

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



EXTRACTOS VEGETALES Y MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS PARA EL  
CONTROL DEL CÁNCER BACTERIANO DEL TOMATE CAUSADO POR  
*Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*.

Tesis

Que presenta LUCERO ELIZABETH AGUILAR HERNÁNDEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRA EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRICOLA

Saltillo, Coahuila.

JUNIO, 2025

EXTRACTOS VEGETALES Y MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS PARA EL  
CONTROL DEL CÁNCER BACTERIANO DEL TOMATE CAUSADO POR  
*Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*.

Tesis

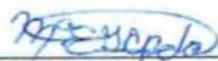
Elaborada por LUCERO ELIZABETH AGUILAR HERNÁNDEZ como requisito  
parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA  
AGRÍCOLA con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría




Dr. Epifanio Castro del Ángel  
Director de Tesis



M.C. Abiel Sánchez Arizpe  
Asesor



Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda  
Asesor



M.C. Rebeca González Villegas  
Asesor



Dr. Antonio Flores Naveda  
Subdirector de Postgrado  
UAAAN

Saltillo, Coahuila.

JUNIO, 2025.

## **AGRADECIMIENTOS A DIOS**

*Por darme la vida, mantenerme con salud, estar presente en cada momento. Pues cada obstáculo superado y lograr una meta más en mi carrera profesional, ha sido gracias a él. Por haber puesto en mi camino a personas que me han brindado su apoyo, cariño y amistad, de las cuales estoy eternamente agradecida.*

### **AI CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONAHCYT)**

*Por brindarme el apoyo a través de la beca para culminar mis estudios de posgrado y llevar a cabo esta investigación. Su apoyo fue fundamental para alcanzar este logro académico.*

### **A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

*Agradezco profundamente a la universidad, por haber sido el espacio donde no solo adquirí conocimientos académicos, sino también las herramientas fundamentales para mi desarrollo profesional y culminar mis estudios de posgrado.*

### **AL DR. EPIFANIO CASTRO DEL ÁNGEL**

*Por darme la oportunidad de trabajar con él, para llevar a cabo este trabajo de investigación. Por su tiempo, apoyo, paciencia, dedicación y compartir sus conocimientos que fueron fundamentales a lo largo de esta etapa.*

### **AL M.C. ABIEL SÁNCHEZ ARIZPE**

*Le agradezco infinitamente, por su valiosa amistad, su apoyo incondicional, paciencia, el tiempo que me brindo para escucharme, así como sus palabras de aliento que fueron importantes para seguir adelante. Además, su generosidad al compartir sus conocimientos, sugerencias que contribuyeron al trabajo de investigación.*

### **A LA DRA. MA. ELIZABETH GALINDO CEPEDA**

*Por compartir sus conocimientos, observaciones y sugerencia al trabajo de investigación. Aprecio profundamente su amistad brindada, disposición para escucharme, sus consejos para seguir adelante.*

**A LA M.C. REBECA GONZÁLEZ VILLEGAS**

*Por formar parte de este trabajo de investigación, sus aportaciones y sugerencias al trabajo.*

**A LA T.Q. L. MARÍA CHRISTINA SÁNCHEZ FLORES**

*Por su apoyo incondicional, conocimientos compartidos, paciencia y tiempo que me brindo durante el proceso del trabajo de investigación en el laboratorio. Valoro sinceramente su amistad y cada uno de sus consejos para seguir adelante.*

## **DEDICATORIA**

### **A MIS PADRES**

*Armando Aguilar López y Celia Hernández Aguilar, con todo mi cariño y gratitud, por ser el pilar fundamental en cada paso de mi vida. Agradezco profundamente su apoyo incondicional, esfuerzo, sacrificio, por estar siempre a mi lado, por brindarme comprensión y confianza. Gracias por sus sabios consejos, por inculcarme valores que han sido esenciales para superar obstáculos, crecer como persona y lograr mis metas.*

### **A MIS HERMANOS**

*Ubando, Héctor, Octavio, Tenchy, Nely, Guille y Ana, Con todo mi afecto, quiero agradecerles por estar siempre presentes en mi vida. Su apoyo incondicional ha sido una fuente importante de fortaleza y motivación en el trayecto de mi formación profesional. Gracias por ser un ejemplo a seguir, por mostrarme con sus acciones el valor del esfuerzo, la perseverancia y la honestidad. Sus consejos me han impulsado a dar lo mejor de mí para seguir adelante y lograr mis metas.*

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	iii
DEDICATORIA .....	v
ÍNDICE GENERAL.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT .....	xiv
INTRODUCCIÓN .....	1
Objetivo general .....	3
Objetivos Específicos.....	3
Hipótesis.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Origen e Historia del Tomate .....	4
Importancia del Cultivo de Tomate .....	4
Producción Nacional.....	5
Estados productores de Tomate en México .....	6
Enfermedades del Tomate.....	6
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i> .....	6
Control Biológico .....	9
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	10
<i>Trichoderma harzianum</i> .....	12
Micoparasitismo .....	13
Antibiosis.....	14
Extractos Vegetales.....	14
Composición química de los extractos de plantas .....	15
<i>Larrea tridentata</i> .....	16
Metabolitos secundarios .....	16
<i>Solanum elaeagnifolium</i> .....	16
MATERIALES Y MÉTODOS .....	19

Ubicación del Experimento.....	19
Aislamiento y Caracterización del fitopatógeno .....	19
Tinción de Gram.....	19
Reacción de KOH.....	20
Reacción de hipersensibilidad en tabaco.....	20
Prueba de O/F (Hugh y Leifson) .....	20
Prueba de Oxidasa.....	20
Prueba de Catalasa .....	21
Prueba de H <sub>2</sub> S de peptona .....	21
Prueba de Hidrólisis de Esculina.....	21
Prueba de Hidrólisis de gelatina.....	21
Tolerancia de NaCl al 6% .....	22
Corroboración molecular del fitopatógeno. ....	22
Preparación de Extractos Vegetales.....	22
Actividad inhibitoria <i>in vitro</i> contra <i>Cmm</i> con extractos de <i>Larrea tridentata</i> y <i>Solanum elaeagnifolium</i> . ....	23
Actividad antagónica <i>in vitro</i> de <i>T. harzianum</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i> contra <i>Cmm</i> . .	23
Control de <i>Cmm</i> con extractos vegetales y microorganismos antagonistas en invernadero.....	24
Establecimiento del experimento en invernadero .....	24
Preparación de los microorganismos antagonistas y de los extractos vegetales.....	24
Inoculación del patógeno en plantas de tomate.....	25
Evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad .....	25
Efecto de microorganismos antagonistas y extractos vegetales en la promoción de crecimiento y desarrollo .....	26
Diámetro de tallo .....	26
Diámetro polar y ecuatorial de frutos .....	26
Peso de frutos.....	27
Peso fresco de hojas .....	27
Peso de raíz .....	27
RESULTADOS Y DISCUSION .....	28

Aislamiento y caracterización del patógeno .....	28
Resultados de las pruebas realizadas para la caracterización de <i>C. michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i> . ....	28
Tinción de Gram (+) .....	28
Reacción de KOH (-) .....	29
Reacción de hipersensibilidad en tabaco (+) .....	29
Prueba de óxido fermentación O/F (+/-).....	29
Prueba de Oxidasa (-) .....	30
Prueba de Catalasa (+) .....	30
Prueba de H <sub>2</sub> S de peptona (+) .....	30
Prueba de Hidrólisis de Esculina (+) .....	31
Prueba de Hidrólisis de gelatina (-) .....	31
Prueba de Tolerancia de NaCl al 6% (+) .....	31
Corroboración molecular del fitopatógeno .....	32
Actividad inhibitoria <i>in vitro</i> contra <i>Cmm</i> con extractos hidroalcohólicos de <i>L. tridentata</i> y <i>S. elaeagnifolium</i> . ....	32
<i>Larrea tridentata</i> .....	32
<i>Solanum elaeagnifolium</i> .....	34
Actividad antagónica <i>in vitro</i> de <i>T. harzianum</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i> contra <i>Cmm</i> . .	35
Confrontación <i>in vitro</i> de <i>T. harzianum</i> .....	35
Confrontación <i>in vitro</i> de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	37
Incidencia y severidad de la enfermedad .....	38
Efecto de microorganismos antagonistas y extractos vegetales en la promoción de crecimiento y desarrollo .....	40
Microorganismos antagonistas y extractos de plantas sobre el diámetro de tallo de tomate.....	40
Microorganismos antagonistas y extractos de plantas sobre el diámetro polar y ecuatorial de frutos de tomate .....	41
Microorganismos antagonistas y extractos de plantas sobre el rendimiento del cultivo de tomate.....	42



Microorganismos antagonistas y extractos de plantas sobre el peso fresco de hojas de tomate.....	43
Microorganismos antagonistas y extractos de plantas sobre el peso de raíz de tomate .....	44
CONCLUSIONES .....	45
REFERENCIAS.....	46

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Escala Arbitraria por Mohd Nadzir <i>et al.</i> (2019) .....	25
Cuadro 2. Resultados de las pruebas realizadas para la caracterización de <i>C. michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i> (Schaad <i>et al.</i> , 2001).....	26

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resultado de la transformación arcoseno del porcentaje de inhibición por el extracto de <i>L. tridentata</i> .....	31
Figura 2. Resultado de la transformación arcoseno del porcentaje de inhibición por el extracto de <i>S. elaeagnifolium</i> .....	32
Figura 3. Inhibición del crecimiento de <i>T. harzianum</i> contra <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i> en cultivo dual.....	34
Figura 4. Inhibición del crecimiento de <i>B. amyloliquefaciens</i> contra <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i> .....	36
Figura 5. Incidencia y severidad de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i> ...	37
Figura 6. Diámetro de tallos de tomate, tratados con microorganismos antagonistas y extractos de plantas.....	39
Figura 7. Diámetro polar y ecuatorial de frutos de tomate, tratados con microorganismos antagonistas y extractos de plantas .....	40
Figura 8. Rendimiento del cultivo de tomate, tratados con microorganismos antagonistas y extractos de plantas .....	40
Figura 9. Peso fresco de hojas de tomate, tratados con microorganismos antagonistas y extractos de plantas .....	41
Figura 10. Peso de raíz de tomate, tratados con microorganismos antagonistas y extractos de plantas.....	41

## RESUMEN

EXTRACTOS VEGETALES Y MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS PARA EL  
CONTROL DEL CÁNCER BACTERIANO DEL TOMATE CAUSADO POR  
*Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*.

POR

LUCERO ELIZABETH AGUILAR HERNÁNDEZ

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. EPIFANIO CASTRO DEL ÁNGEL -ASESOR-

Saltillo, Coahuila.

JUNIO, 2025.

El objetivo de esta investigación fue el control de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* (*Cmm*) con *Trichoderma harzianum*, *Bacillus amyloliquefaciens* y extractos hidroalcohólicos de *Larrea tridentata* y de *Solanum elaeagnifolium* en el cultivo de tomate. El patógeno se aisló de plantas de tomate con síntomas de cáncer bacteriano, se determinó la eficacia de los microorganismos antagonistas y extractos vegetales mediante pruebas *in vitro*, placa envenenada y cultivos duales en cajas Petri. Se observó el crecimiento del patógeno y los antagonistas cada 24 h y se evaluaron utilizando el software ImageJ.JS versión 0.5.8 para determinar el área de colonización, los resultados obtenidos fueron convertidos a % de inhibición, fueron procesados por análisis de varianza y separación de medias por la prueba de Tukey con  $P \leq 0.05$  de significancia, utilizando el programa SAS 9.0. El establecimiento del cultivo fue bajo condiciones de invernadero, se utilizaron plantas de tomate variedad Floradade. Los tratamientos evaluados fueron: (T1) *B. amyloliquefaciens* + *Cmm*; (T2) *T. harzianum* + *Cmm*; (T3) *S. elaeagnifolium* + *Cmm*; (T4) *L. tridentata* + *Cmm*; (T5) Testigo absoluto; (T6) *L. tridentata* + *S. elaeagnifolium* + *B. amyloliquefaciens* + *T. harzianum* + *Cmm*; (T7) *Cmm* y (T8) *B. amyloliquefaciens* + *T. harzianum* + *Cmm*. Se determinó la incidencia y la severidad de la enfermedad. De igual manera, se evaluaron diferentes variables agronómicas, como el diámetro del tallo, diámetro polar y ecuatorial de frutos, así como el peso de hojas, raíces y frutos. Los resultados obtenidos mostraron que los tratamientos aplicados tuvieron efecto sobre el desarrollo y rendimiento de las plantas. Estos resultados fueron procesados por análisis de varianza y separación de medias por la prueba de Tukey con  $P \leq 0.05$  de significancia. Con base a los resultados se concluye que los extractos hidroalcohólicos de *L. tridentata*, *S. elaeagnifolium* y microorganismos antagonistas presentaron efecto sobre el patógeno, inhibieron el crecimiento y desarrollo de *Cmm* ya que compitieron por espacio y nutrientes.

## ABSTRACT

PLANT EXTRACTS AND ANTAGONIST MICROORGANISMS FOR THE  
CONTROL OF BACTERIAL CANCER IN TOMATO CAUSED BY *Clavibacter*  
*michiganensis* subsp *michiganensis*.

BY

LUCERO ELIZABETH AGUILAR HERNÁNDEZ

MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. EPIFANIO CASTRO DEL ÁNGEL - ADVISOR-

SALTILLO, COAHUILA.

JUNE, 2025.

he objective of this research was the control of *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* (*Cmm*) with *Trichoderma harzianum*, *Bacillus amyloliquefaciens* and hydroalcoholic extracts of *Larrea tridentata* and *Solanum elaeagnifolium* in tomato crops. The pathogen was isolated from tomato plants with symptoms of bacterial canker, the efficacy of antagonistic microorganisms and plant extracts was determined by in vitro tests, poisoned plate and dual cultures in Petri dishes. The growth of the pathogen and antagonists was observed every 24 h and evaluated using ImageJ.JS version 0.5.8 software to determine the colonization area, the results obtained were converted to % inhibition, processed by analysis of variance and separation of means by Tukey's test with  $P \leq 0.05$  of significance, using SAS 9.0 software. The crop was established under greenhouse conditions, using tomato plants of the Floradade variety. The treatments evaluated were: (T1) *B. amyloliquefaciens* + *Cmm*; (T2) *T. harzianum* + *Cmm*; (T3) *S. elaeagnifolium* + *Cmm*; (T4) *L. tridentata* + *Cmm*; (T5) Absolute control; (T6) *L. tridentata* + *S. elaeagnifolium* + *B. amyloliquefaciens* + *T. harzianum* + *Cmm*; (T7) *Cmm* and (T8) *B. amyloliquefaciens* + *T. harzianum* + *Cmm*. The incidence and severity of the disease were determined. Likewise, different agronomic variables were evaluated, such as stem diameter, polar and equatorial diameter of fruits, as well as the weight of leaves, roots and fruits. The results obtained showed that the applied treatments had an effect on plant development and yield. These results were processed by analysis of variance and means separation using the Tukey test with a  $P \leq 0.05$  significance level. Based on the results, it is concluded that the hydroalcoholic extracts of *L. tridentata*, *S. elaeagnifolium*, and antagonistic microorganisms had an effect on the pathogen, inhibiting the growth and development of *Cmm* as they competed for space and nutrients.

## INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) se cultiva ampliamente en todo el mundo ya que ocupa el décimo lugar en la producción. Es un producto agrícola muy importante como alimento, contiene altos niveles de licopeno, betacaroteno, flavonoides, y vitamina C. Se conocen alrededor de 200 enfermedades del tomate de diversas causas y etiologías (Rodríguez *et al.*, 2020). De las enfermedades bacterianas más importantes que atacan a este cultivo es el cáncer bacteriano, causada por *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* (Cmm), enfermedad de mayor importancia en el mundo debido a las pérdidas significativas que van del 50 y 100% de la producción y efectos en la calidad de los frutos (Temel *et al.*, 2023).

No hay alternativas químicas eficientes para el control de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* actualmente se recurre al uso de antibióticos que han mostrado efecto sobre el patógeno, sin embargo, han sido cuestionados por los efectos tóxicos y resistencia que puedan presentar ante este patógeno (Osdaghi *et al.*, 2018). La resistencia a estos compuestos puede ser causada por varias sustancias químicas relacionadas (Yu *et al.*, 2017). Dado el problema de organismos resistentes a los antimicrobianos y sus efectos sobre la salud humana y el medio ambiente, se requiere un uso considerable de productos químicos para garantizar la inocuidad de los alimentos y combatir la resistencia a los antibióticos (Miller *et al.*, 2022). Por lo tanto, se han buscado alternativas para el control de enfermedades como el control biológico con microorganismos antagonistas ya que es una estrategia eficiente para disminuir el uso de productos químicos y reducir los costos de producción (Dimkić *et al.*, 2022). El género *Trichoderma* presenta amplio espectro de aplicación agrícola sobre fitopatógenos (Mesa *et al.*, 2019). Aislamientos de *Trichoderma spp.* se están usando para el control biológico de enfermedades en diferentes cultivos a nivel mundial ya que tienen potencial para controlar enfermedades causadas por *C. michiganensis subsp. michiganensis* en el cultivo de tomate en invernadero (Monaco *et al.*, 2017). Entre los organismos antagonistas bacterianos, especies del género *Bacillus* como *B. amyloliquefaciens*, han demostrado ser eficientes en el control de enfermedades del tomate, ya que producen una variedad de compuestos biológicamente activos con un amplio espectro de acción contra fitopatógenos y tienen la capacidad de inducir resistencia sistémica en las plantas (Gautama *et al.*, 2019). *Bacillus amyloliquefaciens* posee



actividad de biocontrol, produce resistencia sistémica inducida en la planta y es capaz de generar una variedad de compuestos antimicrobianos (Hernández *et al.*, 2022).

Por otra parte, el uso de extractos vegetales etanólicos, hexánicos, cetónicos, metanólicos y acuosos se han reportado con propiedades antimicrobianas y fúngicas, así como los aceites esenciales de las plantas (Delgadillo *et al.*, 2017). El ácido nordihidroguayárico (NDGA) es uno de los compuestos fenólicos más relevantes en *Larrea tridentata*, también conocida como gobernadora. Este antioxidante se encuentra en la resina que producen las células ubicadas cerca de la superficie de las hojas y los tallos (Peñuelas *et al.*, 2017). *Larrea* es una planta que se destaca por su capacidad para combatir bacterias y hongos (Morales *et al.*, 2021). *Solanum elaeagnifolium* presenta efectos positivos para el ser humano ya que contiene cantidad de fenoles, alcaloides, saponinas, terpenos, flavonoides, cumarinas y carotenoides donde se ha demostrado que tienen propiedades anticancerígenas, antioxidantes, antihipertensivas, antidepresivas, antiinflamatorias, hipoglucémicas, antimicrobianas y con actividad nematocida (Al-Hamaideh *et al.*, 2020). Al respecto, el objetivo de la investigación fue el control de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* con *Trichoderma harzianum*, *Bacillus amyloliquefaciens* y extractos hidroalcohólicos de *Larrea tridentata* y de *Solanum elaeagnifolium* en el cultivo de tomate.

### **Objetivo general**

Control del cáncer bacteriano *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* con agentes antagonistas y extractos de plantas, en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*).

### **Objetivos Específicos**

- Aislar e identificar el agente causal del cáncer bacteriano del Tomate.
- Determinar la inhibición *in vitro* de *T. harzianum*, *B. amyloliquefaciens*, extractos hidroalcohólicos de *L. tridentata* y *S. elaeagnifolium* contra *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*.
- Determinar la efectividad de microorganismos antagonistas y de extractos vegetales para el control de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* en invernadero.

### **Hipótesis**

Al menos un tratamiento de control reducirá la incidencia y severidad del cáncer bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* en el cultivo de tomate.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Origen e Historia del Tomate

Hace 2,600 años el tomate fue domesticado por pueblos mesoamericanos, en México se encuentran diferentes variedades de este fruto tanto de tamaño como de colores y de sabores, por ejemplo: redondo, saladette, pera, cereza o cherry. En el norte de México, este fruto se llama tomate, mientras que en el centro y sur del país se le conoce como jitomate, lo cual ayuda a distinguirlo del tomate verde o tomate de cáscara (SADER, 2022).

El tomate es un fruto de color rojo, presenta un sabor ácido, ampliamente cultivado y consumido a nivel mundial. Se utiliza tanto en fresco como procesado y es un ingrediente común en variedad de platillos como ensaladas, jugos y salsas. Es originario de los Andes bajos, fue cultivado por los aztecas en México. Su nombre difiere dependiendo de la región donde se encuentre (SIAP, 2016).

El tomate pertenece al género *Solanum*, que forma parte de la gran familia de las solanáceas, las variedades que se cultivan provienen de una sola especie, *Solanum lycopersicum*. Existen 16 especies de tomates silvestres de *S. lycopersicum* que son nativos de América del Sur, los tomates silvestres tienen un estigma ligeramente elevado, la parte femenina de la flor permite su polinización con la ayuda de insectos o del viento. Estas especies tienen genes importantes para la resistencia a las enfermedades (Raziard *et al.*, 2020).

### Importancia del Cultivo de Tomate

El Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una hortaliza de gran importancia a nivel mundial, es afectado por el ataque de insectos y diferentes fitopatógenos que afectan su producción. Una de las enfermedades bacterianas que atacan al cultivo de tomate es el cáncer bacteriano, causada por *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*, es una enfermedad de mayor importancia a nivel mundial por las pérdidas de plantas que ocasiona y los daños que presenta en la calidad de los frutos, causando pérdidas entre 50 y 100% de la producción (Guerrero *et al.*, 2017).

El tomate es la hortaliza más cultivada y consumida a nivel nacional e internacional, siendo México uno de los principales países productores. Presenta mayor valor económico, es cultivado en diferentes países donde destacan China, India, Estados Unidos, México y Egipto (Reyes *et al.*, 2020).

Las plagas y enfermedades son un factor biótico importante en el cultivo de tomate ya que disminuye significativamente la producción, existen más de 200 enfermedades asociadas a las solanáceas de diversas etiologías. Para el control eficiente de las enfermedades, se requiere analizar las mejores alternativas posibles que reduzcan las pérdidas de producción (Srinivas *et al.*, 2019).

El tomate es fundamental e importante por su alto contenido de vitaminas y carotenos que hace que se incorpore a la dieta humana ya que presenta propiedades que favorecen a la salud. Este alimento es una fuente valiosa de nutrientes esenciales como el potasio, ácido fólico y la vitamina C (Peña *et al.*, 2016).

### **Producción Nacional**

México es uno de los principales países productores de tomate en el mundo, la mayor producción de este cultivo está en los estados de: Sinaloa, Michoacán, Guanajuato y Sonora. En los últimos años la producción de tomate en México ha sido afectado por problemas de sequías y enfermedades fitopatógenas, sin embargo, se ha mantenido resistente y sigue siendo importante para la economía Mexicana (Sader, 2021).

El tomate (*Solanum lycopersicum*) a nivel mundial se considera como una de las hortalizas más importantes debido a su uso industrial, la producción ha ido en aumento en los últimos años 9.5%. A nivel nacional el cultivo de tomate se encuentra entre las hortalizas más importantes debido a los niveles de producción, sembrando alrededor de 81,000 ha donde se obtienen cerca de 2 millones de toneladas (FAOSTAT, 2015).

## Estados productores de Tomate en México

En 2021 los principales Estados productores de tomate en México fueron Sinaloa, San Luis Potosí, Michoacán, Jalisco y Baja California Sur, que en conjunto aportaron el 53.3% de volumen nacional, equivalente a 1,772,966 toneladas. Sinaloa sobresalió con una producción de 677.612 toneladas, lo que equivale el 20.4% del total nacional. Esta cantidad provino de la cosecha de 12,110 hectáreas, lo que representa el 25.3% de toda la superficie del país destinada a este cultivo (Sader, 2021).

## Enfermedades del Tomate

### *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*

En México, *Cmm* es una enfermedad de gran importancia en el cultivo de tomate ya que causa pérdidas económicas estimadas en 40 millones de dólares anuales. Esta bacteria causa daño en los vasos del xilema, presenta síntomas de marchitez, clorosis en las hojas, se puede diseminar mediante semillas, uso de plántulas, herramientas infectadas (Yuqing *et al.*, 2018).

El primer informe científico sobre el cáncer bacteriano fue documentado por Erwin Smith a principios de la década de 1900. Este brote ocurrió cerca de Grand Rapids, Michigan; por lo tanto, la enfermedad se denominó "la enfermedad del tomate de Grand Rapids" que se planteó como causada por *Bacterium michiganense* (Smith 1910). Desde el primer aislamiento en 1909, este patógeno se ha detectado a nivel mundial, convirtiéndose en un problema económicamente desafiante para los productores de tomate de todo el mundo.

*Clavibacter michiganensis* es la especie del género *Clavibacter*, pertenece al filo Actinobacteria. Hasta la fecha, se han reportado seis subespecies diferentes causantes de enfermedades en plantas, incluyendo *C. michiganensis* subsp *michiganensis*, causante de la enfermedad bacteriana del cáncer en tomate (*Solanum lycopersicum*) (Davis *et al.*, 1984).

*Clavibacter michiganensis* incluye varias subsp que afectan a diferentes cultivos. La subsp *Sepedonicus* causante de la enfermedad de podredumbre anular en la papa (*Solanum tuberosum*); subsp *nebraskensis* causa marchitez y tizón en el maíz (*Zea mays*); subsp

*insidiosus* provoca marchitez y crecimiento lento en la alfalfa (*Medicago sativa*); subsp *tessellarius* causa pecas y manchas foliares en el trigo (*Triticum aestivum*); y la subsp *phaseoli* causante del amarillamiento de las hojas en el frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Ji Oh *et al.*, 2016).

Las plantas de tomate infectadas por *Clavibacter michiganensis* pueden presentar diversos síntomas, como marchitez en un solo lado de las hojas, lesiones cancerosas en el tallo e incluso la muerte completa de la planta. La severidad de estos síntomas varía según los factores como la etapa de desarrollo de la planta al momento de la infección, la agresividad de la bacteria y las condiciones ambientales. Esta bacteria se propaga principalmente por los tejidos vasculares (Benchlih *et al.*, 2023).

Varios factores explican la severidad de los síntomas que causa *Cmm*, entre ellos está la edad de la planta, algunas variedades de tomate susceptibles a esta enfermedad, algunas pueden ser asintomáticas o desarrollar marchitez lenta, *Cmm* se multiplica rápidamente en los vasos del xilema que le permite colonizar rápidamente (Rivera *et al.*, 2022).

*Cmm*, es una enfermedad que puede propagarse rápidamente y también puede provocar grandes pérdidas de la producción, la gravedad de la enfermedad depende de la susceptibilidad de la planta y de las condiciones ambientales. Las temperaturas óptimas para el desarrollo de los síntomas son de (25–28 °C) (Abo-Elyousr *et al.*, 2019).

*Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* es la bacteria que causa el cáncer bacteriano del tomate, fue identificada por primera vez en 1910 en Michigan, Estados Unidos. Inicialmente se creía que era un parásito que afectaba al floema de la planta, pero investigaciones posteriores demostraron que en realidad invade al xilema (Sen *et al.*, 2014).

*Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* puede contaminar las semillas tanto en la superficie como internamente, ingresando a través de la cubierta y llegar al endospermo. Una vez establecida, puede causar una infección sistémica que se propaga por toda la planta. Cuando la bacteria invade los tejidos vasculares, provoca marchitamiento de las

hojas y folíolos, hasta el marchitamiento total de la planta, esta enfermedad se propaga con rapidez causando una pérdida significativa en la producción (Nandi *et al.*, 2019).

*Clavibacter michiganensis subsp michiganensis* es una bacteria Gram positivo, tiene forma de bacilos irregulares que no forman esporas, es el agente causal del marchitamiento y cáncer bacteriano del cultivo de tomate, es considerada una de las enfermedades más contagiosas y destructivas de este cultivo. Esta bacteria es un patógeno transmitido por semilla que se presenta en diferentes áreas de producción de tomate en todo el mundo que ha causado epidemias devastadoras, lo que ha provocado grandes e importantes pérdidas financieras en la producción en invernadero y en campo (Chalupowicz *et al.*, 2017).

La enfermedad del cáncer bacteriano del tomate causado por *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis* se descubrió en 1993 en Irán, se convirtió en una amenaza para la industria multimillonaria del tomate del país durante la última década. Inspecciones en campo mostraron que el patógeno se está propagando hacia las regiones sur y este del país. Además, mediante análisis de secuencias de múltiples loci y tipificación genética (MLSA/MLST), utilizando cinco genes esenciales (*atpD*, *gyrB*, *ppk*, *recA* y *rpoB*), se determinó que 37 cepas de *C. michiganensis subsp michiganensis* aisladas en Irán presentan una alta variabilidad genética (Ansari *et al.*, 2019).

*Clavibacter* spp son patógenos bacterianos de plantas, importantes económicamente que causan daño a diversos cultivos agrícolas como: alfalfa, maíz, pimienta, papa, tomate y trigo. Varias especies fitopatógenas del género, por ejemplo: *C. michiganensis* sensu stricto y *C. sepedonicus*, que infectan plantas de tomate y papa, están incluidos en la lista A2 (de alto riesgo) de patógenos de cuarentena de la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (EPPO). Aunque las especies asociadas al tomate de *Clavibacter* spp. representan una parte significativa de la diversidad genética del género, solo las cepas que pertenecen a *C. michiganensis* sensu stricto (anteriormente *C. michiganensis subsp michiganensis*) causan la enfermedad del cáncer bacteriano del tomate (Osdaghi *et al.*, 2020).

Los métodos más utilizados para el control de *Cmm* es el uso de diversos productos químicos y antibióticos sintéticos. Sin embargo, la aplicación de estos agroquímicos ha generado preocupaciones sobre la contaminación ambiental y efectos en la salud humana. El control químico es costoso y no eficiente en el manejo del cáncer bacteriano, por ello los investigadores han desarrollado alternativas más eficientes y seguras para la enfermedad (Rani *et al.*, 2020).

### **Control Biológico**

Una opción para controlar las enfermedades en los cultivos es el control biológico, que implica el uso de organismos vivos o sustancias producidas por ellos mismos para prevenir o reducir el daño causado por patógenos que afectan a las plantas. Su aplicación en el control de plagas y enfermedades es común, sin embargo, en la actualidad cada vez se descubren más microorganismos con actividad antimicrobiana a fitopatógenos y esto los hace potencialmente útiles en este tipo de control (Reyes *et al.*, 2015).

El control biológico de enfermedades en plantas se fundamenta en el uso de microorganismos antagonistas presentes en el suelo, que pueden inhibir o reducir la actividad de los patógenos que causan enfermedades. Esta estrategia forma parte del manejo integrado de enfermedades (Naeini *et al.*, 2010).

Es el uso de elementos de la naturaleza para contrarrestar el daño por microorganismos causantes de enfermedades en las plantas y disminuir la densidad de población o el impacto de un organismo plaga específico (Meehan *et al.*, 2011).

Uno de los métodos más utilizados para controlar las pérdidas en los cultivos agrícolas por organismos o plagas que causan enfermedades, es el uso de pesticidas, que son sustancias químicas que producen efectos indeseados sobre el ecosistema, induciendo a la generación de organismos resistentes, persistencia ambiental de residuos tóxicos, contaminación de suelos, lo cual altera el equilibrio ecológico. Actualmente, en el sector agroindustrial se busca reducir tanto los costos de producción como los residuos presentes de pesticidas en los cultivos y en el medio ambiente. En este contexto, el control biológico



se presenta como una alternativa para el manejo de plagas, al ser una estrategia sostenible y menos contaminante (Medina *et al.*, 2011).

Las bacterias y hongos biocontroladores como *Trichoderma* y *Bacillus* afectan directamente a los fitopatógenos mediante varios modos de acción como son: parasitismo, donde la síntesis de enzimas degradadoras de la pared celular tiene gran importancia, antibiosis, mediante la biosíntesis y la liberación de compuestos con capacidad para matar o impedir el crecimiento a los fitopatógenos (rasgo que es predominante en las bacterias biocontroladoras) y competencia por espacio y nutrientes, que se presenta tanto en hongos como en las bacterias biocontroladoras (Moreno *et al.*, 2018).

### ***Bacillus amyloliquefaciens***

El género *Bacillus* ha sido ampliamente estudiado debido a su alta abundancia y diversidad en los agro sistemas, siendo significativamente mayor su población en comparación a otros géneros microbianos y además por sus capacidades metabólicas destacando su capacidad para producir antibióticos y otros metabolitos antimicrobianos y antifúngicos (Villareal *et al.*, 2017).

Algunos microorganismos como las rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas pertenecientes al orden baciliales, son conocidos por su actividad antagonista. *Bacillus amyloliquefaciens* de la familia *Bacillaceae*, produce resistencia sistémica inducida en la planta huésped y es capaz de generar una variedad de compuestos antimicrobianos (Hernández *et al.*, 2022).

Las rizobacterias aeróbicas formadoras de endosporas pertenecientes a *B. amyloliquefaciens* subsp *plantarum* son conocidos por mejorar el rendimiento de las plantas y por su función de biocontrol contra los patógenos de las plantas. La cepa tipo de la subespecie FZB42T, se utiliza comercialmente como bacteria de biocontrol siendo especialmente eficaz contra patógenos fúngicos y bacterianos (Soumitra *et al.*, 2015).

*B. amyloliquefaciens* es una bacteria no patógena que vive en el suelo, se ha utilizado para el control de las enfermedades en el cultivo de tomate mediante la producción de una

variedad de compuestos biológicamente activos, con un amplio espectro de actividades hacia fitopatógenos que son capaces de inducir resistencia sistémica del huésped (Gautam *et al.*, 2019).

El análisis del genoma completo de *B. amyloliquefaciens* FZB42 es una bacteria Gram positiva, tiene capacidad de producir un espectro diverso de diferentes metabolitos secundarios destinados a suprimir los microbios y nematodos dañinos que viven dentro de la rizosfera de la planta (Borriss, 2013).

Las cepas de *B. amyloliquefaciens* tienen muchos genes dedicados a la producción de sustancias incluidas fitohormonas que estimulan el crecimiento de las plantas, polisacáridos para la formación de biopelículas, sideróforos para la solubilización del hierro, enzimas líticas y una gama de policétidos sintetizados no ribosómicos y lipopéptidos para inhibir patógenos. En vivo, *in vitro* y ensayos de campo, se informó que *B. amyloliquefaciens* promueve el crecimiento de las plantas a través de la producción de hormonas, compuestos orgánicos volátiles, sideróforos (Zhao *et al.*, 2022).

Los metabolitos primarios y secundarios de *B. amyloliquefaciens* se pueden utilizar en aplicaciones alimentarias y médicas. Algunos de estos productos incluyen EPS microbiano que tiene aplicaciones funcionales que incluyen la actividad antiviral, antitumoral, anticancerígena, inmunomoduladora y antioxidante. El otro es la síntesis de lipopéptidos, que son metabolitos secundarios, que incluyen principalmente serrawettin, surfactin y viscosin. Estos lipopéptidos tienen funciones múltiples que incluyen antimicrobianos, antivirales, antiinflamatorios y anti adhesivos (Yohannes *et al.*, 2020).

La promoción del crecimiento vegetal de las bacterias del género *Bacillus* puede ocurrir de manera directa o indirecta. De forma directa estas bacterias pueden influir en el crecimiento de las plantas al realizar actividades como la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de minerales esenciales como es el fósforo y la producción de hormonas que regulan el crecimiento vegetal, de forma indirecta, contribuye a la producción de

compuestos que inhiben el desarrollo de patógenos y estimulan los mecanismos de defensa en las plantas (Tejera *et al.*, 2011).

### ***Trichoderma harzianum***

Los microorganismos que se utilizan con frecuencia para el control de hongos fitopatógenos son hongos y bacterias. Varios estudios científicos han demostrado que los hongos del género *Trichoderma sp.* muestran efectos antagónicos contra fitopatógenos (López *et al.*, 2017).

En la actualidad se recurre al uso de estos organismos en el control biológico como antagonista sobre distintos patógenos por la producción de metabolitos secundarios. El género *Trichoderma* presenta amplio espectro de aplicación agrícola sobre bacterias, parásitos e insectos (Mesa *et al.*, 2019).

*Trichoderma* pertenece al Reino *Mycetae* (Fungi), División Eumycota, Subdivisión Ascomycotina, Clase Euascomycetes, Orden Hypocreales, Familia Hypocreaceae. Son hongos anaerobios facultativos y se encuentran distribuidos alrededor del mundo colonizando material celulósico y la rizosfera de las plantas, se caracteriza por presentar coloración blanca, verde, amarillo en el medio de cultivo (Bissett *et al.*, 2015)

Los hongos filamentosos del género *Trichoderma*, que pertenecen a la familia Hypocreaceae, se encuentran en todo el mundo, colonizando suelos, madera y hortalizas en descomposición. Estos hongos tienen una amplia variedad de formas de vida y que pueden interactuar con otros hongos, animales y plantas, lo que les otorga una flexibilidad ecológica. Además poseen capacidad enzimática para descomponer diferentes tipos de sustratos, un metabolismo adaptable y resistencia a sustancias que inhiben el crecimiento microbiano (Gupta *et al.*, 2014).

Se ha investigado durante varios años los mecanismos de control biológico de las especies de *Trichoderma spp.* su capacidad antagónica está documentada como agentes de biocontrol de patógenos que afectan a cultivos de importancia agrícola y económica. Las

cepas de *Trichoderma* producen enzimas, compiten por espacio y nutrientes al reducir o detener completamente el desarrollo del fitopatógeno, promueven el crecimiento de las plantas e inducen resistencia sistémica, micoparasitismo y antibiosis (Mayo *et al.*, 2015).

*Trichoderma* es un organismo utilizado para control biológico, dentro de los mecanismos responsables de la actividad antimicrobiana de este hongo incluyen el parasitismo y competencia por espacio y nutrientes, *Trichoderma* es capaz de sintetizar diferentes compuestos como proteínas, enzimas y antibióticos. Estudios recientes han demostrado que *Trichoderma spp* secreta grandes enzimas de lisis, como celulasas, quitinasas y glucanasas, durante el micoparasitismo (Valenzuela *et al.*, 2015).

Varios estudios han demostrado la efectividad que tienen las especies del género *Trichoderma* ya que presenta diferentes mecanismos de acción, tales como micoparasitismo, competencia por espacio, antibiosis e inducción de resistencia sistémica. El género *Trichoderma* se caracteriza por la coloración que presenta en los medios de cultivo, que varía entre blanco, verde y amarillo, en la parte superior del cultivo. Entre sus características microscópicas se observan tres tipos de propágulos denominados hifas, clamidosporas y conidios hialinos no verticilados (Gajera *et al.*, 2013).

Estudios realizados han demostrado los efectos positivos del control biológico de *Trichoderma spp*. Esto se debe a que estimula resistencia en la planta ya sea localizada o en todo el organismo, mediante la producción de enzimas antifúngicas, como las quitinasas y las  $\beta$ -1,3-glucanasas. Estas enzimas están relacionadas en la descomposición de la pared celular de los hongos y trabajan en conjunto con otras enzimas, para controlar a los hongos que causan enfermedades en las plantas (Martínez *et al.*, 2017).

### **Micoparasitismo**

Es el ataque directo de una especie fúngica sobre otra, es uno de los mecanismos antagónicos más importantes expresados por *Trichoderma spp*. Alrededor de 75 especies de *Hypocrea/Trichoderma* con potencial micoparásito han sido reportadas previamente. Hay investigaciones que indican que varias cepas de *Trichoderma* atacan y desintegran

hongos fitopatógenos, como son: *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea*, *Pythium* spp. y *Ustilago maydis* (Kapoor *et al.*, 2020).

### **Antibiosis**

La antibiosis es la acción directa de metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro, muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico, estas sustancias inhibidoras son consideradas “antibióticos” (Osorio *et al.*, 2017).

Recientemente caracterizaron un grupo de metabolitos secundarios (azapilona, butenolide, 6-pentil-á-pirona, 1-hidroxi-3-metil-antraquinona, 1,8-dihidroxi-3-metil-antraquinona, ácido heptelídico, trichoviridina, ácido harziánico, gliotoxina, gliovirina, viridina, viridiol) obtenidos de la interacción entre *R. solani* y dos cepas comerciales de *T. harzianum* (T22 y T39) (Martínez *et al.*, 2013).

### **Extractos Vegetales**

Los extractos de plantas han sido usados por el hombre para el control de enfermedades bacterianas y antifúngicas. Se han reportado las propiedades antimicrobianas y antifúngicas que tienen los aceites esenciales de las plantas (Delgadillo *et al.*, 2017).

Los métodos para el control de enfermedades se han estudiado con énfasis en nuevos compuestos derivados de plantas, como aceites esenciales y extractos vegetales ya que son más seguros tanto para los consumidores como para el medio ambiente y es efectivo contra patógenos que han desarrollado resistencia a los plaguicidas, así como en el control de enfermedades que aparecen después de la cosecha. Varios estudios han comprobado la eficacia de las plantas en el control de enfermedades causadas por hongos del género *Fusarium* (Villa *et al.*, 2015).

Los compuestos fenólicos son de considerable importancia fisiológica y morfológica en plantas, son importantes en el crecimiento y la reproducción de las mismas. Estos metabolitos tienen características estructurales. Además se ha demostrado que el tipo de solvente y método de extracción utilizado influye en la extracción de estos fitoquímicos (Azmir *et al.*, 2013)

La selección inicial de plantas para posibles actividades antimicrobianas generalmente comienza usando el crudo o extracciones con alcohol y pueden ser elaborados por varios métodos de extracción con solventes orgánicos. El agua es un solvente universal utilizado para extraer productos vegetales con actividad antimicrobiana (Singh *et al.*, 2012).

Los tipos de extractos están relacionados al solvente usado para su elaboración los más comunes son: etanólicos, hexánicos, cetónicos, metanólicos, oleosos y acuosos (Centurión *et al.*, 2013).

En los últimos años, el incremento de bacterias resistentes y la rápida emergencia de nuevas infecciones han disminuido la intensidad en la eficiencia de los antibióticos para tratar enfermedades causadas por ciertos microorganismos, por lo tanto, aumenta la necesidad para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos. En respuesta a estas necesidades se ha recurrido a la fitoquímica y a la Fito farmacología, logrando encontrar nuevas moléculas extraídas de plantas, ya que son una fuente importante de sustancias activas con propiedades antibacterianas (Vallejo *et al.*, 2014).

### **Composición química de los extractos de plantas**

La polaridad del solvente es factor clave en el tipo de compuesto que se va a extraer a partir de las hojas de las plantas. En extractos acuosos se pueden obtener compuestos como antocianinas, taninos, saponinas y terpenoides, en extractos obtenidos con etanol pueden ser extraídos taninos, polifenoles (flavonoles), terpenoides y alcaloides. En extractos metanólicos se ha reportado la presencia de compuestos fenólicos (antocianinas y flavonoles), terpenoides, saponinas y taninos, con cloroformo se han obtenido terpenoides y flavonoides (Ramírez *et al.*, 2018).

### ***Larrea tridentata***

*L. tridentata* o gobernadora se ha estudiado que más de 45 bacterias son susceptibles a la resina o sus componentes que esta contiene, así como las levaduras, hongos y parásitos intestinales que atacan a los humanos. Los compuestos presentes en la gobernadora como los flavonoides actúan contra virus que afectan el RNA (Morales *et al.*, 2021).

De los compuestos fenólicos bioactivos más estudiados e importantes de la gobernadora es el ácido nordihidroguayartico (NDGA), es un antioxidante que se encuentra en la resina de las células cercanas a las capas epidérmicas de las hojas y tallos que está presente en todas las especies del género, estudios sobre *L. tridentata* realizados en el desierto de Sonora revelaron que las concentraciones del ácido nordihidroguayartico (NDGA) varían dependiendo de la latitud y la época del año (Peñuelas *et al.*, 2017).

*Larrea tridentata* es un arbusto perenne de México y Estados Unidos que se utiliza para tratar diversas enfermedades, es reconocida por sus diversos usos tradicionales. En cuanto a su composición química, predominan los productos de las vías del mevalonato, shikimato y malonato. *L. tridentata* posee ácido nordihidroguayartico (NDGA), uno de sus metabolitos secundarios más estudiados que exhibió notables actividades biológicas (Morales *et al.*, 2022).

### **Metabolitos secundarios**

Las plantas han evolucionado diversos mecanismos para defenderse contra factores de estrés, tanto de origen biológico como ambiental. Entre estas defensas se encuentran estructuras físicas como espinas, tricomas, pelos glandulares y espigas, que impiden el ataque de herbívoros. Además, como parte de su defensa química, muchas plantas producen metabolitos secundarios, los cuales tienen propiedad antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, nematocida y farmacológico (Soto *et al.*, 2022).

### ***Solanum elaeagnifolium***

Presenta efectos positivos para el ser humano ya que contiene cantidad de fenoles, alcaloides, saponinas, terpenos, flavonoides, cumarinas y carotenoides donde se ha

demostrado que tienen propiedades anticancerígenas, antioxidantes, antihipertensivas, antidepresivas, antiinflamatorias, hipoglucémicas, antibacterianas y también presenta actividad molusquicida y nematocida (Al-Hamaideh *et al.*, 2020).

En 2010 se reportó en Estados Unidos que el trompillo (*Solanum elaeagnifolium*) es una maleza invasora de América que se extendió al sur de Europa, África, India y Australia. Se describe como una planta exótica, perenne e invasora, que se encuentra principalmente en zonas de clima seco en América. Puede alcanzar una altura de entre 10 y 100 cm, sus tallos están protegidos por espinas, y tanto las hojas como los tallos están cubiertos por una estructura vellosa que le da a la planta un aspecto plateado o grisáceo (Roberts *et al.*, 2022).

Se ha demostrado que la composición química de *S. elaeagnifolium* depende del solvente de extracción. Se han realizado extractos y estudios fitoquímicos de hojas utilizando como solvente, etanol y se ha encontrado la presencia de taninos, flavonoides, esteroides, alcaloides y saponinas (Rajalakshmi *et al.*, 2016).

*S. elaeagnifolium* es conocida por su nombre común como trompillo, es una planta robusta perenne, sus raíces pueden alcanzar hasta dos metros de profundidad, sus hojas son de color verde a plateado grisáceo con un tamaño de 1 a 10 cm (Cirujeda *et al.*, 2011).

Es ampliamente distribuida en el norte de México, crece en matorrales, pastos, es considerada una maleza para cultivos agrícolas y es altamente tóxica para el ganado. Los extractos se utilizan en la medicina popular mexicana, que contienen solasodina,  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol. *Solanum elaeagnifolium* tiene propiedades antivirales y antifúngicas, contiene saponinas esteroidales y glicoalcaloides como solasonina (Carranza *et al.*, 2017).

Las flores de *S. elaeagnifolium* tienen una estructura de cinco pétalos (pentámeras), con una corola en forma de estrella. Los lóbulos de la corola tienen una forma triangular o en delta, y entre los pétalos se encuentra un tejido que conecta entre sí, denominado tejido interpetalar, las anteras son de forma cónica alargada, dehiscentes, suelen ser



heteromórficas y en general son ligeramente curvadas, el androceo se caracteriza por la formación de un cono anteral y el estilo es largo, curvado, pubescente en la parte basal con tricomas estrellados (Mancini *et al.*, 2021).

*Solanum elaeagnifolium* es una especie perteneciente a la familia *Solanaceae*, se conoce por contener glicoalcaloides, los cuales son un tipo de alcaloides esteroideos. Entre estos compuestos, los más identificados en la planta son la  $\alpha$ -solanina y la solanidina. Análisis fitoquímicos han revelado la presencia de compuestos como taninos, flavonoides, terpenos, glucósidos cardenólidos y saponinas terpénicas (Hernández *et al.*, 2017).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del Experimento

La presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), ubicada en calzada Antonio Narro 1923, en Saltillo, Coahuila de Zaragoza. Además, el experimento de laboratorio, se desarrolló en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología.

### Aislamiento y Caracterización del fitopatógeno

El patógeno se obtuvo mediante plantas que presentaban síntomas de *Cmm*, que fueron recolectadas en un lote comercial de la ciudad de Querétaro. Primeramente se realizó la desinfección superficial de las muestras, posteriormente se seleccionaron tejidos donde presentaban los síntomas y se procedió a realizar maceración con agua destilada estéril. La siembra se realizó por el método de diluciones seriadas en medio de cultivo KB, después se incubaron a  $26 \pm 2^\circ \text{C}$  durante 48h. Para la caracterización de la bacteria, se realizaron las pruebas preliminares correspondientes, de acuerdo a la metodología de (Schaad *et al.*, 2001): Tinción de Gram, reacción de KOH, reacción de hipersensibilidad en tabaco, prueba de O/F, prueba de oxidasa, catalasa,  $\text{H}_2\text{S}$  de peptona, hidrólisis de esculina, hidrólisis de gelatina y tolerancia de NaCl al 6%.

### Tinción de Gram

La prueba se realizó colocando una gota de agua en el portaobjetos limpio, se tomó muestra del patógeno de 48 h de edad con un asa bacteriológica y se extendió mezclando el agua con el patógeno, después se fijó con calor evitando que este se sobrecaliente, posteriormente se agregó cristal violeta, se reposo por 60 seg, se enjuago con agua corriente de la llave escurriendo el exceso de agua, después se agregó yodo Lugol se reposo por 60 seg, se lavó con etanol al 95% durante 30 seg y se enjuagó con agua corriente para después teñir con colorante safranina durante 60 seg, se enjuago con agua y se dejó secar a medio ambiente. Finalmente la muestra se observó en microscopio compuesto con aumento de 100X utilizando aceite de inmersión.

### Reacción de KOH

Para esta prueba se utilizó un portaobjetos limpio donde se agregó una gota de solución acuosa de KOH al 3%. Posteriormente se tomó una pequeña muestra del cultivo puro de la bacteria de 48 h de edad con ayuda de un asa bacteriológica y se mezcló con la solución de KOH, al mismo tiempo se levantó el asa para poder observar la consistencia de la mezcla.

### Reacción de hipersensibilidad en tabaco

Para llevar a cabo esta prueba, se inoculó una planta de tabaco con *Cmm* con ayuda de una jeringa, por otra parte se inoculó con agua estéril como control. Posteriormente se observó el efecto a las 24 h y 48 h, donde se pudo observar en la parte inoculada con la bacteria que presentó marchitez.

### Prueba de O/F (Hugh y Leifson)

Se preparó el medio utilizando los siguientes reactivos: Peptona de caseína, Cloruro de sodio (NaCl), Fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Azul de bromotimol (solución acuosa al 1%) y Agar, se mezclaron homogéneamente en un matraz Erlenmeyer de 125 mL ajustando el pH a 7.1 y se esterilizó a 121°C durante 20 min. Se preparó una solución acuosa de glucosa al 10% y se esterilizó por filtración agregándolo al matraz con el medio basal. Después se vertió en tubos de ensayo de 4.0 mL hasta solidificar. Se incubaron por 48 h para descartar algún tubo contaminado, posteriormente se inocularon 3 tubos con el patógeno donde a uno se le agregó 1 mL de aceite mineral triple estéril a una profundidad de 5 mm el otro se inoculó sin aceite mineral y el tercer tubo no se inoculó ya que fue el testigo. Se incubaron a 26° C y se mantuvieron en observación por 24 y 48 h.

### Prueba de Oxidasa

Primeramente se utilizó el cultivo de 48 h de edad, se tomó con un asa bacteriológica una porción de la bacteria *Cmm* colocándola sobre una placa de oxidasa (BD BBL™ DrySlide™) que contiene el compuesto N,n,n,n-tetrametil-p-fenilendiamina dihidrocloruro y se frotó. El resultado se interpretó a los 10-30 seg.

### Prueba de Catalasa

Para esta prueba se utilizó un cultivo puro de 48 h de edad y peróxido de hidrogeno al 3.5% ( $H_2O_2$ ). Se colocó una pequeña porción de la bacteria a un portaobjetos limpio, se mezcló con una gota de  $H_2O_2$  hasta detectar la formación de burbujas.

### Prueba de $H_2S$ de peptona

Se preparó medio de cultivo con fosfato de amonio ( $NH_4H_2 PO_4$ ), Sulfato de Potasio dibásico ( $K_2HPO_4$ ), Sulfato de Magnesio ( $MgSO_4 \times H_2O$ ), Cloruro de Sodio (NaCl), extracto de levadura, se sustituyó peptona por cisteína, todos los reactivos se disolvieron homogéneamente y se vaciaron 5 mL en tubos de ensaye, luego se esterilizaron en autoclave a  $121^\circ C$  durante 20 min. Posteriormente se inocularon 2 tubos con el patógeno con ayuda de un asa bacteriológica antes de que solidificara, después se colocó una tira de papel filtro de 1x10 cm, antes de colocarlo en el tubo inoculado este se sumergió en una solución de acetato de plomo al 5%, posteriormente se tapó el tubo sujetando la tira de papel filtro. Después se incubó durante 14 días.

### Prueba de Hidrólisis de Esculina

Para esta prueba, se preparó el medio de cultivo con peptona, esculina, citrato de amonio férrico, agar y agua destilada. Todos los reactivos se mezclaron homogéneamente y se calentó para disolver, se dispuso 5mL de la mezcla en cada tubo de ensaye, después se esterilizo en autoclave a  $121^\circ C$ , 15 libras por pulgada durante 15 min y se solidifico de manera inclinada. Posteriormente se inoculo la bacteria mediante una estría sobre la superficie del medio y se incubó durante 24 y 48 h a  $28^\circ C$ .

### Prueba de Hidrólisis de gelatina

Se preparó medio de cultivo con Peptona, Cloruro de sodio (NaCl), Extracto de carne, gelatina, Agar y Agua, se mezclaron todos los reactivos calentando gradualmente, para la integración homogénea, después se esterilizo en autoclave a  $120^\circ C$  durante 20 min, después se vació en tubos de ensaye hasta solidificar, posteriormente se inoculó la bacteria de 48 h de edad con ayuda de un asa bacteriológica y se incubó a  $26^\circ C$  por 24 horas.

### Tolerancia de NaCl al 6%

Para esta prueba se preparó un caldo YS con fosfato de amonio ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ), Sulfato de Potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), Sulfato de Magnesio ( $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ), Cloruro de Sodio (NaCl) y Extracto de levadura, se disolvieron homogéneamente en un matraz de 125 mL y se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min. Después se vació en tubos de ensaye, posteriormente se inoculó el patógeno con ayuda de un asa bacteriológica. Se incubaron a 26° C y se mantuvieron en observación durante 24 y 48 h, se observó una reacción positiva ya que el tubo con el medio presento turbidez.

### Corroboración molecular del fitopatógeno.

La extracción de ADN genómico se realizó por el método de lisis cruda con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB 2%) (Labarrios *et al.*, 2004), a partir de un cultivo bacteriano puro de *Cmm* cultivado en un agitador rotatorio a 120 rpm, en medio de cultivo LB durante 48h. Para la reacción de PCR se utilizaron los primers específicos (CMM-5F GCGAATAAGCCCATATCAA y CMM-6R CGTCAGGAGGTCTGCTAATA) para este patógeno (Rivera *et al.*, 2022). La secuenciación de las regiones parciales del gen 16S rRNA se llevó a cabo por el laboratorio IPICYT, previamente las secuencias obtenidas se limpiaron y alinearon utilizando el Software CodonCodeAligner, posteriormente se compararon con las reportadas en la base de datos del NCBI del GenBank.

### Preparación de Extractos Vegetales

Se utilizaron plantas de *Larrea tridentata* y *Solanum elaeagnifolium*, recolectadas en el ejido La Encantada y Buenavista Saltillo, Coahuila, posteriormente se seleccionaron las hojas que estaban libre de daños por insectos o enfermedades. Se lavaron con agua de la llave y luego con agua destilada estéril para eliminar cualquier partícula de polvo que están pudieran presentar, posteriormente se secaron en papel estraza, después se colocaron y se mantuvo en la estufa de secado a 40 °C hasta que se eliminó toda la humedad. Las hojas deshidratadas se molieron en una licuadora hasta obtener un tamaño de partícula pequeña, el polvo obtenido se colocó en frascos de vidrio ámbar para protegerlo de la luz. Posteriormente se llevó a cabo la preparación de los extractos hidroalcohólicos de *Larrea tridentata* y *Solanum elaeagnifolium* utilizando dos solventes (etanol y agua). Para la

obtención de los extractos se pesaron 120 g de polvo (*Larrea tridentata*) de las hojas deshidratadas y se agregaron en un matraz Erlenmeyer con 800 mL del solvente, para *solanum elaeagnifolium* se pesaron 97.5 g de polvo en 650 mL de solvente, posteriormente se mantuvieron durante 7 días en ausencia de luz a 26 °C. Después se llevó a cabo el filtrado de los extractos con un embudo, gasa estéril de algodón y papel filtro Whatman del número 2 para obtener la parte líquida y separar el sólido, finalmente se centrifugaron durante 15 min a 4000 rpm. Posteriormente el sobrenadante se recolectó en frascos de vidrio ámbar y se mantuvieron a 4 °C (Tiwari *et al.*, 2011).

#### **Actividad inhibitoria *in vitro* contra *Cmm* con extractos de *Larrea tridentata* y *Solanum elaeagnifolium*.**

La evaluación de los extractos vegetales se realizó por la técnica de medio envenenado con medio de cultivo KB (Peñuelas *et al.*, 2015). Una vez teniendo el medio preparado, antes de solidificar se agregó el extracto de *Larrea tridentata* así como también de *Solanum elaeagnifolium*, posteriormente se vació el medio en cajas Petri, con 4 repeticiones para cada concentración. Las concentraciones evaluadas para ambos extractos fueron: *L. tridentata* (50, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 4500, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10 000 ppm). *S. elaeagnifolium* (5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10 000, 20 000, 25 000, 50 000 ppm). Una vez que se obtuvo la placa envenenada se procedió a agregar 100 µL del patógeno (*Cmm*), a una concentración de Mc Farland de  $1 \times 10^8$ , la siembra se realizó por dispersión con una varilla de vidrio. A las 48, 72 horas de incubación se observó el crecimiento bacteriano de *Cmm*, posteriormente se tomaron fotos de cada caja y se realizó un análisis de imagen utilizando el software ImageJ.JS versión 0.5.8 para evaluar la inhibición del crecimiento bacteriano. El experimento se distribuyó en un diseño completamente al azar. Los resultados obtenidos fueron analizados usando el programa SAS versión 9.0. Se determinó la  $CI_{50}$  y  $CI_{90}$  utilizando un análisis Probit.

#### **Actividad antagónica *in vitro* de *T. harzianum* y *B. amyloliquefaciens* contra *Cmm*.**

La evaluación de microorganismos antagónicos contra el fitopatógeno (*Cmm*) se realizó por medio de cultivos duales (Ezziyyani *et al.*, 2007) con medio Agar nutritivo, se utilizaron cepas de *Trichoderma harzianum* y de *Bacillus amyloliquefaciens* tomados de

la colección de microorganismos del Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología. Se utilizó cultivo puro de *Cmm* de 48 h de edad. La confrontación de *Trichoderma* con *Cmm* se realizó sembrando el patógeno de lado izquierdo de la caja mediante una estría con la ayuda de un asa bacteriológica y a la derecha se colocó un disco de micelio de 5 mm de *Trichoderma*. El crecimiento de ambos microorganismos se observó cada 24 h. Para el caso de *Bacillus amyloliquefaciens* contra *Cmm*, se realizó mediante tres métodos, una siembra por estría para ambos microorganismos, a la izquierda de la caja el patógeno y a la derecha el antagonista, otro método fue inocular al centro de la caja Petri el antagonista y en los cuatro puntos cardinales el patógeno, por otra parte, al centro de la caja se inoculó el patógeno (*Cmm*) y en los 4 puntos cardinales el antagonista, esto fue a cierta distancia para poder observar el crecimiento, posteriormente las muestras se observaron cada 24 h por 4 días. Posteriormente se tomaron fotos de cada caja y se realizó un análisis de imagen utilizando el software ImageJ.JS versión 0.5.8 para evaluar la inhibición del crecimiento bacteriano. Los resultados obtenidos fueron transformados en % de inhibición.

### **Control de *Cmm* con extractos vegetales y microorganismos antagonistas en invernadero.**

#### **Establecimiento del experimento en invernadero**

Se trasplantaron plántulas de tomate variedad Floradade, como sustratos se utilizaron: peat moss, perlita y fibra de coco a una proporción: 3:1:1. Posteriormente se sembraron en bolsas de plástico de 10 Kg de capacidad. El diseño experimental fue completamente al azar con 8 tratamientos y 4 repeticiones.

#### **Preparación de los microorganismos antagonistas y de los extractos vegetales**

Se utilizaron cepas de *Trichoderma harzianum* y de *Bacillus amyloliquefaciens*, tomados de la colección de microorganismos del Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología. Se cultivaron en matraces Erlenmeyer con medio de cultivo caldo papa dextrosa adicionado con peptona para *Trichoderma* y extracto de levadura para *Bacillus* (Jung *et al.*, 2014). Posteriormente se inocularon con un disco de micelio de 0.5 mm de diámetro de la cepa de *Trichoderma* y con una asada para el caso de *Bacillus*. Los cultivos

se dejaron en reposo en incubación por 5 días en ausencia de luz. Después del tiempo de incubación se pasaron a través de una gasa estéril para separar el micelio del hongo de la fase líquida. Los cultivos se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/mL para el caso de *T. harzianum* y de  $1 \times 10^8$  ufc para la bacteria *B. amyloliquefaciens*, posteriormente se mantuvo en oscuridad a una temperatura de 4 °C para su conservación. Para los extractos vegetales, la concentración que se utilizó fue la  $CI_{90}$  obtenida de los resultados de la evaluación *in vitro*.

### **Inoculación del patógeno en plantas de tomate**

El patógeno se reactivó en cajas Petri con medio de cultivo KB, después de 48 h de edad se procedió a la inoculación del patógeno en las plantas de tomate haciendo una punción con la ayuda de un palillo estéril en la axila del peciolo de las hojas en tres estratos diferentes (inferior, centro, superior), los tratamientos utilizados fueron: (T1) *B. amyloliquefaciens* + *Cmm*; (T2) *T. harzianum* + *Cmm*; (T3) *S. elaeagnifolium* + *Cmm*; (T4) *L. tridentata* + *Cmm*; (T5) Testigo absoluto; (T6) *L. tridentata* + *S. elaeagnifolium* + *B. amyloliquefaciens* + *T. harzianum* + *Cmm*; (T7) *Cmm* y (T8) *B. amyloliquefaciens* + *T. harzianum* + *Cmm*.

La primera aplicación de los extractos y antagonistas fueron al suelo, alrededor de la base del tallo de la planta se hizo un canal donde se aplicaron 10 mL de cada extracto y 20 mL de cada antagonista con la ayuda de una jeringa hipodérmica, posteriormente se cubrió con el mismo suelo. De la segunda a la cuarta aplicación se realizaron de manera foliar a los 8 días posteriores entre cada aplicación.

### **Evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad**

Para determinar el efecto de control, se evaluó la incidencia de la enfermedad mediante la observación de los síntomas de *Cmm* y se expresó en porcentaje. La severidad se determinó utilizando una escala arbitraria propuesta por Mohd Nadzir *et al.* (2019), de 5 escalas que va de un rango de 0 al 5 que se presenta en el cuadro 1.



**Cuadro 1.** Escala Arbitraria por Mohd Nadzir *et al.* (2019)

<b>Categoría</b>	<b>Descripción</b>
0	Sin síntomas
1	0-25 % de hojas marchitas en la planta.
2	26-50 % de hojas marchitas en la planta
3	51-75 % de hojas marchitas en la planta
4	76-100 % de hojas marchitas en la planta
5	Plantas muertas

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza y separación de medias por la prueba de Tukey con  $P=0.05$  de significancia. Se utilizó el software SAS versión 9.0 para Windows.

### **Efecto de microorganismos antagonistas y extractos vegetales en la promoción de crecimiento y desarrollo**

Para cada tratamiento, se evaluaron diferentes parámetros y de rendimiento para determinar sus efectos sobre el desarrollo de las plantas, entre las variables evaluadas se realizaron mediciones de diámetro de tallo, diámetro polar y ecuatorial de frutos, peso de los frutos así como el peso fresco de las hojas y peso de la raíz. Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza y separación de medias por la prueba de Tukey con  $P=0.05$  de significancia.

#### **Diámetro de tallo**

Para esta variable se midió el tallo principal de la planta, en la base del tallo el cual se midió en milímetros (mm) con la ayuda de un vernier. Esta variable es importante porque un diámetro mayor del tallo puede presentar una planta más vigorosa con mejor eficiencia en el transporte de agua y nutrientes.

#### **Diámetro polar y ecuatorial de frutos**

El diámetro polar del fruto se midió en milímetros (mm) desde el extremo superior (pedúnculo) hasta el extremo inferior, en el caso del diámetro ecuatorial se midió el ancho

del fruto, perpendicular al diámetro polar con un vernier. Estas medidas nos permiten evaluar la forma y el tamaño del fruto ya que son importantes para la calidad y el rendimiento.

#### Peso de frutos

En esta variable, se utilizó una balanza para pesar los frutos de cada tratamiento, registrando el peso en gramos (g), para cuantificar el rendimiento ya que un peso mayor refleja un mejor desarrollo de los frutos.

#### Peso fresco de hojas

Se realizó el peso total de hojas frescas de cada planta de los diferentes tratamientos con ayuda de una balanza expresado en gramos (g). Esta variable refleja el vigor vegetativo y la capacidad fotosintética de la planta, lo cual influye directamente en el crecimiento y la producción.

#### Peso de raíz

Al momento de la cosecha se determinó el peso de las raíces, expresado en gramos (g), previamente lavadas con agua de la llave para eliminar el resto de suelo que pudieran tener. Esta variable es importante ya que un sistema radicular bien desarrollado favorece la absorción de agua y nutrientes.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamiento y caracterización del patógeno

En las pruebas preliminares y bioquímicas realizadas para corroborar la cepa con *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*, previamente aisladas de las muestras de plantas de tomate con síntomas de *Cmm*, se obtuvieron resultados similares a los reportados por Schaad *et al.* (2001) (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Resultados de las pruebas realizadas para la caracterización de *C. michiganensis* subsp *michiganensis* (Schaad *et al.*, 2001).

Prueba Realizada	Resultado
Tinción de Gram	Gram +
Reacción de KOH	-
Reacción de hipersensibilidad en tabaco	+
Prueba de óxido fermentación O/F	+/-
Prueba de Oxidasa	-
Prueba de Catalasa	+
Prueba de H <sub>2</sub> S de peptona	+
Prueba de Hidrólisis de Esculina	+
Prueba de Hidrólisis de gelatina	-
Prueba de Tolerancia de NaCl al 6%	+

(+) Resultado positivo, (-) Resultado negativo, (+/-) Resultado variable.

### Resultados de las pruebas realizadas para la caracterización de *C. michiganensis* subsp *michiganensis*.

#### Tinción de Gram (+)

En esta prueba, la tinción presentó bacilos Gram positivos, se tiñeron de color violeta, la pared celular retiene el color de cristal violeta ya que tienen un mayor contenido de peptidoglicano. Tripathi *et al.* (2025) mencionan que la tinción de Gram comienza

aplicando un colorante primario, como es el cristal violeta o azul de metileno sobre la muestra, los microorganismos que retienen este colorante se denominan Gram positivos y se observan con un tono púrpura bajo el microscopio, poseen una pared celular rica en peptidoglicano. En cambio aquellos microorganismos que no retienen el colorante cristal violeta, se tiñen de rojo y se denominan como Gram negativos, ya que tienen una menor cantidad de peptidoglicano y una mayor proporción de lípidos en su membrana externa.

#### Reacción de KOH (-)

Como resultado, en esta prueba se pudo observar que al separar el asa bacteriológica de la mezcla bacteriana con KOH no se formó la hebra viscosa ya que la bacteria es Gram positiva. La prueba de hidróxido de potasio (KOH) al 3% es una técnica utilizada en fitopatología para diferenciar bacterias Gram positivas y Gram negativas, también para detectar la presencia de hongos en muestras vegetales. En el caso de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*, esta prueba se utiliza para observar la viscosidad de la colonia bacteriana, lo que puede indicar la presencia de polisacáridos extracelulares, esto se observa al mezclar la muestra bacteriana con KOH y forma una hebra viscosa al levantar el asa bacteriológica (Maeso *et al.*, 2012).

#### Reacción de hipersensibilidad en tabaco (+)

La planta de tabaco inoculada con la bacteria *Cmm* presentó marchitamiento a los 2 días alrededor de la zona inoculada, por lo tanto nos indica que la bacteria es fitopatógena. Lu *et al.* (2015) Mencionan que esta prueba permite observar como una planta reacciona frente a una bacteria, observando una necrosis localizada en el área inoculada. En el caso de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*, se ha documentado que esta bacteria no infecta a plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) puede provocar una reacción de defensa como es la reacción de hipersensibilidad (HR), Esta reacción consiste en la muerte celular.

#### Prueba de óxido fermentación O/F (+/-)

Como resultado de esta prueba, en el tubo de control (sin bacteria) no se observó cambio de color, de igual manera en el tubo donde se le agrego aceite mineral triple estéril para

crear condiciones anaeróbicas e inoculado con la bacteria, pero sin embargo en el tubo donde no se le agrego aceite mineral, se observó cambio de color azul a amarillo ya que estaba en condiciones aeróbicas. Esto se refiere a que la bacteria metaboliza carbohidratos por vía oxidativa. Estudios realizados por Sun *et al.* (2019) mencionan que han utilizado la prueba de (O/F) como una herramienta bioquímica para analizar el metabolismo de las bacterias, entre ellas *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*. Esta bacteria es negativa en la prueba de oxidasa y además, no posee la capacidad de fermentar glucosa cuando se encuentra en ambiente sin oxígeno.

#### Prueba de Oxidasa (-)

El resultado de esta prueba, fue negativa para *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* ya que la colonia no se tornó a un color violeta.

La prueba de oxidasa negativa en *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* es una característica para su identificación ya que no produce la enzima oxidasa, lo que la diferencia de otras bacterias que son positivas para esta prueba. Este resultado indica que *Cmm* no utiliza la oxidasa como parte de su proceso respiratorio (Argüello *et al.*, 2014).

#### Prueba de Catalasa (+)

La reacción que presentó la bacteria *Cmm* al mezclarla con una gota de  $H_2O_2$  sobre el portaobjetos, se pudo observar la formación de burbujas lo que indica que la prueba es positiva para la enzima de la catalasa. Al respecto, Varela *et al.* (2021) reportaron que la catalasa es una enzima que se presenta en algunas bacterias, descomponen el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Si la bacteria tiene catalasa, se observan burbujas (liberación de oxígeno) al añadir  $H_2O_2$  a una colonia bacteriana.

#### Prueba de $H_2S$ de peptona (+)

Después del proceso de incubación de los cultivos bacterianos, se pudo observar un cambio de color en las tiras de papel filtro que estaban dentro de los tubos de ensaye inoculados con la bacteria, se tornaron de color blanco a negro, por lo tanto, la reacción de la prueba fue positiva para la producción de sulfuro de hidrogeno, presentando una actividad bioquímica, por la acción de enzimas bacterianas. Zhang *et al.* (2010)

mencionan que la peptona, la cisteína y el tiosulfato presentes en medios de cultivo son fuentes de azufre que algunas especies de bacterias utilizan para producir  $H_2S$ . Además, explica cómo la formación de un precipitado de color negro en el medio, presenta una reacción positiva para la producción de  $H_2S$ .

#### Prueba de Hidrólisis de Esculina (+)

Después de 48 h de incubación, se observó una reacción positiva en la prueba de hidrólisis de esculina ya que el medio presentó un cambio de color característico en el tubo inoculado con la bacteria, lo cual significa que el microorganismo fue capaz de hidrolizar la esculina presente en el medio.

La prueba de hidrólisis de esculina es una herramienta útil para diferenciar tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas, incluyendo variedad de organismos aerobios, anaerobios facultativos y anaerobios estrictos. Esta técnica se basa en la capacidad de ciertas bacterias para descomponer la esculina. Para esta prueba se utilizan medios sólidos o líquidos que requieren al menos 18 h de incubación (Contreras *et al.*, 2008).

#### Prueba de Hidrólisis de gelatina (-)

Los resultados se obtuvieron a las 24 h de incubación, observando que el medio permaneció en estado sólido, sin mostrar signos de licuefacción, por lo cual la reacción fue negativa. Esto significa que la bacteria no produjo la enzima gelatinasa, la cual es responsable de romper las moléculas de gelatina en péptidos y aminoácidos. *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* puede descomponer proteínas, realizando la prueba de hidrólisis de gelatina con medio que contiene gelatina como única fuente de proteína. Después de incubar 24 a 48 h, se observa que el medio sigue sólido, significa que la bacteria no produjo la enzima gelatinasa (Ignatov *et al.*, 2019).

#### Prueba de Tolerancia de NaCl al 6% (+)

Como resultado de esta prueba, se observó el crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* en el medio de cultivo suplementado con 6% de cloruro de sodio (NaCl). La presencia de turbidez en el tubo inoculado mostro actividad metabólica y proliferación bacteriana, por lo tanto, el resultado fue positivo a la prueba de tolerancia a

NaCl. Al respecto, Borboa *et al.* (2009) reportaron durante un análisis bioquímico, que identificaron y seleccionaron las colonias bacterianas que crecieron en un medio con 6 % de (NaCl), también observaron que esas colonias fueron capaces de fermentar ciertos azúcares como glucosa, sacarosa y maltosa, lo que significa que pueden descomponerlos para obtener energía.

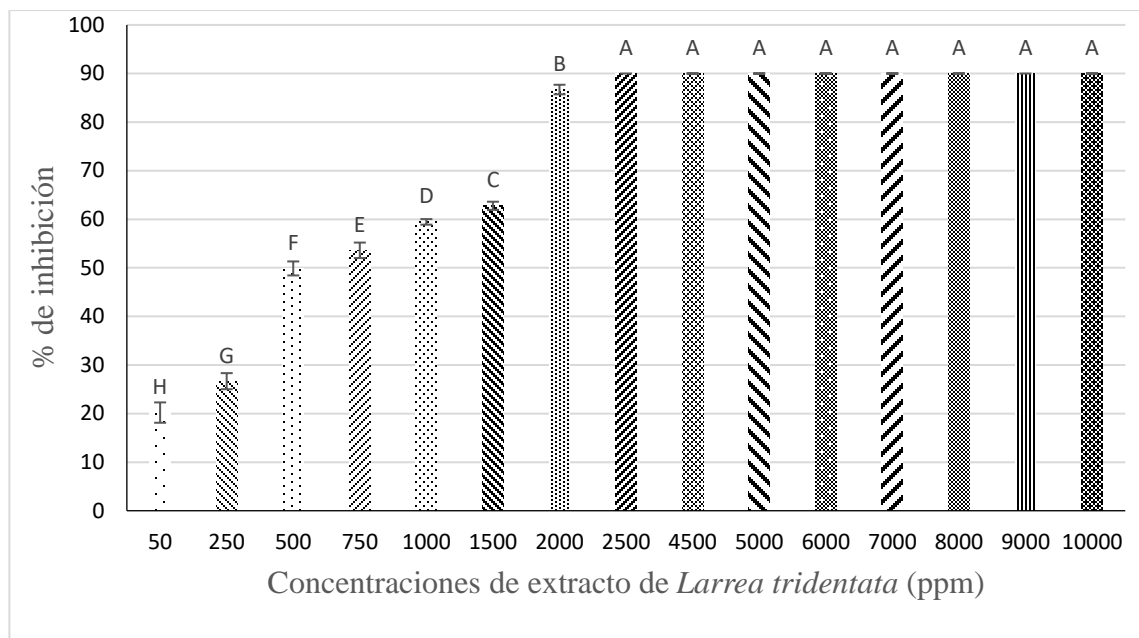
### **Corroboración molecular del fitopatógeno**

Se amplificó un fragmento interno del gen Ácido Ribonucleico ribosomal (ARNr) 16S de la cepa aislada e identificada bioquímicamente como *Cmm*. Sus secuencias parciales del gen ARNr 16S compartieron el 100% de identidad nucleotídica con *C. michiganensis* en el 100 % de la cobertura de búsqueda para fragmentos de 499 pb de longitud, la secuencia fue depositada en el GenBank con la siguiente clave de acceso [PV288757](#).

### **Actividad inhibitoria *in vitro* contra *Cmm* con extractos hidroalcohólicos de *L. tridentata* y *S. elaeagnifolium*.**

#### ***Larrea tridentata***

La inhibición del crecimiento del fitopatógeno osciló desde 20.2% hasta 90% ( $P < 0.0001$ ), este efecto se observó a partir de la concentración de 50 ppm hasta 10 000 ppm (Figura 1). A partir de 2500 ppm y hasta 10 000 ppm se puede observar la inhibición completa de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* por el extracto hidroetanólico de *L. tridentata*. Los resultados del análisis probit determinaron la  $CI_{50}$  y  $CI_{90}$  de 5.8 ppm y 482.6 ppm, respectivamente.



**Figura 1.** Resultado de la transformación arcoseno del porcentaje de inhibición por el extracto de *L. tridentata*. \*Las barras superiores, son la desviación estándar de la media.

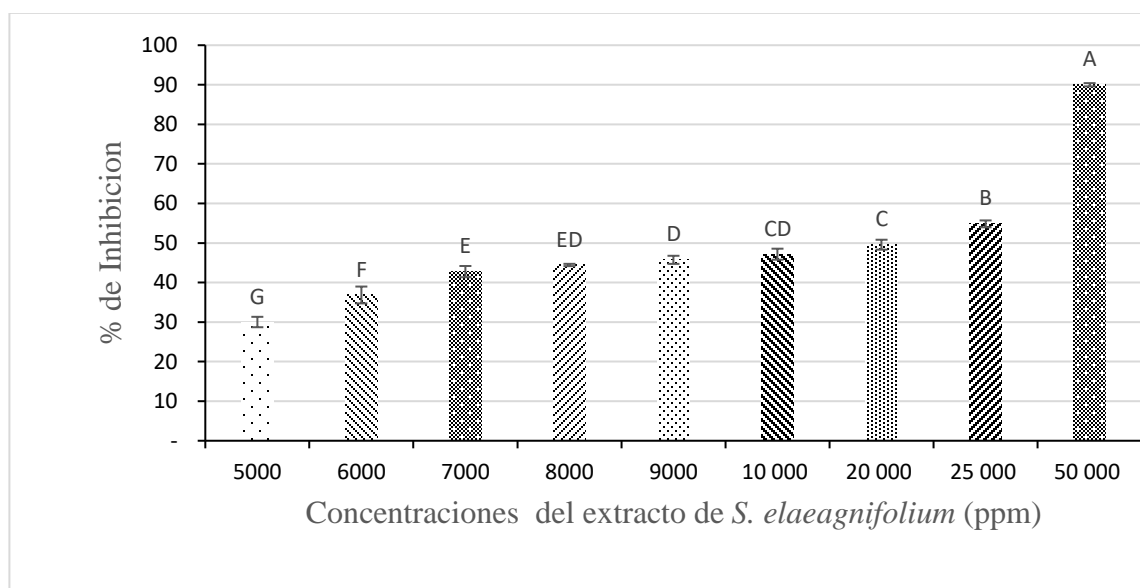
Estudios realizados por Skouta *et al.* (2018) reportaron la utilización de extractos acuosos, alcohólicos e hidroalcohólicos de *L. tridentata*, siendo los extractos hidroalcohólicos los que mayor contenido de compuestos fenólicos mostraron (212.46 EAG·L<sup>-1</sup>), dicha actividad puede estar atribuida a compuestos como Justicidin B y Beta peltain. En este contexto, Hernández *et al.* (2012) reportaron que *L. tridentata* contiene lignanos y flavonoides con actividad antibacteriana y antimicobacteriana, respectivamente. Se ha identificado que uno de estos lignanos antibacterianos es el 3'-desmetoxi-6-O-desmetil-isoguaiacina. El ácido nordihidroguayartico (NDGA), tuvo actividad contra cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*. También, Turner *et al.* (2021) demostraron que los extractos etanólicos de *L. tridentata* al 40% presentan inhibición de patógenos de importancia clínica como *Staphylococcus* y *Streptococcus*, dicho efecto se le atribuye a la capacidad de los extractos para actuar como potenciadores de antibióticos de origen  $\beta$ -lactámicos. Investigaciones realizadas por Bamidele *et al.* (2024) reportan que los extractos hidroalcohólicos (etanol y agua) presentaron un efecto inhibitorio superior al 50 y 40 % sobre *F. oxysporum* y *Alternaria alternata*, respectivamente, siendo los compuestos ácidos cafeico 4-O-glucósido, ramnetina, ácido protocatechuico 4-O-



glucósido, kaempferol, (+)-galocatequina y luteolina las principales moléculas responsables de dicho potencial antifúngico.

### *Solanum elaeagnifolium*

El efecto de control sobre *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* por el extracto de *S. elaeagnifolium* inhibió el crecimiento con 30% en la concentración más baja y 90% en la concentración de 50,000 ppm (Figura 2). Sin embargo, en las concentraciones que van de 5000 y hasta 20, 000 ppm se observó una inhibición menor al 50% ( $P < 0.0001$ ). El efecto sobre el crecimiento del patógeno, el análisis probit detectó que con una  $CI_{50}$  se pudiera obtener con 14.1 ppm, para el caso de la  $CI_{90}$  fue de 405.9 ppm.



**Figura 2.** Resultado de la transformación arcoseno del porcentaje de inhibición por el extracto de *S. elaeagnifolium*. \*Las barras superiores, son la desviación estándar de la media.

Al respecto, Balah *et al.* (2020) mencionan que el género *Solanum* incluye plantas que contienen metabolitos secundarios en sus hojas, frutos y raíces, tales como alcaloides, flavonoides y terpenos, los cuales le otorgan un potente efecto alelopático, además presentan propiedades molusquicidas, nematocidas, bactericidas, acaricidas y fungicidas. Por otra parte, Krigas *et al.* (2023) reportaron que *S. elaeagnifolium* tiene actividad

insecticida y actúa como repelente frente a plagas insectiles que afectan a los cultivos, además de mostrar actividad antimicrobiana.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria, se evaluó el método de dilución doble por Kobisi *et al.* (2024) con concentraciones de 8 a 128 ppm del extracto etanólico de *Solanum elaeagnifolium* contra *Erwinia carotovora*. Los resultados demostraron que la actividad antibacteriana aumentaba conforme aumentaba la concentración del extracto, observando una zona de inhibición que va entre  $10.67 \pm 0.72$  mm y  $32.00 \pm 0.47$  mm. Bouslamti *et al.* (2022) reportaron que el extracto hidroetanólico de *S. elaeagnifolium* contiene flavonoides, polifenoles, alcaloides y saponinas con actividad antibacteriana contra bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. lentus*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*. También, Sharma *et al.* (2021) mencionan que los flavonoides y las saponinas del extracto de *S. elaeagnifolium* tiene propiedades antibacterianas debido a la capacidad para formar complejos con proteínas solubles, proteínas extracelulares y la pared celular bacteriana.

### **Actividad antagónica *in vitro* de *T. harzianum* y *B. amyloliquifaciens* contra *Cmm*.**

#### **Confrontación *in vitro* de *T. harzianum***

Los resultados del análisis de imágenes para detectar la inhibición de *Trichoderma harzianum* contra *Cmm* en cultivo dual, se observó una interacción antagonista entre ambos microorganismos, mostrando una colonización del 77% y 48% de la superficie de la bacteria; demostrando el potencial del hongo como antagonista al interferir directamente con el crecimiento y desarrollo del patógeno, siendo evidente la notable competencia por el espacio y nutrientes y la producción de metabolitos antimicrobianos (Figura 3).

En este contexto, Anwar *et al.* (2017) encontraron que este hongo produce metabolitos antibacterianos que en condiciones de laboratorio disminuye el crecimiento de *Xanthomonas campestris* y *Clavibacter michiganensis*. Al respecto, Noshad *et al.* (2019) determinaron la actividad antibacteriana de nanopartículas de plata cargadas con conidios de *T. harzianum* como agente de biocontrol sobre *Cmm*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Xanthomonas campestris* obteniendo resultados favorables. Por otra parte, Guerrero *et al.*

(2017) mencionan que *Trichoderma harzianum* es un habitante del suelo de plantaciones de tomate y que tiene potencial frente a infecciones causadas por *C. michiganensis* subsp *michiganensis* en condiciones de invernadero así mismo tiene la capacidad de disminuir e inhibir el crecimiento de las colonias del patógeno a nivel de laboratorio, también presenta efectos directos sobre las plantas de tomate.

Por otra parte, Wang *et al.* (2019) reportaron que *Trichoderma spp.* tiene la capacidad para combatir patógenos que son transmitidos por el suelo, como *Streptomyces spp.*, lo cual lo convierte en un agente eficiente de control biológico. Además, se utiliza como biopesticida para controlar patógenos, como biofertilizante ya que facilita la disponibilidad de nutrientes para las plantas. López *et al.* (2023) reportaron estudios realizados con *Trichoderma* con efectividad contra fitopatógenos, disminuyendo las poblaciones y reduciendo la incidencia de la enfermedad. Las propiedades antagónicas contra los patógenos se fundamentan en varios mecanismos, tales como el micoparasitismo, producción de antibióticos, la promoción del crecimiento vegetal y la inducción de respuestas defensivas en las plantas (Andrade *et al.*, 2019).



**Figura 3.** Inhibición del crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* contra *T. harzianum* en cultivo dual.

### **Confrontación *in vitro* de *Bacillus amyloliquefaciens***

Como se observa en la figura 4 la actividad antagonista de *B. amyloliquefaciens* fue significativa en los tres métodos evaluados, presentando una inhibición del 64%, 39% y 63% sobre el crecimiento de *Cmm*. Este efecto se debe principalmente a la producción de metabolitos antimicrobianos de *B. amyloliquefaciens*, como antibióticos, compuestos volátiles, lipopeptidos y enzimas que tienen la capacidad de inhibir el desarrollo del patógeno.

Estudios han demostrado que *Bacillus amyloliquefaciens* produce fitohormonas, fija nitrógeno y solubiliza fosfatos, esta bacteria tiene la capacidad de colonizar la rizosfera, promover el crecimiento vegetal y combatir fitopatógenos. Debido a esto, se han utilizado como bioplaguicidas y biofertilizantes Belbahri *et al.* (2017). Las cepas de *Bacillus* son eficientes agentes de biocontrol para diversas enfermedades de las plantas. El potencial de biocontrol de *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. pumilus* y *B. amyloliquefaciens* se ha documentado en numerosos informes. Entre varias cepas de *Bacillus*, *B. amyloliquefaciens* es el que mostró antagonismo sobresaliente que cualquier otra especie (Zouari *et al.*, 2016).

Rodríguez *et al.* (2020) han reportado que las esporas bacterianas tienen una estructura resistente que les permite mantenerse viables durante años, esperando las condiciones adecuadas para su desarrollo. Estas propiedades del género *Bacillus* les permiten sobrevivir en diferentes ambientes. Cui *et al.* (2022) reportaron que *Bacillus amyloliquefaciens* es una bacteria grampositiva que ha demostrado ser eficiente en contra de varios patógenos, como la sarna de la papa (*Streptomyces griseoplanus*). *B. amyloliquefaciens* inhibe la actividad de este patógeno mediante varios mecanismos, como producción de antibióticos, competencia por nutrientes e inducción de resistencia en las plantas.

Pei *et al.* (2023) mencionan que *B. amyloliquefaciens* tiene actividad antagónica contra varios fitopatógenos por ello se recomienda utilizarlo como agente de biocontrol para el control de enfermedades de los cultivos, como la sarna de la papa causada por *Streptomyces griseoplanus*, pudrición de la raíz del trigo causada por *Bipolaris sorokiniana*, antracnosis de la alfalfa causada por *Colletotrichum truncatum*, marchitamiento bacteriano del tomate causado por *Ralstonia solanacearum* y el cáncer

bacteriano del tomate causado por *C. michiganensis*. Lin *et al.* (2018) mencionan que *B. amyloliquefaciens* Ba01 presentó efecto inhibitorio significativo más que *B. subtilis* frente a *S. scabies*, patógeno causante de la sarna común de la papa, las hifas en la zona afectada no presentaron signos de diferenciación después de 20 días, lo que aseguran que el crecimiento de las hifas fue realmente detenido.

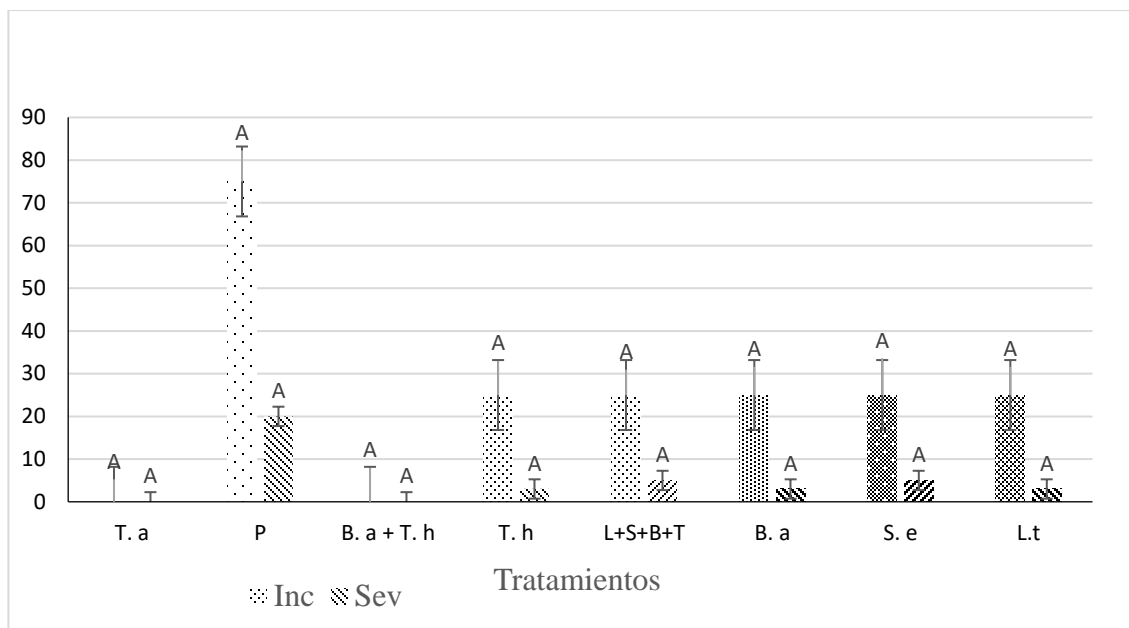
Estudios han reportado que las especies de *Bacillus* tienen la capacidad de producir diferentes tipos de giberelinas, que favorecen el crecimiento de la altura de la planta. Así mismo se ha reportado que cepas de *B. subtilis* presentan actividad antagonista en condiciones de laboratorio e invernadero contra *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* (Solano *et al.*, 2021).



**Figura 4.** Inhibición del crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* contra *B. amyloliquefaciens*.

### **Incidencia y severidad de la enfermedad**

Los tratamientos evaluados demostraron ser efectivos, inhibieron el crecimiento del patógeno tanto en condiciones de laboratorio como en invernadero (Figura 5). La mayor reducción en la incidencia y severidad de la enfermedad se observó en las plantas de tomate tratadas con *T. harzianum* y una mezcla de *T. harzianum* + *B. amyloliquefaciens* respecto al patógeno, mientras que, en los otros tratamientos, la incidencia de la enfermedad fue del 25% con una severidad que va entre el 3% y 5%.



**Figura 5.** Incidencia y severidad de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*. \*Las barras superiores, son la desviación estándar de la media.

Los resultados obtenidos por Abo-Elyousr *et al.* (2019) mencionaron que tanto *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*, ya sea en forma líquida o formulados, redujeron significativamente la severidad del cáncer bacteriano, *B. amyloliquefaciens* formulado (74.4%), *P. aeruginosa* (66.7%) y *B. subtilis* (53.3%). Además, las formulaciones mejoraron la efectividad de las bacterias antagonistas. Así mismo Tremblay *et al.* (2024) reportaron que el tratamiento de las semillas con cepas de *Bacillus* disminuyó la incidencia del cáncer bacteriano en las plantas tratadas en comparación con las no tratadas ya que algunas especies producen compuestos antimicrobianos, como antibióticos que inhiben el crecimiento de patógenos.

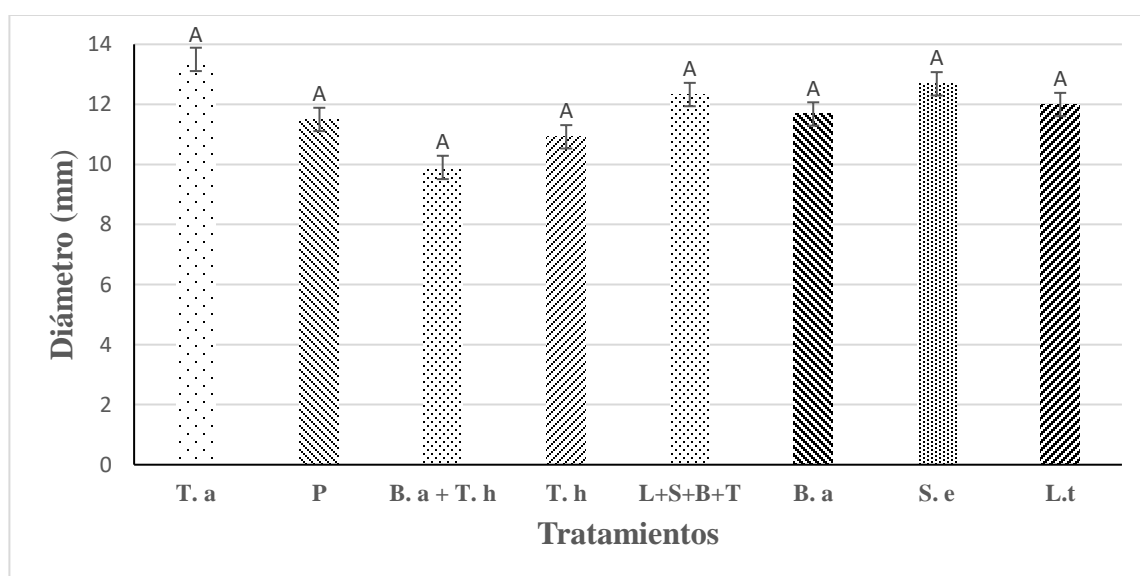
Nandi *et al.* (2018) Mencionan que el tratamiento de semillas con cepas de *Bacillus* es una alternativa eficiente para mejorar la calidad de las semillas de tomate y así mismo reducir la incidencia del cáncer bacteriano, causado por *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*, bacteria patógena que afecta a las plantas como a los frutos de tomate. Tripathi *et al.* (2022) reportaron que los síntomas de *Cmm*, como es la lesión cancerosa en el tallo, se extiende a lo largo de la planta, lo que provoca la muerte temprana de la misma. Al cortar el tallo longitudinalmente, se observa una textura harinosa en el interior, acompañada de una decoloración marrón en los tejidos internos, donde se refleja tanto la

incidencia como la severidad, siendo ambos críticos para el desarrollo de la enfermedad en los cultivos.

### Efecto de microorganismos antagonistas y extractos vegetales en la promoción de crecimiento y desarrollo

#### Microorganismos antagonistas y extractos de plantas sobre el diámetro de tallo de tomate

En cuanto al diámetro de tallo, los tratamientos aplicados presentaron efecto positivo en el desarrollo de las plantas ya que los tratamientos de la mezcla de *L. tridentata*, *S. elaeagnifolium*, *B. amyloliquefaciens* y *T. harzianum* (L+S+B+T), *S. elaeagnifolium* mostraron los valores más altos que fueron de 13mm, le sigue *L. tridentata* con 12 mm (Figura 6). Al respecto, estudios realizados por Luo *et al.* (2022) tanto en laboratorio como en campo, han informado que *B. amyloliquefaciens* promueve el desarrollo de las plantas a través de varios mecanismos, como: producción de hormonas vegetales, compuestos orgánicos volátiles, producción de sideróforos que ayudan a captar nutrientes, mejora la disponibilidad de minerales en el suelo y controlan microorganismos patógenos presentes en la rizosfera.

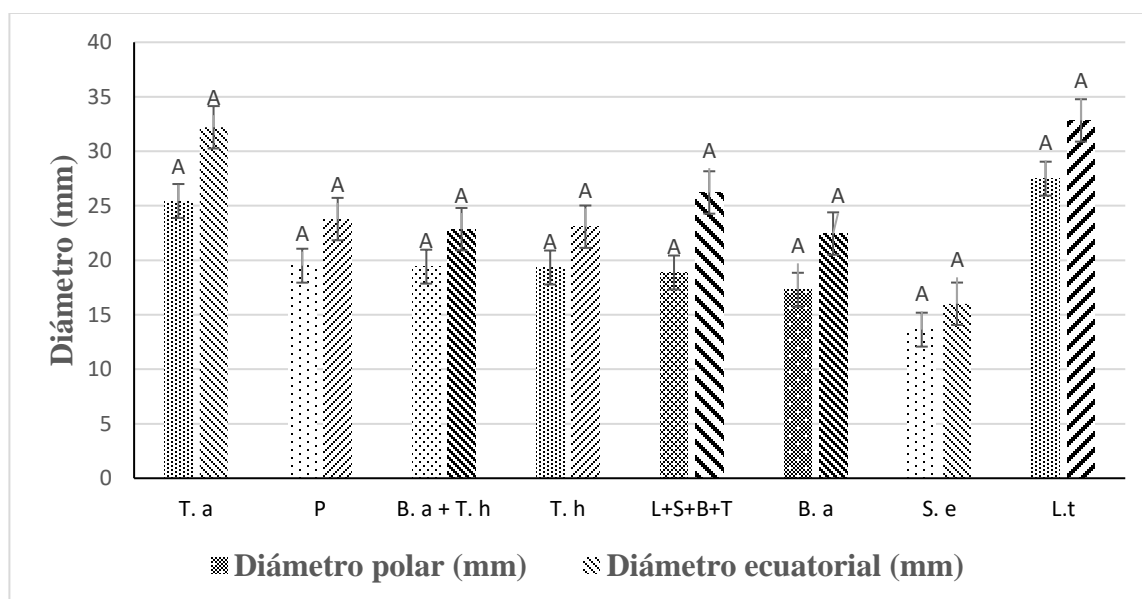


**Figura 6.** Diámetro de tallos de tomate, tratados con microorganismos antagonistas y extractos de plantas

### Microorganismos antagonistas y extractos de plantas sobre el diámetro polar y ecuatorial de frutos de tomate

Los resultados muestran que los tratamientos aplicados influyeron en el tamaño de los frutos ya sea por la disponibilidad de nutrientes, la mezcla de *L. tridentata*, *S. elaeagnifolium*, *B. amyloliquefaciens* y *T. harzianum* (L+S+B+T) con 28 mm el tratamiento con *L. tridentata* presentó los frutos con mayor diámetro (33 mm) respecto al testigo (Figura 7).

*Trichoderma* no solo actúa como un agente antimicrobiano para combatir microorganismos fitopatógenos, sino que también tiene efectos positivos en las plantas de tomate al mejorar su productividad, crecimiento y desarrollo de raíces y tener mayor rendimiento del cultivo (Bader *et al.*, 2020).

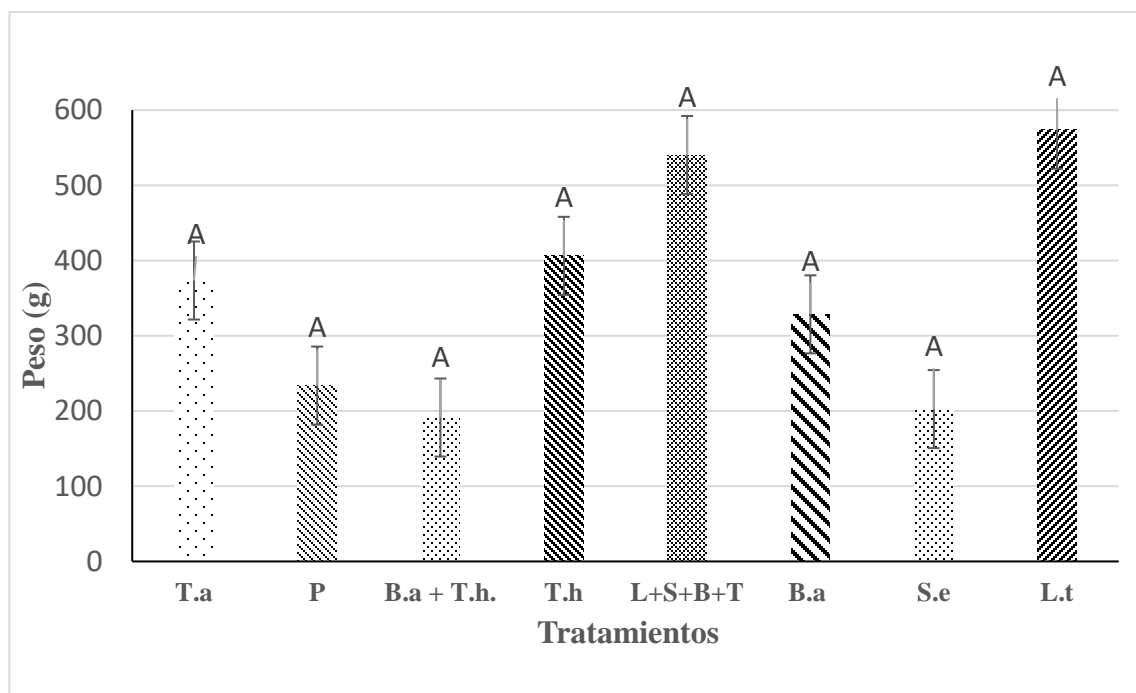


**Figura 7.** Diámetro polar y ecuatorial de frutos de tomate, tratados con microorganismos antagonistas y extractos de plantas.



### Microorganismos antagonistas y extractos de plantas sobre el rendimiento del cultivo de tomate

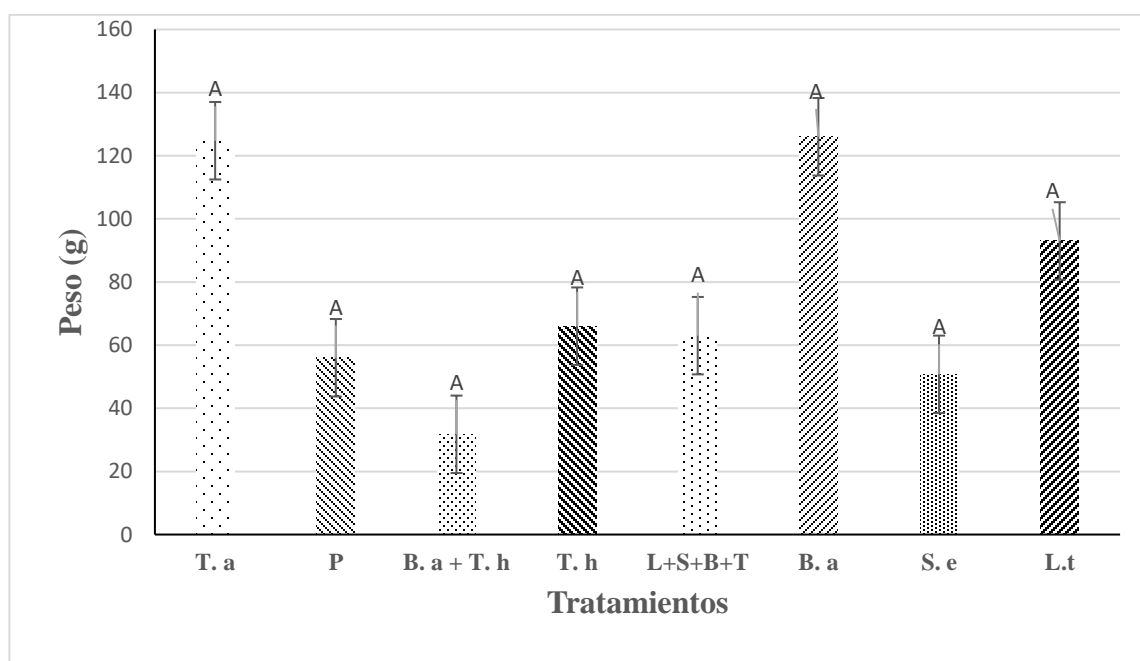
En cuanto al rendimiento del cultivo, se observaron diferencias entre los tratamientos aplicados. Los resultados muestran que los tratamientos más efectivos fueron, la mezcla compuesta por *Larrea tridentata*, *Solanum elaeagnifolium*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Trichoderma harzianum* (L+S+B+T), que obtuvo un rendimiento de 540 g y el tratamiento con *L. tridentata* presento un rendimiento superior de 580 g, ambos tratamientos mostraron un incremento en comparación con el testigo que no se le aplico microorganismos antagonistas ni extractos vegetales (Figura 8). Qiao *et al.* (2014) mencionan que *Bacillus amyloliquefaciens* es una bacteria Gram positiva, es capaz de formar esporas, tiene la capacidad de establecerse en la rizosfera de las plantas. Puede desarrollarse en condiciones adversas y se ha investigado como una alternativa ecológica para promover el crecimiento de las plantas.



**Figura 8.** Rendimiento del cultivo de tomate, tratados con microorganismos antagonistas y extractos de plantas

### Microorganismos antagonistas y extractos de plantas sobre el peso fresco de hojas de tomate

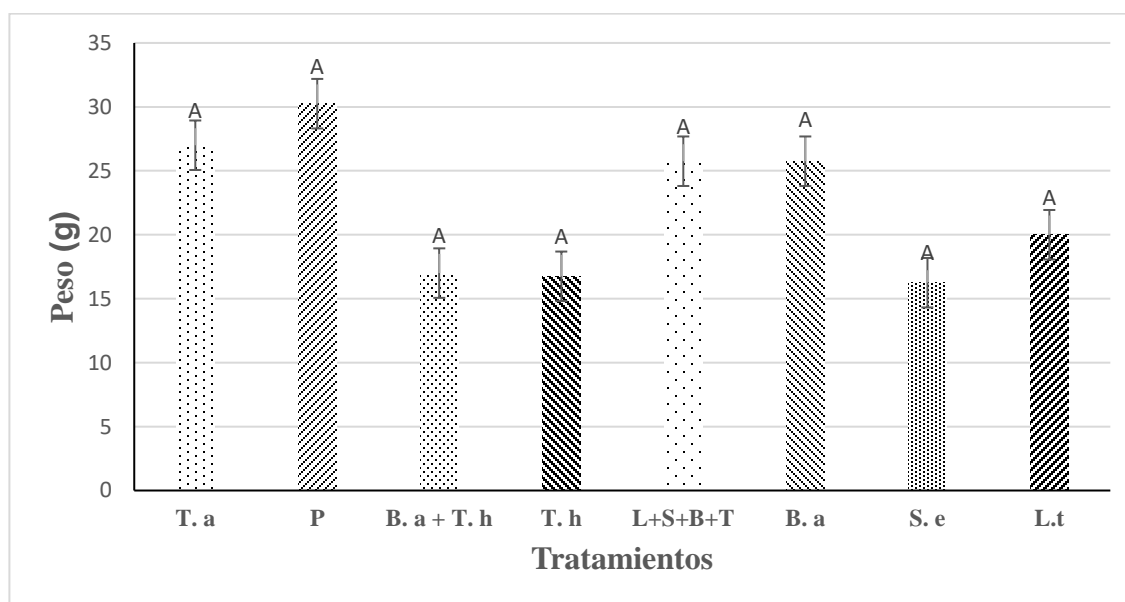
En lo que respecta al peso fresco de las hojas de las plantas, las aplicaciones de extractos vegetales y microorganismos antagónicos influyeron en el crecimiento ya que tienen la capacidad de actuar como bioestimulantes, mejorando los procesos fisiológicos como la fotosíntesis, los tratamientos con *B. amyloliquefaciens* y *L. tridentata* sobresalieron al presentar el mayor peso con 128 y 92 g respecto al testigo (Figura 9), Peñuelas *et al.* (2017) reportaron un aumento del 25 % en el peso seco de las plantas de tomate al aplicar extractos de *Larrea tridentata* en concentraciones de 2000 y 3000 ppm, lo que indica que estimula el desarrollo vegetativo de las plantas. Por otra parte, Morales *et al.* (2021) ha reportado el uso de infusión de *L. tridentata*, combinada con lanolina y manteca de cacao, como promotora del crecimiento vegetal en tomate, logrando incrementos del 77 % en el peso seco y del 100 % en el peso fresco.



**Figura 9.** Peso fresco de hojas de tomate, tratados con microorganismos antagonistas y extractos de plantas

### Microorganismos antagonistas y extractos de plantas sobre el peso de raíz de tomate

En los resultados del peso de raíz, se observaron diferencias entre los tratamientos, los más eficientes fueron la combinación de *L. tridentata*, *S. elaeagnifolium*, *B. amyloliquefaciens* y *T. harzianum* (L+S+B+T) y *B. amyloliquefaciens*, ambos con un peso de 25 g, seguido de *L. tridentata* con un peso de 20 g (Figura 10). Estos resultados muestran que la mezcla de extractos vegetales con microorganismos, como la aplicación específica de *B. amyloliquefaciens*, estimulan el crecimiento del sistema radicular. Rodríguez *et al.* (2022) mencionaron que la aplicación de *Trichoderma harzianum* en plantas de tomate presentó un aumento significativo del peso fresco de las raíces. Este efecto se debe a varios mecanismos, como la estimulación del crecimiento en las primeras etapas del desarrollo, la producción de ácido harziánico y promover la producción de hormonas vegetales que favorecen el desarrollo de raíces.



**Figura 10.** Peso de raíz de tomate, tratados con microorganismos antagonistas y extractos de plantas

## CONCLUSIONES

El patógeno se aisló y caracterizó morfológica y molecularmente obteniendo como resultado a *C. michiganensis* subsp *michiganensis*.

En el bioensayo *in vitro*, ambos extractos inhibieron el crecimiento de *C. michiganensis* subsp *michiganensis*, para el caso de los microorganismos antagonistas presentaron competencia por espacio y nutrientes.

Los extractos vegetales y los microorganismos antagonistas redujeron la incidencia y la severidad de la enfermedad ocasionada por *C. michiganensis* subsp *michiganensis* en invernadero.

## REFERENCIAS

- Abo, E.K.A.M., Khalil, B.H.M., Hashem, M., Alamri, S.A.M. y Mostafa, Y.S. (2019). Control biológico del marchitamiento del tomate causado por *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* utilizando bacterias promotoras del crecimiento vegetal formuladas. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29, 54. <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0152-6>.
- Al-Hamaideh, KD, Dmour, I., El-Elimat, T. y Afifi, FU (2020). Perfil de UPLC-MS y actividad antiproliferativa de las bayas de una maleza silvestre agresiva: *Solanum elaeagnifolium* Cav. (*Solanaceae*): [doi.org/10.26538/tjnpr/v4i12.16](https://doi.org/10.26538/tjnpr/v4i12.16).
- Andrade-Hoyos, P., Luna-Cruz, A., Osorio-Hernández, E., Molina-Gayosso, E., Landero-Valenzuela, N., & Barrales-Cureño, H. J. (2019). Antagonism of *Trichoderma* spp. vs fungi associated with wilting of chilli. . *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(6), 1259-1272. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326>.
- Ansari, M., Mohsen, T.S., Hamzehzarghani, H., Valenzuela, M., Siri, M.I. y Osdaghi, E. (2019). Múltiples introducciones del patógeno del tomate *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* en Irán, según revela un análisis filogeográfico a escala global. 10.1128/AEM.02098-19.
- Ansari, M., Mohsen, T. S., Hamzehzarghani, H., Valenzuela, M., Siri, M. I., y Osdaghi, E. (2019). Múltiples introducciones del patógeno del tomate *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* en Irán, según revela un análisis filogeográfico a escala global. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(24), <https://doi.org/10.1128/AEM.02098-19>.
- Anwar, J., y Iqbal, Z. (2017). Effect of growth conditions on antibacterial activity of *Trichoderma harzianum* against selected pathogenic bacteria. *Sarhad Journal of Agriculture*, 33, 501-510.
- Argüello, N.A. Z., & Moreno, R.L. Y. (2014). Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias diazótrofes aisladas de suelos con cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, 63(3), 238-245. <https://doi.org/10.15446/acag.v63n3.41033>.
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N. y Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*.117: 426-436.
- Bader, A. N., Salerno, G. L., Covacevich, F. & Consolo, V. F. (2020). Native *Trichoderma harzianum* strains from Argentina produce indole-3 acetic acid and phosphorus solubilization, promote growth and control wilt disease on tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of King Saud University - Science*, 32(1), 867–873. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.04.002>.

- Balah, M. A., y AbdelRazek, G. M. (2020). Actividad pesticida de las hojas de *Solanum elaeagnifolium* Cav. contra nematodos y malezas perennes. *Acta Ecologica Sinica*, 40, 373–379. DOI: 10.1016/j.chnaes.2019.07.001.
- Bamidele, M. O., Pérez, O. B. Á., Sandoval-Cortes, J., Flores-López, M. L., Chavez-González, M. L., y Aguilar, C. N. (2024). Polyphenolic bioactive compounds from *Larrea tridentata* (DC.) Coville: Extraction, characterization, antioxidant, and antifungal activities. *Research Square*, <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4370220/v1>.
- Belbahri, L., Chenari B., A., Rekik, I., Alenezi, F. N., Vallat, A., Luptakova, L., Petrovova, E., Oszako, T., Cherrad, S., Vacher, S., y Rateb, M. E. (2017). La genómica comparativa de las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* revela un genoma central con características de adaptación al hábitat y un genoma accesorio rico en metabolitos secundarios. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1438. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01438>.
- Benchlihi, S., Esmael, Q., Aberkani, K., Tahiri, A., Belabess, Z., Lahlali, R. y Barka, E.A. (2023). Modes of Action of Biocontrol Agents and Elicitors for sustainable Protection against Bacterial Canker of Tomato. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030726>.
- Bissett, J., Gams, W., Jaklits, W. M., y Samuels, G. J. (2015). Accepted Trichoderma names in the year 2015. *IMA Fungus*, 6(2), 319-328. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2015.06.02.05>.
- Borboa, F.J., Rueda, P.E. O., Acedo, F.E., Ponce, J. F., Cruz, M., Grimaldo, J. O. y García, O. A. M. (2009). Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *Revista fitotecnica mexicana*, 32(4), 319-326.
- Borriss R. (2013). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. in *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*. <https://doi.org/10.1002/9781118297674.ch83>.
- Bouslamti, M., Barnossi, A., Kara, M., Alotaibi, B.S., Kamaly, O.A.I., Lyoussi, B., y Benjelloun, A.S. (2022). Contenido total de polifenoles, actividad antioxidante y antimicrobiana de hojas de *Solanum elaeagnifolium* Cav. de Marruecos. *Molecules*, 27(13), 4322. <https://doi.org/10.3390/molecules27134322>.
- Carranza, R. P., Hernández, O.L., Cobos, P. L.E., López, L. L. I., Ascasio, V. J. A. y Silva, B.S. (2017). Bioguided Fractionation from *solanum elaeagnifolium* to evaluate toxicity on cellular lines and breast tumor explants. Facultad de Química Farmacéutica. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v24n2a05>.
- Centurión, B.S.A., Aquino, J.A.S., y Bozzano, S.G. (2013). Extractos vegetales para el control alternativo del damping-off causado por *Rhizoctonia solani* en plántulas de tomate. *Investigación Agraria*, 15(1), 23-29.
- Chalupowicz, L., Barash, I., Reuven, M., Dror, O., Sharabani, G., Gartemann, K.H., Eichenlaub, R., Sessa, G. y Manulis-Sasson, S. (2017). Differential contribution of *Clavibacter*

*michiganensis* ssp. *michiganensis* virulence factors to systemic and local infection in tomato. Mol.

- Cirujeda, A., Fernández, C. S., Aibar, J., León, M. y Zaragoza C. (2011). *Solanum elaeagnifolium*. Cav. [http://www.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon/Departamentos/AgriculturaAlimentacion/Areas/03\\_Sanidad\\_Vegetal/01\\_Protecci%C3%B3n%20Vegetal/PublicacionesCPV](http://www.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon/Departamentos/AgriculturaAlimentacion/Areas/03_Sanidad_Vegetal/01_Protecci%C3%B3n%20Vegetal/PublicacionesCPV).
- Contreras, N., Jiménez, O., Bonilla, M. y Nass, H. (2008). Identificación y caracterización de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* como patógeno de la caña de azúcar (*Saccharum* sp.) en la región centro occidental de Venezuela. *Bioagro*, 20(2), 111-118x.
- Cui, L., Yang, C., Wang, Y., Ma, T., Cai, F., Wei, L., Jin, M., Osei, R., Zhang, J., & Tang, M. (2022). Potencial de una bacteria endófito *Bacillus amyloliquefaciens* 3-5 como agente de biocontrol contra la sarna de la papa. *Microbial Pathogenesis*, 161, 105171. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105171>.
- Delgadillo, R.L., Bañuelos, V.R., Delgadillo, R.O., Silva, V.M. y Gallegos, F.P. (2017). Composición química y efecto antibacteriano in vitro de extractos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens*. ISSN 2007 – 0705.
- Dimkić, I., Janakiev, T., Petrović, M., Degrassi, G., y Fira, D. (2022). Actividades antimicrobianas de *Bacillus* y *Pseudomonas* asociadas a plantas en la supresión de enfermedades de las plantas a través de mecanismos de control biológico: Una revisión. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 117, 101754. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101754>.
- Ezziyyani, M., Requena, M. E., Egea-Gilabert, C., y Candela, M. E. (2007). Control biológico de la podredumbre radicular causada por *Phytophthora* en pimientos utilizando *Trichoderma harzianum* y *Streptomyces rochei* en combinación. *Journal of Phytopathology*, 155(6), 342-349. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01237.x>.
- Favela-Hernández, J. M. J., García, A., Garza-González, E., Rivas-Galindo, V. M., y Camacho-Corona, M. R. (2012). Lignanos y flavonoides antibacterianos y antimicobacterianos de *Larrea tridentata*. *Phytotherapy Research*, 26(12), 1957–1960. <https://doi.org/10.1002/ptr.4660>.
- Gajera, H., Domadiya, R., Patel, S., Kapopara, M. y Golakiya, B. (2013). Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system – a review. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*. SSN: 2320-2246.
- Gautam, S., Chauhan, A., Sharma, R., Sehgal, R. y Shirkot, C.K (2019). Potencial de *Bacillus amyloliquefaciens* para el biocontrol del cancro bacteriano del tomate inducido por *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Patogénesis microbiana*, 130, 196-203. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.03.006>.

- Guerrero, R., Monaco, C., Stocco, M., Rolleri, J. y Guerrero, N. (2017). Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. Para el control del cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*) del tomate (*Lycopersicum esculentum* mill.). *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 49(2), 185-196.
- Gupta, V.G., Schmoll M., Herrera E. A., Upadhyay, R.S., Druzhinina. I. y Tuohy, M. (2014). *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Newnes. Amsterdam: Elsevier. doi:10.1016/C2012-0-00434-6.
- Hernández, O. L., Carranza, R. P., Cobos, P. L., López, L. I., Ascasio, V. J. A., y Silva, B. S. Y. (2017). Fraccionamiento bioguiado de *Solanum elaeagnifolium* para evaluar toxicidad en líneas celulares y explantos de tumores mamarios. *Vitae*, 24(2), 124-131. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v24n2a05>.
- Ignatov, A. N., Spechenkova, N. A., Taliansky, M. y Kornev, K. P. (2019). First report of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infecting potato in Russia. *Plant Dis*, 103(147), 10-1094.
- Jaramillo, E., Barrezueta, S., Luna, E., y Castillo, S. (2017). Efecto biofungicida del gel de Aloe vera sobre *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra en Musa (AAA). *Scientia Agropecuaria*, 8(3). <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.03.10>.
- Ji Oh, E., Bae, C., Beoyl, L. H., Sun, H. I., Hyok, I. L., Chi, Y. M., Yim, K. O., Lee, S., Heu, S., Soon, J., & Sik, O. C. (2016). *Clavibacter michiganensis* subsp. *capsici* subsp. nov., causante de la enfermedad bacteriana del cancro en el pimiento. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 4647-4653. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001311>.
- Jung, W. J., Mabood, F., Souleimanov, A., Whyte, L. G., Niederberger, T. D., y Smith, D. L. (2014). Antibacterial activity of antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* DJM-51 against phytopathogenic *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* ATCC 7429 in vitro. *Microbial Pathogenesis*, 77, 13-16. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.10.008>.
- Kapoor, D., Sood, M., Kumar, V., Ramakrishnan, M., Landi, M., Araniti, F. y Sharma, A. (2020). *Trichoderma*: Los "secretos" de un agente de biocontrol multitalentoso. <https://doi.org/10.3390/plants9060762>.
- Kobisi, A. N. A., Balah, M. A., & Hassan, A. R. (2024). Bioactividad de partes de bayas de *Solanum elaeagnifolium* Cav. frente a *Galleria mellonella* y *Erwinia carotovora* y perfil químico LC-MS de su extracto potencial. *Scientific Reports*, 14(1), 18747. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-68961-z>.
- Krigas, N., Votsi, N.-E., Samartza, I., Katsoulis, G. y Tsiafouli, M.A. (2023). *Solanum elaeagnifolium* (Solanaceae) invade una de cada cinco áreas protegidas de Natura 2000 en Grecia y uno de cada cuatro tipos de hábitat: ¿qué sigue? *Diversity*, 15 (2), 143. <https://doi.org/10.3390/d15020143>.



- Labarrios, L. A. A., Herrera, R. R., González, C. N. A., Victoriano, F. L., y Carrillo, A. R. Q. (2004). Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (Schuster, Hoff, Mandel y Lazar) Vidaver y Mandel, usando la reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(2), 239-245.
- Lin, C., Tsai, C.-H., Chen, P.-Y., Wu, C.-Y., Chang, Y.-L., Yang, Y.-L. (2018). Biological control of potato common scab by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01. *PLoS ONE*, 13(4), e0196520. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196520>.
- López, F. U.C., Brito, V.H., López, M.D., Salaya, J.M., D.J.M., y Gómez, M.E. (2017). Papel de *Trichoderma* en los sistemas agroforestales cacaotal como un agente antagonico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 20, 91-100.
- López, L.N., Heredia, B.J., Hernández, M.C., Rodríguez, I.J.R., Escalante, A.M.A. y Estrada, G.S.R. (2022). Biosíntesis inducida de fengicina y surfactina en una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* con actividad oomicetida sobre zoosporas de *Phytophthora capsica*. *Revista Argentina de Microbiología*: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.03.002>.
- López, L., M. E., Toro, S.C. L. D., Ochoa, A. S., Aguilar, L. J. A., Martínez, C.O., Madrigal, P. J. A. y Gutiérrez, L. M. (2023). Antagonismo de cepas de *Trichoderma* aisladas en Tanaxuri, Michoacán, México contra patógenos postcosecha del fruto de aguacate (*Persea americana* Mill). *Biotechnia*, 25(1). <https://doi.org/10.18633/biotechnia.v25i1.1726>.
- Lu, Y., Hatsugai, N., Katagiri, F., Ishimaru, C. A., & Glazebrook, J. (2015). Putative serine protease effectors of *Clavibacter michiganensis* induce a hypersensitive response in the apoplast of *Nicotiana* species. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(11), 1216–1226. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-15-0036-R>.
- Luo, L., Zhao, C., Wang, E., Raza, A. & Yin, C. (2022). *Bacillus amyloliquefaciens* as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: An overview for its mechanisms. *Microbiological Research*, 259, 127016. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127016>.
- Maeso, D., & Walasek, W. (2012). Evaluación de métodos para desinfectar semillas de tomate contra cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). *Agrociencia (Uruguay)*, 16(1), 134–142.
- Mancini, M., Chiarini, F., Calviño, A. y Stiefkens, L. (2021). Estudios citogenéticos y morfo-anatómicos comparativos entre diploides y Poliploides de *Solanum elaeagnifolium* (Solanaceae). <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v56.n2.32517>.
- Martínez, B., Danay, I., y Yusimy, R. (2013). “*Trichoderma* Spp. y Su función en el control de plagas en los cultivos.” *Revista de Protección Vegetal* 28(1):1–11.
- Martínez, P.H.Y., Osorio, H.E.O., Estrada, D.B., López, S.J.A., Varela, F.S.E. y Torres, C.J.A. (2017). Control biológico de fitopatógenos mediante aislados de *Trichoderma spp.* *Revista Agroproductividad*.

- Mayo, S., Gutiérrez, S., Malmierca, M. G., Lorenzana, A., Campelo, M. P., Hermosa, R., y Casquero, P. A. (2015). Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma spp.* in growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes. *Frontiers in Plant Science*, 6, 685. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00685>.
- Medina, T.L., y Izzeddin, A.N. (2011). Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. <http://ve.scielo.org/pdf/s/v15n3/art05.pdf>.
- Mesa, V.A.M., Marin, A. y Calle, O.J. (2019). “Metabolitos Secundarios En *Trichoderma* Spp. y Sus Aplicaciones Biotecnológicas Agrícolas.” *Canadian Journal of Chemistry*. doi: 10.1139/V92-320.
- Miller, S.A., Ferreira, J.P., y LeJeune, J.T. (2022). Uso de antimicrobianos y resistencia en la agricultura vegetal: una perspectiva de Una Salud. *Agricultura*. <https://doi.org/10.3390/agriculture12020289>.
- Mohd Nadzir, M. M., Vieira Lelis, F. M., Thapa, B., Ali, A., Visser, R. G. F., van Heusden, A. W., & van der Wolf, J. M. (2019). Development of an in vitro protocol to screen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* pathogenicity in different *Solanum* species. *Plant Pathology*, 68(1), 42-48. <https://doi.org/10.1111/ppa.12965>.
- Monaco, C., Stocco, M., Roller, J. y Guerrero, N. (2017). Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. Para el control del cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*) del tomate (*Lycopersicon esculentum* mill.). *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología*.
- Morales, U.A.L., Rivero, P.N., Avila, R.F., Aquino, T.E., Prieto, M.J., Hetta, H.F., Batiha, G. y Zaragoza, B.A. (2021). Bactericidal activity of *Larrea tridentata* hydroalcoholic extract against phytopathogenic bacteria. *Agronomy*, 11(5), 957. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050957>.
- Morales, U.A.L., Rivero, P.N., Valladares, C.B., Madariaga, N.A., Higuera, P.R.I., Delgadillo, R.L., Bañuelos, V.R. y Zaragoza, B.A. (2022). Compuestos fitoquímicos y propiedades farmacológicas de *Larrea tridentata*. <https://doi.org/10.3390/molecules27175393>.
- Moreno, V.C.A., Cotes, A.M., Beltrán, A.C., Bettiol, W. y Elad, Y. (2018). Control biológico de fitopatógenos del suelo. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (agrosavia).
- Naeini, A., Ziglari, T., Shokri, H. y Khosravi, A.R. (2010). Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* Z isolates. *of Medical Mycology* 20:174–178.
- Nandi, M., Macdonald, J., Liu, P., Weselowski, B. y Yuan, Z. (2019). *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: Cancro bacteriano del tomate, interacciones moleculares y manejo de

- la enfermedad. *Molecular Plant Pathology*, 19(11), 2036-2050.  
<https://doi.org/10.1111/mpp.12795>.
- Noshad, A., Iqbal, M., Folkers, L., Hetherington, C., Aamir Khan, M., Numan, M., y Ullah, S. (2019). Antibacterial effect of silver nanoparticles (AgNPs) synthesized from *Trichoderma harzianum* against *Clavibacter michiganensis*. *Journal of Nano Research*, 58, 10-19.
- Osdaghi, E., Ansari, M., Taghavi, S.M., Zarei, S., Koebnik, R., y Lamichhane, J.R. (2018). Patogenicidad y análisis filogenético de *Clavibacter michiganensis* cepas asociadas con plantas de tomate en Irán. *Fitopatología*, 58(2), 93-101.
- Osdaghi, E., Rahimi, T., Mohsen, T.S., Ansari, M., Zarei, S., Portier, P., Briand, M. y Agnes, J.M. (2020). Los análisis genómicos comparativos y filogenéticos sugieren varias especies nuevas dentro del género *Clavibacter*, incluidas cepas no patógenas asociadas al tomate. doi: 10.1128/AEM.02873-19.
- Osorio, H.E.O., Martínez, P.H.Y., Estrada, D.B., López, S.J.A. y Varela, F.S.E. (2017). control biológico de fitopatógenos mediante aislados de *Trichoderma spp.*  
<https://www.researchgate.net/publication/319250943>.
- Peña, C.K., Rodríguez, F.J.C. y Meléndrez, J.F. (2016). El VIUSID AGRO una alternativa en el incremento de la producción de tomate (*Solanum lycopersicum* L.).  
<http://www.eumed.net/rev/caribe/2016/05/viusid.html>.
- Peñuelas, R. O., Arellano, G. M., Verdugo, F. A. A., Chaparro, E. L. A., Hernández, R. S. E., Martínez, C. J. L., y Vargas, A. I. C. (2017). Extractos de *Larrea tridentata* como estrategia ecológica contra *Fusarium oxysporum* radialis-lycopersici en plantas de tomate en condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(3), 1703-3.  
<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1703-3>.
- Peñuelas, O., Arellano, M., Vargas, I. (2015). Bioactividad *in vitro* de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata*) sobre la inhibición de hongos poscosecha: *Alternaria tenuissima*, *Aspergillus niger*. *Polibotánica* 40: 183-198.
- Peralta, I. E., Spooner, D.M. y Knapp, S. (2008). Taxonomy of Wild Tomatoes and their Relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, and sect. *Lycopersicon*; Solanaceae). *Systematic Botany Monographs* Vol. 84.
- Pineda, I.J.A., Ipiates, J.J.P., Barrigas, R.D.A., Muñoz, P.F.A. y Pineda, S.C.A. (2021). Production of the fungus-mold (*Trichoderma harzianum*): a review. Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA). ISSN: 2602-8530.
- Qiao, J. Q., Wu, H. J., Huo, R., Gao, X. W. & Borriss, R. (2014). Estimulación del crecimiento vegetal y biocontrol mediante *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 diseñado para una acción mejorada. *Química, Biología, Tecnología Agrícola*, 1(1), 1–14.

- Rajalakshmi, P. y Pugalenthi, M. (2016). Detección fitoquímica y actividad antioxidante in vitro de *Lantana camara* L y *Solanum elaeagnifolium* C.\**Revista Internacional de Estudios Botánicos*, 1 , 26–29.
- Ramirez, R.M.I., Vargas, S.R.D., Torrez, M.B.M., Torrescano, U.G.R. y Sanchez, E.A. (2018). Plant leaf extracts for preserving the quality of fresh meat and meat products. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud* <http://biotecnia.unison.mx>.
- Rani, L., Thapa, K., Kanojia, N., Sharma, N., Singh, S., Grewal, A.S., Srivastav, A.L. y Kaushal, J. (2020). An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment.
- Raziard., Schwarz, D., Thompson, AJ. Y Klaring, HP. (2020). La historia del tomate: cómo un cultivo tropical se convirtió en un cultivo global. *Facultad de Ciencias Agrícolas*.
- Regassa, D., Tigre, W. y Shiferaw, A. (2016). Evaluación de variedades de tomate ( *Lycopersicon esculentum* mill.) en la zona de Borana, distrito de Yabello, sur de Etiopía. *Ciencia de cultivos de fitomejoramiento*.
- Reyes, P. J., Enríquez, A. E., Ramírez, A. M., Zúñiga, V. E., Lara, C. y Hernández, M.L.G. (2020). Efecto del quitosano sobre variables del crecimiento, rendimiento y contenido nutricional del tomate. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. <https://doi.org/10.29312/remexca.v1i13.2392>.
- Reyes, T.A., Rincón, E.G., López, P.L., Evangelista, M.Z. y Quiñones A.E. (2015). Lucha entre microbios: una herramienta para el control de enfermedades de plantas. <https://www.revista.unam.mx/vol.16/num11/art92/> Revista Digital Universitaria ISSN: 1607 – 6079.
- Rivera, S.L.M., Ramírez, V.G., Martínez, Y.B., Hernández, A.J. y Aranda, O.S. (2022). Respuesta de variedades de jitomate (*Solanum lycopersicum*) a la infección con *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. ISSN 0185-3309. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2106-8>.
- Roberts, J., & Florentine, S. (2022). Biology, distribution and management of the globally invasive weed *Solanum elaeagnifolium* Cav (silverleaf nightshade): A global review of current and future management challenges. *Weed Research*, 62(6), 393-403.
- Rodríguez, C.J., Pérez, G.A., Ortega, G.L., y Arteaga, B.M. (2020). Estudio hidrosostenible en el cultivo del tomate, su efecto en el rendimiento y calidad del fruto. *Revista Científica*, 18(2), 1819-4087.
- Rodríguez, G.D. & Vargas, R.J. (2022). Efecto de la inoculación con *Trichoderma* sobre el crecimiento vegetativo del tomate (*Solanum lycopersicum*). *Agronomía Costarricense*, 46(2), 47–60. <https://dx.doi.org/10.15517/rac.v46i2.52045>.

- Rodríguez, H.M. G., Gallegos, R. M. Á., Rodríguez, S.L., Fortis, H.M., Luna, O. J. G. y González, S.U. (2020). Cepas nativas de *Bacillus* spp. como una alternativa sostenible en el rendimiento de forraje de maíz. *Terra Latinoamericana*, 38(2), 313-321. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.690>.
- SADER. 2021. Regiones productoras de tomate en México. <https://producepay.com/es/el-blog/produccion-de-tomate-en-mexico-principales-regiones/>.
- SADER. 2022. El jitomate, hortaliza mexicana de importancia mundial. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/el-jitomate-hortaliza-mexicana-de-importancia-mundial?idiom=es>.
- Schad, N. W., J. Jones, B. y W. Chun. (2001). Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, The American Phytopathological Society. St Paul, Minesota. 3ed. Pág. 236-242.
- Sen, Y., Wolf, J.V., Visser, R.GF. y Heusden, S.V. (2014). Cáncer bacteriano del tomate: conocimientos actuales sobre detección, manejo, resistencia e interacciones. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-14-0499-FE>.
- Shahid, I., Han, J., Hanoq, S., Malik, K.A., Borchers, C.H., & Mehnaz, S. (2021). Perfiles de metabolitos de *Bacillus* spp. y su aplicación en la promoción del crecimiento sostenible de las plantas y el biocontrol. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.745144>.
- Shahzad, R., Khan, A.L., Bilal, S., Asaf, S., y Lee, I.J. (2017). Bacterias endófitas promotoras del crecimiento de las plantas frente a infecciones patógenas: un ejemplo de *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 y *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* en tomate. *peer journal*. <https://doi.org/10.7717/peerj.3143>.
- Sharma, P., Tyagi, A., Bhansali, P., Pareek, S., Singh, V., Ilyas, A., Mishra, R., & Poddar, N.K. (2021). Saponinas: extracción, propiedades biomedicinales y camino a seguir para encontrar representantes antivirales. *Food and Chemical Toxicology*, 150, 112075. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112075>.
- Singh, G.M., Ali, S., Akhtar, M. y Surai, S.K. (2012). Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agricultural Sciences*. Vol.3, No.3, 425-433 <http://dx.doi.org/10.4236/as.2012.33050>.
- Skouta, R., Morán, K., Valenzuela, C. A., Vasquez, A. H., y Fenelon, K. (2018). Assessing the antioxidant properties of *Larrea tridentata* extract as a potential molecular therapy against oxidative stress. *Molecules*, 23(7), 1826. <https://doi.org/10.3390/molecules23071826>.
- Smith, E.F. 1910. Una nueva enfermedad del tomate de importancia económica . *Science* 31:794-796.
- Soumitra, P.C., Hartmann, A., Gao, X. y Borris, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42—a review. doi: 10.3389/fmicb.2015.00780.

- Srinivas, C., Devi, D. N., Murthy, K. N., Mohan, C. D., Lakshmeesha, T. R., Singh, B., ... & Srivastava, R. K. (2019). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity—A review. *Saudi journal of biological sciences*, 26(7), 1315-1324.
- Sun, E.H., Ji, E.O., Han, B.L. y Chang, S.O. (2019). Functional Characterization of Two Cellulase Genes in the Gram-Positive Pathogenic Bacterium *Clavibacter michiganensis* for Wilting in Tomato. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-18-0227-R>.
- Tejera, H. B., Rojas, B. M. M. y Heydrich, P. M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 42, núm. 3. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181222321004>.
- Temel, I., Dönmez, M.F., y Temtek, E. (2023). Control del agente bacteriano cancerígeno y marchitante *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* utilizando diferentes aceites esenciales de plantas. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2023.2239872>.
- Tiwari, P., Kumar, B., Mandeep, K., Kaur, G. y Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1): 98–106.
- Tripathi, N., & Sapra, A. (2025). *Tinción de Gram*. En StatPearls. StatPearls Publishing. <https://europepmc.org/article/NBK/nbk562156>.
- Turner, T., Ruiz, G., Gerstel, J., y Langland, J. (2021). Caracterización de la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de la planta botánica *Larrea tridentata*. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21, 344. <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03344-9>.
- Valenzuela, N.L., Ángel, D.N., Ortiz, D.T., Rosas, R.A., García, C.F.O. y Santos, M.O. (2015). Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. on maradol papaya fruit, *Biological Control*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.08.002>.
- Vallejo, A., Feitosa, A., Goullart, A.E., Pires. L.L, y Mosquera, O.M. (2014). Tamizaje de acción antimicrobiana de 34 extractos vegetales contra bacilos gram negativos. *Salud Soc Uptc*. 2014;1(1):34-39.
- Varela, M. P. C., Blanco, A. P. y Díaz, B. J. (2021). ¿Por qué paran las reacciones? Diseñar experimentos para indagar la interacción enzima-sustrato. *Educación Química*, 32(2), e75875. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2021.2.75875>.
- Villa, M. A., Pérez, L.R., Morales, M.H.A., Basurto, S. M., Soto, P.J.M. y Martínez, E.E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358> e-ISSN 2323-0118.

- Villareal, D.M.F., Villa, R.E.D., Cira, C.L.A., Estrada, A.M.I., Parra, C.F.I. y Santos, V.S. (2017). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>.
- Yohannes, W. K., Wan, Z., Yu, Q., Li, H., Wei, X., Liu, Y. y Sun, B. (2020). Prebiotic, Probiotic, Antimicrobial, and Functional Food Applications of *Bacillus amyloliquefaciens*. <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06396>.
- Yu, Z., Gunn, L., Wall, P., y Fanning, S. (2017). Antimicrobial resistance and its association with tolerance to heavy metals in agriculture production. *Food microbiology*, 64, 23-32.
- Yuqing, W., Zhang, Y., Zhipeng, G. y Wencai, Y. (2018). Breeding for resistance to tomato bacterial diseases in China: challenges and prospects. *Horticultural Plant Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2018.08.004>.
- Zhang, W., Yang, W., Meng, Q., Li, Y. y Liu, D. (2010). Screening and identification of antagonistic *Streptomyces* spp. against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato rhizosphere. *Frontiers of Agriculture in China*, 4, 159-164.
- Zhao, C., Luo, L., Wang, E. Raza, A. y Yin, C. (2022). *Bacillus amyloliquefaciens* como excelente agente para biofertilizantes y biocontrol en agricultura: una visión general de sus mecanismos. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127016>.
- Zouari, I., Jlaiel, L., Tounsi, S., y Trigui, M. (2016). Actividad de biocontrol de la cepa endófitas de *Bacillus amyloliquefaciens* CEIZ-11 contra *Pythium aphanidermatum* y purificación de sus compuestos bioactivos. *Biological Control*, 100, 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.007>.