciente ha traído como consecuencia la resistencia de los hongos del suelo a fungicidas y de las bacterias a los antibióticos, la contaminación de los suelos, el deterioro de la calidad del aire, el agua y los alimentos, así como también perjuicios a productores y consumidores (Guédeza et al., 2012). El problema económico y ecológico que representa el control químico de enfermedades hace necesaria la búsqueda de alternativas viables en la solución de la problemática con métodos limpios, ecológicos y rentables económicamente. El manejo de las enfermedades fitosanitarias se ha hecho mundialmente difícil debido a la resistencia a los fungicidas y a los antibióticos que durante años fueron empleados en la agricultura de forma excesiva; esta situación ha motivado la búsqueda de alternativas biológicas que cuiden el medio ambiente y no dañen la salud de los trabajadores, entre ellas, los extractos vegetales han resultado prometedores por sus efectos antimicrobianos y aparente inocuidad hacia la salud humana y el entorno natural (Nalimova et al., 2005).

## **Objetivo General**

Potenciar la eficacia biológica de los extractos vegetales de cuatro plantas regionales con la agregación de productos químicos.

## **Objetivos Específicos**

1. Obtener los extractos vegetales de cuatro plantas regionales: Altamisa (*Artemisia vulgaris*), Eucalipto (*Eucalyptus globulus*), Cenizo (*Hyptis emeryi*) y Yerbanis (*Targetes lucida*).
2. Evaluar los extractos vegetales y los productos químicos con *Fusarium oxysporum*, *Xanthomonas* sp, *Erwinia* sp y *Clavibacter* sp, patógenos del cultivo de chile.
3. Evaluar las mezclas del extracto vegetal con mayor eficiencia biológica con diferentes productos químicos y en distintas concentraciones.

## **Hipótesis**

Al menos una de las mezclas igualará o mejorará la eficacia biológica de los productos químicos.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Cultivo de Chile

El chile es el fruto de las plantas pertenecientes al género *Capsicum*, el cual es económicamente importante dentro de la familia Solanaceae. El género incluye al menos 32 especies nativas de América, de las cuales *C. annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L. y *C. pubescens* R&P fueron domesticados desde hace 6,000 años a. C. por los nativos americanos (Milla, 2006; Scaldaferrero *et al.*, 2013; Vázquez-Flota *et al.*, 2007). Los pimientos tienen una gran diversidad de forma, tamaño y color de la fruta. Los pimientos picantes se usan como especias y los pimientos dulces se usan como vegetales. Después del regreso de Colón a Europa tras el descubrimiento de América y de los siguientes viajes de exploración, los chiles se extendieron por todo el mundo debido a su adaptación a diferentes regiones agroclimáticas y la rápida adopción de chiles en diferentes culturas como alimentos, medicinas y plantas ornamentales (Hayman y Kam, 2008). En México, se cultivan las cinco especies antes mencionadas además de encontrar dos variedades silvestres, *C. lan-ceolatum* con amplia distribución en el territorio nacional, y *Capsicum ciliatum* que solo se ha reportado en los estados de Chiapas y Veracruz (Castañón-Nájera *et al.*, 2008).

### 2.2 Plagas del chile

Dentro de los fitopatógenos que atacan al cultivo del chile destacan los causantes de las pudriciones de raíz, cuya mortalidad en las parcelas se estima entre el 26 y 40%, estos agentes causales son: *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia* spp, *Sclerotium rolfsii*, *Verticillium dahliae* y *Pythium* spp, así como algunas especies del nematodo *Meloidogyne* spp, los cuales provocan diversas sintomatologías foliares no específicas que comprenden, entre otros, clorosis, defoliación y marchitez. Por otro lado, el cultivo también

sufre pérdidas provocadas por bacterias como lo es la mancha bacteriana, siendo su agente causal *Xanthomonas campestris*, la pudrición blanda provocada por *Erwinia carotovora*, entre otras (Vásquez *et al.*, 2009).

### **2.2.1 Marchitez del chile**

La marchitez del chile es causada por el género *Fusarium*, siendo la especie principal *Fusarium oxysporum*, es una de las enfermedades de mayor distribución en el mundo y más destructiva de muchos cultivos hortícolas (Bowers y Locke, 2000). El hongo del suelo antes mencionado causa marchitez vascular infectando las plantas a través de las raíces y creciendo internamente a través de la corteza hacia la estela. Los tejidos vasculares de la raíz, y luego del tallo, están colonizados por el crecimiento de hifas y el movimiento de conidios en la corriente de transpiración. Los síntomas iniciales aparecen como clorosis y distorsión de las hojas inferiores, a menudo en un lado de la planta (Sahi y Khalid, 2007). La clorosis foliar, la necrosis y el retraso en el crecimiento de las plantas se vuelven más pronunciados a medida que la enfermedad progresa. La marchitez ocurre en el lado afectado de la planta, seguido de decoloración vascular y necrosis del tallo. Toda la planta se marchita y muere a medida que el patógeno se mueve hacia el tallo. Los síntomas provocados por *F. oxysporum* dificultan su identificación a nivel de campo. Otros estudios han mostrado que hongos como *Fusarium oxysporum* var. *redolens* y *F. solani* pueden interactuar con *P. capsici* para producir la marchitez del chile (Koike *et al.*, 2006).

#### **2.2.1.1 *Fusarium oxysporum***

La especie *F. oxysporum* pertenece al Phylum Ascomycota, Clase Sordariomycetes, Orden Hipocreales y Familia Nectriaceae. Entre los hongos filamentosos, el género *Fusarium* es uno de los más importantes, fue descrito por primera vez por Link en 1809 (Leslie *et al.*, 2001; Michielse y Rep, 2009). El

deuteromiceto *F. oxysporum* produce tres tipos de esporas asexuales, los microconidios, que tienen de una a dos células y son las esporas que el hongo produce con una mayor frecuencia y abundancia en todas las condiciones, con más frecuencia en el interior de los vasos de las plantas hospedantes que ha infectado. Los macroconidios, son las esporas típicas de *Fusarium*, están constituidos de 3 a 5 células, se adelgazan gradualmente y se encorvan hacia ambos extremos, aparecen usualmente sobre la superficie de plantas que han sido destruidas por el patógeno y por lo común forman grupos similares a los esporodoquios. El último tipo de esporas son las clamidosporas, que están constituidas por una o dos células, son de pared gruesa y redondas que se forman terminal o intercaladamente en el micelio más viejo o en los macronidios del hongo. Los tres tipos de esporas se forman en los cultivos del hongo y quizá también en el suelo, aunque cabe decir que sólo las clamidosporas sobreviven en este último sustrato durante más tiempo (Agrios, 1995).

### **2.2.2 Pudrición blanda**

La pudrición blanda de los órganos carnosos de los vegetales es normalmente causada por el género bacteriano *Erwinia*, en particular por *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. carotovora* subsp. *atroptica* y *E. chrysanthemi*. En el fruto de chile es más común la podredumbre blanda de las raíces, también provocada por el mismo agente causal (Henz *et al.*, 2006). El primer síntoma que aparece en las plántulas de chile es una zona húmeda que comienza en la punta del cotiledón recién desarrollado y se extiende hacia el tallo, esta área más tarde desarrolla una podredumbre blanda que es de color marrón, lo que provoca el colapso de las plántulas. Los síntomas también aparecen como una coloración parduzca-negra de las venas de las primeras hojas, que luego se pudre. En el invernadero, la enfermedad se observa por primera vez como la marchitez de las plantas en el momento de la primera cosecha de la fruta o más tarde. La parte inferior del tallo en las plantas marchitas parece húmeda y sutil, y luego se vuelve negra y se desprende (Hadas *et al.*, 2001).

### 2.2.2.1 Género *Erwinia*

El género *Erwinia* pertenece al Phylum Proteobacteria, Clase Gammaproteobacteria, Orden Enterobacteriales y Familia Enterobacteriaceae, descrita por primera vez por Burrill en 1882 (Kerstens *et al.*, 2006). Son bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos, con flagelos peritricos, catalasa positiva, oxidasa negativa, fermentan glucosa, reducen el nitrato, producen  $\beta$ -galactosidasa y H<sub>2</sub>S, utilizan L-arabinosa, D-galactosa, glicerol, D-manosa, D-ribosa, y sacarosa, pero no la dextrina (Schaad *et al.*, 2001).

### 2.2.3 Mancha bacteriana

Es una enfermedad importante del chile (*Capsicum* spp), tanto en las regiones tropicales como en las más templadas y es causada por cepas fenotípicamente y genéticamente heterogéneas del género *Xanthomonas* (Bouzar *et al.*, 2004). Jones *et al.* (2004) sugieren que solo cuatro genoespecies de este género (*Xanthomonas euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans* y *X. vesicatoria*) pueden causar manchas bacterianas en el chile. Estas genoespecies difieren en el rango de hospedador, lo que lleva a la descripción al menos de nueve razas en el cultivo chile. Sin embargo, existen otras cepas de *Xanthomonas* que afectan a este cultivo como lo son las cepas de *X. campestris* pv. *Raphani*, principalmente patógenas para las especies de plantas crucíferas, que causan brotes de enfermedad de la mancha y la marchitez de las hojas (Hamza *et al.*, 2010).

#### 2.2.3.1 Género *Xanthomonas*

El género *Xanthomonas* pertenece al Phylum Proteobacteria, Clase Gammaproteobacteria, Orden Xanthomonadales y Familia Xanthomonadaceae, descrita por primera vez por Pammel en 1895. Son bacilos de 0.4-0.6 × 0.8-2.0  $\mu$ m, en su mayoría simples o en pares, Gram negativo, presenta un solo flagelo

polar, aerobio obligado, no reduce el nitrato. Las colonias suelen ser amarillas, lisas, mucoides o viscosas. Los pigmentos son aril polienos bromados altamente característicos o "xanthomonadinas". Un heteropolisacárido ácido extracelular característico llamado xantano es producido por la mayoría de las cepas dando la consistencia viscosa. El crecimiento es inhibido por 6% de NaCl, 30% de glucosa, 0.01% de acetato de plomo, verde de metilo o tionina, y por 0.1% (y usualmente por 0.02%) de cloruro de trifeniltetrazolio. Catalasa positiva; oxidasa negativa o débil; ureasa no producida, generalmente produce H<sub>2</sub>S, pero no el indol ni la acetoina. Pequeñas cantidades de ácido se producen a partir de muchos carbohidratos, pero no de l-ramnosa, adonitol, sorbosa, d-sorbitol, meso-inositol o meso-eritritol (Saddler y Bradbury, 2005).

#### **2.2.4 Cancro bacteriano**

El agente causal de esta enfermedad es la bacteria fitopatógena *Clavibacter michiganensis*, la cual ha causado serias pérdidas en las cosechas de tomate (*Lycopersicum esculentum*) y chile (*Casicum annuum*) en invernadero y en campo cultivados a cielo abierto, matando a las plantas jóvenes o reduciendo su producción comercial. El cancro bacteriano se ha dispersado en el mundo y la reducción en la producción se puede asociar a la pérdida directa de la planta, números reducido y de menor tamaño del fruto. La infección primaria es transmitida por semilla contaminada, posteriormente la bacteria penetra a los tejidos vasculares a través de heridas, estomas, tricomas e hidátides de la hoja (Borboa-Flores *et al.*, 2010).

##### **2.2.4.1 Género *Clavibacter***

El género *Clavibacter* pertenece al Phylum Actinobacteria, Clase Actinobacteriea, Orden Micrococcales y Familia Microbacteriaceae, descrita por primera vez por Smith en 1910. Bacilos pleomórficos que miden 0.4 - 0.75 x 0.8 - 2.5 µm, a menudo en formaciones angulares en forma de V, Gram positive, no

móvil y no forma esporas, aerobio obligado. La producción de ácido a partir de carbohidratos es lenta y débil; el ácido se produce aeróbicamente a partir de glucosa y glicerol. No produce ácido a partir de adonitol, esculina, meso-inositol, melecitosa,  $\beta$ -metil-D-glucósido, rafinosa, ramnosa o ribosa. Es catalasa positiva; oxidasa, lipasa, tirosinasa y ureasa negativa. Su temperatura óptima de crecimiento es de 20 a 29 °C; la temperatura máxima para el crecimiento es de 35 °C (Saddler y Kerr, 2011).

### 2.3 Control químico

El control químico de las plagas es la represión de sus poblaciones o la prevención de su desarrollo mediante el uso de sustancias químicas. Los compuestos químicos que se utilizan en la protección de los cultivos reciben el nombre genérico de pesticidas o plaguicidas. El éxito del control químico, en el combate de las plagas depende del buen criterio que se tenga para decidir: qué producto usar, en qué forma aplicarlo y en qué momento u oportunidad ejecutar el tratamiento. Entre los principales métodos de control de las enfermedades del cultivo de chile se encuentra el uso de fungicidas químicos, aunque en los últimos años ha generado diversas controversias debido a su toxicidad al hombre y daños ambientales. Adicionalmente, pueden generar resistencia en cepas del patógeno (Sandoval-Chávez *et al.*, 2011). A continuación, se enlistan algunos los productos químicos utilizados para el control de hongos y bacterias en el cultivo de chile, así como las recomendaciones dadas por los proveedores:

**Carbendazim (Prozycar 500 F®):** es un fungicida sistémico de acción rápida, con actividad preventiva y curativa sobre enfermedades producidas por hongos endoparásitos y ectoparásitos en forma de suspensión acuosa. También contiene fitohormonas. Resulta efectivo en el control de numerosas enfermedades fúngicas tales como antracnosis del frijol (*Glomerella lindemuthiana*), mancha ojo de rana (*Cercospora sojina*), mancha o peca de la

hoja del cacahuate (*Cercospora personata*), mancha café de las hojas del cacahuate (*Cercospora arachidicola*), mancha foliar de las ornamentales (*Phomopsis sp*), mancha foliar del crisantemo (*Ascochyta chrysanthemi*), mancha foliar de las ornamentales (*Septoria chrysanthemi*), mancha negra del rosal (*Diplocarpon rosae*), moho gris (*Botrytis cinerea*), cenicilla (*Sphaerotheca sp*), tizón de la vaina y tallo de la soya (*Diaporthe phaseolorum*), pudriciones radicales o pudrición de la base (*Rhizoctonia sp*), fusariosis o pudrición radical (*Fusarium sp*), pudrición de tallo y raíz (*Sclerotinia sp*), pudrición de raíz del tabaco (*Thielaviopsis*). Aplicación: 500-600 mL/ha en 300 litros de agua.

**Metalaxil+cloratonil (Ridomil Gold Bravo®):** es un fungicida sistémico y de contacto. El metalaxil actúa sobre el crecimiento subcuticular de las hifas de los hongos inhibiendo la síntesis de proteínas como consecuencia de la interferencia con la síntesis de ARN (ácido ribonucleico), en las células fungosas, mientras que el clorotalonil inhibe la respiración de las células del hongo. Dentro de las numerosas enfermedades fúngicas que controlan destacan las producidas por: antracnosis (*Colletotrichum sp.*), botritis del ajo y de la cebolla (*Botrytis aclada*), cenicilla polvorienta de las cucurbitáceas (*Golovinomyces cichoracearum*), cercospora del chile (*Cercospora capsici*), chahuixtle o roya del cacahuate (*Puccinia arachidis*), chahuixtle o roya del frijol (*Uromyces appendiculatus*), cordana (*Cordana musae*), escoba de bruja del cacao (*Crinipellis perniciosa*), fusariosis o pudrición radical (*Fusarium sp*), gomosis de los cítricos (*Phytophthora nicotianae*), mal de hilachas (*Corticium koleroga*), mancha de la hoja (*Cercospora sp.*), entre otras. Aplicación: 1.5 a 2.5 L/ha en 300 litros de agua.

**Azoxistrobina (Amistar®):** es un fungicida sistémico y de contacto, actúa inhibiendo el proceso respiratorio de los hongos, resultando especialmente eficaz para impedir la germinación de esporas y el desarrollo inicial del patógeno. Además, la azoxistrobina posee actividad translaminar, otorgando una mejor eficacia en cultivos densos. Su efecto de contacto y prolongada

residualidad, aseguran la protección de las hojas, retardando la senescencia y manteniéndolas verdes por más tiempo, favoreciendo así el llenado de granos. Aplicación: 200-500 g/ha.

**Tiabendazol (Tecto 60®):** es un fungicida sistémico de amplio espectro que puede ser utilizado para tratamientos preventivos y/o curativos. Puede aplicarse como aspersión foliar antes de la cosecha o en tratamientos post-cosecha. Se utiliza en contra de: antracnosis (*Colletotrichum* sp), moho gris (*Botrytis* spp), pudrición del fruto (*Gloeosporium* sp), moho azul (*Penicillium* sp), secadera de plántula (*Rhizoctonia solani*), pudrición basal del tallo (*Sclerotium rolfsii*), pudrición radicular (*Fusarium* sp), entre otras.

**Gentamicina (Final Bacter®):** es un aminoglucósido sistémico cuyo mecanismo de acción consiste en interferir en la síntesis de proteínas precursoras de enzimas bacterianas que degradan los tejidos vegetales, a través de tres maneras: interfieren con la iniciación de la formación del péptido, producen una lectura errónea del ARNm, desdoblan los polisomas en monosomas no funcionales. Este efecto es irreversible y letal para la célula bacteriana ya que se originan proteínas no funcionales y, en ocasiones, tóxicas. Se utiliza para el control de la mancha bacteriana (*Xanthonas vesicatoria*) en chile y tomate, pierna negra (*Erwinia atroseptica*), tizón de fuego (*Erwinia amylovora*), entre otras. Forma de aplicar 2.5 a 4 kg/ha en 700 litros de agua.

**Kasugamicina (Kasumin®):** es un fungicida y bactericida sistémico con actividad preventiva y curativa. Inhibe la incorporación de los aminoácidos en la síntesis de las proteínas de las células en bacterias y hongos, es absorbido por las hojas y raíces movilizándose en todas las partes de la planta, donde previene el desarrollo de hongos y bacterias y con ello impide el crecimiento de las lesiones. Presentado en forma de líquido soluble para en el control de las enfermedades: pudrición bacteriana blanda (*Erwinia carotovora*), quema o

añublo del arroz (*Magnaporthe grisea*), mancha bacteriana del tomate (*Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria*) y bacteriosis del clavel (*Burkholderia andropogonis*). Forma de aplicar: 1.5 a 2 L/ha.

**Eritromicina:** es un antibiótico macrólido bacteriostático producido por *Streptomyces erythreus*. La eritromicina A se considera su componente activo principal. En los organismos sensibles, inhibe la síntesis de proteínas mediante la unión a subunidades 50S ribosomales. Este proceso de unión que inhibe la actividad peptidil transferasa e interfiere con la traslocación de los aminoácidos durante la traducción y el montaje de las proteínas (Álvarez y García, 2002).

## 2.4 Metabolitos Secundarios

Las plantas desarrollan diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico, entre ellas está la síntesis de metabolitos secundarios (MS), que forman parte de la respuesta química contra el daño que ocasionan las heridas y el ataque de microorganismos patógenos (Sepúlveda *et al.*, 2003). Los principales constituyentes de los metabolitos secundarios son los terpenos de bajo y medio peso molecular como los monoterpenos, los sesquiterpenos y, en menor medida, los diterpenos. Los monoterpenos son las moléculas más abundantes, llegando a representar hasta el 90% de ellos (De Sousa, 2011). Para su extracción se pueden utilizar métodos tradicionales como son la hidrodestilación, la destilación de vapor, el prensado en frío, la extracción con solventes y los métodos simultáneos de destilación-extracción, así como varias técnicas más modernas que incluyen la extracción con fluido supercrítico, extracción con líquido a presión, extracción con agua caliente presurizada, extracción con disolvente con membrana, la micro-extracción en fase y extracción asistida por microondas o por ultrasonido (Reyes-Jurado *et al.*, 2015). La forma más tradicional de obtener el aceite esencial es la hidrodestilación, sin embargo, la más utilizada en los laboratorios e industrias es la extracción con solventes por soxhlet, Zhao y Zhang (2014) reportaron un mayor

rendimiento de la extracción por soxhlet comparada con la hidro-destilación y la extracción por fluido supercrítico con CO<sub>2</sub>.

#### 2.4.1 Eucalipto (*Eucalyptos globulus*)

Dentro de los MS toman importancia los obtenidos de *Eucalyptos globulus*, los cuales tienen una acción antibacterial contra bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas (Rueda y Mogollón, 2013); así como otro estudio determinó que el extracto de *E. globulus* no solo tiene actividad antifúngica sino que además inhibe la producción de las micotoxinas AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub> sintetizadas por el género *Aspergillus* (Cisarova *et al.*, 2012). El principal metabolito secundario del extracto de eucalipto es el 1,8 cineol (eucaliptol) que de acuerdo con Pattnaik *et al.* (1997) tiene una notable actividad biológica comprobada con 11 hongos y 18 bacterias en un rango de concentración 0.5 - 10 µL/mL y 0.16 - 20 µL/mL (microlitros del extracto por mililitros de diluyente) para cada tipo de microorganismo respectivamente, destacando a *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* que son de interés fitopatogénico.

Clasificación taxonómica.

**Clase** Magnoliopsida

**Subclase** Rosidae

**Orden** Myrtales

**Familia** Myrtaceae

**Género** *Eucalyptus*

**Especie** *globulus*

(Darriba y Silva-Pando, 2016)

#### 2.4.2 Altamisa (*Artemisia vulgaris*)

El género *Artemisia*, comprendido por pequeñas hierbas y arbustos, es uno de los géneros más grandes y más ampliamente distribuido de la familia de las

Compuestas. Los miembros de este género tienen un olor o sabor característico, de interés botánico, farmacéutico y utilizados en la industria de elaboración de licor (Kordali *et al.*, 2005a). El follaje aromático de *A. vulgaris* se cosecha a fines de la primavera y comienzos del verano, sus extractos se recomiendan a las mujeres para una amplia variedad de problemas ginecológicos y para una multitud de otros propósitos medicinales, incluso como agentes antibacterianos, antiinflamatorios, antisépticos, diaforéticos, emenagógicos o estimulantes (Barney y DiTommaso, 2003).

Clasificación taxonómica.

**Clase** Magnoliopsida

**Subclase** Asteridae

**Orden** Asterales

**Familia** Asteraceae

**Género** *Artemisia*

**Especie** *vulgaris*

(Davidse *et al.* 2012)

### 2.4.3 Yerbanis (*Tagetes lucida*)

La planta *Tagetes lucida* conocida como “yerbanis” ampliamente distribuida en la Sierra Madre Oriental, es utilizada en nuestro país como alimento y planta medicinal (Bye, 1986), su extracto metanólico ha demostrado actividad antibacterial contra 16 microorganismos entre los cuales se encuentran *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*; y una acción antifúngica evaluada con los hongos *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, *Fusarium moniliforme*, *Sporotricum Fusarium*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Rhizoctonia solani*, este último alcanzando un 100% de inhibición *in vitro* (Céspedes *et al.*, 2006).

Clasificación taxonómica.

**Clase** Magnoliopsida

**Subclase** Asteridae

**Orden** Asterales

**Familia** Asteraceae

**Género** *Tagetes*

**Especie** *lucida*

(Villarreal, 2003)

#### 2.4.4 Cenizo (*Hyptis emoryi*)

La planta *Hyptis emoryi*, conocida en el norte del país como “cenizo”, es un arbusto erecto con numerosas ramas delgadas esbeltas, generalmente de tres a ocho ramas principales que crecen ligeramente hacia afuera de la base, y un diámetro medio aproximadamente igual a la altura de las plantas maduras (Smith y Nobel, 1977). El género *Hyptis* incluye más de 775 especies, la mayoría en el continente americano, esta planta se utiliza tradicionalmente como remedio medicinal para diversas enfermedades por sus propiedades antitumorígenas y antimicrobianas (McNeil *et al.*, 2011). *Hyptis emoryi* se encuentra principalmente en el norte de México y sur de EE UU, sus metabolitos secundarios más abundantes son: borneol (11.9%),  $\alpha$ -thujene (7.0%) y el 1,8 cineol (6.9%) (Tanowitz *et al.* 1984).

Clasificación taxonómica.

**Clase** Magnoliopsida

**Subclase** Asteridae

**Orden** Lamiales

**Familia** Lamiaceae

**Género** *Hyptis*

**Especie** *emoryi*

(Pastore *et al.* 2011)

## 2.5 Mecanismos de acción de los extractos vegetales

Los mecanismos de acción de los extractos vegetales no están totalmente resueltos, aunque es probable que impliquen en la mayoría de los casos, disrupciones en las membranas por compuestos lipofílicos. De acuerdo con esto, Mendoza *et al.* (1997) describieron que una disminución de la hidrofobicidad de ciertos diterpenos por la adición de grupos metilo hace disminuir drásticamente su actividad antimicrobiana. Precisamente, una importante característica de los metabolitos secundarios es su hidrofobicidad. Los MS tienen la capacidad de hacer más permeables las membranas lipídicas citoplasmáticas, las membranas de las paredes de las bacterias Gram negativas y en organismos eucariotas, las membranas de las mitocondrias (Burt, 2004). Los metabolitos secundarios también podrían actuar sobre las proteínas embebidas en las membranas celulares interaccionando con las partes hidrofóbicas de las mismas, lo que podría incluso afectar a enzimas como la ATPasa de membrana (Usano-Aleman *et al.*, 2014). La efectividad de algunos extractos contra agentes infecciosos de las plantas ha sido constatada por (Soylu *et al.*, 2006), indicando que su acumulación en los tricomas glandulares puede tener efectos de profilaxis y protección frente a bacterias y hongos oportunistas infecciosos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en el estado de Zacatecas y en el Laboratorio de Toxicología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

#### 3.1 Obtención de los extractos vegetales

La recolección del material vegetal fue realizada en los alrededores de las ciudades de Saltillo y Arteaga, para ello se tomaron hojas de eucalipto, altamisa, cenizo y yerbanis que no tuvieran signos de estar enfermas por agentes microbianos o factores abióticos. Las hojas fueron puestas en papel periódico y se dejaron secar por 72 horas a temperatura ambiente y resguardadas del sol. Transcurrido el tiempo se desinfectaron las hojas, para ello se sumergieron en hipoclorito de sodio al 1% por 3 minutos, se enjuagaron por triplicado con agua destilada estéril y se dejaron secar por 2 horas sobre papel absorbente estéril. Posterior a esto, las hojas fueron trituradas en un molino casero y finalmente se sometieron a una extracción con solventes por soxhlet de acuerdo con la metodología propuesta por Reyes-Jurado *et al.* (2015).

Para realizar la extracción por soxhlet (Figura 1) se pesaron 10 gramos del material vegetal pulverizado, fue colocado en un “saco” hecho con papel filtro doblado e introducido en el sifón del equipo. Enseguida se vertieron 130 mL de etanol al 70% en el matraz de fondo plano del equipo y se procedió a armar el mismo. Para montar el equipo se ajustó el refrigerante sobre el sifón y este sobre el matraz de fondo plano, luego se colocó encima de una parrilla de calentamiento, se fijó con pinzas de tres dedos a un soporte universal, se conectaron las mangueras de entrada y salida de agua al refrigerante, se llenó la tarja con agua que se enfrió con bolsas de gel refrigerante y se colocó la bomba de circulación de agua en la tarja. Una vez armado el equipo se

encendió la parrilla de calentamiento a 90°C y se prendió la bomba de circulación de agua. Ya que se inició la evaporación y condensación del solvente se cronometraron cuatro horas, completando un mínimo de cuatro ciclos, transcurrido el tiempo se apagó todo y se guardó el producto en un frasco ámbar para la posterior recuperación del solvente. Finalmente se recuperó el solvente en un rotavapor a 15 libras de presión y con una temperatura de 43°C y se midió el volumen final. El extracto fue conservado en un frasco ámbar a 4°C hasta su uso.



Figura 1. Extracción por soxhlet y concentración en el rotavapor.

### 3.1.1 Gravimetría

La determinación de la concentración de los extractos se realizó mediante gravimetría (Banse *et al.* 1963), observar figura 2. Se prepararon 5 controles de cloruro de sodio en etanol al 70% en las concentraciones 0.001 g/mL, 0.01 g/mL, 0.1 g/mL, 0.5 g/mL y 1 g/mL. Se tararon varios crisoles a peso constante en una estufa a 200°C, es decir, se colocaron por 1 hora en la estufa y se enfriaron en un desecador por 30 minutos para posteriormente ser pesados, este procedimiento se repitió hasta que el peso de los crisoles se mantuvo sin variaciones y se registró el peso final. Después se les añadió un mililitro de los controles, se pusieron durante 1 hora en la estufa, se enfriaron 30 minutos en el desecador y se pesaron. Se confirmó que la diferencia de peso fuera

equivalente a la concentración del control correspondiente. Una vez verificado el método se agregó 1 mililitro de cada uno de los extractos y se repitió el procedimiento para determinar la cantidad de materia contenida en ellos, aumentando el tiempo de secado a 4 horas.



Figura 2. Proceso de gravimetría.

### 3.2 Obtención de las cepas

Se recolectó el material vegetal (Figura 3) en los municipios de Fresnillo y Ojo Caliente, Zacatecas. Los cultivos muestreados fueron chile pasilla y chile poblano. Dichos cultivos presentaban sintomatología de marchitamiento, entristecimiento, principios de ahorcamiento de raíz y fruto necrosado. De cada planta se recolectó raíz, tallo, hoja y fruto si lo había, separando cada tipo de muestra en una bolsa independiente para evitar la contaminación cruzada y fueron transportadas en una hielera con bolsas de gel congelado al laboratorio de toxicología de la UAAAN. Cada una de las muestras se etiquetaron como M1, M2, ..., M9 y M10, fueron procesadas para la identificación de los fitopatógenos con el procedimiento estandarizado del laboratorio, el cual se describe a continuación.



Figura 3. Muestreo en Zacatecas.

Las muestras fueron lavadas con agua corriente para retirar los residuos de tierra. A cada una se les realizaron varios cortes de aproximadamente  $1 \text{ cm}^2$  que tuviera una parte infectada y una parte sana (Figura 4). Posteriormente se desinfectaron los cortes sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) al 3% durante un minuto, se enjuagaron por triplicado con agua destilada estéril y se pusieron a secar en papel secante (sanitas) durante 20 minutos. Entre cada muestra se cambió la solución de hipoclorito de sodio y el agua destilada. Los cortes desinfectados se sembraron en medio PDA (preparado de acuerdo con las especificaciones del proveedor) sin acidificar y se incubaron por 24-72 horas a  $28^\circ\text{C}$ , transcurrido el tiempo se verificaron las siembras para observar si hubo o no crecimiento y se realizaron las resiembras pertinentes.



Figura 4. Algunos cortes de las muestras.

De los aislados, los hongos fueron identificados morfológicamente con las claves de Barnett y Hunter (1998) e identificados molecularmente, y las bacterias identificadas por pruebas bioquímicas del manual para la identificación de procariontes fitopatógenos de Schaad *et al.* (2001).

### 3.2.1 Identificación del hongo

La extracción de ADN se realizó por el método de Doyle y Doyle (1990) modificado el cual consistió en macerar 50 mg del micelio del hongo purificado en 500  $\mu$ L del buffer de extracción (Tris-HCl pH 8.0 a 100 mM; EDTA pH 8.5 a 50 mM y SDS al 2%), se agitó 30 segundos en vórtex y se colocó en hielo por 15 minutos; se le agregaron 500  $\mu$ L de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, se mezcló por agitación en vórtex y se centrifugó 15 minutos a 12,000 rpm; se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf y se agregó isopropanol frío en relación 1:1; se dejó reposar por 15 minutos a  $-4^{\circ}\text{C}$  y posterior a eso se centrifugó 10 minutos a 12,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 20  $\mu$ L de agua desionizada estéril, se le agregaron 50  $\mu$ L RNAasa y se incubó por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ ; el producto de la extracción se visualizará por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

El ADN se amplificó por PCR de punto final en un termociclador de la marca Select BioProducts, ampliando las regiones internas transcritas ITS1 e ITS4 entre los genes ribosomales (ADNr) 18S-5.8S Y 5.8S-28S utilizando los iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). El coctel de reacción se preparó: 7  $\mu$ L Taq & Go master mix, 0.5  $\mu$ L de iniciador foreward (10mM), 0.5  $\mu$ L de iniciador reverse (10mM), 6  $\mu$ L de agua y 1  $\mu$ L de muestra para dar un volumen total de 15  $\mu$ L. El programa del termociclador se describe en la tabla 1.

Tabla 1. Programa para amplificación ADN de hongos.

Etapa		Temperatura y tiempo
Desnaturalización inicial		94°C por 5 minutos
Ciclos repetitivos (30 ciclos)	Desnaturalización	94°C por 10 segundos
	Hibridación	56°C por 30 segundos
	Extensión	72°C por 2 minutos
Extensión final		72°C por 5 minutos

Los productos fueron visualizados en un gel de agarosa al 2%, se mandaron secuenciar y se correlacionaron en la base de datos del NCBI.

### 3.2.2 Identificación de las bacterias: Pruebas bioquímicas

Se realizaron las pruebas bioquímicas del manual de Schaad *et al.* (2001) para la identificación de fitopatógenos. Estas fueron: tinción de Gram, tinción de flagelos, tinción de esporas, catalasa, oxidasa, ureasa, crecimiento en condiciones aerobias y en condiciones anaerobias, crecimiento en medio YDC, crecimiento en medio KB y crecimiento a temperatura de 40°C.

### 3.3 Bioensayos en microplaca: Extractos vegetales

Los bioensayos fueron realizados con la metodología de microdilución en placa modificada de las técnicas propuestas por Gabrielson *et al.* (2002) y Masoko *et al.* (2005). Se realizó una ventana biológica previa para determinar el rango de acción de los extractos, en donde el rango de concentraciones fue de 2000 a 7.81 ppm. Donde se determinó que la concentración más alta debía ser 500 ppm, y la más baja de 19.51 ppm (Figura 6). Para todas las placas se colocaron tres controles: uno negativo (columna 1) y dos positivos (columnas 2 y 3), y nueve tratamientos. La distribución se ilustra en la Figura 5. El procedimiento fue el siguiente:

1. Se colocaron 100 µL de agar nutritivo con cloruro de trifeniltetrazolio (CTT) al 0.01% en cada uno de los 96 pozos.

2. En la columna 3 se añadieron 100  $\mu\text{L}$  del solvente, se mezclaron y se eliminó el sobrante para no modificar el volumen inicial. El solvente fue agua destilada estéril.
3. A la columna 4 se le agregaron 200  $\mu\text{L}$  del extracto en una concentración de 750 ppm, se mezcló y se retiraron 200  $\mu\text{L}$  para mezclarse con la siguiente columna, así sucesivamente se realizaron las diluciones seriadas hasta la columna 12. La relación de dilución fue 2:3.
4. Se añadieron 10  $\mu\text{L}$  del patógeno correspondiente en una concentración  $1 \times 10^7$  células o esporas/mL a todos los pozos excepto a los de la columna 1 que se les agregó 10  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril.
5. Se tomó una lectura de absorbancias.
6. Se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  por 48 horas, y trascurrido el tiempo se tomó lectura de las absorbancias a 490 nm.

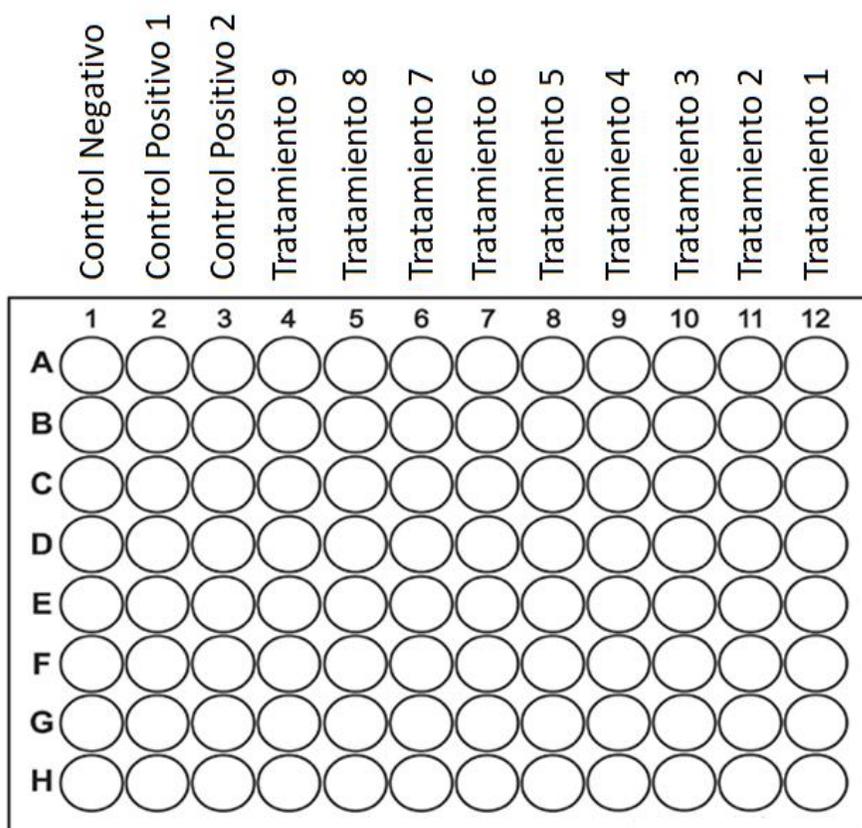


Figura 5. Esquema de la distribución general en la microplaca.

Cada fila fue una repetición y se realizaron tres placas en total. Las lecturas de la absorbancia a 490 nm se realizaron en un espectrofotómetro Biotek modelo Elx800®. Se consideraron positivos los pozos que presentaron una coloración rosa-violeta y como negativos los que no presentaron variación de color, además de los valores de las absorbancias.

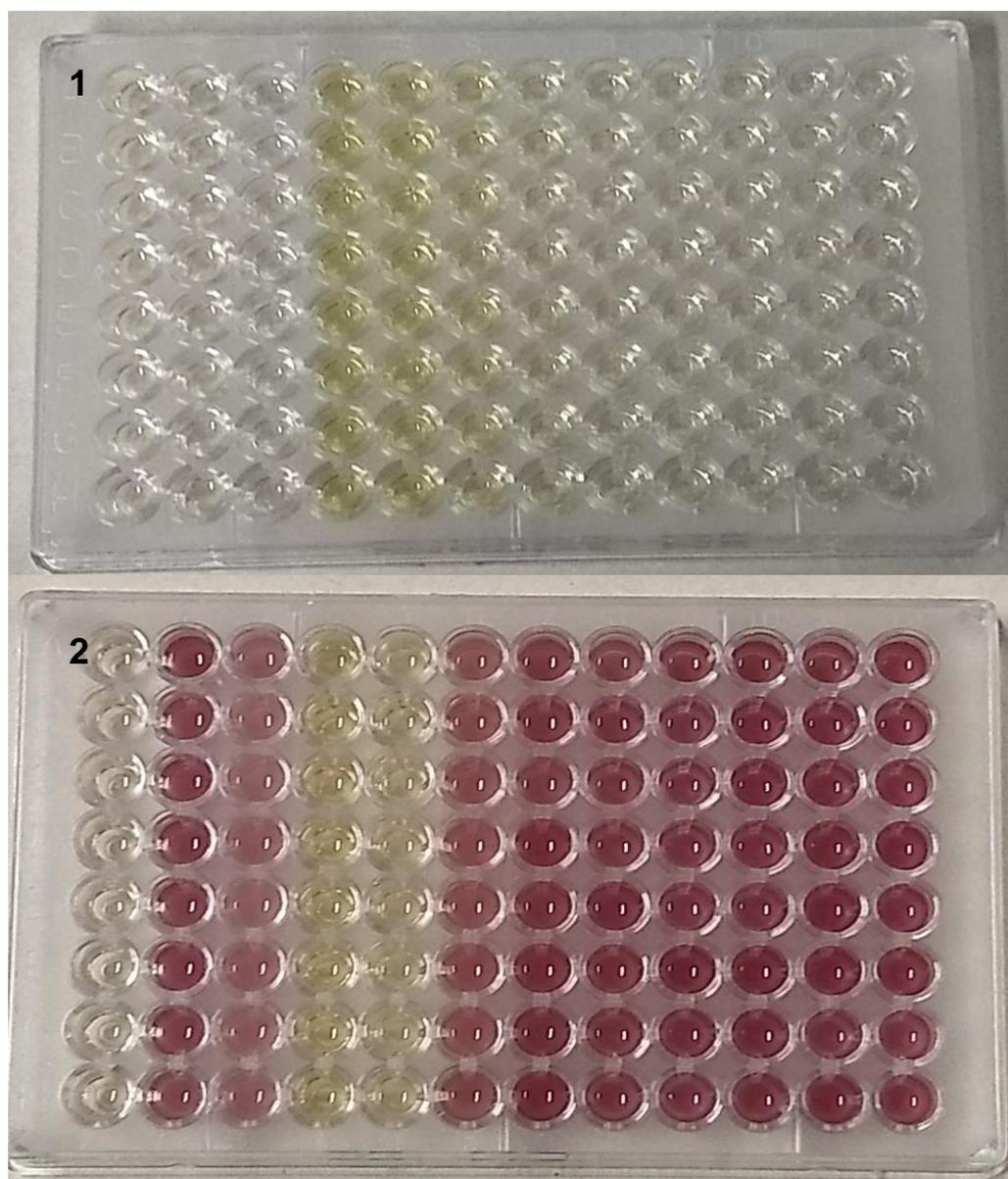


Figura 6. Bioensayo con extractos. 1) Placa al tiempo 0; 2) Placa a las 48 horas de incubación.

### 3.4 Bioensayos en microplaca: Productos Químicos

Todos los ingredientes activos fueron donados por el Laboratorio de Toxicología del Departamento de Parasitología de esta Universidad. Para los productos químicos se tomaron en cuenta las instrucciones de los proveedores partiendo con la concentración más alta (Tratamiento 9), las concentraciones de todos los tratamientos se especifican en las tablas 2 y 3. Igual que en los extractos, en la placa se colocaron 2 controles positivos y uno negativo.

1. Se colocaron 150  $\mu$ L de agar nutritivo con cloruro de trifeniltetrazolio (CTT) al 0.01% en cada uno de los 96 pozos.
2. En la columna 3 se añadieron 150  $\mu$ L del solvente, se mezclaron y se eliminó el sobrante para no modificar el volumen. El solvente fue agua destilada.
3. A la columna 4 se le agregaron 150  $\mu$ L de la solución concentrada 2X de cada producto químico, se mezcló y se retiró el exceso para ser mezclado con la siguiente columna, y así sucesivamente se realizaron las diluciones seriadas hasta la columna 12. La relación de dilución fue 1:2.
4. Se añadieron 10  $\mu$ L del patógeno correspondiente en una concentración  $1 \times 10^7$  células o esporas/mL a todos los pozos excepto a los de la primera columna que se les agregaron 10  $\mu$ L de agua destilada estéril.
5. Se tomó una lectura de las absorbancias.
6. Se incubaron a 28°C por 48 horas, y trascurrido el tiempo se tomaron las absorbancias a 490 nm.

Cada fila fue una repetición y se realizaron tres placas en total. Las lecturas de la absorbancia a 490 nm se realizaron en un espectrofotómetro Biotek modelo Elx800®. Se consideraron positivos los pozos que presentaron una coloración rosa-violeta y como negativos los que no presentaron variación de color, además de los valores de las absorbancias.

Tabla 2. Concentraciones de los principios activos en cada tratamiento para los géneros bacterianos.

<b>Bioensayos con productos químicos</b>			
<b>Tratamiento</b>	Eritrotromicina	Gentamicina	Kasugamicina
<b>1</b>	3.91	1.95	0.45
<b>2</b>	7.81	3.91	0.90
<b>3</b>	15.63	7.81	1.80
<b>4</b>	31.25	15.63	3.59
<b>5</b>	62.50	31.25	7.19
<b>6</b>	125	62.50	14.38
<b>7</b>	250	125	28.75
<b>8</b>	500	250	57.50
<b>9</b>	1000	500	115

Tabla 3. Concentraciones de los principios activos en cada tratamiento para *Fusarium oxysporum*.

<b>Bioensayos con productos químicos</b>				
<b>Tratamiento</b>	Metalaxil+Clorotalonil	Carbendazim	Tiabendazol	Azoxistrobina
<b>1</b>	156.25	39.06	23.44	7.81
<b>2</b>	312.50	78.13	46.88	15.63
<b>3</b>	625	156.25	93.75	31.25
<b>4</b>	1,250	312.50	187.50	62.50
<b>5</b>	2,500	625	375	125
<b>6</b>	5,000	1,250	750	250
<b>7</b>	10,000	2,500	1,500	500
<b>8</b>	20,000	5,000	3,000	1,000
<b>9</b>	40,000	10,000	6,000	2,000

La figura 7 muestra dos fotografías de un bioensayo con producto químico, en ese caso es el fungicida carbendazim, antes y después de la incubación. Se alcanza a apreciar la coloración de los controles negativo, positivo 1 y positivo 2.

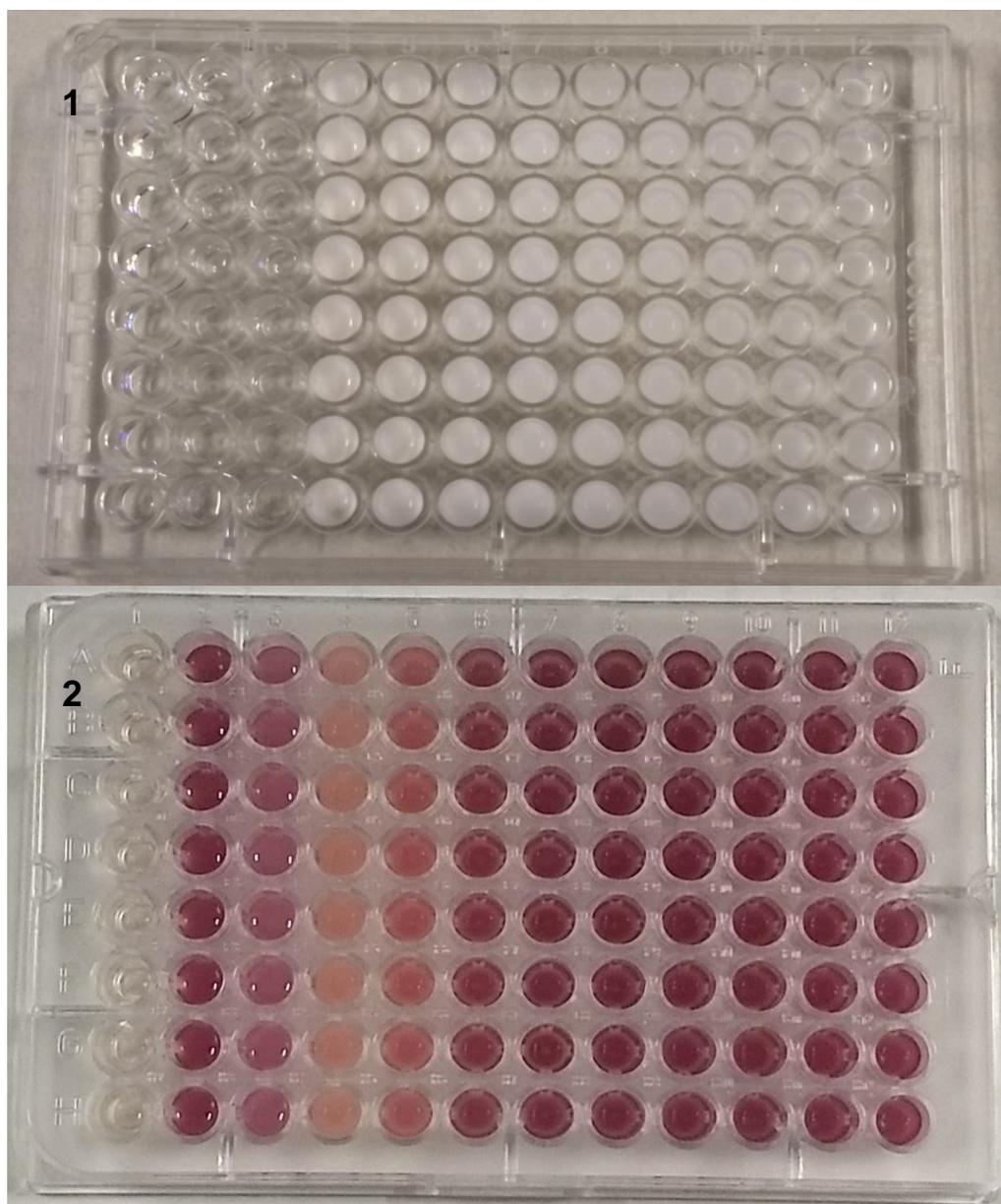


Figura 7. Bioensayo productos químicos (Carbendazim). 1) Placa al tiempo 0;  
2) Placa a las 48 horas de incubación.

### 3.5 Bioensayos en microplaca: Mezclas

Para las mezclas de productos químicos y los extractos, se usó la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) más baja para cada patógeno, es decir, para *Xanthomonas* sp el extracto de eucalipto con 33.33 ppm, para *Clavibacter* sp fue el extracto de altamisa con 33.55 ppm, para *Erwinia* sp y *Fusarium*

*oxysporum* fue el extracto de cenizo con 198.41 y 44.26 ppm respectivamente. Las concentraciones de los principios activos de los tratamientos se especifican en las tablas 4 y 5. Cada placa tuvo 2 controles positivos (columnas 2 y 3) y un control negativo (columna 1).

1. Se colocaron 150  $\mu$ L de agar nutritivo con cloruro de trifeniltetrazolio (CTT) al 0.01% en cada uno de los 96 pozos.
2. En la columna 3 se añadieron 150  $\mu$ L del producto químico concentrado 2X, se mezclaron y se eliminó el sobrante para no modificar el volumen. El solvente fue agua destilada.
3. A la columna 4 se le agregaron 150  $\mu$ L de la solución concentrada 4X de cada producto químico, se mezcló y se retiró el exceso para ser mezclado con la siguiente columna, y así sucesivamente se realizaron las diluciones seriadas hasta la columna 12. El factor de dilución fue 1:2.
4. Se añadieron 150  $\mu$ L de la solución concentrada 2X del extracto correspondiente, se mezcló y se eliminó el resto. Esto se hizo para todos los pozos de la columna 4 a la 12. El factor de dilución fue 1:2.
5. Se añadieron 10  $\mu$ L del patógeno correspondiente en una concentración  $1 \times 10^7$  células o esporas/mL a todos los pozos excepto a los de la primera columna que se les agregaron 10  $\mu$ L de agua destilada estéril.
6. Se tomó una lectura de absorbancias.
7. Se incubaron a 28°C por 48 horas, y trascurrido el tiempo se tomaron las absorbancias a 490 nm.

Cada fila fue una repetición y se realizaron tres placas en total. Las lecturas de la absorbancia a 490 nm se realizaron en un espectrofotómetro Biotek modelo Elx800®. Se consideraron positivos los pozos que presentaron una coloración rosa-violeta y como negativos los que no presentaron variación de color, además de los valores de las absorbancias.

Tabla 4. Concentraciones de los principios activos en cada tratamiento para los géneros bacterianos.

<b>Bioensayos con mezclas</b>						
	<i>Xanthomonas sp, Clavibacter sp</i>			<i>Erwinia sp</i>		
<b>Tratamiento</b>	Eritro	Genta	Kasu	Eritro	Genta	Kasu
<b>1</b>	1.95	1.95	0.45	0.49	0.49	0.45
<b>2</b>	3.91	3.91	0.90	0.98	0.98	0.90
<b>3</b>	7.81	7.81	1.80	1.95	1.95	1.80
<b>4</b>	15.63	15.63	3.59	3.91	3.91	3.59
<b>5</b>	31.25	31.25	7.19	7.81	7.81	7.19
<b>6</b>	62.50	62.50	14.38	15.63	15.63	14.38
<b>7</b>	125	125	28.75	31.25	31.25	28.75
<b>8</b>	250	250	57.50	62.50	62.50	57.50
<b>9</b>	500	500	115	125	125	115

Eritro: eritromicina; Genta: gentamicina; Kasu: kasugamicina.

Tabla 5. Concentraciones de los principios activos en cada tratamiento para *Fusarium oxysporum*.

<b>Bioensayos con productos químicos</b>				
<b>Tratamiento</b>	Metalaxil+Clorotalonil	Carbendazim	Tiabendazol	Azoxistrobina
<b>1</b>	9.77	9.77	9.77	0.98
<b>2</b>	19.53	19.53	19.53	1.95
<b>3</b>	39.06	39.06	39.06	3.91
<b>4</b>	78.13	78.13	78.13	7.81
<b>5</b>	156.25	156.25	156.25	15.63
<b>6</b>	312.50	312.50	312.50	31.25
<b>7</b>	625	625	625	62.50
<b>8</b>	1,250	1,250	1,250	125
<b>9</b>	2500	2500	2500	250

Para el caso específico de *Erwinia sp* con antibiótico eritromicina, se tuvo que bajar las dosis debido a que no se desarrollaba crecimiento alguno en los tratamientos (Figura 8).

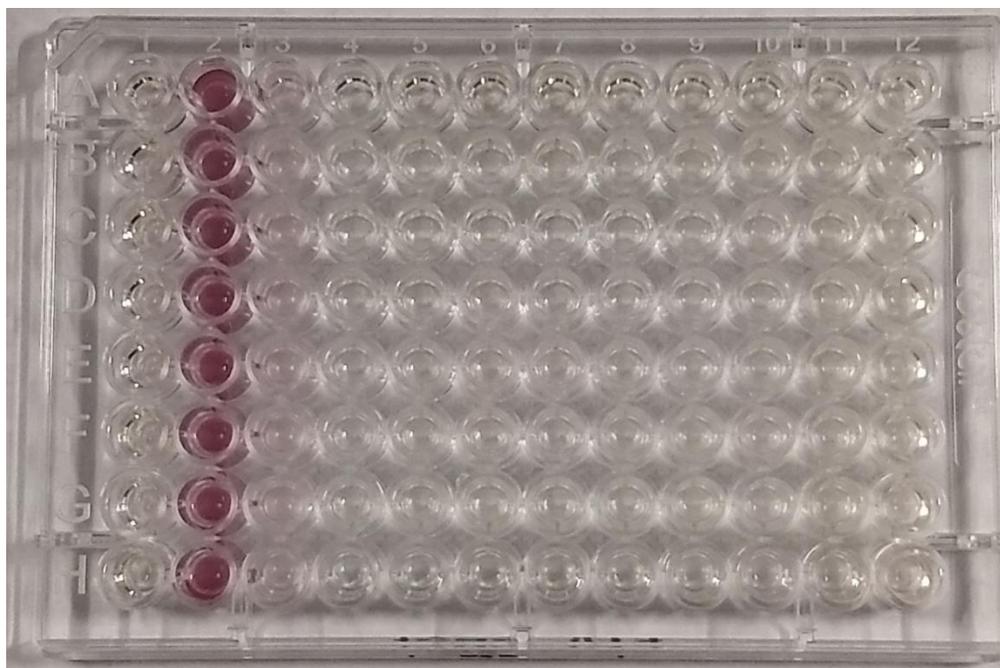


Figura 8. Placa de *Erwinia* sp sin crecimiento en los tratamientos.

### 3.6 Calculo del porcentaje de inhibición

Para calcular el porcentaje de inhibición se les resto el valor de la absorbancia obtenida de la primera lectura, denominada tiempo cero. Así se garantizó que el cambio de absorbancia fuera sólo por el incremento de población o debido la coloración generada por los procesos respiratorios de los patógenos. Posterior a eso se utilizó la fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Control positivo} - \text{Tratamiento}}{\text{Control positivo}} (100)$$

En donde,

Control positivo: absorbancia del control positivo

Tratamiento: absorbancia de una repetición

En los bioensayos de los extractos y los principios activos de los antibióticos se utilizó para los cálculos el control positivo 1, y para los cálculos en los

bioensayos con fungicidas y los bioensayos de las mezclas se utilizó el control positivo 2, el cual tuvo una mayor absorbancia.

### 3.7 Análisis estadístico

Los datos de porcentaje de inhibición fueron sometidos a una comparación de medias y a un análisis Probit. La comparación de medias se realizó el sistema estadístico Minitab versión 11 mediante un análisis de varianza con prueba de Tukey ( $p=0.05$ ); la determinación las concentraciones inhibitorias medias ( $CI_{50}$ ) se llevó a cabo con el programa estadístico SAS System versión 9.2 por regresión Probit. También se calculó el índice Co-Toxicidad utilizando fórmula de Sun y Johnson (1960):

$$ICT = \frac{CI_{50} \text{ de } A}{CI_{50} \text{ de } B} (100)$$

En donde,

$CI_{50}$  de A: Concentración inhibitoria media uno de los compuestos

$CI_{50}$  de B: Concentración inhibitoria media de la mezcla

ICT: Índice de Co-Toxicidad

Si el ICT es aproximado a 100 los compuestos tienen acción independiente, si el ICT es superior a 100 tienen una acción sinergista y si el ICT es menor a 100 la acción de los compuestos es antagonista.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Extractos

Se obtuvieron los cuatro extractos, el que tuvo mayor concentración fue el extracto de eucalipto mientras que el extracto de cenizo fue el de menor concentración. Esto se puede apreciar en la siguiente tabla.

Tabla 6. Concentración de cada uno de los extractos vegetales.

Extracto	Volumen	Concentración
Eucalipto	7.5 mL	185,200 ppm
Altamisa	7.0 mL	85,800 ppm
Cenizo	7.5 mL	151,000 ppm
Yerbanis	7.3 mL	155,800 ppm

### 4.2 Obtención de cepas

De los aislados se obtuvo el hongo *Fusarium oxysporum* el cuales fue identificado morfológicamente con las claves de Barnett y Hunter (1998), e identificado molecularmente; y tres bacterias *Erwinia* sp, *Clavibacter* sp y *Xanthomonas* sp identificadas por pruebas bioquímicas de manual de Schaad *et al.* (2001).

#### 4.2.1 Identificación del hongo

En la Figura 6 se muestran los dos geles de agarosa, el primero corresponde a la extracción de ADN y el segundo a la amplificación de gen ITS por PCR, como se logra apreciar se extrajo y amplificó correctamente el ADN del hongo aislado. La secuenciación tuvo un 100% de correlación con el gen [KX929698.1](#) de *F. oxysporum* en la base de datos del NCBI.

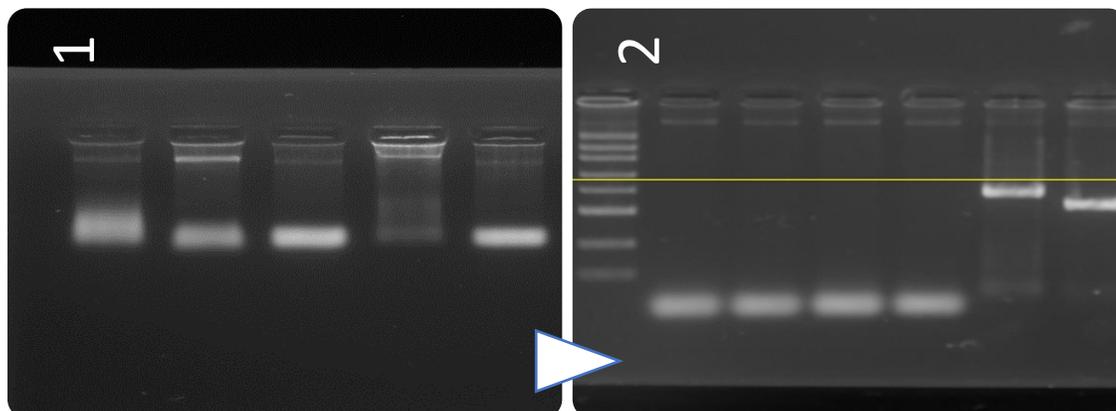


Figura 9. Geles de agarosa. 1) Gel de verificación de la extracción de ADN; 2) Gel de verificación de producto de PCR (600 pb línea amarilla)

#### 4.2.2 Identificación de las bacterias: Pruebas bioquímicas

De acuerdo con los resultados obtenidos, los tres aislamientos bacterianos corresponden a los géneros *Erwinia* sp, *Xanthomonas* sp y *Clavibacter* sp. Estos se muestran en la tabla 7 junto con los resultados reportados en el manual de Schaad *et al.* (2001). Las colonias de la M1 eran colonias blancas en el medio YDC y no presentaban fluorescencia; las colonias de la muestra M2 y M3 tenían una coloración amarilla en el medio YDC y ninguna presentó fluorescencia en medio KB. Tanto la colonia M1 como M2 fueron bacilos Gram negativo y la M3 fueron bacilos Gram positivos, en esta última se observaron algunos en forma de V.

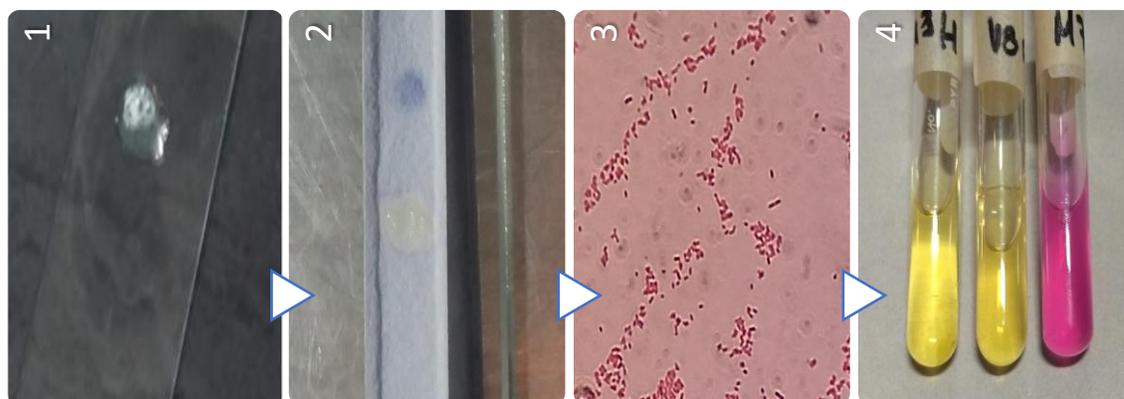


Figura 10. Pruebas bioquímicas. 1) Prueba de catalasa; 2) Prueba de oxidasa; 3) Tinción de Gram 100x; 4) Prueba de ureasa.

Tabla 7. Características usadas para diferencias géneros de patógenos procariontes de plantas que crecen en medios comunes (Schaad *et al.* 2001).

Características	<i>Erwinia</i>		<i>Xanthomonas</i>		<i>Clavibacter</i>	
	Sc	M1	Sc	M2	Sc	M3
Tinción de Gram	–	–	–	–	+	+
Crecimiento anaerobio	+	+	–	–	–	–
Crecimiento aerobio	+	+	+	+	+	+
Colonias amarillas en medio YDC	–	–	+	+	+	+
Colonias mucoides en YDC a 30°C	–	–	+	+	+	+
Pigmento fluorescente en KB	–	–	–	–	–	–
Ureasa	– <sup>a</sup>	+	–	–	–	–
Oxidasa	–	–	–	–	–	–
Crecimiento a 40°C	–	–	–	–	–	–
Más de 4 flagelos peritricos	+	+	–	–	–	–
Formación de esporas	–	–	–	–	–	–
Micelio aéreo	–	–	–	–	–	–

Sc: Resultado reportado en el manual de Schaad; M1/M2/M3: resultados obtenidos en las muestras; –, 80% o más de cepas negativas; +: 80% o más de cepas positivas después de 5 días; <sup>a</sup> algunas especies son positivas.

### 4.3 Bioensayos

#### 4.3.1 Bioensayos extractos

Como se aprecia en las tablas 8 y 9, todos los extractos tienen actividad biológica sobre los microorganismos evaluados, siendo el de mayor actividad para *Xanthomonas* sp el extracto de eucalipto (*E. globulus*) con una  $Cl_{50}$  de 33.33 ppm, para *Clavibacter* sp el extracto de altamisa (*A. vulgaris*) con una  $Cl_{50}$  de 33.55 ppm y el de cenizo (*H. emoryi*) con una  $Cl_{50}$  de 198.41 ppm para *Erwinia* sp y de 44.26 ppm para *Fusarium oxysporum*. Almeida Pinheiro *et al.* (2015) reportan que los extractos metanólicos de algunas especies de plantas pertenecientes al género *Hyptis* tienen efectos bacteriostáticos sobre los patógenos de humanos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* en un rango de 15 a 70 ppm dependiendo de la especie de donde se obtuvo el extracto, lo anterior concuerda con los datos generados con

excepción de la cepa de *Erwinia* sp que necesitó una concentración mayor para tener una inhibición del 50%, de igual modo el resultado para *F. oxysporum* se asemeja a lo obtenido en el mismo estudio para el deuteromyceto *Candida albicans* con una  $CI_{50}$  de 50 ppm.

Tabla 8. Comparación de medias de los porcentajes de inhibición.

Tratamiento	Eucalipto		Altamisa		Cenizo		Yerbanis	
<b><i>Xanthomonas</i> sp</b>								
<b>Control (+)</b>	0.00	A	0.00	A	0.00	A	0.00	A
<b>1</b>	18.18	B	6.13	A	15.37	B	26.76	B
<b>2</b>	40.98	C	12.72	AB	14.25	BA	26.97	B
<b>3</b>	66.26	D	12.82	AB	16.78	C	31.64	BC
<b>4</b>	92.38	E	36.20	ABC	13.13	BA	33.63	BC
<b>5</b>	98.36	E	48.90	C	15.56	B	43.80	C
<b>6</b>	97.90	E	62.20	C	30.74	C	73.23	D
<b>7</b>	95.12	E	100	D	54.88	D	98.70	E
<b>8</b>	97.51	E	100	D	99.03	E	96.61	E
<b>9</b>	99.78	E	100	D	99.36	E	90.63	E
<b><i>Clavibacter</i> sp</b>								
<b>Control (+)</b>	0.00	A	0.00	A	0.00	A	0.00	A
<b>1</b>	5.57	AB	43.86	B	29.18	B	3.10	A
<b>2</b>	12.13	AB	47.80	BC	30.70	B	13.85	A
<b>3</b>	15.59	AB	47.86	BC	31.10	B	15.65	A
<b>4</b>	17.71	B	61.82	BC	28.52	B	40.18	B
<b>5</b>	46.74	C	69.41	C	43.58	BC	56.04	BC
<b>6</b>	58.37	C	71.42	D	50.35	BC	67.28	C
<b>7</b>	87.50	D	100	E	59.81	C	96.50	D
<b>8</b>	94.33	D	100	E	98.73	D	96.57	D
<b>9</b>	99.72	D	100	E	100	D	97.46	D
<b><i>Erwinia</i> sp</b>								
<b>Control (+)</b>	0.00	A	0.00	A	0.00	A	0.00	A
<b>1</b>	7.01	B	0.38	A	0.66	A	4.63	AB
<b>2</b>	7.58	B	2.50	AB	3.12	AB	4.44	AB
<b>3</b>	8.24	B	2.84	AB	4.63	AB	3.77	AB
<b>4</b>	8.48	B	3.48	AB	7.03	AB	4.41	AB
<b>5</b>	8.76	B	4.98	AB	10.28	B	4.97	AB
<b>6</b>	15.19	C	9.00	B	40.19	C	14.22	B
<b>7</b>	25.02	D	32.90	C	45.91	C	40.64	C

<b>8</b>	66.12	E	61.89	D	72.20	D	60.17	D
<b>9</b>	87.62	F	99.32	E	99.87	E	95.58	E
<b><i>Fusarium oxysporum</i></b>								
<b>Control (+)</b>	0.00	A	0.00	A	0.00	A	0.00	A
<b>1</b>	17.00	BC	26.36	B	37.11	B	39.22	B
<b>2</b>	32.20	BCD	30.64	B	43.84	BC	40.75	B
<b>3</b>	44.36	CD	34.51	B	50.79	CD	43.05	B
<b>4</b>	47.11	CD	36.62	B	56.96	CDE	43.52	B
<b>5</b>	47.27	CD	50.75	C	59.62	DE	42.92	B
<b>6</b>	52.78	D	67.26	D	66.33	EF	41.76	B
<b>7</b>	53.20	D	80.43	E	79.59	F	50.94	BC
<b>8</b>	63.34	DE	96.60	F	97.28	G	65.67	CD
<b>9</b>	91.96	D	98.23	A	98.09	A	79.03	D

Por otro lado, Kordali *et al.* (2005b) reportaron que las especies del género *Artemisia* tienen una actividad antibacterial en contra de *Clavibacter michiganense*, *Erwinia ananas*, *E. carotovora*, *Xanthomonas axanopoda* y *Xanthomonas pelargonii*, esto se confirma también para la especie de *A. vulgaris* con los datos generados ya que para todas bacterias evaluadas fue efectivo. Los máximos porcentajes de inhibición (100% para todas las bacterias) se validan con los porcentajes de inhibición obtenidos por Ahameethunisa y Hopper (2010) del 66% para *Erwinia sp*, entre 70-77% para *Xanthomonas campestris* y entre 73-87% para *Clavibacter michiganensis* quienes utilizaron el método de disco impregnado con 5mg de extracto de *A. nilagirica*. El extracto de altamisa (*A. vulgaris*) tuvo una  $CI_{50}$  de 68.61 ppm y una tasa de inhibición máxima de 98% para *F. oxysporum* lo cual concuerda con Jiang y Xu (2007) quienes mencionaron que el extracto de *Artemisia argyi* a 50 ppm inhibe el crecimiento del hongo entre el 70-80%, así mismo con Lee *et al.* (2007) que reportan que el extracto de *A. vulgaris* a 22.7 ppm no tiene efecto antifúngico al presentar una inhibición de 0%, en la presente investigación dicho extracto comenzó a tener inhibición a partir de 29 ppm. Tan *et al.* (2008) declararon que un sesquiterpeno derivado del extracto de *Eucalyptus globulus* tiene una  $CI_{50}$  de 158 ppm para *Xanthomonas vesicatoria* y de 114 ppm para el *F. oxysporum* resultados que concuerdan con lo obtenido para el hongo *F. oxysporum* lo que

sugiere que este sesquiterpeno es el principal antifúngico del extracto y se obtuvo un resultado opuesto para la cepa de *Xanthomonas* sp que puede deberse a ser otra cepa bacteriana o a utilizar el extracto en su totalidad y no solo un componente. Takahashi *et al.* (2004) reportaron concentraciones mínimas inhibitorias de 3.9 para *Staphylococcus aureus* y 7.8 ppm para *Bacillus cereus* con el extracto de *Eucalyptus globulus*, lo que contrasta con la  $CI_{50}$  de 98.19 ppm para la bacteria Gram positiva *Clavibacter* sp.

Tabla 9. Concentración inhibitoria media de cada extracto.

Extracto	$CI_{50}$	LFI	LFS	Ecuación de predicción
<b><i>Xanthomonas</i> sp</b>				
Altamisa	120.01	101.90	149.43	$y = -4.06737x + 1.95621$
Eucalipto	33.33	30.90	35.79	$y = -6.67564x + 4.38373$
Cenizo	142.43	82.13	312.76	$y = -4.57753x + 2.125522$
Yerbanis	70.23	36.69	155.46	$y = -3.38014x + 1.83053$
<b><i>Clavibacter</i> sp</b>				
Altamisa	33.55	22.29	43.73	$y = -1.39808x + 0.91635$
Eucalipto	98.19	69.16	160.48	$y = -5.6205x + 2.82147$
Cenizo	94.82	46.41	256.79	$y = -2.56041x + 1.29516$
Yerbanis	83.40	69.64	100.15	$y = -5.68396x + 2.9586$
<b><i>Erwinia</i> sp</b>				
Altamisa	253.23	158.78	586.89	$y = -7.20015x + 2.99561$
Eucalipto	279.95	164.37	899.28	$y = -4.6394x + 1.8959$
Cenizo	198.41	147.54	279.55	$y = -6.92805x + 3.0154$
Yerbanis	251.21	156.73	593.06	$y = -6.12134x + 2.55052$
<b><i>Fusarium oxysporum</i></b>				
Altamisa	68.61	48.83	92.58	$y = -3.25951x + 1.77498$
Eucalipto	100.50	62.77	162.29	$y = -2.06436x + 1.03106$
Cenizo	44.26	26.49	62.74	$y = -2.29969x + 1.39714$
Yerbanis	101.66	45.12	240.90	$y = -1.20951x + 0.6026$

$CI_{50}$ : concentración inhibitoria media; LFI: limite fiducial inferior; LFS: limite fiducial superior. El p-valor es <0.001 para todos los análisis.

#### 4.3.2 Bioensayos con productos químicos

Las tablas 10, 11 y 12 contienen todos los resultados obtenidos de la comparación de medias y los análisis Probit para cada uno de los productos químicos evaluados. Como se puede apreciar las cepas bacterianas no

mostraron  $CI_{50}$  altas a excepción de las obtenidas para gentamicina, esto sugiere que al ser cepas obtenidas de campo no habían sido tratadas con estos antibióticos y, por lo tanto, no han podido desarrollar demasiada resistencia. El ingrediente activo más eficaz para cada microorganismo es: eritromicina para *Xanthomonas* sp con una  $CI_{50}$  de 8.41 ppm; kasugamicina para *Clavibacter* con una  $CI_{50}$  de 9.62 ppm; gentamicina para *Erwinia* sp con una  $CI_{50}$  de 3.26 ppm; y para *F. oxysporum* el carbendazim con una  $CI_{50}$  de 118.68 ppm. Theodoro y Maringoni (2000) reportaron que la kasugamicina tienen efecto biológico sobre *Clavibacter michiganensis* en una concentración de 1000 ppm, lo que soporta más la teoría de la baja resistencia de las cepas obtenidas en campo. Estos resultados también difieren con lo investigado por Ramírez *et al.* (2009) para *Xanthomonas* sp, quienes mencionaron que esta bacteria es sensible a la gentamicina a 10 ppm mientras que la cepa aislada durante este proyecto es sensible a 430 ppm, en el mismo estudio también se evaluó a *Erwinia* sp resultados que concuerdan los encontrados, los cuales indican que es resistente a la eritromicina a 15 ppm y sensible a la gentamicina a 10 ppm.

Tabla 10. Comparación de medias de los porcentajes de inhibición de las bacterias contra los antibióticos.

Tratamiento	Gentamicina		Kasugamicina		Eritromicina	
<b><i>Xanthomonas</i> sp</b>						
<b>Control (+)</b>	0.00	A	0.00	A	0.98	A
<b>1</b>	15.32	B	16.59	AB	34.90	BA
<b>2</b>	19.85	BC	17.44	AB	45.40	B
<b>3</b>	23.76	BC	30.70	BC	43.52	B
<b>4</b>	19.78	BC	24.74	BC	48.72	BC
<b>5</b>	19.92	BC	28.60	BC	50.39	BC
<b>6</b>	24.73	BC	29.69	BC	61.89	BC
<b>7</b>	26.79	BC	46.33	CD	66.20	BC
<b>8</b>	41.55	C	57.34	DE	83.79	C
<b>9</b>	73.08	D	74.22	E	80.84	C
<b><i>Clavibacter</i> sp</b>						
<b>Control (+)</b>	0.00	A	0.00	A	0.75	A
<b>1</b>	18.92	AB	9.51	AB	23.15	AB

2	27.49	BC	9.94	AB	41.63	BC
3	27.68	BC	18.53	B	54.90	CD
4	33.60	BC	45.77	C	66.28	CDE
5	34.54	BC	52.76	C	72.95	DE
6	34.29	BC	54.50	CD	71.82	DE
7	36.37	BC	67.88	DE	82.95	EF
8	38.60	BC	73.38	EF	99.74	F
9	57.92	C	84.74	F	98.88	F
<b><i>Erwinia sp</i></b>						
<b>Control (+)</b>	0.37	A	0.00	A	0.00	A
1	32.99	B	2.59	AB	3.11	A
2	51.20	C	6.01	B	6.88	AB
3	81.83	D	6.01	B	15.92	AB
4	100	E	5.57	B	23.27	B
5	100	E	6.96	B	53.43	C
6	99.97	E	14.78	C	66.26	C
7	100	E	38.41	D	92.44	D
8	100	E	80.63	E	93.24	D
9	100	E	94.24	F	93.15	D

Tabla 11. Comparación de medias de los porcentajes de inhibición del hongo contra los fungicidas.

<b><i>Fusarium oxysporum</i></b>								
Tratamiento	Tiabendazol	Azoxistrobina	Metalaxil+ Clorotalonil	Carbendazim				
<b>Control (+)</b>	0.00	A	0.00	A	0.00	A	0.00	A
1	2.33	A	4.65	AB	10.51	B	29.51	B
2	4.81	A	7.47	AB	15.87	BC	42.01	C
3	7.51	A	13.72	BC	20.79	C	52.21	D
4	40.72	B	12.58	BC	27.60	D	71.25	E
5	49.51	B	12.16	BC	44.99	E	83.24	FG
6	74.34	C	21.30	C	48.86	E	81.89	F
7	83.81	C	32.59	D	87.86	F	82.56	F
8	94.45	D	62.99	E	90.71	F	86.59	G
9	97.64	D	96.55	F	92.60	F	98.17	H

La tabla 12 sintetiza los resultados del análisis Probit, en esta se observa que el fungicida con menor concentración inhibitoria fue el carbendazim (118ppm),

resultado similar al obtenido por Amini y Sidovich (2010) de  $CI_{50}$  80 ppm para dicho fungicida, aunque los datos obtenidos para la azoxistrobina no concuerdan con la  $CI_{50}$  156 ppm, esta variación sugiere que los agricultores no utilizan mucho ambos fungicidas para el control de las plagas. La tabla 11 muestra que todos los ingredientes activos tuvieron un porcentaje de inhibición superior al 90%, siendo el carbendazim el de mayor inhibición un resultado de 98.17%

Tabla 12. Concentración inhibitoria media de cada extractor para los géneros bacterianos.

P. Activo	$CI_{50}$	LFI	LFS	Ecuación de predicción
<b><i>Xanthomonas sp</i></b>				
Kasugamicina	24.84	7.15	322.63	$y = -0.63792x + 0.45724$
Gentamicina	430.33	114.81	49,382	$y = -1.34135x + 0.50928$
Eritromicina	8.41	6.29	10.60	$y = -1.12242x + 1.21801$
<b><i>Clavibacter sp</i></b>				
Kasugamicina	9.62	6.66	14.14	$y = -0.96214x + 0.97853$
Gentamicina	1577	425.7	32,095	$y = -0.82886x + 0.2592$
Eritromicina	15.53	11.23	20.44	$y = -1.00736x + 0.84575$
<b><i>Erwinia sp</i></b>				
Kasugamicina	28.81	13.76	91.35	$y = -2.28079x + 1.56264$
Gentamicina	3.26	2.36	4.18	$y = -1.415x + 2.75444$
Eritromicina	63.88	48.17	84.70	$y = -2.93015x + 1.62299$
<b><i>Fusarium oxysporum</i></b>				
Tiabendazol	365.37	317.05	420.86	$y = -4.51328x + 1.76111$
Azoxistrobina	542.11	260.76	1,854	$y = -3.18729x + 1.16576$
Carbendazim	118.68	59.25	194.65	$y = -1.82088x + 0.87779$
Metalaxil +Clorotalonil	2,649	1,717	4,129	$y = -4.21883x + 1.23245$

$CI_{50}$ : concentración inhibitoria media; LFI: limite fiducial inferior; LFS: limite fiducial superior; P. Activo: principio activo. El p-valor es  $<0.001$  para todos los análisis.

### 4.3.3 Bioensayos con mezclas

En las tablas 13 y 14 se observa que la mayoría de los tratamientos alcanzaron porcentajes de inhibición por arriba de 90%, el más bajo lo obtuvo la mezcla de

azoxistrobina con cenizo para *Fusarium oxysporum* llegando al 67.77% de inhibición; y el más alto fue de 100% de inhibición y lo alcanzaron 3 combinaciones la gentamicina con cenizo para *Erwinia* sp, la kasugamicina con eucalipto y cenizo para *Xanthomonas* sp y *Erwinia* sp respectivamente.

Tabla 13. Comparación de medias de los porcentajes de inhibición de las bacterias contra la mezcla de antibióticos y extractos.

Tratamiento	Extracto	Gentamicina	Kasugamicina	Eritromicina
<b><i>Xanthomonas</i> sp</b>				
<b>Control (+)</b>	Eucalipto	0.00 A	0.00 A	0.40 A
1	Eucalipto	18.17 AB	25.49 B	30.72 AB
2	Eucalipto	17.66 AB	26.60 B	44.09 B
3	Eucalipto	22.36 B	25.90 B	46.54 B
4	Eucalipto	21.34 B	29.25 BC	46.39 B
5	Eucalipto	25.01 BC	30.53 BC	36.60 AB
6	Eucalipto	24.66 BC	37.69 C	50.80 B
7	Eucalipto	29.81 BC	57.33 D	69.80 BC
8	Eucalipto	41.76 C	79.69 E	90.66 C
9	Eucalipto	71.36 D	100 F	94.69 C
<b><i>Clavibacter</i> sp</b>				
<b>Control (+)</b>	Altamisa	0.00 A	0.00 A	0.00 A
1	Altamisa	6.38 AB	4.50 A	6.59 AB
2	Altamisa	5.75 AB	17.97 B	16.20 BC
3	Altamisa	11.90 ABC	20.81 B	20.16 BCD
4	Altamisa	20.50 BC	26.71 C	21.86 BCD
5	Altamisa	29.60 C	30.70 C	27.18 CD
6	Altamisa	27.40 C	32.18 CD	33.31 DE
7	Altamisa	29.49 C	37.54 D	44.34 E
8	Altamisa	49.65 D	62.80 E	77.45 F
9	Altamisa	73.45 E	90.29 F	87.30 F
<b><i>Erwinia</i> sp</b>				
<b>Control (+)</b>	Cenizo	0.00 A	0.00 A	0.00 A
1	Cenizo	18.86 B	8.15 B	9.83 B
2	Cenizo	69.88 C	29.58 C	47.89 C
3	Cenizo	88.92 D	56.43 D	60.01 D
4	Cenizo	88.88 D	91.05 E	95.84 E
5	Cenizo	90.49 D	91.74 E	96.42 E
6	Cenizo	100 E	93.05 EF	96.72 E

7	Cenizo	100	E	94.83	F	97.13	E
8	Cenizo	100	E	98.28	G	99.34	E
9	Cenizo	100	E	100	G	99.25	E

Tabla 14. Comparación de medias de los porcentajes de inhibición del hongo contra la mezcla de fungicidas y extracto.

<i>Fusarium oxysporum</i>									
$\theta$	Extracto	Tiabendazol	Azoxistrobina	Metalaxil+ Clorotalonil	Carbendazim				
C(+)	Cenizo	0.00	A	0.00	A	0.00	A	0.00	A
1	Cenizo	44.63	B	44.78	B	46.30	B	35.52	B
2	Cenizo	50.04	C	46.27	B	48.00	B	51.71	C
3	Cenizo	54.50	D	47.95	BC	47.67	B	56.03	D
4	Cenizo	58.65	E	48.16	BC	48.20	B	60.59	E
5	Cenizo	63.92	F	48.57	BC	48.15	B	63.58	F
6	Cenizo	71.74	G	49.44	BC	54.79	C	68.30	G
7	Cenizo	78.96	H	51.20	CD	58.69	D	76.11	H
8	Cenizo	85.43	I	55.73	D	66.54	E	86.56	I
9	Cenizo	91.57	J	67.77	E	92.95	F	95.78	J

$\theta$ : tratamiento; C(+): control positivo.

La tabla 15 muestra los resultados del análisis Probit para las mezclas, es decir, las concentraciones inhibitorias medias para cada combinación. Para *Xanthomonas* sp la mezcla con una  $CI_{50}$  menor fue kasugamicina con extracto de eucalipto de 10.28 ppm; *Clavibacter* sp tuvo una de  $CI_{50}$  22.63 ppm en la combinación de kasugamicina con extracto de altamisa; para *Erwinia* sp la  $CI_{50}$  menor es 0.762 ppm correspondiente a la combinación de gentamicina con extracto de cenizo; y finalmente para *F. oxysporum* la  $CI_{50}$  menor es de 10.90 obtenida con la mezcla de azoxistrobina con extracto de cenizo.

Tabla 15. Concentración inhibitoria media de cada extractor para los géneros bacterianos.

Mezcla	$CI_{50}$	LFI	LFS	Ecuación de predicción
<i>Xanthomonas</i> sp				
Kasugamicina + Eucalipto	10.28	4.38	29.63	$y = -0.88093x + 0.87054$

<b>Gentamicina + Eucalipto</b>	407.39	122.17	14,056	$y = -1.2948x + 0.49609$
<b>Eritromicina + Eucalipto</b>	69.93	13.35	385.14	$y = -1.4631x + 0.79314$
<b><i>Clavibacter</i> sp</b>				
<b>Kasugamicina + Altamisa</b>	22.63	11.57	61.65	$y = -1.19064x + 0.87892$
<b>Gentamicina + Altamisa</b>	214.09	122.17	500.69	$y = -1.92895x + 0.82765$
<b>Eritromicina + Altamisa</b>	82.98	47.89	170.70	$y = -1.85952x + 0.96903$
<b><i>Erwinia</i> sp</b>				
<b>Kasugamicina + Cenizo</b>	1.58	0.864	2.52	$y = -0.34882x + 1.74486$
<b>Gentamicina + Cenizo</b>	0.762	0.157	1.472	$y = 0.20041x + 1.702$
<b>Eritromicina + Cenizo</b>	1.28	0.312	2.70	$y = -0.20133x + 1.89763$
<b><i>Fusarium oxysporum</i></b>				
<b>Tiabendazol + Cenizo</b>	32.93	20.45	47.94	$y = -0.9248x + 0.60941$
<b>Azoxistrobina + Cenizo</b>	10.90	2.33	34.88	$y = -0.18553x + 0.17882$
<b>Carbendazim + Cenizo</b>	29.99	19.00	43.04	$y = -0.96447x + 0.65302$
<b>Metalaxil-Clorotalonil + Cenizo</b>	54.40	2.31	190.61	$y = -0.68879x + 0.39686$

Cl<sub>50</sub>: concentración inhibitoria media; LFI: limite fiducial inferior; LFS: limite fiducial superior. El p-valor es <0.001 para todos los análisis.

#### 4.3.3.1 Índice de Co-toxicidad

De acuerdo con los índices de Co-toxicidad (Tabla 16) para las bacterias la mayoría de las combinaciones tuvo un resultado de sinergismo, siendo la mezcla con un índice mayor la de eritromicina con extracto de cenizo utilizada para evaluar *Erwinia* sp. Se tuvieron 3 resultados antagónicos correspondientes a las combinaciones de kasugamicina y eritromicina con altamisa probadas con *Clavibacter* sp, y la mezcla de eritromicina con eucalipto para evaluar a *Xanthomonas* sp. Así mismo, se obtuvo un resultado de acción independiente,

es decir, que ambas soluciones no interactúan ni positiva ni negativamente entre sí, este resultado corresponde a la mezcla de gentamicina con eucalipto (ICT 105.63) usada con *Xanthomonas* sp.

Tabla 16. Índices de Co-toxicidad para la mezcla de antibióticos y extractos.

Fitopatógeno	Extracto	Kasugamicina	Gentamicina	Eritromicina
<i>Xanthomonas</i> sp	Eucalipto	241.63	105.63	12.02
<i>Clavibacter</i> sp	Altamisa	42.51	736.61	18.71
<i>Erwinia</i> sp	Cenizo	1,823.41	427.82	4,990.63

Los resultados concuerdan con Pereira *et al.* (2014), ellos reportan que el 55% de las combinaciones de extractos de *Eucalyptus globulus* combinados con gentamicina generan una acción sinergista, que 3 de los extractos evaluados tuvieron acción antagonista y el resto una acción independiente. Así mismos coinciden con los reportados por Nascimento *et al.* (2000), quienes combinaron extractos de clavo (*Syzygium aromaticum*), jambolan (*Syzygium cumini*), granada (*Punica granatum*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) con tres antibióticos ampicilina, cloranfenicol y tetraciclina para evaluarlos con la bacteria *Pseudomona aeruginosa* resistente a 19 antibióticos, incluidos los antes mencionados, la cual fue sensible posterior a las combinaciones reportando así su efecto sinergista.

En la tabla 17 se observan los ICT de los fungicidas combinados con el extracto de cenizo, como se aprecia todos están por arriba de 100, por lo cual tienen un efecto sinergista entre las soluciones. Dentro de ellos, el más bajo corresponde a la mezcla de carbendazim con cenizo (ICT 395.73) y el más alto a la combinación de azoxistrobina con cenizo (ICT 4973.49). Los resultados se ratifican con la investigación de Pyun y Shin (2006) quienes declararon un efecto sinergista entre el extracto de *Allium sativum* y el antimicótico ketoconazol para el control de tres especies de *Trichophyton*, y con los obtenidos con Lim *et al.* (2008) los cuales indicaron que la combinación del

extracto de *E. globulus* con ketoconazol tiene efecto significativo de sinergismo sobre los patógenos *C. albicans* y en menor intensidad sobre *Trichophyton* sp.

Tabla 17. Índices de Co-toxicidad para la mezcla de fungicidas y extractos.

<b><i>Fusarium oxysporum</i></b>					
<b>Fungicida</b>	<b>Extracto</b>	<b>ICT</b>	<b>Fungicida</b>	<b>Extracto</b>	<b>ICT</b>
Tiabendazol	Cenizo	1,109.53	Carbendazim	Cenizo	395.73
Azoxistrobina	Cenizo	4,973.49	Metalaxil+ Clorotalonil	Cenizo	4,869.49

## 5. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados, todos los extractos generan acción antimicrobiana a dosis menores a 200 ppm, con lo que se sugiere utilizarlos para el control de estos fitopatógenos. El extracto de *Hyptis emoryi* ejerce una acción biológica de control contra dos patógenos evaluados, aunque es el que tuvo un rendimiento menor en la extracción.

La mayoría de los extractos potencializan los productos químicos, lo que reduce el uso de estos productos para el control de las cepas correspondientes, esto trae como beneficio la reducción de costos en la producción de Chile y reduce el riesgo a la salud humana y contaminación del medio ambiente.

El extracto de *Artemisia vulgaris* no se debe combinar con los antibióticos gentamicina ni eritromicina debido a su interacción negativa, teniendo mejor control solos que en mezcla.

## 6. REFERENCIAS

- Agrios, G. N. 1995. fitopatología. Uteha-Noriega.
- Ahameethunisa, A. R., and Hopper, W. 2010. Antibacterial activity of *Artemisia nilagirica* leaf extracts against clinical and phytopathogenic bacteria. *BMC complementary and alternative medicine* 10:6.
- Álvarez Martínez, M. Olivia, and García del Pozo, J. A. 2002. Eritromicina. Descubrimiento, características y aplicaciones. *Offarm: Farmacia y Sociedad* 21:78-82.
- Amini, J., and Sidovich, D. 2010. The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of plant protection research* 50:172-178.
- Banse, K., Falls, C., and Hobson, L. 1963. A gravimetric method for determining suspended matter in sea water using Millipore filters. Pages 639-642 in: *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts Elsevier*.
- Barnett, H. L., and Hunter, B. B. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. American Phytopathological Society (APS Press).
- Barney, J., and DiTommaso, A. 2003. The biology of Canadian weeds. 118. *Artemisia vulgaris* L. *Canadian journal of plant science* 83:205-215.
- Borboa-Flores, J., Rueda-Puente, E., Acedo-Félix, E., Ponce, J., Cruz-Villegas, M., García-Hernández, J., and Ortega-Nieblas, M. 2010. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales contra *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12.
- Bouzar, H., Minsavage, G., Stall, R., Schaad, N., Jones, J., and Lacy, G. 2004. Bacterial spot-worldwide distribution, importance and review. Pages 27-34 in: *I International Symposium on Tomato Diseases* 695.
- Bowers, J. H., and Locke, J. C. 2000. Effect of botanical extracts on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of *Fusarium* wilt in the greenhouse. *Plant disease* 84:300-305.

- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology* 94:223-253.
- Bye, R. A. 1986. Medicinal plants of the Sierra Madre: comparative study of Tarahumara and Mexican market plants. *Economic Botany* 40:103-124.
- Castañón-Nájera, G., Latournerie-Moreno, L., Mendoza-Elos, M., Vargas-López, A., and Cárdenas-Morales, H. 2008. Colección y caracterización de Chile (*Capsicum* spp) en Tabasco, México. *Phyton (Buenos Aires)* 77:189-202.
- Cisarova, M., Tancinova, D., Medo, J., and Kacaniová, M. 2016. The in vitro effect of selected essential oils on the growth and mycotoxin production of *Aspergillus* species. *J Environ Sci Health B* 51:668-674.
- Céspedes, C. L., Avila, J. G., Martínez, A., Serrato, B., Calderón-Mugica, J. C., and Salgado-Garciglia, R. 2006. Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:3521-3527.
- Darriba, A. F., and Silva-Pando, F. 2016. El Género *Eucalyptus* (Myrtaceae) en Galicia: Claves y descripción/The genus *Eucalyptus* (Myrtaceae) in Galicia: Identification keys and descriptions. *NACC. Biología* 23:23.
- Davidse, G., Sousa-Pena, M., Knapp, S., and Chiang Cabrera, F. 2012. *Asteraceae*. *Flora Mesoamericana* 5.
- de Almeida Pinheiro, M., Magalhães, R. M., Torres, D. M., Cavalcante, R. C., Mota, F. S. X., Coelho, E. M. A. O., Moreira, H. P., Lima, G. C., da Costa Araújo, P. C., and Cardoso, J. H. L. 2015. Gastroprotective effect of alpha-pinene and its correlation with antiulcerogenic activity of essential oils obtained from *Hyptis* species. *Pharmacognosy magazine* 11:123.
- De Sousa, D. P. 2011. Analgesic-like activity of essential oils constituents. *Molecules* 16:2233-2252.
- Doyle, J. J. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Gabrielson, J., Hart, M., Jarelöv, A., Kühn, I., McKenzie, D., and Möllby, R. 2002. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and

spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *Journal of Microbiological Methods* 50:63-73.

Guédeza, C., Cañizaleza, L., Castilho, C., and Olivarb, R. 2012. Artículo original Evaluación in vitro de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 32:44-49.

Hadas, R., Kritzman, G., Gefen, T., and Manulis, S. 2001. Detection, quantification and characterization of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* contaminating pepper seeds. *Plant pathology* 50:117-123.

Hamza, A. A., Robène-Soustrade, I., Jouen, E., Gagnevin, L., Lefeuvre, P., Chiroleu, F., and Pruvost, O. 2010. Genetic and pathological diversity among *Xanthomonas* strains responsible for bacterial spot on tomato and pepper in the southwest Indian Ocean region. *Plant Disease* 94:993-999.

Hayman, M., and Kam, P. C. 2008. Capsaicin: a review of its pharmacology and clinical applications. *Current Anaesthesia and Critical Care* 19:338-343.

Henz, G. P., Reifschneider, F. J. B., and Duarte, V. 2006. *Erwinia chrysanthemi*: pectolytic bacterium causing soft rot outbreaks of arracacha in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41:1567-1571.

Jiang, M.-s., and Xu, W.-y. 2007. Inhibition activities of the extract from the plant of *Artemisia argyi* against 13 kinds of phytopathogenic fungi. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)* 4:004.

Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E., and Schaad, N. W. 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst Appl Microbiol* 27:755-762.

Kerstens, K., De Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P., and Stackebrandt, E. 2006. Introduction to the Proteobacteria. Pages 3-37 in: *The prokaryotes*. Springer.

Koike, S. T., Gladders, P., and Paulus, A. 2006. *Vegetable diseases: A colour handbook*. CRC Press.

- Kordali, S., Cakir, A., Mavi, A., Kilic, H., and Yildirim, A. 2005a. Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish *Artemisia* species. *Journal of agricultural and food chemistry* 53:1408-1416.
- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A., and Yildirim, A. 2005b. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry* 53:9452-9458.
- Lee, S.-O., Choi, G.-J., Jang, K.-S., Lim, H.-K., Cho, K.-Y., and Kim, J.-C. 2007. Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. *The Plant Pathology Journal* 23:97-102.
- Leslie, J. F., Zeller, K. A., and Summerell, B. A. 2001. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59:107-117.
- Lim, S. 2008. Combined effects of the essential oil from *Eucalyptus globulus* with ketoconazole against *Candida* and *Trichophyton* species. *Natural Product Sciences* 14:1-5.
- Masoko, P., Picard, J., and Eloff, J. 2005. Antifungal activities of six south African *Terminalia* species (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 99:301-308.
- McNeil, M., Facey, P., y Porter, R. 2011. Essential oils from the *Hyptis* genus—a review (1909–2009). *Nat Prod Commun* 6:1775-1796.
- Melgar, J. C., Weller, S., UU, E., La Lima, C., and Honduras, C. 2012. Marchitez bacteriana en solanáceas: Su reconocimiento y manejo integrado. La Lima, Cortés: Honduras: FHIA.
- Mendoza, L., Wilkens, M., y Urzua, A. 1997. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 58:85-88.

- Michielse, C. B., and Rep, M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology* 10:311-324.
- Milla, A. 2006. *Capsicum de capsia, cápsula el pimiento*. *Pimientos: Compendios de Horticultura*. Consultado 28 oct 2011.
- Nalimova, M. S., Peña, S. G. R., and Izquierdo, M. F. C. 2005. Efecto in vitro de extractos de plantas sobre especies bacterianas del género *Xanthomonas*. *Diagnóstico fitosanitario* 9:49.
- Nascimento, G. G., Locatelli, J., Freitas, P. C., and Silva, G. L. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian journal of microbiology* 31:247-256.
- Pastore, J. F. B., Harley, R. M., Forest, F., Paton, A., and van den Berg, C. 2011. Phylogeny of the subtribe Hyptidinae (Lamiaceae tribe Ocimeae) as inferred from nuclear and plastid DNA. *Taxon* 60:1317-1329.
- Pattnaik, S., Subramanyam, V., Bapaji, M., and Kole, C. 1997. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios* 89:39-46.
- Pereira, V., Dias, C., Vasconcelos, M., Rosa, E., and Saavedra, M. 2014. Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). *Industrial crops and products* 52:1-7.
- Pyun, M.-S., y Shin, S. 2006. Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine* 13:394-400.
- Ramírez, L., Castaño, S., and López, R. 2009. Identificación de bacterias que afectan el establecimiento in vitro de segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth. *Revista Investigaciones. Universidad del Quindío*:151-158.
- Reyes-Jurado, F., Franco-Vega, A., Ramírez-Corona, N., Palou, E., and López-Malo, A. 2015. Essential oils: antimicrobial activities, extraction methods, and their modeling. *Food Engineering Reviews* 7:275-297.

- Rueda, X. Y., y Mogollón, O. F. C. 2013. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia). *Bistua Revista de la Facultad de Ciencias Basicas* 10.
- Saddler, G. S., and Kerr, E. M. *Clavibacter*. 2011. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*.
- Saddler, G. S., and Bradbury, J. F. 2005. Xanthomonadales ord. nov. Pages 63-122 in: *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer.
- Sahi, I. Y., and Khalid, A. 2007. In vit o biological control of *Fusarium oxysporum-r* causing wilt in *Capsicum annuum*.
- Sandoval-Chávez, R. A., Martínez-Peniche, R. Á., Hernández-Iturriaga, M., Fernández-Escartín, E., Arvizu-Medrano, S., and Soto-Muñoz, L. 2011. Control biológico y químico contra *Fusarium stilboides* en pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) en poscosecha. *Revista Chapingo. Serie horticultura* 17:161-172.
- Scaldaferro, M. A., Grabiele, M., and Moscone, E. A. 2013. Heterochromatin type, amount and distribution in wild species of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). *Genetic resources and crop evolution* 60:693-709.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001. *Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria*. American Phytopathological Society (APS Press).
- Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H., and Rocha Sosa, M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21.
- SIAP. 2013. México primer lugar en la producción de chile verde.
- Smith, W. K., and Nobel, P. S. 1977. Temperature and water relations for sun and shade leaves of a desert broadleaf, *Hyptis emoryi*. *Journal of Experimental Botany* 28:169-183.
- Soylu, E. M., Soyly, S., and Kurt, S. 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia* 161:119-128.

- Sun, Y.-P., and Johnson, E. 1960. Analysis of joint action of insecticides against house flies. *Journal of economic entomology* 53:887-892.
- Takahashi, T., Kokubo, R., and Sakaino, M. 2004. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. *Letters in applied microbiology* 39:60-64.
- Tan, M., Zhou, L., Huang, Y., Wang, Y., Hao, X., and Wang, J. 2008. Antimicrobial activity of globulol isolated from the fruits of *Eucalyptus globulus* Labill. *Natural product research* 22:569-575.
- Tanowitz, B. D., Junak, S. A., and Smith, D. M. 1984. Terpenoids of *Hyptis emoryi*. *Journal of natural products* 47:739-740.
- Theodoro, G. d. F., and Maringoni, A. C. 2000. In vitro and in vivo action of chemicals on *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, causal agent of the bacterial canker of tomato. *Scientia Agrícola* 57:439-443.
- Usano-Aleman, J., Paúl, J. P., and Díaz, S. 2014. Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana. *Reduca (Biología)* 7.
- Velásquez, V., and Amador, R. 2009. Enfermedades bióticas del ajo y chile en Aguascalientes y Zacatecas. *Libro Técnico*:187.
- Velásquez-Valle, R., Reveles-Torres, L. R., and Reveles-Hernández, M. 2013. Manejo de las principales enfermedades del chile para secado en el Norte Centro de México. *Folleto Técnico*.
- Villarreal, Q. J. 2003. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 113. Familia Compositae, tribu Tageteae. Patzcuaro, Michoacan: Instituto de Ecología 85p.-illus.. ISBN 1117155627.
- Vásquez López, A., Tlapal Bolaños, B., Yáñez Morales, M., Pérez Pacheco, R., and Quintos Escalante, M. 2009. Etiología de la marchitez del'chile de agua'(Capsicum annum L.) en Oaxaca, México. *Revista fitotecnia mexicana* 32:127-134.
- Vázquez-Flota, F., Miranda-Ham, M. d. L., Monforte-González, M., Gutiérrez-Carbajal, G., Velázquez-García, C., and Nieto-Pelayo, Y. 2007. La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30.

Zhao, S., y Zhang, D. 2014. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of Eucalyptus leaves oil and comparison with Soxhlet extraction and hydro-distillation methods. *Separation and Purification Technology* 133:443-451.