

# Efectividad biológica de extractos de *Agave striata* y *Fouquieria splendens* contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Biological effectiveness of *Agave striata* and *Fouquieria splendens* extracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Jesús Eduardo Ramírez Méndez<sup>1</sup>, Francisco Daniel Hernández Castillo<sup>1\*</sup>, Marco Antonio Tucuch Pérez<sup>1</sup>, Isaac Irving Camacho Aguilar<sup>1</sup>, Roberto Arredondo Valdés<sup>2</sup>, José Ángel Villarreal Quintanilla<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Parasitología. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista. CP. 25315. Saltillo, Coahuila, México.

<sup>2</sup> Universidad Autónoma de Coahuila Facultad de Ciencias Químicas Departamento de Nanobiociencias. Saltillo, Coahuila, México. Ing. J. Cardenas Valdez S/N, Col. República, CP. 25280. Saltillo, Coahuila, México.

<sup>3</sup> Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Botánica. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista. CP. 25315. Saltillo, Coahuila, México.

## RESUMEN

El cancro bacteriano es una de las enfermedades del tomate (*Solanum lycopersicum*), la cual es causada por la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*). En el presente trabajo se realizó la identificación de *Cmm* mediante PCR de punto final utilizando los primers CMM5F y CMM6R. Se evaluó la efectividad de los extractos metanólicos de *Agave striata* y *Fouquieria splendens* sobre *Cmm* *in vitro* e invernadero, así también se obtuvo información acerca de la composición de fitoquímicos presentes en las plantas. El ensayo *in vitro* se realizó mediante la técnica de microdilución en placa desde los 3.9 mg/L a 1000 mg/L, se determinó la  $CI_{50}$  y  $CI_{90}$  de cada extracto. En el experimento en invernadero se evaluó el efecto de los extractos y un producto orgánico "Biobacter" contra *Cmm*, se calculó la incidencia, severidad y parámetros morfométricos. Los resultados *in vitro* indicaron que los extractos de *F. splendens* y *A. striata* presentan inhibición sobre el fitopatógeno, sin embargo, el extracto de *F. splendens* mostro control a menores concentraciones que con *A. striata*. El ensayo en invernadero demostró que la incidencia, severidad y parámetros morfométricos fue menor con el extracto de *F. splendens*, así después con el producto Biobacter.

**Palabras clave:** *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, tomate, extractos metanólicos, efectividad biológica.

## ABSTRACT

Bacterial canker is one of the tomatoes (*Solanum lycopersicum*) diseases caused by the bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*). In this study, *Cmm* was identified by end-point PCR using the primers CMM5F and CMM6R. The efficacy of methanolic extracts of *Agave striata* and *Fouquieria splendens* on *Cmm* *in vitro* under greenhouse conditions was evaluated, as well as information about the composition of phytochemicals present in plants. The *in vitro* assay was performed using the plate microdilution technique from 3.9 mg/L to 1000 mg/L, the  $CI_{50}$  and  $CI_{90}$  of each extract was determined. In the greenhouse experiment, the effect of the extracts and an organic product "Biobacter" against *Cmm* was evaluated on incidence, severity, and

morphometric parameters. The *in vitro* results indicated that the extracts of *F. splendens* and *A. striata* showed inhibition on the phytopathogen. The greenhouse trial showed that the incidence, severity and morphometric parameters were lower with *F. splendens* extract, subsequently, with Biobacter product.

**Keywords:** *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, tomato, methanolic extracts, biological effectiveness.

## INTRODUCCIÓN

El tomate es una de las hortalizas más importantes a nivel mundial; con una superficie cultivada durante el 2020 de 5,051,983 ha y una producción de 186,821,216 t. Los principales países productores de tomate son China, India, Turquía, Estados Unidos y Egipto, en tanto que México ocupa el noveno lugar en producción de 4,137,342 t y una superficie sembrada de 84,926 ha (FAO, 2020). México contribuye con el 19 % de volumen de las exportaciones a nivel mundial, ubicándolo como el principal país exportador por encima de España (14 %) y Países Bajos (13 %) (FAOSTAT, 2020). La producción del cultivo del tomate es afectada por diversos problemas fitosanitarios causados por plagas insectiles y microorganismos fitopatógenos tales como hongos, nematodos, bacterias y virus (Arie *et al.*, 2007). Las enfermedades bacterianas son unas de las principales problemáticas debido a su capacidad de infectar y la dificultad para ser controladas en los sistemas de producción (Calleros, 2013). Entre las principales especies bacterianas responsables de enfermedades en el tomate se encuentran *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*), *Ralstonia solanacearum* (*Rs*), *Agrobacterium tumefaciens* (*At*), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) (Koike *et al.*, 2007; López, 2017). *Cmm* es conocida como "el cáncer" o "cancro bacteriano" (Davis *et al.*, 1984), es una de las principales especies de interés económico por el alto grado de pérdidas que ocasiona en el cultivo de tomate (de León *et al.*, 2011; Nandi *et al.*, 2018), las cuales pueden alcanzar el 100 % si no es controlada (EFSA, 2014; Hadas *et al.*, 2014; FIRA, 2016). Su principal fuente de inóculo es la propagación por medio de semillas infectadas, trasplantes de plantas infectadas, y restos de la planta localizada

en el suelo (Gartemann *et al.*, 2003; Kawaguchi *et al.*, 2010). Esta especie muestra una gran variabilidad en la virulencia (Alvarez *et al.*, 2004), pudiendo sobrevivir en restos de plantas hasta por dos años (Fatmi y Schaad, 2002; Sen *et al.*, 2018). Las estrategias de control disponibles para *Cmm* son principalmente la prevención y exclusión (Xu *et al.*, 2010; De León *et al.*, 2011), las soluciones se basan en la rotación del cultivo, buenas prácticas agrícolas y el uso de semillas sanas (Sen *et al.*, 2015; Tíreng-Karut *et al.*, 2019). Por su parte los productos químicos no han sido eficientes (Balestra *et al.*, 2009), siendo el uso de compuestos cúpricos y de antibióticos los que han mostrado mayor efecto sobre el patógeno (Milijacevic *et al.*, 2009), sin embargo, sus efectos tóxicos, su potencial de acumulación en los suelos y su capacidad para inducir resistencia en los microorganismos fitopatógenos hacia los ingredientes activos, no permite su uso en la agricultura de algunos países. Debido a lo anteriormente mencionado, se realizan trabajos de investigación para desarrollar alternativas orgánicas, amigables con el medio ambiente y que no generen resistencia en los microorganismos (Basim *et al.*, 2000; Sarwar, 2015), mediante extractos de plantas y sus principios activos por sus diversos efectos antimicrobianos (Scarpari *et al.*, 2017; Valdés *et al.*, 2017; Simonetti *et al.*, 2020; Bahaman *et al.*, 2021). Siendo las plantas del género *Agave* una de las que han mostrado actividad antibacteriana (Krishnaveni, 2017; López-Romero *et al.*, 2018; Camacho-Campo *et al.*, 2020); así también como la especie *Fouquieria splendens* (Rodríguez-Garza, 2010; Vega-Menchaca *et al.*, 2013). *Agave striata* es una especie endémica de México, y su distribución se encuentra en el Desierto Chihuahuense desde el estado de Hidalgo hasta Coahuila (Trejo *et al.*, 2016), por su parte *Fouquieria splendens* es la especie más distribuida de la familia Fouquieriaceae y se puede encontrar desde el suroeste de los Estados Unidos, y en México se encuentra en los desiertos de Chihuahua y Sonora, desde San Luis Potosí y Tamaulipas hasta la parte sur de Zacatecas, Querétaro e Hidalgo (Nevárez-Prado *et al.*, 2021). Los objetivos del presente trabajo son; determinar la presencia de fitoquímicos en los extractos metanólicos de las hojas de *A. striata* y de los tallos de *F. splendens*, y determinar su actividad antibacteriana *in vitro* e invernadero contra *Cmm* en tomate.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento de *Cmm*

La cepa de *Cmm* se obtuvo de plantas de tomate Saladette variedad Rio grande, de la zona productora de tomate del municipio de Ahome, en el Estado de Sinaloa. Se obtuvieron muestras de tallos y hojas con síntomas característicos de la enfermedad, ya que mostraban presencia de chancros en los tallos y marchitamiento marginal en los folíolos (Gartemann *et al.*, 2008), en el laboratorio de Micología y Biotecnología del Departamento de Parasitología de la UAAAN las muestras se desinfectaron con una solución de cloro al 3 % durante 3 min, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces y se dejó secar sobre papel estroza estéril. Una vez secas, las muestras se maceraron en bolsas de maceración con agua destilada estéril, posteriormente se tomó un tubo cónico con 9 mL de agua destilada

estéril y se le agregó 1 mL de líquido de la maceración de las muestras, de este se realizó una dilución de  $10^{-6}$ , y posteriormente se sembró en un medio King B (KB) y se re-aislaron las colonias con crecimiento similar al de *Cmm*, se eligieron las que presentaron las colonias amarillas, mucoides convexas, a las cepas aisladas se les realizaron pruebas bioquímicas, propuestas por Shaad *et al.* (2001).

### Identificación molecular de *Cmm*

Se realizó la extracción de ADN de acuerdo con la metodología de Doyle y Doyle (1990), con algunas modificaciones. Para la reacción de la PCR de punto final se utilizaron los primers marca Probiotek CMM5F (5'GCGAATAAGCCCATATCAA3') y CMM6R (5'CGTCAGGAGGTCGTAATA3') específicos para este patógeno, derivados del gen de patogenicidad pat-1 (serina proteasa) presente en el plásmido pCM2, cuyo tamaño de amplicón es de 614 pb aproximadamente (Dreier *et al.*, 1995). En la reacción de PCR se emplearon 7  $\mu$ L de Taq&GoT Mastermix (MB Biomedicals), 5  $\mu$ L de cada primer y 1  $\mu$ L de ADN. Las condiciones para realizar la amplificación requieren de una temperatura inicial de 95 °C durante 3 min, 94° por 30 seg, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min y 72 °C por 5 min, con un total de 30 ciclos, en un termociclador MaxyGene (AxyGen, USA). Posteriormente se realizó la electroforesis mediante un buffer TBE 1X con un gel de agarosa al 1.2 %, para la visualización del gel se utilizó un fotodocumentador UVP.

### Colecta de plantas

Se colectaron plantas de *A. striata* y *F. splendens*, ubicadas en el municipio de General Cepeda, Coahuila, México (25°21'31.09"N y 101°27'54.91"O a 1525 m.s.n.m.), durante el mes de Mayo del 2021. Se depositaron en bolsas de estroza para su traslado al laboratorio de Micología y Biotecnología del departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). En el laboratorio las plantas se lavaron con agua corriente, se secaron y se separaron las partes aéreas de las raíces. Posteriormente las partes aéreas de las plantas se colocaron en una estufa de secado (Arsa AR-130D, México) a 60 °C hasta presentar peso constante. Finalmente, cada planta se trituró con un molino (Surtek Mogra1, México), se pasaron por una licuadora (Mabe, México); finalmente se tamizaron con un tamiz de 0.2  $\mu$ m para guardarse en recipientes oscuros debidamente identificados hasta su uso.

### Preparación de los extractos

Los extractos se prepararon de acuerdo a el método reportado por Jasso de Rodríguez *et al.* (2015), con algunas modificaciones, utilizando como solvente metanol al 96 %; se depositaron 42 g del polvo de cada planta en matraces de 1L adicionando 750 mL del solvente; se colocaron en una parrilla de agitación (Thermo Scientific Cimarec, USA) durante 72 h a una temperatura de 60 °C. Posteriormente el solvente se separó mediante un rotavapor (IKA RV 10 digital V, USA) a 150 r.p.m a temperaturas de 70 °C. Una vez obtenida la fracción metanólica esta se vertió en recipientes de vidrio y se colocaron en una

estufa de secado (Arsa AR-130D, México) a 50 °C durante 48 h, finalmente se obtuvieron los extractos y se colocaron en frascos ámbar para su posterior uso.

### Análisis de compuestos fitoquímicos

Para la identificación de los compuestos fitoquímicos los extractos se prepararon a concentración de 1000 mg/L, y posteriormente se realizó el análisis de presencia de: alcaloides (Prueba de Dragendorf y Sonneschain); azúcares reductores (Prueba de Feling y Benedict); carbohidratos (Prueba de Molisch); carotenoides (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y FeCl<sub>3</sub>); cumarinas (Prueba de Erlich); esteroides y terpenos (Prueba de Liberman-Burchard y Rhosenthalert); flavonoides (Prueba de Shinoda y de NaOH); glicósidos cianogénicos (Prueba de Gringnard); purinas (Prueba de HCl); quinonas (Prueba de Hidróxido de amonio, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y Bortrager); saponinas (Prueba de Espuma) y taninos (Prueba de Gelatina y FeCl<sub>3</sub>, K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) (Sahgal *et al.*, 2009; Usman *et al.*, 2009).

### Efectividad antibacteriana de los extractos metanólicos de plantas sobre *Cmm* *in vitro*

#### Ensayo *in vitro*

Se utilizó la metodología descrita por Tucuch-Pérez *et al.* (2020) mediante microplacas de poliestireno de 96 pozos; en ellas, la primera columna (testigo negativo) se le agregaron 110 µL de caldo nutritivo (medio) y 40 µL de cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolio (revelador), a la segunda columna (testigo positivo) se le agregaron 100 µL de medio más 10 µL de suspensión bacteriana de *Cmm* a concentración de 1x10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonias bacterianas (UFC) UFC/mL y 40 µL de revelador, la tercera columna (testigo solvente) se preparó con 100 µL de medio y solvente (metanol) en una relación 1:1 (v/v) más 10 µL de suspensión bacteriana y 40 µL de revelador, a partir de la columna cuatro, se agregaron 100 µL del extracto a una concentración de 2000 mg/L, quedando en la columna cuatro a 1000 mg/L, se mezcló y se transfirieron 100 µL a la siguiente columna, así sucesivamente hasta la columna doce, obteniendo concentraciones de 1000 a 3.9 mg/L. El siguiente paso consistió en agregar 40 µL de revelador, y finalmente se adicionaron 10 µL de una suspensión bacteriana de *Cmm* a concentración de 1 x 10<sup>6</sup>. Cada microplaca se consideró una repetición con ocho unidades experimentales, y se realizaron tres repeticiones por tratamiento; se incubaron a 26 °C por 48 h y finalmente se realizó una lectura de absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro (Thermo scientific multiskan go 51119200, USA).

### Porcentaje de inhibición

El porcentaje de inhibición se determinó mediante la fórmula propuesta por Arredondo-Valdés *et al.* (2021), donde:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = (1 - (As/Ac)) (100)$$

Ac: Absorbancia de la solución control.

As: Absorbancia de la solución muestra.

### Actividad biológica de los extractos metanólicos de *A. striata* y *F. splendens* contra *Cmm* bajo condiciones de invernadero

El experimento se llevó a cabo en el invernadero del Departamento de Parasitología (25°21'08.01"N y 101°01'38.00"O) de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), ubicada en la ciudad de Saltillo, Coahuila, México, durante el ciclo otoño-invierno de 2021.

### Inoculación y trasplante

Se utilizaron plantas de tomate variedad Rio Grande, con desarrollo de 25 días después de la siembra y con altura de 9 cm aproximadamente al momento del trasplante. Se prepararon vasos de unicel de 1L, y se les agregó 800 gramos de sustrato; el cual consistió de 45 % suelo (previamente pasteurizado), 45 % peat moss y 10 % perlita. Se realizaron heridas en la superficie de las primeras dos hojas verdaderas y el tallo con un hisopo estéril, posteriormente se asperjaron las heridas con una solución de 400 µL de *Cmm* a concentración de 1 x 10<sup>6</sup> UFC/mL, una vez inoculadas se dejaron reposar por 20 min, para después aplicar los tratamientos de los extractos de *F. splendens*, *A. striata* y el producto comercial Biobacter O°.

### Aplicación de los tratamientos

Los tratamientos utilizados fueron T1 = Testigo absoluto, T2 = Testigo inoculado, T3 = Extracto de hojas de *A. striata* (1828 mg/L), T4 = Extracto de tallos de *F. splendens* (1736 mg/L) y T5 = Testigo comercial (Biobacter O° 1 L/ha). En relación a los extractos vegetales la concentración utilizada se seleccionó tomando la Cl<sub>90</sub> del experimento *in vitro*. Estos se aplicaron por aspersión mediante bombas aspersoras de 3 L (J.H. Company 10344, USA). Se realizaron tres aplicaciones, la primera se realizó después de la inoculación de la bacteria; las otras aplicaciones se realizaron a los 7 y 14 d después de la primera aplicación, estas se realizaron directamente en la planta, en cada aplicación se asperjaron tres veces en la parte aérea y tres veces en la parte del tallo.

### Variables evaluadas

Se evaluó la incidencia y severidad de la enfermedad, tanto en follaje como los tallos de las plantas. De igual forma, se evaluaron variables agronómicas, tales como: peso fresco y seco de la biomasa aérea y de la raíz, altura de planta, longitud de raíz y diámetro de tallo. La incidencia de la enfermedad se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Incidencia (I)} = \text{No. de plantas enfermas} / \text{Total de plantas} \times 100$$

La severidad se evaluó mediante la escala propuesta por Mohd Nadzir *et al.* (2019), la cual mide de un rango del 0 al 5 donde: 0 = Sin síntomas, 1 = 0 - 25 % de hojas marchitadas en la planta, 2 = 26 - 50 % de hojas marchitadas en la planta, 3 = 51 - 75 % de hojas marchitadas en la planta, 4 = 76 - 100 % de hojas marchitadas en la planta y 5 = Plantas muertas.

### Análisis estadístico

En el ensayo *in vitro* se realizó un análisis Probit para determinar la concentración inhibitoria al 50 % y al 90 % ( $Ci_{50}$  -  $Ci_{90}$ ) de cada extracto utilizando el programa estadístico Statistical AnalysisSys, V9.0., con los resultados obtenidos se realizó análisis de varianza con las concentraciones inhibitorias; en el estudio se evaluaron los tratamientos con tres repeticiones y se realizaron pruebas de rango de Duncan ( $p < 0.05$ ). Para el experimento bajo condiciones de invernadero se realizó un diseño completamente al azar con cinco tratamientos y cuatro repeticiones. Los datos de las variables evaluadas (incidencia, severidad y parámetros morfométricos) se sometieron a ANVA y pruebas de comparación de medias de Duncan ( $p < 0.05$ ), con el programa estadístico Statistical AnalysisSys, V9.0, cumpliéndose los supuestos de normalidad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Pruebas preliminares para identificación de *Cmm*

A las cepas previamente aisladas de las muestras de las plantas de tomate con la posible presencia de *Cmm* se les realizaron pruebas bioquímicas, propuestas por Shaad *et al.* (2001), en donde la cepa denominada "CV1" mostro similitud con las reportadas para esta bacteria (Tabla 1).

**Tabla 1.** Resultados de puebas bioquímicas correspondientes a la cepa "CV1".

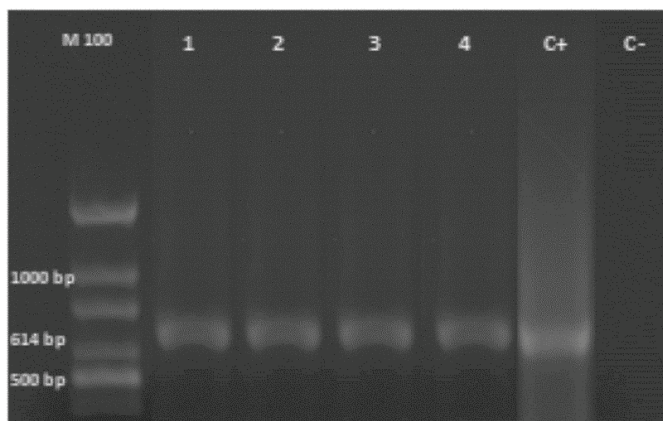
Prueba	Reacción "CV1"	Resultado
Crecimiento en B de King	+	+
Crecimiento a 28 °C	+	+
Colonias amarillas, mucoides y convexas	+	+
Tinción de Gram	+	+
Prueba de RYU	-	+
Oxidasa	-	+
Catalasa	+	+

### Identificación molecular de *Cmm*

Se confirmó que la cepa denominada "CV1" amplificó con los primers CMM5F/CMM6R específicos para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Figura 1) mediante la técnica de PCR de punto final.

### Análisis de los Fitoquímicos identificados en *A. striata* y *F. splendens*

El extracto metanólico de *A. striata* presentó: alcaloides, carbohidratos, flavonoides (flavonones y chalconas), saponinas (triterpenoides y esteroidales), taninos (fenoles), quinonas (an-



**Figura 1.** Visualización del segmento de 614 bp. Carril "M" corresponde al marcador molecular de 10,000 bp; Carriles 1, 2, 3 y 4 corresponden a la misma cepa "CV1", aislada de las plantas de tomate colectadas con síntomas de *Cmm*; carril 5 corresponde a un control positivo (C+) (*Cmm*); y el carril 6 a un control negativo (C-) (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*). \*Cepas control + (*Cmm*) y - (*Xcv*) obtenidas de la colección microbiológica del laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología de la UAAAN.

**Figure 1.** Visualization of the 614 bp segment. Lane "M" corresponds to the 10,000 bp molecular marker; Lanes 1, 2, 3 and 4 correspond to the same strain "CV1", isolated from tomato plants collected with *Cmm* symptoms; lane 5 corresponds to a positive control (C+) (*Cmm*); and lane 6 to a negative control (C-) (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*). \*Control strains + (*Cmm*) and - (*Xcv*) obtained from the microbiological collection of the Phytopathology laboratory of the Department of Parasitology of UAAAN.

traquinonas y benzoquinonas), así como cumarinas (Tabla 2). Se han encontrado en *A. striata* presencia de flavonoles (derivados de quercetina) (Almaraz-Abarca *et al.*, 2013), así como saponinas esteroidales (Marker y López, 1947). La presencia de saponinas esteroidales en el género *Agave* ha sido bien documentada (Scout y Eagleson, 1988) así los como compuestos alcaloides, flavonoides, terpenoides, cumarinas, azúcares reductores, inulina, fructanos, entre otros (Chigodi *et al.*, 2013; Almaraz-Abarca *et al.*, 2013). En las especies de *A. salmiana* y *A. fourcroydes* encontraron saponinas, flavonoides, alcaloides, taninos (Valdivia *et al.*, 2018; Delgado-Alvarado, 2021). Así también se han encontrado presencia de carbohidratos, azúcares reductores, quinonas y lactonas sesquiterpénicas en hojas de *A. Americana* (Cervantes-Tenorio y Reyna-Pizán, 2019), así como glucósidos cardiotónicos en *A. angustifolia* (Camacho-Campos *et al.*, 2020). Por su parte la especie *F. splendens* presentó: alcaloides, carbohidratos, flavonoides (flavonones, flavonas, flavononas y chalconas), azúcares reductores, saponinas (triterpenoides), taninos (derivados Acido

**Tabla 2.** Fitoquímicos identificados en extractos metanólicos.

**Table 2.** Phytochemicals identified in methanolic extracts.

	A		F			GC		AZ		S		T				Q			Cu	P	Ca
	F1	F2	F3	F4	Az1	Az2	S1	S2	T1	T2	T3	T4	Q1	Q2	Q3						
<i>A. striata</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>F. splendens</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-

+ = Fitoquímico presente, - = Fitoquímico ausente; A = Alcaloides, C = Carbohidratos, F = Flavonoides, GC = Glucósidos Cianogenicos, AZ = Azúcares Reductores, S = Saponinas, T = Taninos, Q = Quinonas, Cu = Cumarinas, P = Purinas, Ca = Carotenoides, F1 = Flavonones, F2 = Flavonas, F3 = Flavononas, F4 = Chalconas, Az1 = , Az2, S1 = Triterpenoides, S2 = Esteroidal, T1 = Gelatina, T2 = Derivados Acido Gálico, T3 = Derivados Catecoles, T4 = Fenoles, Q1 = Antraquinonas, Q2 = Benzoquinonas, Q3 = Antronas.

Galico, derivados de catecol y fenoles) y quinonas (antraquinonas y benzoquinonas) (Tabla 2). Bate-Smith (1964), describe que los constituyentes más característicos del género *Fouquieria* corresponden a la flavonoides (leucocianidina, kaempferol y quercetina), ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido elágico, cumarina y escopoletina. Rodríguez-Garza (2010), encontró en *F. splendens* presencia de grupos carbonilo, oxidrilos fenólicos, esteroides y metilesteroides, cumarinas, saponinas, sesquiterpenlactonas y flavonoides. Dentro de la composición del ocotillo se descubrió que tanto los tallos como las hojas producían soluciones amarillas producto de varios flavonoides como el kaempferol, ermanina y cetina, además flavonas apigenina, acacetina, luteolina y crisoiol. Entre estos, apigenina y ermanina, rutina y quercetina-3-O-glucósido fueron los principales compuestos fenólicos en las hojas (Wollenweber, 1994; Monreal-García et al., 2019), también se han encontrado triterpenos, triterpenoides, saponinas esteroideas y compuestos iridoides (Takhtajan, 2009), y dentro de las flores los fitoesteroides y alcanos de cadena larga y corta; y en el tallo compuestos como el Dammaran-triterpeno, el fouquierol y el isofouquierol, así como el dammarendiol en las raíces (Hegnauer, 1989; Waterman, 1985). Por otro lado, en el ocotillo se ha aislado el pyxinol y el ocotillol, el último es una saponina triterpenoides el cual presenta actividades interesantes como la inhibición del crecimiento de bacterias con bajas tasas de toxicidad (Pokhilo y Uvarova, 1988; Bi Y. et al., 2017).

### Efectividad antibacteriana *in vitro*

Los extractos de las hojas de *A. striata* y de los tallos de *F. splendens* presentaron efecto inhibitorio en el crecimiento de *Cmm* (Figura 2 y Tabla 3), se observó que *A. striata* inhibió desde 125 mg/L y *F. splendens* desde 62.5 mg/L con 20.86 % y 7.69 % respectivamente, por su parte el análisis Probit estimó una  $CI_{50}$  y  $CI_{90}$  de 389.28 y 1828 mg/L para *A. striata*, y 308.82 y 1736 mg/L para *F. splendens* (Tabla 4).

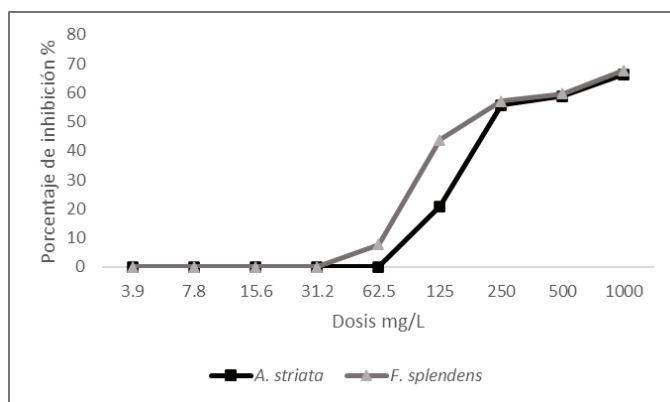
No se encuentra en la literatura científica reportes sobre el efecto de extractos de *A. striata* y *F. splendens* en la inhibición de *Cmm*. El género *Agave* ya ha mostrado efecto bactericida con las

especies de *A. argentium*, *A. stricta*, *A. americana* y *A. angustifolia* los cuales mostraron actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *E. coli* que afectan la salud humana (Krishnaveni, 2017; López-Romero et al., 2018; Camacho-Campo et al., 2020). Así mismo la especie *F. splendens* ha mostrado efecto antibacteriano contra *S. aureus* y *E. coli* (Rodríguez-Garza, 2010; Vega-Menchaca et al., 2013), y contra *B. cereus*, *B. subtilis* (Rodríguez-Garza, 2010). Sin embargo la actividad antibacteriana de extractos vegetales contra *Cmm* ya ha sido reportada por Arredondo-Valdés et al. (2020) con extractos etanólicos de hojas de *Magnolia tamaulipana* reportando una  $IC_{50}$  y  $IC_{90}$  de 64.75 – 176.73 ppm; además Arredondo-Valdés et al. (2021) utilizaron extractos etanólicos de hojas de *Moringa oleifera* contra *Cmm*, obteniendo una  $IC_{50}$  fue de 350.48 ppm. Pérez-Pérez et al. (2020) señalan que los extractos metanólicos, hexánico y de acetato de etilo a partir de raíces de *Jatropha dioica* Seseé (Sangre de drago), también inhibieron el crecimiento de *Cmm*, con una mejor respuesta con acetato de etilo con una  $CI_{50}$  de  $2.0 \pm 0.43$  mg mL<sup>-1</sup>. De igual manera se reportan con los extractos metanólicos de hojas de *Calendula officinalis* y *Echinacea purpurea* actividad inhibitoria contra *Cmm* (Aksoy et al., 2021).

### Efectividad biológica de los extractos metanólicos de *A. striata* y *F. splendens* contra *Cmm* en el cultivo de tomate bajo condiciones de invernadero

#### Incidencia y severidad de la enfermedad

Los resultados mostraron que no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos, a excepción del tratamiento con *F. splendens* contra el tratamiento inoculado. Siendo la incidencia de *F. splendens* 25 %, *A. striata* y Biobacter 50 % y el testigo inoculado 100 %. (Tabla, 5). Por su parte, la severidad no mostró diferencias significativas entre tratamientos, a excepción del testigo inoculado el cual presentó una severidad de 3.25, siendo superior a la presentada por los tratamientos aplicados, los cuales mostraron una severidad de 1, 0.5 y 0.25 en el caso de *A. striata*, *F. splendens* y Biobacter. El efecto obtenido sobre la disminución de la enfermedad de *Cmm* en las plantas tratadas puede ser debido a que los extractos de *A. striata* y *F. splendens* presentaron fitoquímicos tales como: alcaloides, carbohidratos, flavonoides, saponinas, taninos, quinonas, cumarinas, sin embargo *F. splendens* también presentó azúcares reductores y mayor presencia de taninos. Dichos compuestos presentan actividad antibacteriana al degradar y alterar la pared celular, inhiben la actividad enzimática e inactiva tóxicos de origen microbiano (Sepúlveda-Jiménez et al., 2003; Ávalos y Pérez, 2009; Andrade-Bustamante et al., 2017). La presencia de taninos hidrolizables, en su mayoría elagitaninos y galotananos (precursores del ácido gálico) han mostrado efectividad antibacteriana, pues tienen la capacidad de formar enlaces con glicoproteínas presentes en las membranas bacterianas, causando inestabilidad e inhibición a varias funciones vitales de los microorganismos, como: protección celular, transporte de nutrientes o proteínas y obtención de energía (Rosero-Ortiz, 2021), estos se encuentran presentes en los extractos de *F. splendens*, debido a esto pudo haber sido mayor la eficacia en el control de *F. splendens* contra *Cmm*.



**Figura 2.** Inhibición de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* por extractos de *Agave striata* y *Fouquieria splendens* determinado por el método de microdilución en placa.

**Figure 2.** Inhibition of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by extracts of *Agave striata* and *Fouquieria splendens* determined by the plate microdilution method.

**Tabla 3:** Porcentaje de inhibición de las diferentes concentraciones de los extractos metanólicos de hojas de *Agave striata* y tallos de *Fouquieria splendens*.**Table 3:** Inhibition percentage of the different concentrations of methanolic extracts from leaves of *Agave striata* and stems of *Fouquieria splendens*.

Tratamientos	1000 mg/L	500 mg/L	250 mg/L	125 mg/L	62.5 mg/L	31.2 - 3.9 mg/L
A. striata	66.34	58.89	55.81	20.86	0	0
F. splendens	67.74	59.67	57.10	43.82	7.69	0

**Tabla 4.** Valores de las concentraciones inhibitorias al 50 y 90 % ( $Ci_{50}$  y  $Ci_{90}$ ) de los extractos de *Agave striata* y *Fouquieria splendens* sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* In Vitro.**Table 4.** Inhibitory concentration at 50 and 90 % ( $Ic_{50}$  and  $Ic_{90}$ ) of *Agave striata* and *Fouquieria splendens* extracts on *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* In Vitro.

Tratamientos	$Ci_{50}$	$Ci_{90}$
A. striata	389.28 mg/L	1828 mg/L
F. splendens	308.82 mg/L	1736 mg/L

**Tabla 5:** Incidencia y Severidad en follaje de plantas de tomate inoculadas con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y tratadas con extractos de *Agave striata* y *Fouquieria splendens*.**Table 5:** Incidence and Severity in tomato plants foliage inoculated with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and treated with *Agave striata* and *Fouquieria splendens* extracts.

Tratamientos	Incidencia	Severidad
1. Tratamiento Absoluto	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
2. Tratamiento Inoculado	100 <sup>b</sup>	3.25 <sup>b</sup>
3. Tratamiento con extracto de A. striata	50 <sup>ab</sup>	1.00 <sup>a</sup>
4. Tratamiento con extracto de F. splendens	25 <sup>a</sup>	0.25 <sup>a</sup>
5. Tratamiento producto comercial "Biobacter O"	50 <sup>ab</sup>	50 <sup>a</sup>

\*Valores con la misma letra son estadísticamente similares (Duncan,  $p < 0.05$ ).

### Parámetros morfométricos evaluados

Los resultados obtenidos en los parámetros morfométricos evaluados (Tabla 6), muestran que los tratamientos (*A. striata*, *F. splendens* y Biobacter) mostraron similitud estadística con el testigo absoluto en diámetro de tallo, para altura de planta *F. splendens* y Biobacter mostraron relación estadística con el testigo absoluto, para tamaño de raíz los tratamientos no mostraron diferencias significativas entre ellos, y solo *F. splendens* mostró similitud con el testigo absoluto, para peso fresco tampoco se observaron diferencias entre los tratamientos y solo Biobacter mostró similitud con el testigo absoluto, para el peso seco el mejor tratamiento fue Biobacter el cual se separó estadísticamente de los tratamientos de *A. striata* y *F. splendens*, esto se puede entender ya que el producto Biobacter en su formulación orgánica además de extractos vegetales, por esporas de bacterias bioestimuladoras de *Bacillus* spp. Por su parte *F. splendens* mostro similitud estadística en diámetro de tallo, altura de planta y tamaño de raíz con el testigo absoluto, lo que podría indicar que este extractos pudiera tener acción bioestimuladora de crecimiento en las plantas tratadas.

**Tabla 6:** Parámetros morfométricos de plantas inoculadas de tomate con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, y tratadas con extractos de *Agave striata* y *Fouquieria splendens* bajo condiciones de invernadero.**Table 6:** Morphometric parameters of tomato plants inoculated with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, treated with *Agave striata* and *Fouquieria splendens* extracts under greenhouse conditions.

Tratamientos	Diámetro de tallo (mm)	Altura de tallo (cm)	Tamaño de raíz (cm)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
Absoluto	4.06 ± 0.73 <sup>a</sup>	13.8 ± 1.18 <sup>a</sup>	6.55 ± 0.91 <sup>a</sup>	3.86 ± 0.57 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.08 <sup>a</sup>
Inoculado	2.78 ± 0.27 <sup>c</sup>	6.3 ± 0.91 <sup>c</sup>	3.92 ± 0.62 <sup>c</sup>	2.06 ± 0.14 <sup>c</sup>	0.18 ± 0.02 <sup>d</sup>
A. striata	3.54 ± 0.23 <sup>ab</sup>	9.25 ± 1.08 <sup>b</sup>	5.5 ± 0.32 <sup>b</sup>	2.39 ± 0.51 <sup>bc</sup>	0.26 ± 0.03 <sup>c</sup>
F. splendens	3.78 ± 0.17 <sup>ab</sup>	12.9 ± 0.56 <sup>a</sup>	6.75 ± 0.75 <sup>ab</sup>	2.81 ± 0.19 <sup>bc</sup>	0.27 ± 0.03 <sup>c</sup>
5. Biobacter	3.18 ± 0.14 <sup>ab</sup>	11.4 ± 1.80 <sup>a</sup>	5.57 ± 0.25 <sup>b</sup>	3.24 ± 0.97 <sup>ab</sup>	0.31 ± 0.03 <sup>b</sup>

\*Valores con la misma letra son estadísticamente similares (Duncan,  $p < 0.05$ ).

### CONCLUSIONES

Los compuestos fitoquímicos determinados en los extractos metanólicos de *A. striata* y *F. splendens* pertenecen a las familias de los alcaloides, carbohidratos, flavonoides, saponinas, taninos, quinonas, cumarinas, sin embargo, *F. splendens* tuvo mayor presencia de taninos, flavonoides y preceñica de azúcares reductores. En el ensayo *in vitro* ambos extractos mostraron actividad antibacteriana sobre *Cmm*, sin embargo, en el experimento bajo condiciones de invernadero el extracto de *F. splendens* mostró mayor reducción en la incidencia y severidad, seguido de Biobacter, y por último el extracto de *A. striata*. En cuanto a los parámetros morfométricos los tratamientos con mayor efectividad biológica contra *Cmm* fueron Biobacter y *F. splendens*. Los resultados muestran que la presencia de fitoquímicos en los extractos puede estar relacionado con la eficiencia en el control de *Cmm*, ya que *F. splendens* presento mayor número de fitoquímicos que *A. striata*.

### AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, mediante el proyecto de asignación 2020-000026-02NACF-17358, y a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro con clave 38111-425101001-2455.

### REFERENCIAS

- Aksoy, H.M., Arslanoğlu, Ş.F., Edbeib, M.F., Kaya, Y. y Marakli, S. 2021. Actividad antibacteriana de los extractos de *Calendula officinalis* y *Echinacea purpurea* contra el agente causal del cancro bacteriano del tomate: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 20: 496-502.

- Almaraz-Abarca, N., González-Elizondo, M., Campos, M., Ávila-Sevilla, Z.E., Delgado Alvarado, E.A. y Ávila-Reyes, J.A. 2013. Variability of the foliar felon profiles of the *Agave victoriae-reginae* complex (Agavaceae). *Botanical Sciences*. 91(3): 295-306.
- Alvarez, A.M., Kaneshiro, W.S. y Vine, B. G. 2004. Diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* populations in tomato seed: What is the significance. *Acta Horticulturae*. 695:205-214.
- Andrade-Bustamante, G., García-López, A.M., Cervantes-Díaz, L., Aíl-Catzim, C.E., Borboa-Flores, J. y Rueda-Puente, E.O. 2017. Estudio del potencial biocontrolador de las plantas autóctonas de la zona árida del noroeste de México: control de fitopatógenos. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*. 49(1): 127-142.
- Arie, T., Takahashi, H., Kodama, M., y Teraoka, T. 2007. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant Biotechnology*. 24(1): 135-147.
- Arredondo-Valdés, R., Chacón-Hernández, J.C., Reyes-Zepeda, F., Hernández-Castillo, F.D., Anguiano-Cabello, J.C., Heinz-Castro T.Q., Mora-Ravelo S.G. 2020. *In vitro* antibacterial activity of *Magnolia tamaulipana* against tomato phytopathogenic bacteria. *Plant Protection Science*. 56(4): 268-274.
- Arredondo-Valdés, R., Hernández-Castillo, F.D., Rocandio-Rodríguez, M., Anguiano-Cabello, J.C., Rosas-Mejía, M., Vanoye-Eligio, V., Ordaz-Silva, S., López-Sánchez, I.V., Carrascosa-Peña, L.D. y Chacón-Hernández, J.C. 2021. *In vitro* Antibacterial Activity of *Moringa oleifera* Ethanolic Extract against Tomato Phytopathogenic Bacteria. *Phyton*. 90(3): 1299.
- Ávalos, G.A. y Pérez-Urria, C.E. 2009. Serie Fisiología Vegetal. *Reduca Biología*. 2(3): 119-145.
- Balestra, G.M., Heydari, A., Ceccarelli, D., Ovidi, E. y Quattrucci, A. 2009. Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. *Crop Protection*. 28: 807-811.
- Bahaman, A.H., Wahab, R.A., Abdul Hamid, A.A., Abd Halim, K.B. y Kaya, Y. 2021. Molecular docking and molecular dynamics simulations studies on  $\beta$ -glucosidase and xylanase *Trichoderma asperellum* to predict degradation order of cellulosic components in oil palm leaves for nanocellulose preparation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 39(7): 2628-2641.
- Basim, H., Yegen, O. y Zeller, W. 2000. Antibacterial effect of essential oil of *Thymbra spicata* L. var. *spicata* on some plant pathogenic bacteria/Die antibakterielle Wirkung des ätherischen Öls von *Thymbra spicata* L. var. *spicata* auf phytopathogene Bakterien. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*. 279(3):279-284.
- Bate-Smith, E.C. 1964. Chemistry and taxonomy of *Fouquieria splendens* Engelm.: A new member of the asperuloside group. *Phytochemistry*. 3(5):623-625.
- Bi, Y., Liu, X.X., Zhang, H.Y., Yang, X., Liu Z.Y., Lu J., Lewis, P.J., Wang, Ch.Z., Xu, J.Y., Meng, Q.G., Ma, K. y Yuan, Ch.S. 2017. Synthesis and antibacterial evaluation of novel 3-substituted ocotillol-type derivatives as leads. *Molecules*. 22(4):1-10.
- Calleros, G.V. 2013. Manejo y Control de las Enfermedades Bacterianas en Productos Agrícolas. XL Congreso Nacional y XV Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 31: 74-75.
- Camacho-Campos, C., Pérez-Hernández, Y., Valdivia-Ávila, A., Rubio-Fontanills, Y. y Fuentes-Alfonso, L. 2020. Evaluación fitoquímica, antibacteriana y moluscicida de extractos de hojas de *Agave* spp. *Revista Cubana de Química*. 32(3): 390-405.
- Cervantes-Tenorio, R.M. y Reyna-Pizán, T.N. 2019. Identificación fitoquímica y aislamiento de microorganismos endófitos de *Agave americana*. Universidad María Auxiliadora. Lima, Perú. 21-23 pp.
- Chigodi, M.O., Samoei, D.K. y Muthangya, M. 2013. Phytochemical screening of *Agave sisalana* Perrinele aves (waste). *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 4(4): 200-204.
- Davis, M.J., Gillaspie, A.G., JrVidaver, A.K. y Harris, R.W. 1984. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov. subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 34: 107-117.
- De León, L., Sivero, F., López, M. Y Rodríguez, A. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seed born tomato pathogen: Healthy seeds are still the goal. *Plant Diseases*. 95(11): 1328-1339.
- Delgado-Alvarado, E.A., Ávila-Reyes, J.A., Torres-Ricario, R., Naranjo-Jiménez, N., Chaidez-Ayala, A.I. y Almaraz-Abarca, N. 2021. Caracterización fitoquímica de *Agave shrevei* Gentry. *e-CUCBA*. (16): 56-59.
- Doyle, J.J. y Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13-15.
- Dreier, J., Bempohl, A. y Eichenlaub, R. 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*. 85:462-468.
- EFSA (2014). Scientific opinion on the pest categorisation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.* *EFSA Journal*. 12(6): 1-26.
- Fatmi, M. y Schaad, N.W. 2002. Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathology*. 51:149-154.
- FAO [Consultado 12 Marzo 2022] 2020. FAOSTAT. Disponible en: <http://www.fao.org/foostat/es/#home/>.
- FAOSTAT [Consultado 13 Marzo 2022] 2020. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Estadísticas. Disponible En: <http://www.fao.org/foostat/es/#home>.
- FIRA. 2016. Panorama Agroalimentario: Tomate rojo. *Panorama Agroalimentario*. 2-10 pp.
- Gartemann, K.H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R. y Burger, A. 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*. 106: 179-191.
- Gartemann, K.H., Abt, B., Bekel, T., Burger, A., Engemann, J., Flügel, M., Gaigalat, L., Goesmann, A., Gräfen, I., Kalinowski, J., Kaup, O., Kirchner, O., Krause, L., Linke, B., MacHardy, A., Meyer, F., Pohlé, S., Ruckert, C., Schneiker, S., Zellermann, E.M., Puhler, A. y Eichenlaub, R. 2008. The genome sequence of the tomatopathogenic Actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *Journal of Bacteriology*. 190: 2138-2149.
- Hadas, R.G., Kritsman, Klietman F., Gefen, T. y Manulis, S. 2014. Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant pathology*. 54: 643-649.

- Hegnauer, R. 1989. Chemotaxonomie Der Pflanzen. In an overview of the distribution and the systematic importance of plant substances. Birkhäuser-Verlag, Basel. 8: 684-689.
- Jasso de Rodríguez, D., Trejo-González, F.A., Rodríguez-García, R., Díaz-Jimenez, M.L.V., Sáenz-Galindo, A., Hernández-Castillo, F.D., Villarreal-Quintanilla, J.A. y Peña-Ramos F.M. 2015. Antifungal activity *in vitro* of *Rhus muelleri* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Industrial Crops and Products. 75: 150-158.
- Kawaguchi, A., Tanina, K. y Inoue, K. 2010. Molecular typing and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouses in Japan. Plant Pathology. 59: 76-83.
- Koike, S.T., Gladders, P. y Paulos, A.O. 2007. Vegetables Diseases. London, U.K: Manson Publishing. 320 pp.
- Krishnaveni, V. 2017. Investigation of phytochemical and antibacterial activity on *Agave americana* methanolic extract for medical applications. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 8(3): 500-505.
- López, M.L.M. 2017. Manual técnico del cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum*). San José, Costa Rica: Instituto Nacional de Innovación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria. 76-80 pp.
- López-Romero, J.C., Ayala-Zavala, J.F., Peña-Ramos, E.A., Hernández, J. y González-Ríos, H. 2018. Antioxidant and antimicrobial activity of *Agave angustifolia* extract on overall quality and shelf life of pork patties stored under refrigeration. Journal of Food Science and Technology. 55(11): 4413-4423.
- Marker, R.E. y López, J. 1947. Sapogeninas esteroides. Nº 162. Kappogenina y Furcogenina. Journal of American Society. 69(10): 2380-2383.
- Milijasevic, S., Todorovic, B., Potocnik, I., Rekanovic, E. y Stepanovic, M. 2009. Effects of copper-based compounds, antibiotics and a plant activator on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouse tomato seedlings. Pesticide and Phytomedicine. 24: 19-27.
- Mohd-Nadzir, M.M., Vieira-Lelis, F.M., Thapa, B., Ali, A., Visser, R.G.F., Van-Heusden, A.W. y 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.
- Monreal-García, H., Almaraz-Abarca, N., Ávila-Reyes J., Torres-Ricario R., González-Elizondo S., Herrera-Arrieta Y. y Gutiérrez-Velázquez M.V. 2019. Phytochemical variation among populations of *Fouquieria splendens* (Fouquieriaceae). Botanical Science. 97(3): 398-412.
- Nandi, M., MacDonald, J., Liu, P., Weselowski, B. y Yuan, Z.C. 2018. *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: cancro bacteriano del tomate, interacciones moleculares y manejo de enfermedades. Patología de las Plantas Moleculares. 19(8): 1-47.
- Nevárez-Prado, L.O., Rocha-Gutiérrez, B.A., Néder-Suárez, D., Córdova-Lozoya, M.T., Ayala-Soto, J.G., Salazar-Balderrama, M.I., Ruiz-Anchondo, T.J. y Hernandez-Ochoa, L.R. 2021. El género *Fouquieria*: una revisión de aspectos etnobotánicos, fitoquímica y actividad biológica. Tecnociencia, Chihuahua. 15(3): 186-220.
- Pérez-Pérez, J.U., Guerra-Ramírez, D., Reyes-Trejo, B., Cuevas-Sánchez, J.A. y Guerra-Ramírez, P. 2020. Actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos de *Jatropha dioica* Seseé contra bacterias fitopatógenas de tomate. Polibotánica. (49): 125-133.
- Pokhilo, N.D. y Uvarova, N.I. 1988. Isoprenoids of various species of the genus *Betula*. Chemistry of Natural Compounds. 24(3): 273-285.
- Rodríguez-Garza, R.G. 2010. Tamizaje fitoquímico y actividad biológica de *Fouquieria splendens* (Engelmann), *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) y *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma De Nuevo León. Nuevo León, México, 32-35 pp.
- Rosero-Ortiz, J.N. 2021. Revisión actualizada sobre las actividades farmacológicas y aplicaciones de los taninos. Facultad de Ciencias Químicas. Quito, Ecuador. 29-35 pp.
- Sahgal, G., Ramanathan, S., Sasidharan, S., Mordi, M. N., Ismail, S. y Mansor, S. M. 2009. Phytochemical and antimicrobial activity of *Swietenia mahagoni* crude methanolic seed extract. Tropical Biomedicine. 26(3): 274-279.
- Sarwar, M. 2015. Biopesticides: an effective and environmental friendly insect-pests inhibitor line of action. International Journal of Engineering and Advanced Research Technology. 1(2): 10-15.
- Scarpari, M., Reverberi, M., Parroni, A., Scala, V., Fanelli, C., Pietricola, C., Zjalic, S., Maresca, V., Tafuri, A., Ricciardi, M. R., Liccheta, R., Mirabilii, S., Sveronis, A., Cescutti, P. y Rizo, R. 2017. Tramesan, a novel polysaccharide from *Trametes versicolor*. Structural characterization and biological effects. Plos One. 12(8): e0171412.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. y Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St Paul, Minnesota, USA. APS Press.
- Sen, Y., Van der Wolf, J., Visser, R.G.F. y Van Heusden, S. 2015. Bacterial canker of tomato: current knowledge of detection, management, resistance, and interactions. Plant Disease 99(1): 4-13.
- Sen, Y., Aysan, Y., Mirik, M., Ozdemir, D., Meijer-Dekens, F., van der Wolf, J.M., Visser, R. G.F. y Van Heusden S. 2018. Genetic characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Turkey. Plant Disease. 102: 300-308.
- Scout, T. y Eagleson, M. 1988. Enciclopedia Concisa de Bioquímica. 2da. Ed. Acriba. España. 712 p.
- Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoin, H. y Rocha-Sosa, M. 2003. La participación de metabolitos secundarios en la defensa de plantas. Revista Mexicana de Fitopatología. 21(3): 354-363.
- Simonetti, G., Pucci, N., Brasili, E., Valletta, A., Sammarco, I., Carnevale, E., Pasqua G. y Loreti, S. 2020. In vitro antimicrobial activity of plant extracts against *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae causal agent of bacterial canker in kiwifruit. Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology. 154(1): 100-106.
- Takhtajan, A. (Ed.) 2009. Class Magnoliopsida (Dicotyledons). Flowering Plants. Springer. Amsterdam, Netherlands. 7-588.
- Tíreng-Karut, S., Horuz, S. y Aysan, Y. 2019. Domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı etmeni *Clavibacter michiganensis* Subsp. *michiganensis*' in tohumda aranması ve tohum uygulamalarının patojen gelişimine etkisinin belirlenmesi. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi. 16(3): 284-296.
- Trejo, L., Alvarado-Cárdenas, L.O., Scheinvar, E. y Eguiarte, L.E. 2016. Population genetic analysis and bioclimatic modeling in *Agave striata* in the Chihuahuan Desert indicate higher genetic variation and lower differentiation in drier and more variable environments. American journal of botany. 103(6): 1020-1029.
- Tucuch-Pérez, M.A., Arredondo-Valdés, R. y Hernández-Castillo, F.D. 2020. Antifungal activity of phytochemical compounds of extracts from Mexican semi-desert plants against *Fusarium oxysporum* from tomato by microdilution in plate method. Nova Scientia. 12(25): 1-19.



- Usman, H., Abdulrahman F.I. y Usman A. 2009. Qualitative phytochemical screening and *in vitro* antimicrobial effects of methanol stem bark extract of *Ficus thonningii* (Moraceae). African Journal Traditional Alternative Medicine. 6(3): 289-295.
- Valdés, R.A., Castillo, F.D.H., Cabello, J.C.A., Fuentes, Y.M.O., Morales, G.G., Cantú, D.J. y Aguilar, C.N. 2017. Review of antibacterial activity of plant extracts and growth-promoting microorganism (GPM) against phytopathogenic bacterial tomato crop. European Journal of Biotechnology and Genetic Engineering. 4(1): 11-27.
- Valdivia, A.L., Fontanills, Y.R., Álvarez, L.M.H., Rabelo, J.J., Hernández, Y.P. y Tundidor, Y. P. 2018. Propiedades fitoquímicas y antibacterianas de los extractos de las hojas de *Agave fourcroydes* Lem.(henequén). Revista Cubana de Plantas Medicinales. 23(2): 1-3.
- Vega-Menchaca, M.C., Rivas-Morales, C., Verde-Star, J., Oranday-Cárdenas, A., Rubio-Morales, M.E., Núñez-González, M.A. y Serrano-Gallardo, L.B. 2013. Antimicrobial activity of five plants from Northern Mexico on medically important bacteria. African Journal of Microbiology Research. 7(43): 5011-5017.
- Waterman, P.D. 1985. Triterpenes from the stem bark of *Commiphora dalzielii*. Phytochemistry. 23(12): 2925-2928.
- Wollenweber, E. 1994. External Flavonoids of Ocotillo (*Fouquieria splendens*). Journal of Biosciences. 689-690.
- Xu, X., Miller, F., Baysal-Gurel, K., Gartemann, R., Eichenlaub, K. y Rajashekara, G. 2010. Bioluminescence imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection in tomato seeds and plants. Applied Environmental Microbiology. 76: 3978-3988.