









Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* y en invernadero de extractos de *Salvia amarissima* contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Evaluation of the antibacterial activity *in vitro* and in the greenhouse of the extracts of *Salvia amarissima* against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Rodríguez González, E. M.¹, López Muraira, I.G.¹, Bautista Redonda, F. E.³,
Flores Martínez, H.¹, Andrade González, I.¹, Farías Cervantes, V. S.¹,
Silos Espino, H.², Alpuche-Solís, A.G.³

¹ Tecnológico Nacional de México/ I.T. Tlajomulco. División de Estudios de Posgrado e Investigación. Km 10, Carretera Tlajomulco-San Miguel Cuyutlán. C.P. 45645 Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco. México.

² Tecnológico Nacional de México/I.T. Llano. Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. Carretera Aguascalientes-San Luis Potosí km 18, CP. 20330, El Llano, Aguascalientes, México.

³ Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. (IPICYT). Camino a la Presa San José 2055. Col. Lomas 4ta sección C.P. 78216. San Luis Potosí, S.L.P., México.



Please cite this article as/Como citar este artículo:

Hernández Martínez, R., Santacruz Varela, A., Reyes Méndez, C.A., López Sánchez, H., Lobato Ortiz, R., Castillo González, F. (2024). Development of single-cross maize hybrids with different parent selection strategies. *Revista Bio Ciencias*, 11, e1615. <https://doi.org/10.15741/revbio.11.e1615>

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: December 05th 2023.

Accepted/Aceptado: May 07th 2024.

Available on line/Publicado: May 28th 2024.

RESUMEN

El chancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), representa una de las amenazas más devastadoras para el cultivo de tomate. En este estudio se investigó la eficacia antimicrobiana de la fracción de acetato de etilo obtenida a partir del extracto soluble en acetona de hojas y flores de *Salvia amarissima* (EC-SA AcOEt), así como de los diterpenoides amarissinina A (STJ-3) y amarissinina C (STJ-1), como posibles tratamientos biorracionales para el control de *Cmm*, comparándolos con un control químico tradicional. Mediante ensayos de inhibición *in vitro*, se observó que el diterpenoide STJ-1 de *S. amarissima* mostró la mayor actividad antimicrobiana de todos los tratamientos, a una concentración de 25 µg/mL. En condiciones de invernadero, el tratamiento con 25 µg/mL de STJ-1 de *S. amarissima* redujo en un 30 % la incidencia y un 42 % el índice promedio de la severidad del cáncer bacteriano en plantas de tomate respecto al testigo positivo. Los resultados indican que los extractos de *S. amarissima*, en particular el STJ-1, representan una alternativa biorracional prometedora para el control de *Cmm* en los cultivos de tomate. Estos extractos exhiben una eficacia superior a la proporcionada por los productos químicos tradicionales, ofreciendo una solución sostenible y efectiva en la lucha contra esta enfermedad.

PALABRAS CLAVE: Cáncer bacteriano, tomate, bioprospección, hierba del cáncer, control bacteriano.

*Corresponding Author:

Irma Guadalupe López-Muraira. Tecnológico Nacional de México/ I.T. Tlajomulco. División de Estudios de Posgrado e Investigación. Km 10, Carretera Tlajomulco-San Miguel Cuyutlán. C.P. 45645 Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco. México.

E-mail: irma_lm@tlajomulco.tecnm.mx | **Ángel Gabriel Alpuche-Solís.** División de Biología Molecular. Laboratorio de Biología Molecular de Plantas. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. (IPICYT). Camino a la Presa San José 2055. Col. Lomas 4ta sección, C.P. 78216. San Luis Potosí, S.L.P., México. E-mail: alpuche@ipicyt.edu.mx

ABSTRACT

Bacterial canker, caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), stands as one of the most devastating threats for tomato cultivation. This study aimed to investigate the antimicrobial efficacy of the ethyl acetate fraction obtained from the acetone-soluble extract of *Salvia amarissima* leaves and flowers (EC-SA AcOEt), along with the diterpenoids amarissinina A (STJ-3) and amarissinina C (STJ-1), as potential biorational treatments for *Cmm* control, in comparison to a traditional chemical control. Through *in vitro* inhibition assays, it was observed that the diterpenoid STJ-1 from *S. amarissima* showed the highest antimicrobial activity among all the treatments, at a concentration of 25 µg/mL. Under greenhouse conditions, treatment with 25 µg/mL of STJ-1 from *S. amarissima* reduced in 30 % the incidence and 42 % the average severity index of bacterial canker in tomato plants in comparison to the positive control. The results suggest that *S. amarissima* extracts, particularly STJ-1, represent a promising biorational alternative for *Cmm* control in tomato crops. These extracts exhibit superior efficacy compared to traditional chemical products, offering a sustainable and effective solution in the fight against this disease.

KEY WORDS : Bacterial cancer, tomato, bioprospecting, cancer herb, bacterial control

Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum*), es una de las hortalizas más consumidas a nivel mundial y en México tiene una gran importancia en el sector agroalimentario (SADER, 2020). Una enfermedad recurrente y altamente destructiva en este cultivo es el chancro bacteriano, causada por la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*). Esta enfermedad está clasificada como un patógeno de cuarentena internacional (EFSA, 2014; EPPO, 2016), lo cual resalta su severidad y el impacto potencial en la agricultura a nivel global. Causa pérdidas económicas sustanciales al afectar tanto la cantidad como la calidad del tomate (Gartemann *et al.*, 2003; Eichenlaub & Gartemann, 2011; Sen *et al.*, 2015; Nandi *et al.*, 2018). Por ejemplo, según un estudio realizado por Borboa-Flores *et al.* (2009), en México se estimó que esta enfermedad generó pérdidas económicas anuales de aproximadamente 40 millones de dólares. Recientemente productores de tomate en Michigan, USA, reportaron pérdidas por hasta 300,000 dólares (Peritore-Galve *et al.*, 2021).

Los síntomas característicos del chancro bacteriano incluyen el daño en el fruto conocido como ojo de pájaro, el marchitamiento y muerte de las plantas, clorosis marginal de las hojas y la formación de lesiones en el tallo conocidas como chancro (Bae *et al.*, 2015). Estos síntomas se

deben a que *Cmm* infecta y bloquea el xilema, dificultando el transporte de agua en las plantas. La bacteria se disemina a través de semillas (Werner *et al.*, 2002; Nandi *et al.*, 2018; Peritore-Galve *et al.*, 2021) y también puede transmitirse mediante plántulas, herramientas, suelo y agua contaminada (Tancos *et al.*, 2013), así como por el contacto entre fluidos de plantas sanas y enfermas (Sharabani *et al.*, 2013).

Se ha observado que los sistemas de producción en invernadero son especialmente propensos a presentar síntomas y pérdidas más severas debido a las condiciones ambientales y a las prácticas agrícolas continuas que favorecen la proliferación de este patógeno (Martínez-Castro *et al.*, 2018; Yuqing *et al.*, 2018).

En la actualidad, se han investigado diferentes estrategias para controlar la enfermedad, siendo la más importante el uso de semillas sanas, libres de contaminación de *Cmm* (de León *et al.*, 2011). En términos de control químico, se utilizan principalmente antibióticos y compuestos cúpricos como oxiclورو, óxido o hidróxido de cobre (de León *et al.*, 2008; Milijašević *et al.*, 2009). También se ha explorado el control biológico (Nandi *et al.*, 2018), el uso de extractos vegetales (Stefanova Nalimova *et al.*, 2005; Siddique *et al.*, 2020) y bacteriocinas (Mirzaee *et al.*, 2021). Sin embargo, todos estos tratamientos tienen una eficacia limitada debido a la alta variación en la agresividad y virulencia del patógeno (Croce *et al.*, 2016; Wassermann *et al.*, 2020) y la falta de disponibilidad de compuestos antibacterianos comerciales adecuados que mitiguen los diferentes tipos de problemas ambientales y toxicológicos.

Recientemente, se ha prestado atención a nivel mundial al uso de productos vegetales como agentes quimioterapéuticos para la protección de las plantas. Los plaguicidas botánicos están ganando popularidad y algunos productos vegetales se están utilizando en todo el mundo como plaguicidas ecológicos. Los productos naturales como aceites esenciales, compuestos fenólicos, saponinas, compuestos flavonoides, terpenoides, esteroides, ácidos grasos, alcaloides y otros aislados de plantas medicinales y aromáticas, tienen una larga historia por su bioactividad frente a ciertos patógenos (Hernández-Díaz *et al.*, 2001; Nostro & Papalia, 2012). Se han reportado más de 550 diterpenoides de diferentes especies de *Salvia* (Kabouche & Kabouche, 2008), la mayoría de los cuales han mostrado un amplio espectro de actividades biológicas interesantes y desempeñan roles ecológicos, que incluyen funciones antimicrobianas, anticancerígenas, antivirales, antioxidantes y anti-inflamatorias (Jassbi *et al.*, 2017; González-Chávez *et al.*, 2018). La utilización de productos botánicos obtenidos de *Salvia amarissima* han sido ampliamente estudiados debido a sus moléculas bioactivas farmacológicamente como flavonoides, fenoles, terpenoides y esteroides (Jassbi *et al.*, 2006; 2016).

Diversas investigaciones sobre varias especies de *Salvia*, han destacado su actividad antibacteriana eficaz y se citan ejemplos más adelante. Tanto los extractos crudos como los compuestos bioactivos aislados de estas plantas se han utilizado para comparar con un control positivo. Los metabolitos secundarios de las plantas, como los compuestos fenólicos, terpenos y alcaloides, despliegan selectivamente su acción antibacteriana contra varios microorganismos mediante mecanismos diversos, como la unión a proteínas o adhesinas, inhibición enzimática, privación de sustrato y disrupción de la membrana (Cowan, 1999). Aunque la mayoría de los

estudios se han centrado en patógenos humanos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, se han documentado actividades antibacterianas en compuestos aislados de especies como *Salvia reptans* y *S. greggii* contra *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* (Martínez-Vázquez *et al.*, 1998) y *Bacillus subtilis* (Kawahara *et al.*, 2004). Además, se ha observado que extractos de diferentes polaridades de *Salvia sessei* fueron efectivos contra *Staphylococcus haemolyticus*, *S. hominis* y *Enterococcus faecalis* (Gómez-Rivera *et al.*, 2018).

Sin embargo, hay poca investigación realizada sobre el uso de extractos vegetales como alternativa para el control de bacterias fitopatógenas, en el manejo integrado de los cultivos agrícolas, específicamente del tomate, y esto representa una alternativa viable con menor impacto ambiental. Dentro de las investigaciones realizadas Stefanova Nalimova *et al.* (2005), encontraron extractos metanólicos de plantas que poseen actividad antimicrobiana frente a bacterias fitopatógenas específicamente del género *Xanthomonas* en condiciones *in vitro*. Siddique *et al.* (2020) encontraron actividad de fitoextractos acuosos de plantas contra la bacteria *Clavibacter*. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de la fracción de acetato de etilo de *Salvia amarissima*, obtenida a partir del extracto soluble en acetona (EC-SA AcOEt) y de dos diterpenoides: amarissinina A (STJ-3) y C (STJ-1), mediante ensayos *in vitro* y en invernadero, con relación a su efecto contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm).

Material y Métodos

Aislamiento y purificación de los constituyentes químicos de *Salvia amarissima*

La fracción de acetato de etilo, obtenida a partir del extracto soluble en acetona, de las hojas y flores de *Salvia amarissima* (EC-SA AcOEt); así como los diterpenoides amarissinina A (STJ-3) y amarissinina C (STJ-1) se emplearon en este trabajo, y fueron previamente preparados y caracterizados como describen Fragoso-Serrano *et al.* (2019). Brevemente, las hojas y flores secas y molidas (3.5 kg) de *S. amarissima* se sometieron a extracción por maceración con acetona (20 L) en 3 etapas con recambio independiente de solvente. El extracto resultante se filtró y el disolvente se recuperó por destilación a presión reducida para obtener 190 g de extracto. El extracto se suspendió en hexano (1 L) y se sometió a un proceso de extracción líquido-líquido con una mezcla de MeOH/H₂O 4:1 en 3 etapas con recambio independiente de solvente (3 × 1 L). La fase hidroalcohólica se sometió a destilación a presión reducida para eliminar el metanol (MeOH) y a la suspensión resultante se adicionó 1 L de agua, y se sometió a extracción líquido-líquido con acetato de etilo (AcOEt, 1 L x 3). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se recuperó por destilación a presión reducida para obtener 50 g de residuo (SMSPA AcOEt). Una muestra de 46.3 g de la fracción de AcOEt, se sometió a un proceso de purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (60 G, 4.5 cm d.i. × 15.0 cm h, frs. 500 mL), eluyendo con mezclas hexano/EtOAc y EtOAc/acetona en polaridad ascendente. A partir de las fracciones obtenidas, se aislaron y purificaron, amarissinina C (STJ-1) (3.1 g, obtenidas con hexano/EtOAc 4:1), y amarissinina A (STJ-3) (1.5 g, obtenidas con hexano/EtOAc 7:3). Los compuestos se identificaron por comparación con una muestra auténtica de cada sustancia mediante cromatografía en capa fina, y por comparación de sus espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H y ¹³C (Figuras S1-S4) (Bautista *et al.*, 2016).

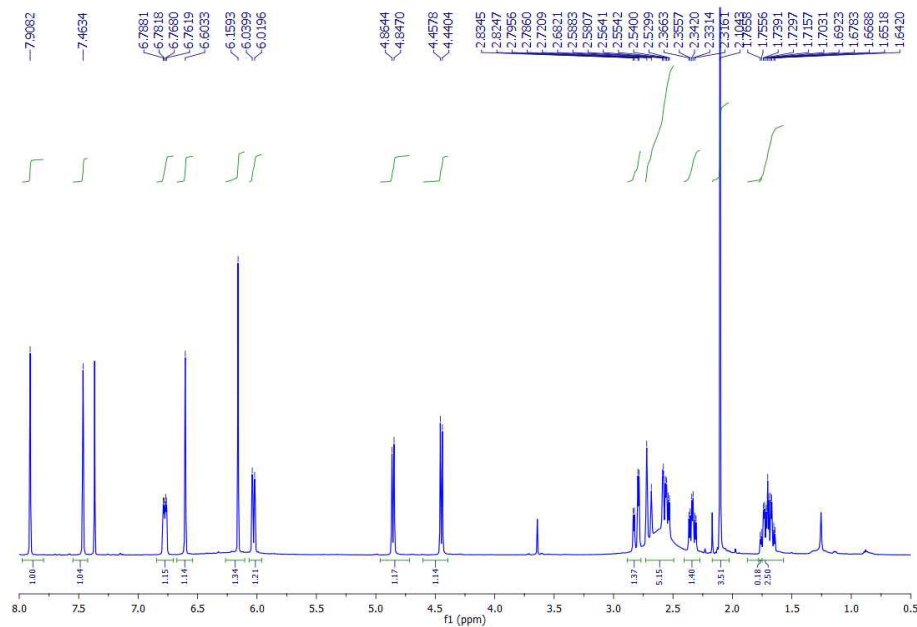


Figura S1. Espectro de RMN de ^1H del compuesto STJ-3 (amarissinina A) en CDCl_3 + $\text{DMSO}-d_6$ a 500 MHz.

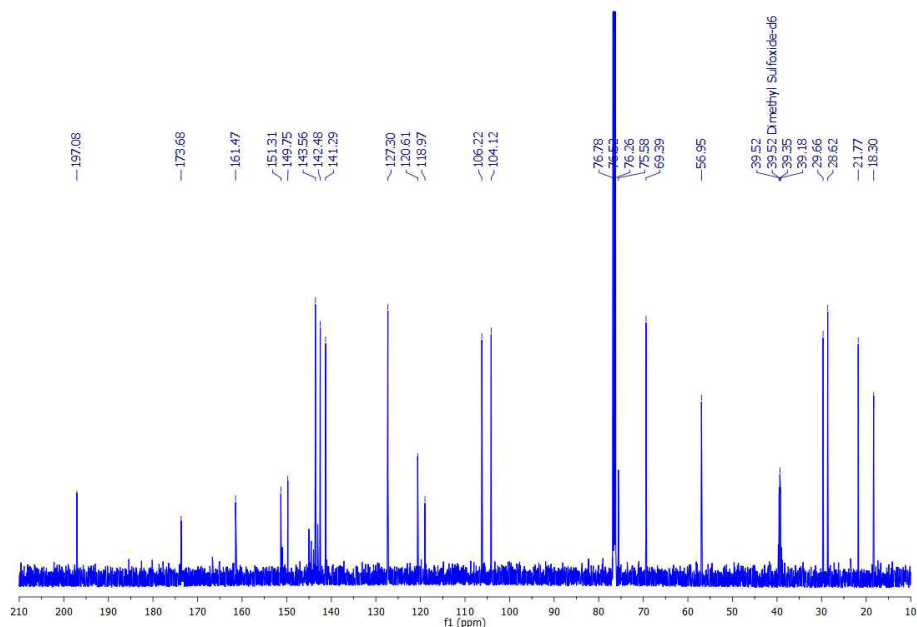


Figura S2. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto STJ-3 (amarissinina A) en CDCl_3 + $\text{DMSO}-d_6$ a 125 MHz.

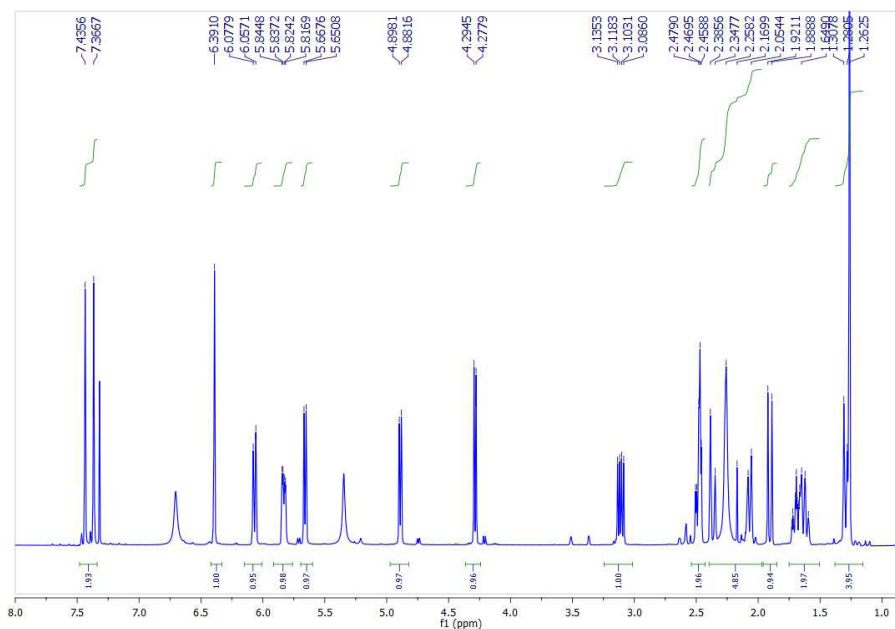


Figura S3. Espectro de RMN de ^1H del compuesto STJ-1 (amarissinina C) en CDCl_3 + $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.

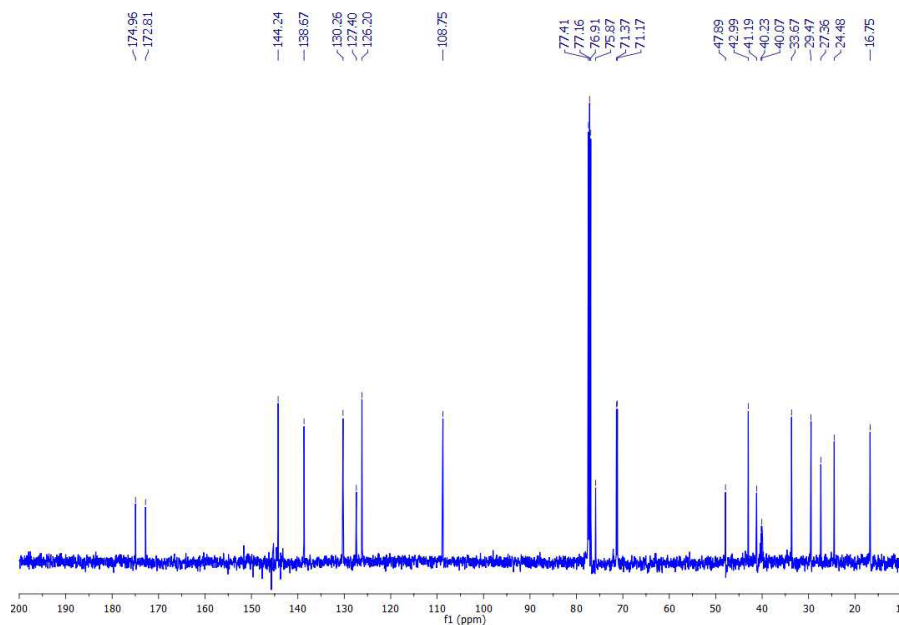


Figura S4. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto STJ-1 (amarissinina C) en CDCl_3 + $\text{DMSO-}d_6$ a 125 MHz.

La fracción de AcOEt (EC-SA AcOEt) y los diterpenoides: amarissinina A (STJ-3) y C (STJ-1) (Tabla 1), se disolvieron en un vehículo compuesto por agua:acetona 85:15 para obtener concentraciones iniciales de 10 mg/mL y posteriormente emplearlas en los ensayos *in vitro* y en invernadero.

Cultivo bacteriano de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm)

Se utilizó la cepa bacteriana *Cmm* AcR42, aislada de cultivos de *S. lycopersicum* en Pénjamo, Guanajuato, México y caracterizada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas en el IPICYT.

Se preparó el inóculo de *Cmm* utilizando un cultivo puro de 48 h de crecimiento en medio líquido 802 (polipeptona 1 g/L, extracto de levadura 2 g/L, sulfato de magnesio 0.92g/L) y se ajustó a una absorbancia de 0.2 (aprox. 1×10^5 CFU/mL) a una longitud de onda de 600 nm, en agua desionizada estéril.

Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (MBC) *in vitro* del extracto de *S. amarissima*

Se utilizó el método de dilución en caldo 802 con el extracto total de acetato de etilo (EC-SA AcOEt) y los dos diterpenoides de *S. amarissima* (STJ-1 y STJ-3). Se probaron 5 diluciones diferentes: 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 $\mu\text{g/mL}$. Se prepararon cultivos en 5 tubos, cada uno contenía 1 mL de caldo 802 estéril, para cada tratamiento, y se realizaron cinco repeticiones para cada concentración. Luego de transcurrir 24 horas, se tomaron 100 μL de los tubos, se inocularon en placas Petri con agar 802 y se incubaron a 28°C durante 24 y 48 horas, según lo indicado por Horna *et al.*, (2005). Posteriormente, se evaluó el efecto bactericida de los extractos utilizados mediante el recuento de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (CFU mL^{-1}), como lo propone Toribio *et al.* (2004).

Tabla 1. Descripción y concentraciones de los tratamientos de los extractos de *S. amarissima* y controles para determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Trat	Nombre	Concentración final	Descripción
T1		100 µg /mL	
T2	EC-SA AcOEt	50 µg /mL	A partir de un stock de 10 mg/mL previamente diluido en agua: acetona (85:15), se ajustaron cada una de las concentraciones con el extracto crudo de <i>S. amarissima</i> (EC-SA).
T3		25 µg /mL	
T4		12.5 µg /mL	
T5		6.25 µg /mL	
T6		100 µg /mL	
T7	Diterpenoide STJ-1	50 µg /mL	A partir de un stock de 10 mg/mL previamente diluido en agua: acetona (85:15), se ajustaron cada una de las concentraciones con la fracción de <i>S. amarissima</i> (STJ-1).
T8		25 µg /mL	
T9		12.5 µg /mL	
T10		6.25 µg /mL	
T11		100 µg /mL	
T12	Diterpenoide STJ-3	50 µg /mL	A partir de un stock de 10 mg/mL previamente diluido en agua: acetona (85:15), se ajustaron cada una de las concentraciones con el extracto crudo de <i>S. amarissima</i> (STJ-3).
T13		25 µg /mL	
T14		12.5 µg /mL	
T15		6.25 µg /mL	
T16	Testigo Positivo de tratamiento químico (TQ)	3 g/L	Se emplearon 3 g/L de oxiclورو de cobre según las recomendaciones de fabricante para el control de <i>Cmm</i> . Es uno de los agroquímicos más utilizados vs. <i>Cmm</i> .
T17	Testigo Solvente (TS)	85:15 Agua: acetona	Se añadió agua y acetona en una proporción 85:15 y la suspensión bacteriana para asegurar que el solvente no afecta el crecimiento de la bacteria y toda acción bactericida sea por efectos de los compuestos vegetales.
T18	Testigo Positivo de crecimiento (T+)	<i>Cmm</i> 1 x 10 ⁵ CFU/mL	Se añadió el medio de cultivo y suspensión bacteriana. Se espera crecimiento de <i>Cmm</i> .
T19	Testigo Negativo de crecimiento (T-)	Sin <i>Cmm</i>	Se añadió únicamente 100 µL de medio de cultivo 802. No se espera crecimiento de microorganismos.

Ensayo de bioprospección en invernadero con plantas de tomate

Se emplearon plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Ailsa Craig) de 38 días después de germinadas (dag); las semillas fueron donadas por la Universidad de Nottingham. La germinación de las semillas se llevó a cabo realizando una desinfección superficial con una solución de hipoclorito de sodio al 5 % y posteriormente se sembraron en una mezcla de suelo comercial (Sunshine Mix #6, Sun Grow Horticulture, Vancouver, BC, CA), en maceta individual, las cuales se colocaron en cámara de crecimiento a 25 °C, con un periodo de luz y oscuridad de 16h/8h, respectivamente, posteriormente fueron transferidas a un invernadero de alta tecnología con áreas separadas para retos con microorganismos, con temperatura controlada de 28 °C y humedad de 60 %. En total, para ensayos de incidencia y severidad en invernadero se probaron en total siete tratamientos con 10 repeticiones. T1 extracto crudo de *S. amarissima* (EC-SAAcOEt 50 µg /mL), T2 y T3: dos diterpenoides (STJ-1 y STJ-3 25 µg /mL), T4 corresponde al control químico (3 g/L de oxiclورو de cobre), T5 control solvente (agua:acetona en una proporción 85:15), T6 Control Positivo que consistió en 100 µL suspensión bacteriana de *Cmm* ajustada a 1×10^5 CFU/mL, y por último, T7 Control Negativo que corresponde a la inoculación con jeringa de 0.1M de MgCl₂ sin *Cmm*.

Crecimiento del patógeno, inoculación de plantas y aplicación de los tratamientos

Para realizar las confrontaciones con *Cmm*, el inóculo se ajustó a una absorbancia de 0.2 (aprox. 1×10^5 CFU) a una longitud de onda de 600 nm. La infección se realizó mediante inyección de 0.5 mL con aguja de insulina en el tallo entre la raíz y la primera hoja verdadera de las plantas de tomate de 40 días después de germinadas (dag).

La primera aplicación de los tratamientos se efectuó de manera preventiva y mediante drench (vertido del tratamiento directamente al sustrato) en un volumen de 50 mL cuando las plantas tenían 38 dag; posteriormente se realizaron tres aplicaciones más de los tratamientos cada 15 días hasta la cosecha del fruto (90 días dag). Estos tratamientos se aplicaron mediante aspersión y se monitoreó la progresión de la enfermedad en las plantas recolectando datos a los 55 y 90 dag.

Monitoreo y medición de datos agronómicos en plantas de tomate

En todos los tratamientos se evaluaron la altura de la planta desde la base del suelo hasta la punta del ápice principal, el diámetro del tallo (1 cm por encima de los cotiledones), el número de racimos florales; estas mediciones se realizaron a los 55 días después de germinar (dag). El rendimiento se evaluó con base en el peso de los frutos por tratamiento y los datos de esta categoría se obtuvieron a las 90 dog.

Valoración de incidencia y severidad

Se llevaron a cabo dos evaluaciones de las plantas de tomate después de la infección por *Cmm*. La primera se realizó cuando las plantas tenían 55 dag y la segunda se llevó a cabo a los 90 dag.

En cada unidad experimental se calculó el porcentaje de afectación o incidencia (I) (Ecuación I) y el Índice Promedio de la Severidad (ASI) (Ecuación II) utilizando las metodologías propuestas por Arauz (1998) y Couto *et al.* (2007), respectivamente.

Las fórmulas para calcular estos índices son las siguientes:

$$I = \frac{\text{Total de plantas enfermas}}{\text{Total de plantas muestreadas}} \times 100 \quad \text{I}$$

$$ASI = \frac{(\text{Grado de Categoría} * \text{Frecuencia})}{\text{Total de plantas evaluadas}} \times 100 \quad \text{II}$$

La incidencia se refiere a la proporción de plantas enfermas en relación con el total de plantas evaluadas y se reporta en porcentaje, mientras que para la obtención de los datos cuantitativos del daño foliar asociado a la bacteria *Cmm*, se obtuvo mediante el conteo de número de ramas dañadas por cada planta. Por otro lado, el Índice Promedio de la Severidad (ASI) mide la frecuencia con la que se observan diversas categorías de daño en relación con el total de plantas enfermas. Para este estudio en particular, se emplearon cinco categorías de severidad, las cuales se basaron en el porcentaje de follaje afectado por el fitopatógeno *Cmm* (Tabla 2).

Tabla 2. Categorías de severidad para la evaluación de los daños producidos por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en plantas de tomate.

Categoría de severidad	Follaje afectado (%)
I	1-20
II	21-40
III	41-60
IV	61-80
V	81-100

Análisis estadístico para ensayos *in vitro* e invernadero

Los datos de los ensayos *in vitro* fueron analizados con un diseño experimental completamente al azar con 19 tratamientos (Tabla 1) y 5 repeticiones. Cada repetición corresponde a una placa de Petri por evaluación, se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias por Tukey ($p > 0.05$) con los resultados obtenidos en el conteo de las CFU/mL a las 24 y 48h, para el análisis estadístico se utilizó el programa Minitab v2017.

Para los ensayos de bioprospección en invernadero, se analizaron los datos relativos a las variables agronómicas como altura, diámetro del tallo, número de racimos florales y rendimiento. Además, se recopilaban los datos de incidencia, daño foliar y severidad en las plantas de tomate mediante un diseño experimental completamente al azar que constaba de 7 tratamientos y 10 repeticiones. Cada repetición representaba una planta de tomate evaluada. Se realizó un análisis de varianza, seguido de una prueba de comparación de medias mediante el método de Tukey (con un valor de $p > 0.05$). Estos análisis se llevaron a cabo con el programa estadístico Minitab v2017. Los resultados se basaron en las evaluaciones realizadas a los 55 y 90 dag.

Resultados y Discusión

Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (MBC) *in vitro* del extracto de *S. amarissima*

La Tabla 3 describe los resultados de la actividad antimicrobiana *in vitro* de la fracción AcOEt de *Salvia amarissima* (EC-SA AcOEt) y dos diterpenoides aislados (STJ-1 y STJ-3) a diferentes concentraciones que van desde 100 hasta 6.25 $\mu\text{g/mL}$, así como los testigos; químico, solvente, positivo y un testigo negativo a través de la medición de la concentración de Unidades Formadoras de Colonias (CFU/mL) de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) y en distintos intervalos de tiempo (24 y 48 h).

Tabla 3. Efecto del extracto crudo de *Salvia amarissima* (EC-SAAcOEt) y las fracciones STJ-1 y STJ-3 sobre el crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

No.	Tratamiento	Concentración Final	<i>Cmm</i>	<i>Cmm</i>
			(CFU/mL) x 10 ⁷ 24 h	(CFU/mL) x 10 ⁷ 48 h
T1		100 $\mu\text{g/mL}$	171.60 \pm 3.66 ^d	255.20 \pm 2.47 ^d
T2		50 $\mu\text{g/mL}$	77.00 \pm 2.02 ^{ef}	155.60 \pm 2.50 ^e
T3	EC-SA AcOEt	25 $\mu\text{g/mL}$	67.80 \pm 3.94 ^{ef}	143.00 \pm 2.48 ^e
T4		12.5 $\mu\text{g/mL}$	51.40 \pm 2.76 ^{fg}	129.20 \pm 3.48 ^{efg}
T5		6.25 $\mu\text{g/mL}$	41.40 \pm 3.14 ^{fg}	121.80 \pm 2.55 ^{efg}

Se presenta el promedio más el error estándar, letras iguales no hay diferencias significativas a través de una prueba de Tukey ($p > 0.05$).

Continuación

Tabla 3. Efecto del extracto crudo de *Salvia amarissima* (EC-SA AcOEt) y las fracciones STJ-1 y STJ-3 sobre el crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

No.	Tratamiento	Concentración Final	<i>Cmm</i>	<i>Cmm</i>
			(CFU/mL) x 10 ⁷ 24 h	(CFU/mL) x 10 ⁷ 48 h
T6		100 µg /mL	127.80 ± 3.72 ^e	170.80 ± 1.93 ^d
T7		50 µg /mL	56.60 ± 1.36 ^g	97.20 ± 1.85 ^{ef}
T8	Diterpenoide STJ-1	25 µg /mL	4.40 ± 0.81 ^h	39.20 ± 2.98 ^h
T9		12.5 µg /mL	5.00 ± 1.30 ^h	38.80 ± 2.92 ^h
T10		6.25 µg /mL	6.20 ± 0.86 ^h	38.40 ± 2.37 ^h
T11		100 µg /mL	133.40 ± 2.83 ^e	174.20 ± 4.45 ^d
T12		50 µg /mL	64.60 ± 2.33 ^g	95.40 ± 1.63 ^e
T13	Diterpenoide STJ-3	25 µg /mL	15.00 ± 1.41 ^h	48.00 ± 1.14 ^{gh}
T14		12.5 µg /mL	8.60 ± 0.67 ^h	40.60 ± 2.52 ^{gh}
T15		6.25 µg /mL	7.20 ± 1.46 ^h	40.60 ± 2.11 ^{gh}
T16	Testigo Químico (TQ)	3 g/L	233.4 ± 11.17 ^c	342.0 ± 24.69 ^c
T17	Testigo Solvente (TS)	85:15	294.4 ± 32.98 ^b	434.60 ± 9.19 ^b
T18	Testigo Positivo (T+)	<i>Cmm</i> +	356.2 ± 14.01 ^a	485.60 ± 5.98 ^a
T19	Testigo Negativo (T-)	<i>Cmm</i> -	0 ± 0 ⁱ	0 ± 0 ^h

Se presenta el promedio más el error estándar, letras iguales no hay diferencias significativas a través de una prueba de Tukey ($p > 0.05$).

A las 24 h de incubación, el mejor efecto antimicrobiano fue el del tratamiento T8: STJ-1 a una concentración de 25 µg /mL, mostrando el menor crecimiento de la bacteria de 4.40 x 10⁷ CFU/mL de *Cmm*. Los tratamientos T9 y T10 que corresponden al diterpenoide STJ-1 a 12.5 µg /mL y 6.25 µg /mL, también controlaron a la bacteria en un menor grado que el T8. A continuación, en efectividad siguieron los tratamientos T13-T15, que fueron estadísticamente iguales y mostraron diferencias respecto a los testigos, y fueron mejores que el control químico (T16= 233.4 x 10⁷ CFU/mL), por lo que se recomienda el uso de las fracciones STJ-1 y 3 a 25 µg/mL para controlar el crecimiento de *Cmm* (Tabla 3). Estos resultados se relacionan con los trabajos de Bozov *et al.*, (2020) que aislaron un nuevo diterpenoide neoclerodano y dos diterpenoides furo-clerodano de las partes aéreas de *Camedrio acuático* (*Teucrium scordium*, *Lamiaceae*) y probaron su actividad antibacteriana y antifúngica contra varios patógenos, encontrando actividades similares contra las especies bacterianas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella*

abony con valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) oscilando entre 250 y 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (Bozov *et al.*, 2020). Por otro lado, Fozia *et al.* (2021), aislaron dos nuevos diterpenos de Marrubio (*Ballota pseudodictamnus*, *Lamiaceae*); los ácidos ballodiólicos A y B, y se probaron para determinar su actividad antibacteriana contra *E. coli* y *Salmonella typhi*. Encontrando que a una concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ambos compuestos exhiben propiedades antibacterianas más potentes en la Zona de Inhibición (ZOI) oscilando entre 11-13 y 11-12 mm, respectivamente, frente a cepas de *E. coli* y *S. typhi* (Fozia *et al.*, 2021).

Con relación al extracto con acetato de etilo de *Salvia amarissima* (EC-SA AcOEt) (T1-T5), se encontró que la concentración más efectiva para inhibir el crecimiento de *Cmm* fue de 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con un resultado de 41.40×10^7 CFU/mL (T5). A pesar de que no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones T2-T5, se determinó que la aplicación de este compuesto en un rango de concentraciones de 6.25 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ resulta efectiva para el control del fitopatógeno *Cmm*. Fragoso-Serrano *et al.* (2019) identificaron un diterpeno llamado amarisólido en la composición química de este extracto, que corresponde a un glicósido de neoclerodano y puede ser responsable de la actividad antimicrobiana observada. Sin embargo, estudios previos de López-Ferrer *et al.* (2010) mostraron que los extractos hexánicos y metanólicos de *S. amarissima* no presentaron actividad antimicrobiana contra varias especies bacterianas, lo cual podría relacionarse con hallazgos de Horiuchi *et al.* (2007). Estos últimos indicaron que compuestos como el carnosol y el ácido carnósico, presentes en extractos de salvia común, tienen una acción sinérgica que inhibe débilmente el crecimiento de bacterias Gram positivas, mientras que no afecta a las bacterias Gram negativas debido a la presencia de una membrana externa que dificulta su ingreso.

A las 48 h de incubación tuvieron comportamiento de inhibición de *Cmm* similar al mostrado de las 24 h, donde los tratamientos más efectivos son T10 y T15 para STJ1 y STJ-3 con 38.40×10^7 y 40.60×10^7 CFU/mL, respectivamente, mientras que para el EC-SA fue T5: 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El Testigo Químico (T16:TQ) mostró una población de *Cmm* 342.0×10^7 CFU/mL, que aunque es una carga de CFU estadísticamente menor que la del testigo positivo, resultó menos eficiente que los tratamientos con los extractos de EC-SA AcOEt y las fracciones STJ-1 y 3, donde los mejores resultados de inhibición de *Cmm* se obtuvieron con los tratamientos T5, T10, y T15 con datos más efectivos que el Testigo del Solvente en ambos tiempos de exposición, lo que indicó que la actividad antimicrobiana observada no es simplemente debido al solvente utilizado en la preparación del extracto. El Testigo Positivo (T+: T18) mostró la población más alta de *Cmm* (485.60×10^7 CFU/mL) en comparación con todos los tratamientos y testigos después de 48 h. Es importante destacar que el testigo negativo (T-) no muestra crecimiento bacteriano en ambos intervalos de tiempo, lo que indicó que no hay presencia de *Cmm* en este tratamiento.

Evaluación de variables agronómicas en plantas de tomate durante los ensayos de bioprospección en invernadero

La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos a los 55 días después de germinadas las plantas (dag) y teniendo la segunda aplicación de los tratamientos de extracto y diterpenoides de *S. amarissima*. Cabe mencionar que, a pesar de que en ensayos anteriores las concentraciones

más efectivas habían sido de 25 µg/mL o menores, se decidió incluir una concentración de 50 µg/mL en los ensayos de invernadero, considerando que, en estas condiciones, los tratamientos tienden a ser menos efectivos debido a la complejidad de factores involucrados. Los tratamientos muestran diferencias significativas en las características agronómicas (Tabla 4). Se observó que las plantas tratadas con EC-SA AcOEt (50 µg /mL) (T1) tuvieron la mayor altura promedio (43.26 cm), seguidas por las plantas tratadas con Diterpenoide STJ-3 (25 µg /mL) (T3) y Testigo Negativo (T-) (42.48 cm). Estas tres condiciones presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí. Por otro lado, las plantas bajo el tratamiento Testigo Positivo (T+) tuvieron la altura más baja en promedio (28.71 cm). Cabe resaltar que para este tiempo ya había una alta incidencia y severidad asociada al chancro bacteriano, y que alrededor del 70 % de las plantas de este tratamiento ya habían muerto, por lo que no alcanzaron la etapa de floración y fructificación.

Tabla 4. Características agronómicas de plantas de tomate ante la infección por *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* a los 55 días después de germinar (55 dag).

Tratamiento	Altura de planta (cm)	Diámetro de tallo (cm)	No. De racimos florales	Rendimiento peso de frutos (g) (90 dag)
T1: EC-SA AcOEt (50 µg /mL)	43.26 ^a	0.80 ^b	3.58 ^c	113.99 ^d
T2: Diterpenoide STJ-1 (25 µg /mL)	40.12 ^e	0.78 ^c	4.45 ^a	125.18 ^a
T3: Diterpenoide STJ-3 (25 µg /mL)	41.15 ^c	0.76 ^d	4.05 ^b	120.33 ^c
T4: Testigo Solvente (TS)	39.43 ^f	0.74 ^f	1.04 ^f	0 ^f
T5: Testigo Químico (TQ)	40.68 ^d	0.76 ^e	2.36 ^e	102.61 ^e
T6: Testigo Positivo (T+)	28.71 ^g	0.61 ^g	0 ^g	0 ^g
T7: Testigo Negativo (T-)	42.48 ^b	0.83 ^a	3.48 ^d	123.48 ^b

Los promedios con igual letra en la misma columna son estadísticamente iguales. Diferencias de medias Tukey ($p > 0.05$).

Otro valor agronómico evaluado fue el diámetro del tallo, donde las plantas tratadas con EC-SA AcOEt (T1) y Diterpenoide STJ-1 (T2) fue mayor en promedio (0.80 cm y 0.78 cm, respectivamente). Las plantas bajo el tratamiento Testigo Positivo (T+) presentaron el diámetro de tallo más pequeño en promedio (0.61 cm). En cuanto al mayor número de racimos florales en promedio se observó en las plantas tratadas con Diterpenoide STJ-1 (T2) (4.45 racimos florales), seguido por las plantas tratadas con Diterpenoide STJ-3 (T3) y EC-SA AcOEt (T1). Cabe resaltar que en este último tratamiento (T1) hubo una aceleración en el tiempo de floración presentándose las primeras flores día 43-45 dag. En contraste, las plantas bajo el tratamiento Testigo Solvente (TS) tuvieron el menor número de racimos florales (1.04 racimos) y el valor de 0 para el T6 se debió a que las plantas ya estaban muriendo por la infección de *Cmm*.

Los resultados del rendimiento de frutos se obtuvieron a los 90 dag y fue más alto en las plantas tratadas con Diterpenoide STJ-1 (T2) (125.18 g), seguido por las plantas tratadas con Testigo Negativo (T-) (123.48 g) y EC-SA AcOEt (T1) (113.99 g). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas entre sí. Por otro lado, el Testigo Químico (TQ) también mostró un rendimiento de frutos (102.61 g).

Los tratamientos con EC-SA AcOEt (T1) y Diterpenoide STJ-1 (T2) demostraron tener un impacto positivo en el crecimiento y rendimiento de las plantas de tomate, con alturas y diámetros de tallo mayores, así como un mayor número de racimos florales y rendimiento de frutos. Estos resultados sugieren que estos tratamientos podrían ser considerados como estrategias potenciales para mejorar la producción de tomates en condiciones de infección por *Cmm* a los 75 dag.

Análisis de la valoración de incidencia y severidad en plantas de tomate

En la Tabla 5 se presentan los datos clave relacionados con la incidencia (porcentaje de plantas afectadas), daño foliar (número de ramas muertas por planta) y la severidad (grado de afectación en las plantas dañadas) de los síntomas del cáncer bacteriano en dos momentos críticos del desarrollo de las plantas (a los 55 y 90 días después de la germinación, respectivamente), lo que corresponde a la segunda y cuarta aplicación de los tratamientos.

De acuerdo con la Tabla 5, el tratamiento T1: EC-SA AcOEt (50 µg/mL) mostró una incidencia inicial del 50 % a los 55 días después de la germinación (dag), la cual se incrementó al 70 % a los 90 dag. Además, durante este mismo período, el índice promedio de severidad (ASI %) mostró un aumento significativo, pasando del 40.6 % al 67.6 %. Por su parte, el T2: Diterpenoide STJ-1 (25 µg/mL) presentó una incidencia del 40 % a los 55 dag, que se elevó al 80 % a los 90 dag. El IPS % también aumentó, pasando de 37.8 % a 59.4 %. En cuanto al T3: Diterpenoide STJ-3 (25 µg/mL), su comportamiento fue similar al T2, con una incidencia del 40 % a los 55 dag y un aumento al 70 % a los 90 dag. El porcentaje ASI % aumentó de 42.7 % a 66.8 %.

En los controles usados en este ensayo, el tratamiento T4:TS mostró una alta incidencia y severidad en ambos momentos de evaluación, alcanzando el 70 % de incidencia a los 55 dag y aumentando al 90 % a los 90 dag. El ASI % también experimentó un notable incremento, pasando del 75.3 % al 93.6 %, lo que indica que este tratamiento no fue eficaz para prevenir o controlar la enfermedad en las plantas de tomate. Por otro lado, se observa que el control solvente no difiere significativamente del control positivo. Esto sugiere que los compuestos activos de *S. amarissima*, presentes en la fracción STJ-1, tienen una capacidad efectiva para controlar la propagación del fitopatógeno *Cmm*.

Tabla 5. Evaluación de la incidencia, daño foliar y severidad de síntomas asociados a cáncer bacteriano en plantas de tomate (*S. lycopersicum*).

Tratamiento	55 dag (2da aplicación de los Tratamientos)			90 dag (4ta aplicación de los Tratamientos)		
	Incidencia (% de plantas enfermas)	Daño foliar (No. de ramas dañada)	Índice Promedio de la Severidad (ASI %)	Incidencia (% de plantas enfermas)	Daño foliar (No. de ramas dañada)	Índice Promedio de la Severidad (ASI%)
T1: EC-SA AcOEt (50 µg /mL)	50 %	46.0 ^c	40.6 ^e	60 %	70 ^a	67.6 ^d
T2: Diterpenoide STJ-1 (25 µg /mL)	40 %	28.3 ^a	37.8 ^f	70 %	86.6 ^b	59.4 ^e
T3: Diterpenoide STJ-3 (25 µg /mL)	40 %	37.5 ^b	42.7 ^d	60 %	73.4 ^a	66.8 ^d
T4: Testigo Solvente (TS)	70 %	71.3 ^e	75.3 ^b	90 %	96.8 ^c	93.6 ^b
T5: Testigo Químico (TQ)	60 %	63.4 ^d	55.2 ^c	80 %	85.1 ^b	85.4 ^c
T6: Testigo Positivo (T+)	70 %	80.6 ^f	84.7 ^a	100 %	98.8 ^c	100 ^a
T7: Testigo Negativo (T-)	0 %	0 ^g	0 ^g	0 %	0 ^d	0 ^f

Los promedios con igual letra en la misma columna son estadísticamente iguales. Diferencias de medias Tukey ($p > 0.05$).

En el caso del T5: Testigo Químico (TQ), se observó una incidencia del 60 % a los 55 dag, que aumentó al 80 % a los 90 dag, acompañada de un aumento en el ASI % del 55.2 % al 85.4 %, esto sugiere que el cobre no tuvo un efecto positivo en el control de la enfermedad. En cuanto al T6: Testigo Positivo (T+), tanto la incidencia como la severidad se mantuvieron al 100 % en ambos momentos de evaluación, indicando una infección severa y constante. Por último, el T7: Testigo Negativo (T-), utilizado como control, no mostró incidencia ni severidad en ningún momento de evaluación.

Los resultados indican que los tratamientos T1 (EC-SA AcOEt) (Figura 1A) y T2 (Diterpenoide STJ-1) (Figura 1B) son especialmente efectivos en la reducción de la incidencia y severidad del cáncer bacteriano en las plantas de tomate, superando incluso al control químico comercial (TQ) y al control positivo (T+). Estos hallazgos respaldan la promisorio perspectiva de utilizar extractos y diterpenoides de *S. amarissima* como una alternativa natural y eficaz para el control de *Cmm* en la agricultura.

Los resultados de la Tabla 5 y la Figura 1 mostradas en este trabajo proporcionan una visión clara de los efectos de los diferentes tratamientos en el fenotipo de las plantas de tomate durante la evaluación contra el fitopatógeno *Cmm*, los tratamientos con el extracto crudo, la fracción STJ-1 y la STJ-3 de *Salvia amarissima* (T1, T2 y T3) tuvieron un efecto positivo en el control de la incidencia y gravedad del cáncer bacteriano en las plantas de tomate. Por otro lado, los tratamientos con TS (T4) y TQ (T5) no fueron efectivos en el control de la enfermedad. Asimismo, el tratamiento T+ (T6) demostró que la bacteria causante del cáncer bacteriano crecida en el medio de cultivo fue capaz de causar la mayor incidencia y severidad de síntomas en el tomate.

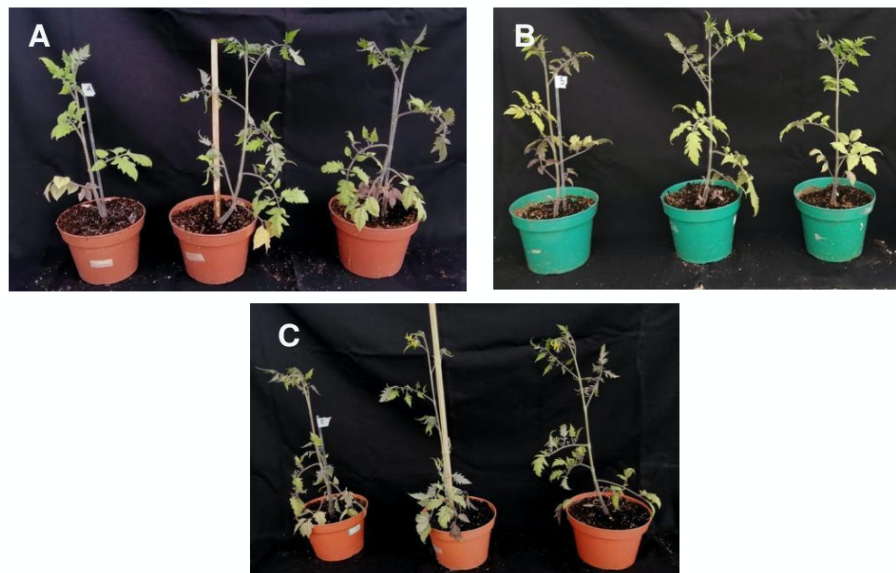


Figura 1. Fenotipo de plantas de tomate (*S. lycopersicum*) de 55 dag durante la primera evaluación de los diferentes tratamientos utilizados contra *Cmm*.

A) Extracto total de *S. amarissima* T1: EC-SA AcOEt (50 µg/mL), B) diterpeno STJ-1 (25 µg/mL), C) diterpeno STJ-3 (25 µg/mL). Triplicados son mostrados en cada tratamiento.

Conclusiones

El ensayo *in vitro* indica que los tres extractos provenientes de *S. amarissima* tienen actividad antimicrobiana *in vitro* contra el fitopatógeno de tomate *Cmm*, lo que sugiere que podrían tener potencial como agentes antimicrobianos para el control de esta bacteria en cultivos agrícolas, incluso con mejores resultados que el control comercial; esto puede ser debido a los distintos tipos de terpenos y fenoles que posee esta especie botánica y que han sido reportados

en diversos trabajos como compuestos con estructura polifenólica que promueven la lisis celular (Monroy *et al.*, 2007). Este estudio es el primero en reportar la actividad del extracto de *S. amarissima* contra *Cmm* en plantas de tomate, sin embargo, se ha probado la capacidad de *Salvia officinalis* para controlar diferentes enfermedades en plantas, mostrando efectividad contra el tizón tardío de la papa (Dorn *et al.*, 2007) y el moho veloso de pepino, cebolla y lechuga (Schmitt *et al.*, 2008; Nowak *et al.*, 2009).

Concretamente, la aplicación de la fracción EC-SA AcOEt y los diterpenoides aislados STJ-1 y STJ-3 de *S. amarissima* mostraron la mayor inhibición en el crecimiento de *Cmm in vitro*, con dosis de 6.25, 25 y 6.25 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, a las 24 horas de incubación del fitopatógeno. A las 48 horas, el tratamiento más efectivo fue el T10: STJ-1 a la concentración de 6.25 $\mu\text{g/mL}$, con un crecimiento de la bacteria de 38.40 CFU/mL.

En términos de resultados agronómicos, el tratamiento más eficaz para el crecimiento y rendimiento de las plantas de tomate fue el T1: EC-SA AcOEt a 50 $\mu\text{g/mL}$, que alcanzó un crecimiento de 43.26 cm de altura, mientras que el T2: Diterpenoide STJ-1 a 25 $\mu\text{g/mL}$ resultó en un rendimiento de 125.18 g por planta. Estos hallazgos indican que el Diterpenoide STJ-1 de *S. amarissima* muestra un prometedor potencial para inhibir el crecimiento del patógeno y mejorar la producción.

Adicionalmente, el tratamiento T2: Diterpenoide STJ-1 a 25 $\mu\text{g/mL}$ también presentó un efecto positivo al reducir la incidencia y severidad a un 70 % y 59.4 %, respectivamente, a los 90 días después de la germinación, en comparación con el T6: Testigo Positivo (T+), que mostró una incidencia y severidad del 100 % durante el mismo período de evaluación. Esto respalda el potencial de estos extractos en el control de esta enfermedad en el cultivo de tomate.

El diterpenoide STJ-1 de *S. amarissima* se perfila como alternativa natural y prometedora para el control de enfermedades bacterianas en los cultivos de tomate, superando a los métodos de control químico tradicionales en términos de eficacia. Estos hallazgos enriquecen el conocimiento en el ámbito de la bioprospección y abren nuevas posibilidades para el desarrollo de soluciones agronómicas más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente en la protección de cultivos contra patógenos.

Contribución de los autores

Conceptualización del trabajo, I.G. López-Muraira, A.G. Alpuche-Solís; desarrollo de la metodología, E.M. Rodríguez-González; fotografías, E.M. Rodríguez-González; análisis de resultados, E.M. Rodríguez-González, I.G. López-Muraira, A.G. Alpuche-Solís; escritura y preparación del manuscrito, E.M. Rodríguez-González, I.G. López-Muraira, A.G. Alpuche-Solís; redacción, revisión y edición, H. Flores-Martínez, H. Silos-Espino, I. Andrade-González, V.S. Farías-Cervantes, I.G. López-Muraira, A.G. Alpuche-Solís; adquisición de fondos, A.G. Alpuche-Solís.

Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.

Financiamiento

Esta investigación fue financiada por recursos fiscales del IPICYT

Agradecimientos

Se agradece las facilidades otorgadas por el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. (IPICYT), en particular al laboratorio de Biología Molecular de Plantas y al invernadero de alta tecnología, así como al Laboratorio Nacional LANBAMA, al técnico QFB Rosy Castillo Collazo y al CONAHCYT por la beca otorgada a EMRG, para realizar su posgrado en el Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología en Procesos Agropecuarios (TecNM-ITTJ)

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Referencias

- Arauz, F. (1998). Fitopatología: un análisis agroecológico. San José, Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica (EUCR). 469 páginas.
- Bae, C., Han, S.W., Song, Y. R., Kim, B. Y., Lee, H. J., Lee, J. M., Yeam, I., Heu, S., & Oh, C.S. (2015). Infection processes of xylem-colonizing pathogenic bacteria: possible explanations for the scarcity of qualitative disease resistance genes against them in crops. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(7), 219-1229. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2521-1>
- Bautista E., Fragoso-Serrano M., Ortiz-Pastrana N., Toscano R. A., & Ortega, A. (2016). Structural elucidation and evaluation of multidrug-resistance modulatory capability of amarissinins A–C, diterpenes derived from *Salvia amarissima*. *Fitoterapia*, 114, 1–6. <http://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2016.08.007>
- Borboa-Flores, J., Rueda Puente, E. O., Acedo Félix, E., Ponce, J.F., Cruz, M., Grimaldo, J. O., & García Ortega, A. M. (2009). Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(4), 319-326. <https://doi.org/10.35196/rfm.2009.4.319-326>
- Bozov, P., Penchev, P., Girova, T., & Gochev, V. (2020). Diterpenoid Constituents of *Teucrium scordium* L. Subsp. *scordioides* (Schreb.) Maire Et Petitmengin. *Natural Product Communications*, 15. <https://doi.org/10.1177/1934578X20959525>
- Couto, A., Alves, F., Gonçalves, R., & Coelho, R. (2007). Isolamiento de Fungus Fitopatoênicos. In A. Couto & R. Gonçalves (Eds.), Métodos em Fitopatologia (pp. 53-91). Viçosa, Brasil: Universidade de Viçosa.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>

- Croce, V., Pianzola, M. J., Durand, K., González-Arcos, M., Jacques, M. A., & Siri, M. I. (2016). Multilocus sequence typing reveals high variability among *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains affecting tomato crops in Uruguay. *European Journal of Plant Pathology*, 144(1), 1-13. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0738-0>
- de León, L., Siverio, F., López, M. M., & Rodríguez, A. (2008). Comparative efficiency of chemical compounds for *in vitro* and *in vivo* activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomato bacterial canker. *Crop Protection*, 27(9), 1277-1283. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.04.004>
- de León, L., Siverio, F., López, M. M., & Rodríguez, A. (2011). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: Healthy seeds are still the goal. *Plant Disease*, 95(11), 1328-1338. <https://doi.org/10.1094/pdis-02-11-0091>
- Dorn, B., Musa, T., Krebs, H., Fried, P. M., & Forrer, H. R. (2007). Control of late blight in organic potato production: evaluation of copper-free preparations under field, growth chamber and laboratory conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 119, 217-240. <http://doi.org/10.1007/s10658-007-9166-0>
- EFSA PLH Panel [EFSA Panel on Plant Health]. (2014). Scientific Opinion on the pest categorisation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith). *EFSA Journal*. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3721>
- Eichenlaub, R., & Gartemann, K.-H. (2011). The *Clavibacter michiganensis* subspecies: Molecular investigation of Gram-positive bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 445-464. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095258>
- European and Mediterranean Plant Protection Organization [EPPO]. (2016). PM 7/42 (3) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. EPPO Bulletin, 46, 202-225. <https://doi.org/10.1111/epp.12302>
- Fozia, A., Shaheen, A., Ahmad, I., Amin, S., Ahmad, N., Ullah, R., Bari, A., Sohaib, M., Hafiz Majid, M., & Alobaid, A. (2021). Ballodiolic Acid A and B: Two New ROS, (OH), (ONOO-) Scavenging and Potent Antimicrobial Constituents Isolated from *Ballota Pseudodictamnus* (L.) Benth. *Pharmaceutics*, 13(3), 402. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030402>
- Fragoso-Serrano, M., Ortiz-Pastrana, N., Luna-Cruz, N., Toscano, R. A., Alpuche-Solís, A. G., Ortega, A., & Bautista, E. (2019). Amarisolide F, an acylated diterpenoid glucoside and related terpenoids from *Salvia amarissima*. *Journal of Natural Products*, 82 (3), 631-635. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00565>
- Gartemann, K.-H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R., & Burger, A. (2003). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: First steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, 106 (2-3), 179-191. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.07.011>
- Gómez-Rivera, A., González-Cortazar, M., Herrera-Ruíz, M., Zamilpa, A., & Rodríguez-López, V. (2018). Sessein and isosessein with anti-inflammatory, antibacterial and antioxidant activity isolated from *Salvia sessei* Benth. *Journal of Ethnopharmacology*, 217, 212-219. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.012>
- González-Chávez, M. M., Alonso-Castro, A. J., Zapata-Morales, J. R., Arana-Argáez, V., Torres-Romero, J. C., Medina-Rivera, Y. E., Sánchez-Mendoza, E., & Pérez-Gutiérrez, S. (2018). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of tilifodiolide, isolated from *Salvia tiliifolia* Vahl (Lamiaceae). *Drug Development Research*, 79 (4), 165-172. <https://doi.org/10.1002/>

[ddr.21432](#)

- Hernández-Díaz, L., & Rodríguez Jorge, M. (2001). Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 6(2), 44-47.
- Horiuchi, K., Shiota, S., Kuroda, T., Hatano, T., Yoshida, T., Tsuchiya, T. (2007). Potentiation of antimicrobial activity of aminoglycosides by carnosol from *Salvia officinalis*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30(2), 287-290. <https://doi.org/10.1248/bpb.30.287>
- Horna, Q. G., Silva, D. M., Taboada, W. V., & Tamariz, O. J. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Médica Herediana*, 16(1), 39-44. <https://doi.org/10.20453/rmh.v16i1.862>
- Jassbi, A. R., Eghtesadi, F., Hazeri, N., Ma'sumi, H., Valizadeh, J., Chandran, J. N., Bernd, S., & Baldwin, I. T. (2017). The roots of *Salvia rhytidea*: A rich source of biologically active diterpenoids. *Natural Product Research*, 31(4), 477-481. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1188096>
- Jassbi, A. R., Mehrdad, M., Eghtesadi, F., Ebrahimi, S. N., & Baldwin, I. T. (2006). Novel rearranged abietane diterpenoids from the roots of *Salvia sahendica*. *Chemistry & Biodiversity*, 3(8), 916-922. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200690093>
- Jassbi, A. R., Zare, S., Firuzi, O., & Xiao, J. (2016). Bioactive phytochemicals from shoots and roots of *Salvia* species. *Phytochemistry Reviews*, 15, 829-867. <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9427-z>
- Kabouche, A., & Kabouche, Z. (2008). Bioactive diterpenoids of *Salvia* species. *Studies in Natural Products Chemistry*, 35, 753-833. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(08\)80017-8](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(08)80017-8)
- Kawahara, N., Tamura, T., Inoue, M., Hosoe, T., Kawai, K., Sekita, S., Satake, M., & Goda, Y. (2004). Diterpenoid glucosides from *Salvia Greggii*. *Phytochemistry*, 65(18), 2577-2581. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.08.012>
- López Ferrer, C. E., Sánchez Dirzo, G., Arrieta Baez, D., & Román García, J. H. (2010). Estudio preliminar fitoquímico y de la actividad antimicrobiana de *Salvia amarissima* Ort. Investigación Universitaria Multidisciplinaria: *Revista de Investigación de la Universidad Simón Bolívar*, (9). ISSN-e 1665-692X.
- Martínez-Castro, E., Jarquin-Gálvez, R., Alpuche-Solís, A. G., Vallejo-Pérez, M. R., Colli-Mull, J. G., & Lara-Ávila, J. P. (2018). Bacterial wilt and canker of tomato: fundamentals of a complex biological system. *Euphytica*, 214, 72. <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2140-4>
- Martínez-Vázquez, M., Miranda, P., Valencia, N. A., Torres, M. L., Miranda, R., Cárdenas, J. & Salmón, M. (1998). Antimicrobial Diterpenes from *Salvia reptans*. *Pharmaceutical Biology*, 36 (2), 77-80. <https://doi.org/10.1076/phbi.36.2.77.4611>
- Milijašević, S., Todorović, B., Potočnik, I., Rekanović, E., & Stepanović, 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. *Pesticidi i Fitomedicina*, 24(1), 19-27. <https://doi.org/10.2298/pif0901019m>
- Minitab. (2021). *Minitab*. Retrieved from <https://www.minitab.com>
- Mirzaee, H., Peralta, N. L. N., Carvalhais, L. C., Dennis, P. G., & Schenk, P. M. (2021). Plant-produced bacteriocins inhibit plant pathogens and confer disease resistance in tomato. *New Biotechnology*, 63, 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2021.03.003>
- Monroy, A., González, R., García, I., Totosa, A., Minor, H. (2007). Actividad antimicrobiana de

- extractos de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y Chile ancho (*Capsicum annuum* L. grossum Sendt). En: 12° Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia, México.
- Nandi, M., Macdonald, J., Liu, P., Weselowski, B., & Yuan, Z. C. (2018). *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: bacterial canker of tomato, molecular interactions, and disease management. *Molecular Plant Pathology*, 19(8), 2036-2050. <https://doi.org/10.1111/mpp.12678>
- Nostro A., & Papalia T. (2012). Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future perspectives. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 7(1), 28–35. <https://doi.org/10.2174/157489112799829684>
- Nowak, A., Konstantinidou-Doltsinis, S., Seddon, B., & Schmitt, A. (2009). Möglichkeiten der Bekämpfung des Falschen Mehltaus an Gurke (*Pseudoperonospora cubensis*) mit alternativen Präparaten. [Possibilities of controlling downy mildew in cucumber (*Pseudoperonospora cubensis*) with alternative preparations]. In 10. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Zürich.
- Peritore-Galve, F.C., Tancos, M.A., & Smart C.D. (2021). Bacterial canker of tomato: revisiting a global and economically damaging seedborne pathogen. *Plant Disease*, 105 (6), 1581-1595.
- SADER. (2020). El jitomate, hortaliza mexicana de importancia mundial. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Fecha de publicación 10 de octubre de 2020. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/el-jitomate-hortaliza-mexicana-de-importancia-mundial?idiom=es>
- Schmitt, A., Nowak, A., Gärber, U., Marx, P., Leinhos, G., Mattmüller, H., Konstantinidou-Doltsinis, S., & Seddon, B. (2008). Downy mildew in organic vegetable production—new biological preparations (German). *Mitteilungen aus dem Julius Kühn-Institut*, 417, 251.
- Sen, Y., van der Wolf, J., Visser, R.G., & van Heusden, S. (2015). Bacterial canker of tomato: Current knowledge of detection, management, resistance, and interactions. *Plant Disease*, 99(1), 4–13. <https://doi.org/10.1094.PDIS/05-14-0499-FE>
- Sharabani, G., Manulis-Sasson, S., Borenstein, M., Shulhani, R., Lofthouse, M., Chalupowicz, L., & Shtienberg, D. (2013). The significance of guttation in the secondary spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato greenhouses. *Plant Pathology*, 62(3), 578-586. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02673.x>
- Siddique, M., Din, N., Ahmad, M., Ali, A., Naz, I., Alam, S. S., & Ullah, N. (2020). Bioefficacy of some aqueous phytoextracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith), the cause of bacterial canker of tomato. *Gesunde Pflanzen*, 72(3), 207-217. <https://doi.org/10.1007/s10343-020-00503-9>
- Stefanova Nalimova, M. N., Rizo Peña, S.G., & Coronado Izquierdo, M. F. (2005). Efecto *in vitro* de extractos de plantas sobre especies bacterianas del género *Xanthomonas*. *Fitosanidad*, 9(3), 49-51.
- Tancos, M. A., Chalupowicz, L., Barash, I., Manulis-Sasson, S., & Smart, C. D. (2013). Tomato fruit and seed colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through external and internal routes. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(22), 6948-6957. <https://doi.org/10.1128/AEM.02495-13>
- Toribio, M. S., Oriani, D. S., & Skliar, M. I. (2004). Actividad antimicrobiana de *Centaurea calcitrapa*. *Ars Pharmaceutica*, 45(4), 335-341
- Wassermann, E., Montecchia, M. S., Garaventa, V. S., Correa, O. S., & Romero, A. M. (2020). Virulence and pCM1 plasmid carriage are related to BOX-PCR fingerprint type in strains

- of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* that cause bacterial wilt and canker of tomato in Argentina. *Plant Pathology*, 69(4), 723-732. <https://doi.org/10.1111/ppa.13163>
- Werner, N. A., Fulbright, D. W., Podolsky, R., Bell, J., & Hausbeck, M. K. (2002). Limiting populations and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on seedling tomatoes in the greenhouse. *Plant Disease*, 86(5), 535-542. <https://doi.org/10.1094/pdis.2002.86.5.535>
- Yuqing, W., Zhang, Y., Zhipeng, G., & Wencai, Y. (2018). Breeding for resistance to tomato bacterial diseases in China: challenges and prospects. *Horticultural Plant Journal*, 4(5), 193-207. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2018.08.004>