INFORME DE INVESTIGACIÓN
PAIE 2014

Uso de extractos de plantas para el control de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

I. RESUMEN

El cancro bacteriano en tomate, causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, es una enfermedad de gran importancia en nuestro país. Las herramientas de control de esta enfermedad son muy escasas. Este trabajo se propone generar insumos para lograr una herramienta alternativa al control químico, que sea sostenible ambientalmente a través del uso de extractos vegetales. Se evaluaron los extractos de lavanda (*Lavandula dentata*), chirca (*Eupatorium buniifolium*), ligustro (*Ligustrum lucidum*), vara de oro (*Solidago canadensis*) y ortiga (*Urtica urens*) por sus efectos sobre la bacteria en condiciones in vitro. El extracto de chirca fue el que presentó mayor inhibición. Para este se probaron diferentes métodos de extracción.

II. INTRODUCCIÓN

En la implementación de medidas de control de enfermedades vegetales es importante considerar todas las medidas de manejo disponibles dejando el control químico como última herramienta de forma que el ambiente, los productos vegetales y en especial los alimentos sean más saludables.

En particular las bacterias fitopatógenas hoy en día ya no se controlan con antibióticos por las implicancias indirectas en la salud humana (Sanchez de Rivas, 2006). La principal herramienta química son los productos a base de cobre para los cuales ya se ha reportado resistencia en bacterias (Canteros, 1999; Goto et al, 1994 y Mirk et al, 2007 citados por Zignago, 2011).

El tomate es una de las hortalizas de mayor consumo por parte de la población y es afectado por muchas enfermedades de distintas causas. Las de origen bacteriano en especial tienen una gran importancia para el cultivo (Balestra et al, 2009) y son alrededor de siete las más relevantes (Jones et al, 2001).

En esta propuesta se plantea el estudio del efecto de extractos vegetales de ortiga (*Urtica urens*), chirca común (*Eupatorium bunifolium*), ligustro (*Ligustrum lucidum*), lavanda (*L. dentata*) y vara de oro (*Solidago canadensis*) para el control in vitro de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, causante del cancro bacteriano. Para la especie vegetal que presenta mayor efecto inhibidor se prueban distintas formas de elaboración del extracto y se busca su concentración mínima inhibitoria.

El criterio para la elección de las especies vegetales a evaluar fue, en el caso de la chirca, por encontrarse en abundancia en los campo del país. Buscarle un uso ayudaría a controlar su avance. Este trabajo genera mayor información sobre esta

especie, que está siendo estudiada en diferentes ámbitos, tanto en el área de la entomología (Umpierrez et al, 2013), o por sus características aromáticas (Davies, 2004), e incluso se han hecho estudios que la describen bioquímicamente (Lorenzo et al , 2005). El ligustro se seleccionó por ser una planta de fácil disponibilidad, considerándose invasora en nuestros montes nativos. Por otro lado Shuang-Cheng et al. (2001) demostraron que el Ligustro posee sustancias con actividad antiviral y en este sentido es interesante investigar si presenta alguna relación con la actividad de Cmm. La ortiga es una hierba que nace de forma invasiva en muchos jardines, invernáculos, etc. por lo que poder encontrarle un uso sería una forma de controlar la especie. La lavanda fue elegida porque su extracto ha presentado buena inhibición de esta bacteria en trabajos previos. Se utilizó el extracto de la planta vara de oro debido a que se tenían referencias de sus efectos antiséptico.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis es la bacteria causante del cancro bacteriano en plantas de tomate. Taxonómicamente se clasifica como sigue:

Reino:	Procaryotae
Division:	Firmicutes (por ser Gram positiva)
Clase:	Thallobacteria
Género:	*Clavibacter*
Especie:	*michiganensis*
Sub especie:	*michiganensis* (Agrios, 2005)

Esta enfermedad, muy importante en dicho cultivo a nivel mundial tanto a campo como en invernaderos, se manifiesta en la planta al principio con desecación del borde de los folíolos de hojas inferiores y más adelante aparecen pequeñas manchas blancas en las nervaduras de hojas y en pecíolos; en tallos y pecíolos pueden aparecer líneas marrones que se rajan y evolucionan a cancros, lo que da el nombre a la enfermedad. Se trasmite por salpicado desde los cancros y semillas. En este último caso la enfermedad se manifiesta recién cuando la planta comienza su etapa reproductiva (Jones et al., 2001).

Eupatorium buniifolium conocida como “chirca” es una especie perteneciente a la familia Asteraceae. Es un arbusto leñoso, perenne de crecimiento erecto y hojas opuestas polimórficas (simples, lineares y pinnatisectas con segmentos lineares). Puede superar los dos metros de altura. Sus flores están agrupadas en inflorescencias en forma de panojas, compuestas de múltiples capítulos, cilíndricos largamente pedicelados. Es una planta hermafrodita que florece en verano y presenta mayor actividad de crecimiento en primavera e inicios de verano, sus frutos son aquenios. Se puede encontrar en Bolivia, Brasil, Argentina, Paraguay y es común en casi todos los campos del territorio de Uruguay.

Ligustrum lucidum o Ligustro es una especie arbórea originaria de China perteneciente a la familia de las Oleaceae. Posee follaje perenne, corteza lisa, hojas simples y flores blancas, pequeñas, dispuestas en panojas terminales cónicas. Los frutos constituyen una baya azulada y globosa de 8-10 mm. Su uso es

principalmente ornamental, pero también se ha utilizado en medicina tradicional china por su efecto antitumoral, antidiabético, antimutagénica y con propiedades hepatoprotectoras (Dawei et al. 2015). Por otro lado Shuang-Cheng et al. (2001) demostraron que la especie presenta acción contra virus patogénicos para los humanos. Sustancias como Lucidumoside C, oleoside dimetiléster, ligustroside encontradas, oleuroproteína y el ácido Oleanólico presentes en ligustro, mostraron acciones antivirales o antioxidativos o reguladores de insulina. El ligustro presenta los siguientes componentes: Lucidumoside C, oleoside dimetiléster, oleuroproteína y el ácido Oleanólico.

Urtica dioica u ortiga es una planta herbácea que pertenecen a la familia Urticaceae. Se encuentran en la mayoría de zonas templadas del mundo, próximas a zonas habitadas, alrededor de las casas, bordes de caminos, cunetas con suelos húmedos y ricos en materia orgánica, etc.

Alcanza entre 50 y 150 cm de altura y es la más común. El tallo al igual que sus hojas está recubierto de tricomas o pelos urticantes que caracterizan a la especie. El tallo es cuadrangular y sus hojas opuestas de color verde oscuro, con dientes recios triangulares. Sus flores de color blanco verdoso se disponen en largos racimos ramificados insertados en las axilas de las hojas.

Por otra parte se consideraron antecedentes de su estudio tanto en el arte culinario como también en sus actividades farmacológicas y composición química (Barnes, Anderson y Phillips, 2005).

Lavandula es un género que incluye arbustos leñosos aromáticos en general. Con o sin indumento. Hojas grisáceas, con o sin pecíolo y de forma variable. Inflorescencia en espigas terminales algunas veces ramificadas. Los verticilos tienen entre 3 y 9 flores con o sin bracteolas. Las diferentes especies varían en su efecto antimicrobiano. En fitoterapia su principal aplicación es para tratar ansiedad, insomnio, depresión, contracturas, trastornos digestivos de origen nervioso. Sin embargo también se reporta su uso para el control de piojos, para cicatrizar y desinfectar -por su efecto antibacteriano- heridas y quemaduras (Castillo-Martinez).

En la producción vegetal existen escasos antecedentes de uso. Sin embargo se pueden citar a L. angustifolia como inhibidora débil de Erwinia chrysantemi, a L. latifolia como inhibidora débil de *Pseudomonas marginalis pv margin*alis y a *Xanthomonas hortorum pv pelargonii* (Kokosková y Pavela,2005) y a L. stoechas como inhibidora de *Calvibacter michiganensis subsp michiganensis* en condiciones in vitro (Soylu et al, 2005). Estudios nacionales confirman el poder antibacteriano in vitro de *L. dentata* frente a patógenos vegetales (Scattolini et al, 2014, Scattolini y González, 2015). Ha demostrado mas eficiencia con fitopatógenas Gram positivas que con Gram negativas (sin publicar).

Lavandula spp tiene entre sus componentes principales a los principales son el linalol y el acetato de linalyl. Su aceite esencial rico en esteres de linalilo y de geranilo. Geraniol, linalol, bomeol, cineol, eucaliptol, limoneno, l-pineneo, cariofilleno, eteres butirico y valerianico, cumarina etc. Con efectos analgésicos, antisépticos, antirreumáticos, cicatrizantes y antimigraña en uso externo (Stuart, 1981; Balchin, 2002).

Solidago es un género que comprende alrededor de 130 especies, donde la mayoría son nativas de América del Norte. *Solidago canadensis*, también conocida como vara de oro de Canadá, es una planta herbácea perenne de la familia

Asteraceae y es usada medicinalmente para el tratamiento de varias enfermedades. Bisht et al. (2010) encontraron que el aceite esencial de la raíz de esta planta tiene actividad antibacteriana y antifúngica contra seis especies de bacterias evaluadas y dos especies fúngicas. Tuvo un control efectivo tanto para bacterias gram positivas como gram negativas, con concentraciones mayores a 500 µg/ml. Otros estudios mostraron que el extracto de aceite volatil de *S. canandensis* controla *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* (Cheng et al, 2006).

Solidago canadensis presenta como compuestos predominantes a Germacrane D and D-Limonene (Zhang et al, 2006).

Evaluación de la inhibición bacteriana in vitro

Para el test de inhibición Iroha, I.R. et al (2009) utilizan placas de agar donde la bacteria es sembrada en superficie por estría en una concentración Mac Farland 0.5. Luego se hacen hoyos de 6 mm de diámetro en el medio de cultivo donde se depositan 100ul del extracto. Se incuban las placas a 37°C durante 24h y luego se mide el diámetro de inhibición. Scattolini et al (2014) contrastan varias metodologías en las que se incorporó la bacteria al medio. Contrastan la inhibición bacteriana aplicando los extractos en hoyos practicados en el medio de cultivo, en discos de antibiograma y a través de gotas sobre el medio. Luego de la incubación y medición del halo de inhibición se constató la mayor sensibilidad del test de inhibición con la aplicación de gotas sobre el agar como también proponen Balestra et al (2009) y Moura et al (2012).

Concentración mínima inhibitoria (CMI) es la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 hs (Bustamante, 2015).

Una forma de determinar la CMI es la que utilizan Ramirez y Marín Castaño (2009) utilizando placas que tienen 96 pocillos (12 mm x 8 mm). Consiste en colocar en todos los hoyos medio de cultivo con el microorganismo incorporado y sobre el mismo aplicar diferentes microdiluciones del/los extracto vegetal a evaluar. Las placas así tratadas se sellan para evitar la evaporación durante la incubación. El pozo que contenga la menor concentración del agente que inhibe completamente el crecimiento define la MIC. La ventaja que tiene este método es la posibilidad de múltiples repeticiones y eventualmente de determinar la CMI de varias sustancias antimicrobianas a la vez.

Toribio *et al* (2012) *Determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante la técnica de dilución en agar*. Este se resuspende el residuo seco del extracto alcohólico en un volumen conocido de agua destilada estéril para determinar la concentración. A partir de ésta solución se preparan diluciones y se coloca 1 ml de cada una de ellas en diferentes placas con 9 ml de medio de cultivo. Se homogeiniza y se deja solidificar. En cada placa se le colocan 5 descargas de 1 µl de suspensión correspondiente a 0.5 de la escala de McFarland de la bacteria en estudio. A modo de testigo se hace lo mismo en una placa con medio de cultivo sin ninguna dilución del extracto. Se incuban durante 24 horas a 35ºC y se interpretaron los resultados.

Otro metodo es como hace Kaoutar Bayoub *et al* (2010) que trabajando con Listeria monocytogenes aplicó el método de difusión en hoyo de agar de las placas inoculadas.

IV. MATERIALES Y METODOS

Recolección de material vegetal. El material vegetal para los extractos vegetales se recolectó de lugares alejados de zonas urbanas.

La ortiga se recolectó de una zona cercana a la ciudad de Santa Lucía (Canelones) en diciembre del año 2014 y se secó naturalmente a la sombra. La chirca y el ligustro fueron recolectados en Melilla (Montevideo) en marzo de 2015. Se utilizó material vegetal fresco, en el caso de chirca hojas y flores y en el de ligustro solo hojas. La lavanda se recolectó en las inmediaciones de la ciudad de Cerrillos y la vara de oro en las cercanías de la ciudad de Las Piedras. Ambas ciudades de Canelones.

Preparación de extractos. Los primeros extractos se prepararon siguiendo una metodología que consiste en macerar el material vegetal en una solución etanólica al 70%. Se llenó un recipiente de vidrio con cada material vegetal y se completó el volumen con agua destilada. Luego se retiró el líquido y se midió el volumen. El 30% del mismo se devolvió con agua al recipiente con el material vegetal y el 70% restante se sustituye por alcohol 96%. Los extractos se filtraron quince días después y se conservaron en lugar oscuro y fresco.

Preparación de la bacteria. Se utilizaron tres aislamientos de *C. michiganensis subsp. michiganensis* (Cmm): uno de la bacterioteca de la Unidad de Fitopatología (Cmm2), otro de otra colección (Cmm17) y un tercero de reciente aislamiento en la clínica de diagnóstico de Fitopatología (Cmm gen). Con todos se realizó el procedimiento siguiente: se sembraron en Nutriente Agar Dextrosa (NAD). Luego de la incubación (24 o 48 hs) se las suspendió en una solución salina a una concentración de $1x10^8$ ufc/ml, correspondiente a 0,5 de Mc Farland, y se incorporó en medio NAD concentrado a una temperatura de de 60 ºC. Enseguida de mezclado se dispensó en placas de Petri.

Comparación de la inhibición bacteriana in vitro de los diferentes extractos vegetales. Se siguió la metodología utilizada por Balestra (2009). Una vez solidificado el medio con la bacteria incorporada se colocaron gotas de 20 ul de 5 extractos vegetales y una de alcohol 96% en forma equidistante en las placas. Estas se incubaron a 28ºC y a las 48 hs se midió el halo de inhibición.

Comparación de diferentes formas de producción de extracto. Con la especie vegetal cuyo extracto presentó mayor inhibición se probaron diferentes formas de extracción, a partir de material fresco y seco. Se compararon maceraciones de 14 y de 7 días en distintas concentraciones de alcohol y con técnicas de maceración, decocción e infusión según se detallan a continuación.

Maceraciones
De material fresco
1) 15 días en agua con 70% de alcohol 96%
3) 2 días en agua con 70% de alcohol 96%
5) 7 días en agua con 10% de alcohol 96%
6) 2 días en agua con 10% de alcohol 96%
De material seco
2) 2 días en agua con 10% de alcohol

Foto Nº1: Extractos obtenidos por maceración.

4) 7 días en agua con 10% de
Decocciones
7) 5 minutos de hervor de **material fresco**
8) 5 minutos de hervor de **material seco**
Infusión
9) Infusión de **material seco**

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se realizaron diluciones definidas del residuo seco del extracto obtenido con el método de producción que demostró mayor eficiencia. Se aplicaron las diluciones en hoyos en el medio con la bacteria incorporada como en los ensayos previos. Se determinará la concentración mínima que inhiba el desarrollo de la bacteria.

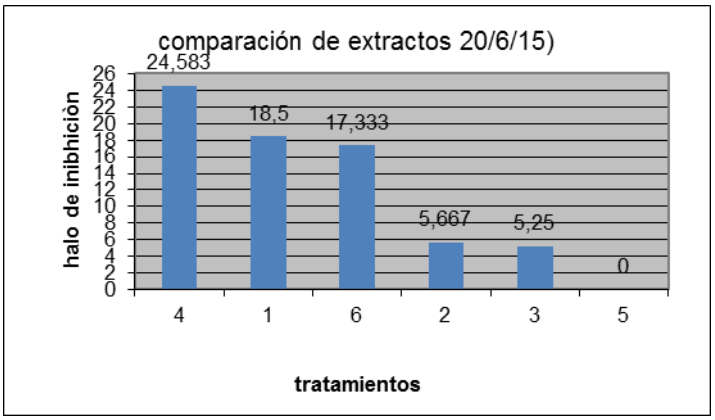
Análisis estadístico Se aplicó un Análisis de Varianza y la prueba de Tukey a través del Sistema de Análisis Estadístico SAS. En todas las ocasiones el ensayo contó con un mínimo de 10 repeticiones.

V. RESULTADOS

Resultados comparación de extractos.

Ensayo 1: Se probó la inhibición bacteriana presentada por los extractos elaborados con las diferentes especies: lavanda (1), ligustro (2), ortiga (3), chirca (4), vara de oro (6) y alcohol (5). Realizado el 20 de junio de 2015 con el aislamiento Cmm2

Gráfica 1. Promedios de diámetros de halos de inhibición presentadas por cada extracto.



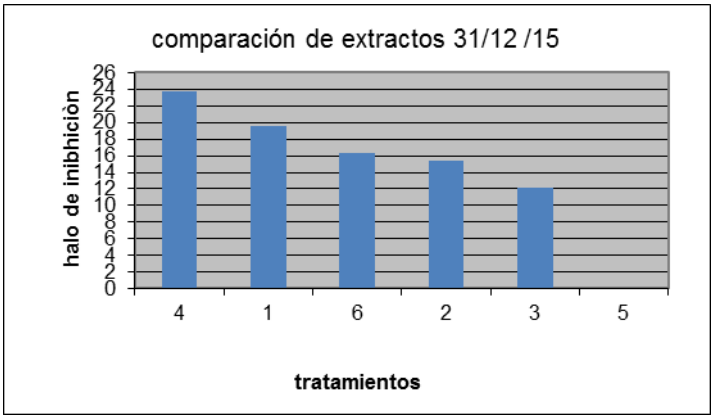
Cuadro 1. Comparación de medias de diámetro de inhibición presentadas por cada extracto.

Tukey Grouping	Valor	Nº trat	Tratamiento
a	24,58	4	Chirca
b	18,50	1	Lavanda
b	17,33	6	Solidago
c	5,67	2	Ligustro
dc	5,25	3	Ortiga
d	0,00	5	Alcohol
coeff var 38,37	P:0,0001		

Como se puede observar existe diferencia significativa entre los halos de inhibición. El extracto de Chirca común (Nº 4) fue el que mostró mayor control pero los otros extractos también presentaron inhibición.

Ensayo 2: se repite el ensayo anterior con el aislamiento Cmm gen de la clínica de diagnóstico de Fitopatología 31 de diciembre de 2015.

Gráfica 2: Promedios de diámetros de inhibición presentadas por cada extracto.



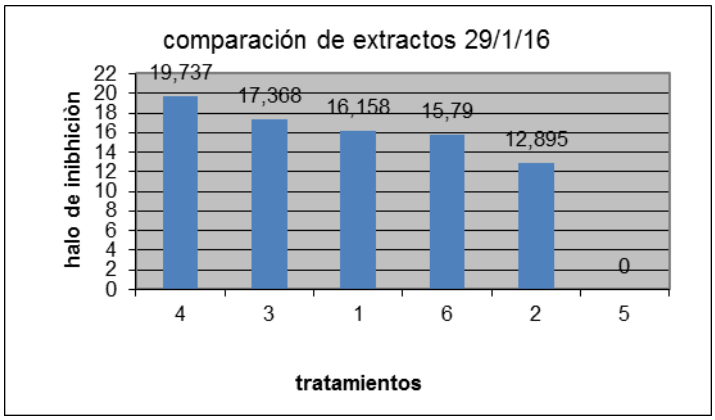
Cuadro 2: Comparación de medias de diámetro de inhibición presentadas por cada extracto.

Tukey Grouping	Valor	Nº trat.	Tratamiento
a	23,70	4	Chirca
b	19,60	1	Lavanda
b	16,40	6	Solidago
c	15,40	2	Ligustro
dc	12,10	3	Ortiga
d	0,00	5	Alcohol
coeff var 9,37	P:0,0001		

Como se observa existe diferencia significativa entre los extractos y nuevamente todos mostraron control, obteniéndose mayor inhibición en el tratamiento realizado con chirca seguido por lavanda y vara de oro como en ensayos anteriores. En el caso de los extractos de ortiga y ligustro, si bien poseen control, sus resultados son significativamente menor que las especies anteriormente mencionadas.

Ensayo 3. Finalmente se repitió el ensayo con el fin de poder obtener datos que confirmen los resultados utilizando el aislamiento Cmm gen. Realizado el 29 de enero de 2016.

Gráfica 3. Promedios de diámetros de inhibición presentadas por cada extracto.



Cuadro 3. Comparación de medias de diámetro de inhibición bacteriana presentadas por cada extracto en el ensayo 3

Tukey Grouping	Valor	Nº trat	Tratamiento
a	19,74	4	Chirca
b	17,37	3	Ortiga
b	16,16	1	Lavanda
b	15,79	6	Solidago
c	12,90	2	Ligustro
d	0,00	5	Alcohol
coeff var 48,65	P:0,0034		

Se volvió a confirmar la tendencia donde todos los extractos ejercen control siendo mayor en el caso de la chirca.

Es de destacar que los resultados mencionados anteriormente tienen una probabilidad de cometer error tipo 1 muy baja (menor a 0,0001 en la mayoría de los casos).

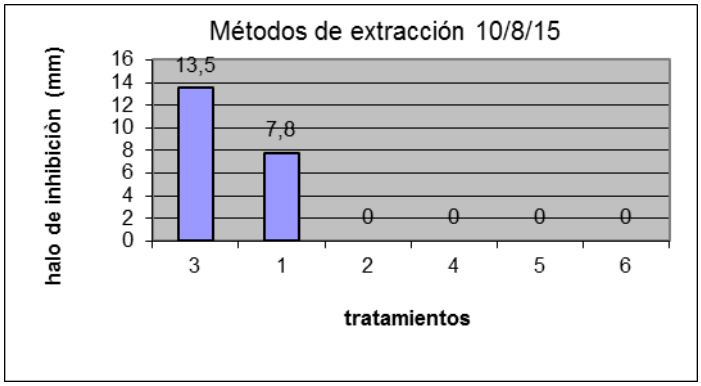
Resultado comparación de métodos de extracción.

Con la especie que presentó mayor control de la bacteria, que fue la chirca, se prepararon extractos con diferentes métodos y se comparó su efecto inhibidor aplicando la misma metodología que en los ensayos anteriores.

Para esta instancia también se realizaron en varias fechas permitiendo ajustar también la metodología.

Ensayo 4: Se evaluaron distintas formas de obtención del extracto de chirca. Se realizó con el aislamiento Cmm 2, el 10 de agosto de 2015.

Grafica 4. Promedios de diámetros de inhibición presentados los extractos obtenidos con diferentes métodos.



Cuadro 4. Comparación de medias de diámetro de inhibición presentadas por los extractos de chirca obtenido con diferentes métodos.

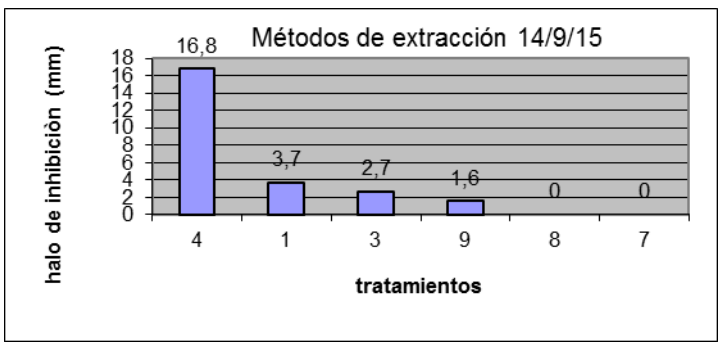
Tukey Grouping	Valor	Nº trat	Tratamiento
a	13,50	3	2 días 70% alcohol
b	7,80	1	15 días 70% alcohol
c	0,00	2	2 días 10% alcohol (seco)
c	0,00	4	8 días 10% alcohol
c	0,00	5	7 días 10% alcohol
c	0,00	6	2 días 10% alcohol
coeff var 64,38376	P:0,0001		

Inicialmente se probaron seis métodos de extracción donde solo se observó control con una diferencia significativa en los métodos donde se maceraba el vegetal fresco en 30 % de agua y 70% de alcohol. El tratamiento 3 se dejó macerar 2 días y el 1 durante 15 días.

A partir de esto se descartaron los tratamientos que no mostraron inhibición y se agregaron nuevos tratamientos.

Ensayo 5: Se evaluaron las formas de obtención más eficientes en el ensayo 4 y se incorporaron en la evaluación difusiones y decocción de la chirca. Realizado con aislamiento Cmm2 el 14 de setiembre de 2015.

Grafica 5. Promedios de diámetros de inhibición presentados por los extractos obtenidos con diferentes métodos.



Cuadro 5. Comparación de medias de diámetros de inhibición presentados por los extractos obtenidos con diferentes métodos.

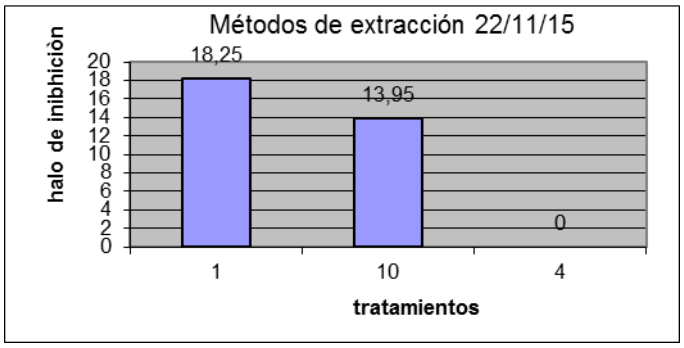
Tukey Grouping	Valor	Nº trat	Tratamiento
a	16,80	4	8 días 10% alcohol
b	3,70	1	15 días 70% alcohol
b	2,70	3	2 días 70% alcohol
b	1,60	9	infusión
b	0,00	8	hervido 5 minutos (seco)
b	0,00	7	hervido 5 minutos (fresco)
coeff var 116,9679	P:0,0001		

En este ensayo se observó que el que demostró mayor control fue el que se utilizó material vegetal seco y se maceró en agua con 10% de alcohol durante 7 días. Por otra parte en los tratamiento con material fresco macerado en agua con 70% de alcohol 15 días y 2 días tanto como el de infusión se observó inhibición pero sin diferencia significativa entre ellos y los tratamientos que no presentaron halo de inhibición.

En las últimas instancias se seleccionaron los extractos que venían demostrando mayor control. Para esto se volvió a preparar un tratamiento con agua y 70 % de alcohol (tratamiento 10) con la precaución de que el tratamiento 1 haya perdido efecto ya que se realizó varios meses atrás. Posteriormente se repitió también el tratamiento 4 con el mismo objetivo (tratamiento 11).

Ensayo 6: realizado con el aislamiento Cmm 17 (INIA Las Brujas) el 22 de noviembre de 2015.

Grafica 6. Promedios de diámetros de inhibición presentadas por el extracto de chirca obtenido con diferentes método de extracción.



Cuadro 6. Comparación de medias de diámetro de inhibición presentados por los extractos de chirca obtenidos con diferentes métodos.

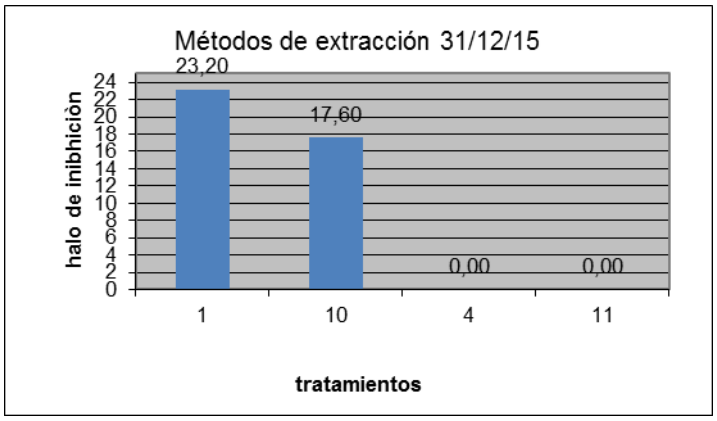
Tukey Grouping	Valor	Nº trat	tratamiento
a	18,25	1	15 días 70% alcohol
a	13,95	10	20 días 70% alcohol
b	0,00	4	8 días 10% alcohol
coeff var 38,18	P:0,0001		

Este ensayo afirmó la tendencia donde el extracto realizado con material fresco y 70% de alcohol durante 15 días era es que parecía demostrar mayor inhibición.

El ensayo final pretendía comprobar el comportamiento observado.

Ensayo 7: Este ensayo fue realizado con el aislamiento Cmm gen el 31 de diciembre de 2015.

Gráfica 7. Promedios de diámetros de inhibición presentados por los extractos de chirca obtenido con diferentes métodos.



Cuadro 7. Comparación de medias de diámetro de inhibición presentados por los0 extractos de chirca obtenidos con diferentes métodos.

Tukey Grouping	Valor	Nº trat	Tratamiento
a	23,20	1	15 días 70% alcohol
b	17,60	10	20 días 70% alcohol
c	0,00	4	8 días 10% alcohol
c	0,00	11	molido 8 días 10% alcohol
coeff var 11,55	P:0,0001		

De esta forma se puede afirmar que con diferencia significativa el tratamiento 1 y 10 presentan control sobre la bacteria.

Resultado concentración inhibitoria mínima.

Este ensayo se realizó en el mes de enero de 2016 donde se realizaron diluciones del extracto que mejor se comportó en los ensayos anteriores. Previamente se filtró el extracto y después se formaron las siguientes diluciones: 1/10; 1/20; 1/40 y 1/60.

En este ensayo no se observó inhibición en ninguno de los tratamientos.

VI. DISCUSIÓN

Los extractos etanólicos de las especies evaluadas inhibieron el crecimiento bacteriano de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis.* Existieron diferencias

significativas en la capacidad antibacteriana de los diferentes extractos, siendo *Eupatorium buniifolium* (chirca) la que presentó mayor control.

El tratamiento utilizado como testigo, alcohol 70%, no produjo halo de inhibición, dejando en evidencia que la inhibición del crecimiento bacteriano se debe a la composición química de los materiales vegetales.

La heterogeneidad de los componentes de las especies vegetales podría estar explicando los distintos niveles de control del crecimiento de la bacteria. El mayor halo de inhibición que presentó el extracto de chirca en todos los ensayos fue un dato del cual no se conocen antecedentes, aunque ya se había probado el aceite esencial de esta especie para el control de insectos y hongos del tomate (Umpierrez y Rossini, 2014).

El método de extracción que se comportó mejor en la mayoría de los ensayos fue el de maceración durante 15 días en agua con 70% de alcohol. Probablemente se deba a que los componentes del vegetal sean más fácilmente extraíbles con alcohol que con agua.

El extracto obtenido por el macerado en agua con 10% de alcohol produjo inhibición en algunos ensayos, por lo que convendría repetir los ensayos para no descartar la posibilidad de utilizar esta alternativa ya que además de ser eficiente es también más fácil de aplicar en condiciones de producción.

La concentración inhibitoria mínima no dio resultados probablemente porque las diluciones del extracto debieron ser filtrados para su manipulación. Esto puede estar evidenciando que los principios activos estén en la fracción descartada en el por lo cual se debería repetir el procedimiento pero con una centrifugación previa de la dilución del residuo seco del extracto crudo.

Hay que tener en cuenta que estos ensayos fueron realizados in vitro, y otros factores pueden afectar las diferencias en el nivel de control de crecimiento; entre ellas la difusión en el agar de cada extracto, la solvencia de los compuestos en alcohol, etc.

El ajuste metodológico del ensayo contó con la dificultad de que el comportamiento de la bacteria fue muy variable en cuanto a su vigor y crecimiento in vitro, afectando los resultados obtenidos en los diferentes ensayos. Esto hizo que en algunos casos los halos no fueran nítidos y se dificultara su lectura.

Debido a esto se utilizaron distintos aislamientos. Las últimas repeticiones de los experimentos se realizaron con la bacteria Cmm gen de reciente aislamiento que se caracteriza por su patogenicidad y su buen comportamiento in vitro.

A pesar de estas consideraciones la eficiencia de inhibición relativa de los extractos fueron similares en todos los ensayos.

VII. PERSPECTIVAS FUTURAS:

Se entiende que este trabajo aporta a la búsqueda de herramientas de control de *Clavibacter michiganensis* basadas en extractos vegetales, particularmente con *Eupatorium bunifolium.* Los resultados que surgen son promisorios con respecto a la utilización de esta planta para controlar el cancro bacteriano en tomate.

En este sentido sería interesante profundizar en cuales son los componentes químicos de esta especie que están inhibiendo el crecimiento de la bacteria. Esto podría también facilitar el estudio de los métodos de extracción y de esta manera obtener un método eficiente y rentable económicamente para los posibles usuarios.

Es necesario ajustar ensayos de concentración inhibitoria mínima que permitan establecer relaciones entre la proporción del producto y la inhibición.

Se impone la realización de ensayos en plantas donde las condiciones cambian de forma importante para ajustar el uso de este extracto vegetal en condiciones de producción.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALCHIN, M.L. Ed. 2002. Lavender. The genus *Lavandula*. Taylor & Francis. London. ISBN 0-415-28486-4. 283pp.

BARNES JOANNE; ANDERSON LINDA, A; PHILLIPSON DAVID, J.2005. Plantas medicinales. Primera edición. Pharma editors, S.L. 386pp.

BALESTRA, G.; HEYDARI, A; DEDDARELLI, D; OVIDI, E; QUATRUCCI, A. 2009. Antibacterial effect od *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. Crop Protection 28: 807-811.

BUSTAMANTE, S.I. 2015. Protocolo para la evaluación/comparación de la actividad antimicrobiana antibióticos genéricos y antibióticos innovadores, frente a patógenos clínicos. Proyecto Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana Facultad De Ciencias Básicas Carrera Microbiología Industrial. Bogota D.C. 51pp.

CANTEROS, 1999. Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv *citri* In Mahadevan A. (ed) 1999. Plant Pathogenic Bacteria- Proceedings International Conference

CASTILLO GARCÍA,E.; MARTINEZ SOLIS, I. 2007.Manual de Fitoterapia. Elsevier. Barcelona. 506pp.

DAVIES, P.2004 Desarrollo del sector de las plantas medicinales y aromáticas en Uruguay" Serie FPTA-INIA, 11: 7-14.

DAWEI, G.; OINGWANG, L.; YING, L.; ZHIHUA, L.; YUSHENG, F.; ZENGSHENG, H.; JIAN, L.; KUN, L. Antidiabetic potential of oleanolic acid from *Ligustrum lucidum* Ait. 2015. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 1076-1083 pp.

IROHA , I.R.;AMADI , E.S.; NWUZO, A.C.; AFIUKWA, F.N.. 2009. Evaluation of the Antibacterial Activity of Extracts of *Sida acuta* Against Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* isolated from Human Immunodeficiency

Virus/Acquired Immunodeficiency Syndrome Patients. Research Journal of Pharmacology. Vol 3 (2) 22-25.

JOLOCHIN, G.; SPERONI, G. 2007. Árboles y arbustos del Parque de la Facultad de Agronomía. Departamento de Biología Vegetal, Curso de Botánica. Taller de Publicaciones de la Facultad de Agronomía. Nueva Guía Docente. 320 p.

JONES, J. B.; JONES, J. P.; STALL, R. E. 2001. Compendio de enfermedades de tomate. St Paul, Minnesota. APS Press. 73 p.

KAOUTAR BAYOUB; TARIK BAIBAI; DRISS MOUNTASSIF ;ABDELAZIZ RETMANE ; ABDELAZIZ SOUKRI . 2010. Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against Listeria monocytogenes and some other pathogenic strains. African Journal of Biotechnology Vol. 9 (27), pp. 4251-4258.

KOKOSKOVA, B.;PAVELA, R. 2005 Effectivity of esential oils against pectinolytic *Erwinia chrysantemi* and *Pseudomonas marginalis*. In 1st Symposium on Biocontrol of Bacteriual Plant Diseases. P76.

KOKOSKOVA, B.;PAVELA, R. 2005. Effectivity of esential oils against *Xanthomonas hortorum pv pelargonii*, the causal agent of bacterial blight on geranium. In 1st Symposium of Biocontrol of Bacteriual Plant Diseases. P.77.

LORENZO, D.; PAZ, D.; DAVIES, P.; VILLAMIL, J.; VILA, R.; CANIGUERAL, S. & DELLACASSA, E. 2005. Application of multidimensional gas chromatography to the enantioselective characterisation of the essential oil of *Eupatorium buniifolium* Hooker et Arnott. Phytochemical analysis: PCA. 16 (1): 39-44.

MOURA, L.; BARROS, C.; MOURÃO, I.; MATOS, O. 2012. Potencialidades de extratos e óleos essenciais de coentro, orégão e poejo como meio de protecçao contra bacterioses do tomateiro. Revista de ciencias Agrárias- Vol 35(2)265-273.

RAMIREZ, L. S.; MARIN CASTAÑO, D. 2009. Metodologias para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia et Technica Año XV, No 42, pp 263-268.

SANCHEZ DE RIVAS, C. 2006. ¿Antibióticos, ayer, hoy y mañana...? Revista Química Viva. 5: 63-77.

SCATTOLINI. A; JUNCAL, M.; SILVERA-PEREZ, E.; HERNÁNDEZ, L.; GONZALEZ, P. 2014. Comparación de metodologías para la evaluación in vitro del efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento de *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis*. In 13er Congreso Nacional de Hortifruticultura. Montevideo. P.97.

SCATTOLINI, A.; GONZALEZ, P. 2015. Estudio del efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento de la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* patógenas de tomate. A1-559 In 5º Congreso Latinoamericano de Agroecología. La Plata Argentina. Disponible en http://memoriasocla.agro.unlp.edu.ar/pdf/A1-559.pdf consultado en enero de 2016.

SHUANG-CHENG, MA.; ZHEN-DAN, HE.; XUE-LONG DENG.; PAUL PUI-HAY, BUT.; ENG-CHOON, V.; HONG-XI XU; SPENCER HON-SUN, L.; SONG-FONG, L. 2001. In Vitro valuation of Secoiridoid Glucosides from the Fruits of *Ligustrum lucidum* as Antiviral Agents.em. Pharm. Bull. 49(11) 1471-1473.

SOYLU,S; SOYLU, E.M.; BAYSAL,Ö.; ZELLER, W. 2005. Antibacterial activity of esential oils from medicinal plants against growth of *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*. In 1st Symposium on Biocontrol of Bacteriual Plant Diseases. P82.

STUART,M. Ed. 1981. Enciclopedia de Hierbas y Herboristería. Ed Omega. Barcelona. 303 pp.

TORIBIO, M.S.; ORIANI, D.S.; POMBAR, A.S.; TOSO, R.E.; FERNÁNDEZ, J.G. 2012. Actividad antibacteriana y ensayos de toxicidad aguda y subaguda de *Polygonum hidropiperoides*. InVet. Vol.14. no.1. pp 79-85.

UMPIÉRREZ ML1, SANTOS E, MENDOZA Y, ALTESOR P, ROSSINI C. 2013. Essential oil from *Eupatorium buniifolium* leaves as potential varroacide. Parasitol Res. 112(10):3389-400.

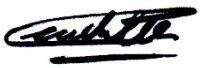
UMPIÉRREZ ML, ROSSINI, C. 2014. Aceites esenciales de la flora local para el control fitosanitario del tomate. In 13er. Congreso Nacional de Horti-fruticultura. Del 3 al 6 de setiembre de 2014. Montevideo, Uruguay.

ZHANG J.;LI B.;CHEN J.;ZHOU T. 2006. Chemical Constituents and Antimicrobial Activity of Volatile Oil from *Solidago canadensis*. L. Journal of Fudan University (Natural Science) 03. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-FDXB200603024.htm . Consultado en diciembre de 2015.

ZIGNAGO, A. 2011. Estudio in vitro de la actividad antimicrobiana de dos propóleos frente a bacterias fitopatógenas. Tesis Ing. Agr. F. de Agronomía. UDELAR. 62 p.

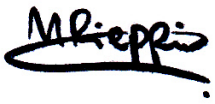
FIRMA DE LOS INTEGRANTES:

Lautaro Ronzzoni



Camilo Peñaloza

Azucena Acuña



Magdalena Rieppi

Agueda Scattolini