

***Pseudomona viridiflava* patogenicidad en *Agave inaequidens* e inhibición con aceites esenciales**

Adelaida Stephany Hernández-Valencia¹

Daniel Leobardo Ochoa-Martínez¹

Anselmo Hernández-Pérez²

Alejandro Martínez-Palacios³

Luis Mario Tapia-Vargas^{2,5}

1 Postgrado en Fitopatología-Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Texcoco, Estado de México. CP. 56230. Tel. 55 58045900. (hernandez.adelaida@colpos.mx, ldaniel@colpos.mx).

2 Campo Experimental Uruapan-INIFAP. Av. Latinoamericana 1101, Uruapan, Michoacán, México. CP. 60150. Tel. 452 5237392. (hernandez.anselmo1@gmail.com; tapia.luismario@inifap.gob.mx).

3 Laboratorio de Biotecnología y Genética-Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Carretera Morelia-Zinapécuaro km 9.5, Tarímbaro Michoacán, México. CP. 58880. Tel. 443 3223500, ext. 5219. (alejandro.palacios@umich.mx).

Autor para correspondencia: tapia.luismario@inifap.gob.mx.

Resumen

La bacteria *Pseudomona viridiflava* (Burkholder, 1930), causa daño económico en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), se ha demostrado que puede afectar a más de 50 huéspedes (Saygili *et al.*, 2008), entre los que destacan: alfalfa (*Medicago sativa*), manzano (*Malus pumila* var. *domestica* (Borkh.) CK Schneid.), (Alimi *et al.*, 2011), brócoli (*Brassica oleracea* L.), entre otros; sin embargo, *Origanum vulgare*, no hay reporte de algún daño sobre el agave mezcalero (*Agave inaequidens* K.Koch), una especie aun poco estudiada, en esta investigación se fundamentó en la evaluación de los efectos de la bacteria *Pseudomona viridiflava* en el proceso de imbibición en semilla de *Agave inaequidens*, mientras que por otra parte se evaluó la tolerancia de la bacteria a los aceites esenciales de canela (*Cinnamomum verum* Blume), clavo (*Syzygium aromaticum* L.) y orégano (*Origanum heracleoticum* Rchb.), como estudios preliminares para la estrategia de manejo ecológico, orgánico, libre de agroquímico en cultivos afectados por *Pseudomona viridiflava*, se encontró que la concentración del 25% de aceite de orégano y clavo, fueron eficientes en el desarrollo de la bacteria en condiciones *in vitro*, mientras que en el proceso de germinación en función a la imbibición de la semilla no hubo reducción en el porcentaje de germinación ni signos de daño por efecto de la bacteria.

Palabras clave:

Agave inaequidens, Agave mezcalero, Pseudomona viridiflava, control biológico.



Introducción

La bacteria *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder 1930), es una especie gram negativa, con amplia gama de huéspedes, provoca síntomas en tallos, hojas y flores. Aunque es considerada una especie fitopatógena, tiene la capacidad de vivir como endófito, epifito y saprofito (Lipps y Samac, 2022). En México es de importancia en cultivos de hortalizas y frutos como: tomate (*Solanum lycopersicum* L.), (Jones *et al.*, 1984), pimiento (*Capsicum annum* L.), melón (*Cucumis melo* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.), uva (*Vitis vinifera* L.) y cítricos (Beiki *et al.*, 2016; Al-Karablieh *et al.*, 2017).

La *Pseudomonas viridiflava* pertenece al complejo de especies de *Pseudomonas syringae* de importancia económica (Bartoli *et al.*, 2015), esta bacteria forma colonias color blanco crema y la mayoría de las especies producen pigmento fluorescente en medio B de King (Aksoy *et al.*, 2017). Los aislamientos son positivos a la pudrición blanda de papa y reacción de hipersensibilidad en tabaco, así como negativos para la producción de levan, oxidasa y actividad de arginina dehidrolasa, por lo que se considera perteneciente al grupo II de LOPAT (Levana-Oxidasa-Podredumbre de la papa-Arginina dihidrolasa- Hipersensibilidad en el Tabaco) (Lelliott *et al.*, 1987; Tsuji y Fuji, 2021).

Se consideró a *Pseudomonas viridiflava* como un patógeno con alto potencial para infectar a nuevos huéspedes (Ramírez *et al.*, 2022), por lo tanto se ha registrado un aumento en nuevos huéspedes afectados por *P. viridiflava*, por tal motivo se consideró la evaluación de la patogenicidad en semillas y plántulas de *Agave inaequidens*, una especie utilizada para producción de mezcal artesanal, además la inflorescencia también se consume, así como la savia es empleada para bebidas fermentadas, como para uso medicinal se emplea el pulque y su inulina, además como diversas partes de la planta; sin embargo, es una especie con pocas investigaciones aún.

El *Agave inaequidens* es una especie nativa y se distribuye en Jalisco, Durango, Sinaloa, Hidalgo, Colima, Michoacán, Estado de México y Morelos en la República Mexicana, en una altura de 1 400 y 3 000 msnm (Torres *et al.*, 2019).

Esta especie se encuentra amenazada por la excesiva extracción para la producción del mezcal. La amenaza más severa se localiza en el estado de Michoacán y sigue en aumento. Esta especie se encuentra en varias áreas protegidas como: Reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán y Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca (Torres *et al.*, 2019); sin embargo, esto no demeritó la protección de la especie para evitar su extinción.

Por otra parte, para el control de las enfermedades ocasionadas por *Pseudomonas viridiflava* se siguen empleando productos de naturaleza química como el polvo humectable de estreptomycina y oxitetraciclina más polvo humectable de validamicina A (Tae, 2019), riesgosos para la inocuidad alimentaria (Morris *et al.*, 2019). El objetivo, fue caracterizar e identificar una cepa nacional de *Pseudomonas viridiflava*, la posible patogenicidad sobre *Agave inaequidens* K. Koch, en la etapa de germinación de la semilla y la sensibilidad *in vitro* de la bacteria a aceites esenciales de canela (*Cinnamomum verum* J. Presl), clavo (*Syzygium aromaticum*) y orégano (*Origanum vulgare* L.), en concentraciones del 25, 50, 75 y 100%.

Materiales y métodos

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Virus Fitopatógenos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México.

Aislamiento de la cepa de *Pseudomonas viridiflava*

La cepa de la bacteria *Pseudomonas viridiflava*, es de origen mexicano (cepa nacional), se activó a partir de un tubo preservado en refrigeración, en medio de cultivo King B (KB) y se mantuvo en incubación en condiciones de obscuridad a temperatura de 27 °C ±1 °C.

Caracterización fisiológica y bioquímicas

El aislado se revisó en luz ultravioleta (25 W Transiluminador TFL-40, California, EE. UU), posteriormente se caracterizó por la prueba determinada Lopat (Lelliot y Stead, 1987) y según los protocolos descritos por Schaad *et al.* (2001).

Extracción de ADN bacteriano

Para la extracción de ADN, se utilizó CTAB 2%, para la identificación a nivel molecular, en un tubo Eppendorf® se colocaron 600 µl de buffer CTAB al 2% y posteriormente se introdujo una asada del cultivo bacteriano puro con un crecimiento de 24- 48 h en medio (KB). Se incubó a 56 °C por 30 min. Después, se añadieron 400 µl de Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se pasó por vortex por 10 s y se centrifugó a 13 500 rpm por 10 min a 4 °C. De la fase acuosa se recuperaron 500 µl en un tubo nuevo y se adicionaron 50 µl de acetato de amonio al 7.5 M y 500 µl de isopropanol. La mezcla se realizó por inmersión. Se mantuvo en refrigeración a -20 °C por 1 h.

Se llevó la centrifuga a 13 500 rpm, 10 min a 4 °C, con precaución se desechó el sobrenadante, esta misma se lavó con 800 µl de etanol al 80% y se centrifugó 13 500 rpm por 3 min a 4 °C, se descartó nuevamente el etanol al 80% y se centrifugó a 13 000 rpm por 3 min a 4 °C, se descartó por segunda vez el etanol y se secó la pastilla por 30 min. Para finalizar, la pastilla se resuspendió en 50 µl de agua libre de nucleasas y se conservó a -20 °C. Los parámetros óptimos de concentración y pureza de ácidos nucleicos se evaluaron mediante espectrofotometría con la ayuda de un NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific 2000, EUA).

Identificación molecular de *Pseudomonas viridiflava* por PCR

La identificación genómica se realizó mediante la amplificación del gen de ADN ribosómico 16S (ADNr), el cual generó un fragmento de 1 500 pb (Weisburg *et al.*, 1991). En una muestra final de 10 µl integrada por: 2 µl Buffer PCR 1X, 0.8 µl de MgCl₂ (50 Mm), 0.2 µl de dNTPs (10 mM), 0.2 µl de cada uno de los iniciadores FD1 (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCTGGC TCAG-3')/rP1 (3' CCCGGGATCCAAGCTTACGGTTACCTTGTTACGACTT-5'), 0.1 µl de GoTaq® DNA Polimerase (Promega), 2 µl de ADN total (50 ng µl⁻¹) y 4.7 µl agua libre de nucleasas. La PCR se realizó en termociclador MiniAmp™ (Thermo Fisher Scientific) y las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, 25 ciclos a 95 °C por 2 min, alineamiento a 42 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 4 min y extensión final a 72 °C por 5 min. Los fragmentos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV en fotodocumentador.

Pruebas bioquímicas de identificación de *Pseudomona viridiflava*

Se realizó la Tinción de Gram y la prueba de KOH 3% (Arai, 2001). La prueba de oxidasa se realizó según lo descrito por Goszczynska *et al.* (2000). Para la determinación del metabolismo oxidativo/fermentativo se siguió la metodología señalada por Hugh y Leifson (1953). La reducción de nitratos a nitritos fue realizada como lo señalan (Hayward *et al.*, 1991) y se tomó registro a los 3, 5 y 7 días. La producción de dihidrolasa de arginina se realizó según la propuesta por Thornley (1960). El registró de la hidrólisis de almidón, fosfatasa y levana se tomó después de 48 h. La licuefacción de gelatina se realizó de acuerdo con lo propuesto por Hayward (1994), mientras que la producción de indol se llevó a cabo tomando registro a los 3 y 5 días. Todas las pruebas se realizaron a 27 °C ±1 °C.

Prueba de reacción de hipersensibilidad en tabaco

Se empleó exudado bacteriano de un cultivo puro, con un crecimiento de 48 h en medio (KB), a partir de este se realizó una suspensión a una densidad celular de 10⁸ UFC/ml, a cuál se comparó con el estándar de McFarland. Con la ayuda de un émbolo de jeringa hipodérmica (3 ml), se infiltró la suspensión celular en el envés de la hoja de tabaco. Por medio de la infiltración se logró invadir

los espacios intercelulares del mesófilo de la hoja, por lo que se observó la apariencia de humedad dentro de la lámina foliar. La inoculación se realizó bajo condiciones de laboratorio, con luz natural, humedad relativa baja y temperaturas promedio de 25 °C. Se evaluó el tejido colapsado a partir de las 24 h posteriores.

Prueba de pudrición en tubérculos de papa

En una caja Petri, se colocó una sanita húmeda en el fondo de la caja Patri para posteriormente colocar dos rodajas de tubérculos de papa, con la ayuda de una aguja de disección estéril se tomó exudado bacteriano y se colocó en el centro de la rodaja de papa, realizando una incisión, en la otra rodaja se realizó la incisión, pero sin adicionar exudado bacteriano, se revisó a las 24 h posteriores.

Pruebas de patogenicidad sobre *Agave inaequidens*

La patogenicidad se evaluó en semillas de *Agave inaequidens* a diferentes tiempos de imbibición en 1 500 µl de una suspensión bacteriana al 10^8 UFC ml⁻¹, (30 min, 2 h, 4 h, 6 h y 8 h). Se utilizaron 12 semillas por tratamiento y la misma cantidad de semillas en el tratamiento testigo por cada tiempo de imbibición, después del tiempo de imbibición las semillas se colocaron en cajas Petri duales, en la base se colocó una sanita húmeda con 3 ml de agua destilada estéril y se mantuvieron en condiciones de obscuridad en incubadora a una temperatura de 27 °C ±1 °C, hasta la aparición de la radícula, posteriormente se colocaron en condiciones de luz natural a temperatura ambiente.

Prueba de sensibilidad a aceites esenciales de canela, clavo y orégano

En condiciones de asepsia, se utilizaron cajas de Petri de vidrio de dimensiones 180 x 30 mm, a las cuales se les adicionaron 50 ml de medio agar nutritivo sólido y se dejaron solidificar. Se preparó una suspensión bacteriana al 10^8 UFC ml⁻¹, se agregaron 300 µl sobre el medio y se dispersó con asa bacteriológica plástica, se dejó que se impregnará la solución bacteriana al medio.

Posteriormente se colocaron cinco círculos de 0.5 mm de diámetro de papel filtro impregnados de los aceites esenciales de canela, clavo y orégano en concentraciones al 25, 50, 75 y 100%, con la ayuda de la fórmula $V_i C_i = V_f C_f$, (C= concentración; V= volumen; i= inicial; y f= final) (Cuadro 1). Los aceites se emulsificaron con etanol al 25%. Cada caja Petri funcionó como un tratamiento con cinco repeticiones, se tomó el dato de desarrollo de los cuatro puntos cardinales de cada papel filtro.

Cuadro 1. Dosis de aceites esenciales de canela, clavo y orégano empleados por separado para medir la sensibilidad de *Pseudomonas viridiflava*.

Tratamiento	Dosis
Testigo	Alcohol al 25%
Aceite (canela, clavo y orégano) 100%	3 ml sin diluir
Aceite (canela, clavo y orégano) 75%	2.25 ml + 0.75 ml de etanol 25%
Aceite (canela, clavo y orégano) 50%	1.5 ml+ 1.5 ml de etanol 25%
Aceite (canela, clavo y orégano) 25%	0.75 ml + 2.25 ml de etanol 25%

Los datos se tomaron a las 48 h después de establecer el experimento y se analizaron en el paquete estadístico SAS versión 9.0, en un Anova completamente al azar con separación de medias de Tukey.



Resultados y discusión

Características de la colonia de *Pseudomona viridiflava* cepa nacional

La caracterización fisiológica y bioquímica de la cepa nacional de *Pseudomona viridiflava* presentó alta similitud con el perfil metabólico descrito por Heydari *et al.* (2012); Sarris *et al.* (2012). Por medio de la prueba Lopat, la cepa nacional no produjo pigmentos fluorescentes en medio KB; sin embargo, indujo una reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco, presentó resultados negativos para oxidasa y arginina deshidrolasa, no produjo levana y generó maceración en las rodajas de tubérculos de papa (Harzallah *et al.*, 2004). De acuerdo con Lelliot y Stead (1987), *Pseudomona viridiflava* pertenece al grupo II de *Pseudomonas* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Caracterización fisiológica y bioquímica de *Pseudomona viridiflava*.

Prueba	Resultado
Tinción de Gram	-
Fluorescencia	-
Levana	-
Oxidasa	-
Pudrición en papa	+
Hipersensibilidad en tabaco	+
Catalasa	+
Hidrolisis de gelatina	+
Reducción de nitratos	-
Hidrolisis de almidón	-
Oxidativo/fermentativo	0
Glucosa	+
Lactosa	+
Maltosa	+
Trehalosa	+
Inositol	+
Sorbitol	+

Reacción de hipersensibilidad en tabaco

La lamina foliar de tabaco que fue infiltrado con la suspensión de la bacteria, presentó lesiones a partir de las 48 h posteriores a la inoculación.

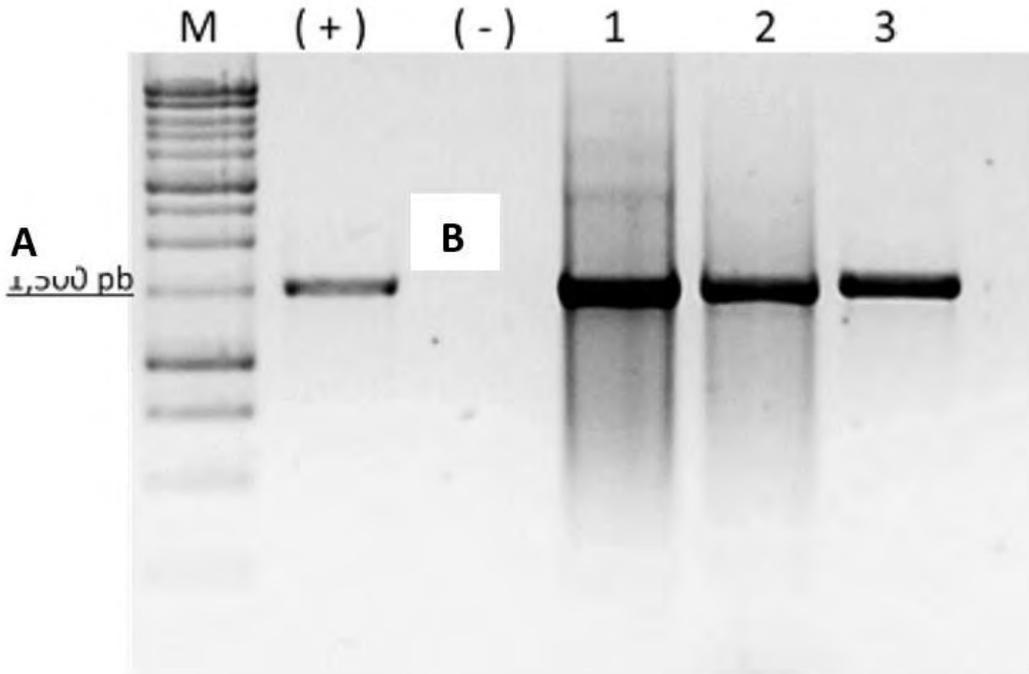
Pudrición en tubérculos de papa

Los tubérculos de papa evaluados presentan una pudrición a las 24 h posteriores a la inoculación, se observó la degradación del tejido vegetal, al tacto con la aguja de disección el tejido era blando y había necrosamiento, así como un avance en el proceso de oxidación natural del tejido.

Identificación molecular

Mediante la extracción de ADN de la bacteria en estudio, se pudo obtener la amplificación del Gen 16 S con 1 500 pb. Diversas investigaciones han considerado el riesgo de establecer filogenias basadas en secuencias de un solo gen; sin embargo, el Gen 16 S, es el más empleado para la identificación bacteriana (Lieckfeldt *et al.*, 2000) (Figura 1).

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR obtenidos con oligonucleótidos universales FD1 / rP1 (~1 500 pb) de bacterias fitopatógenas. Amplificación del gen ribosomal 16 S, carriles:(M) marcador molecular 1 Kb, (+) testigo positivo, (-) testigo negativo (H₂O). 1) testigo *Pseudomona marginalis*; 2) *Pseudomona viridiflava* y (3) testigo *Clavibacter michiganensis* sub *michiganensis*.

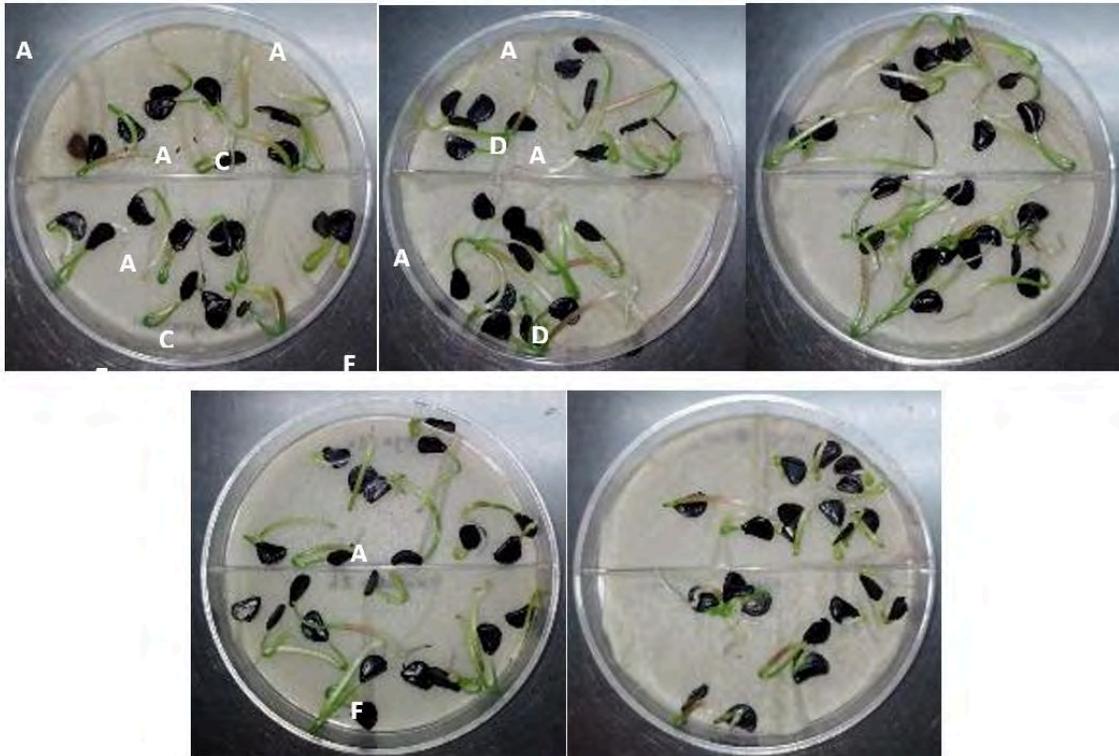


Efecto de *Pseudomona viridiflava* en el proceso de germinación de *Agave inaequidens*

Las semillas de *Agave inaequidens* que fueron imbibidas con la solución bacteriana a diversos tiempos, no redujeron su porcentaje de germinación por efecto del desarrollo de la bacteria *Pseudomona viridiflava*. Al tercer día de la imbibición de las semillas con la suspensión bacteriana, se empezaron a presentar las primeras semillas con la emergencia de la radícula; sin embargo, la mayoría se encontraban en la región de los testigos. Al día 12 se habían desarrollado el 96% de las plántulas de *Agave inaequidens* sin la presencia de daños ocasionados por la bacteria *Pseudomona viridiflava* (Figura 2). Por lo que se consideró que la bacteria no ejerce ningún efecto sobre el desarrollo germinativo de *Agave inaequidens*.



Figura 2. Semilla de *Agave inaequidens* inoculadas al día 12 con una suspensión de la bacteria *Pseudomona viridiflava* en diversos tiempos de imbibición: A) testigos en cada tiempo; B) 30 min; C) 2 h; D) 4 h; E) 6 h y F) 8 h.



Sensibilidad de *Pseudomona viridiflava* a aceites esenciales

Los tratamientos de aceite de canela en su cuatro diferentes concentraciones presentaron diferencias estadísticas entre la dosis más alta (100%) la más baja (25%); sin embargo, un dato impórtate es que la dosis del 25% de concentración fue la más efectiva, pese a lo que se pensaría debido al grado de concentración del compuesto presente en el aceite, que son el cinamaldehído y eugenol; sin embargo, se destaca la importancia de que un aceite este emulsificado para que sea activado a una concentración menos densa para que se obtenga una mejor respuesta de control (Figura 3).

Figura 3. Evaluación del aceite de canela (*Cinnamomum verum* J. Presl), sobre del desarrollo de *Pseudomona viridiflava* en medio solido (Agar nutritivo), con los tratamientos: A) testigo; B) 100%; C) 75%; D) 50% y E) 25%.

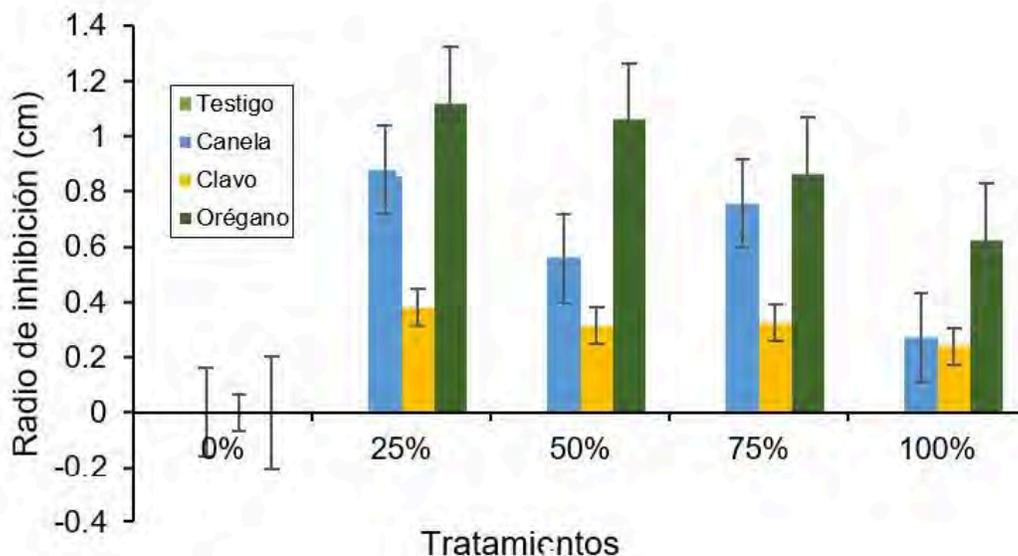


Los aceites esenciales provenientes de plantas han mostrado tener propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antiparasitarias, antiinflamatorias, antidiarreicas y antimicóticas en humanos (Van-Zyl *et al.*, 2004). Estos resultados pueden estar asociados a la presencia de eugenol y cimaldehído en los aceites esenciales, que logran un efecto directamente sobre la membrana bacteriana inhibiendo el crecimiento de microorganismos fúngicos y bacterianos (Cava *et al.*, 2012). Mientras que Tong *et al.* (2005), determinaron que los aceites esenciales pueden inhibir el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) del metabolismo de la respiración bacteriana, afectando el consumo de oxígeno de las bacterias, causando su muerte.

En los tratamientos de clavo a las dosis analizadas, estadísticamente se comportaron de forma similar entre ellas, el principal componente químico presente en su aceite fue el eugenol, compuesto antes mencionado en canela.

El aceite de orégano en las cuatro diferentes concentraciones logró el mayor radio de inhibición del desarrollo bacteriano, cabe señalar la capacidad de inhibición en la concentración más baja, lo que es un aporte importante al reducir los costos de aplicación en el caso particular que sea efectivo en condiciones *in situ* (Figura 4).

Figura 4. Radio de inhibición de crecimiento de *Pseudomona viridiflava* por efecto de los aceites esenciales de canela, clavo y orégano en concentraciones de 25, 50, 75 y 100%.



El uso de aceites esenciales de especies vegetales permite dar una alternativa positiva al uso de antibióticos que puedan generar resistencia y ser perjudiciales para la salud (Esquivel *et al.*, 2010). Caballero *et al.* (2016), demostraron que los aceites esenciales de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*) a concentraciones de 0.05, 0.1 y 0.2% inhiben el crecimiento de microorganismos fúngicos como *Aspergillus flavus* (Erosa *et al.*, 2021), por lo cual en la presente investigación se sugiere la experimentación con otras dosis de los aceites para llegar a las concentraciones ideales.

Conclusiones

Pseudomona viridiflava no generó patogenicidad en las semillas de *Agave inaequidens*, mientras que los aceites que provocaron una mayor inhibición del desarrollo de la bacteria fueron el orégano al 25%, seguido de la canela al 25% por lo que se consideran candidatos para ser evaluados en condiciones de invernadero y plantaciones a cielo abierto en los principales hospederos de la bacteria.

Bibliografía

- 1 Aksoy, H. M.; Ozturk, M. and Aktas, A. 2017. First report of *Pseudomonas viridiflava* causing cabbage bacterial leaf spot in Turkey. *Journal of Plant Pathology*. 99(3):799-818.
- 2 Alimi, M.; Rahimian, H.; Hassanzadeh, N.; Darzi, M. T.; Ahmadikhah, A.; Heydari, A. and Balestra, G. M. 2011. First detection of *Pseudomonas viridiflava*, the causal agent of blossom blight in apple by using specific designed primers. *African Journal of Microbiology Research*. 5(26):4708-4713.
- 3 Al-Karablieh, N.; Mutlak, I. and Al-Dokh, A. 2017. Isolation and identification of *Pseudomonas viridiflava*, the causal agent of fruit rotting of *Cucumis sativus*. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*. 13(1):79-91. <https://doi.org/10.12816/0039717>.
- 4 Arai, N. N. 2001. Procedimiento simplificado para la identificación de bacterias fitopatógenos. Guatemala. USAC-Facultad de agronomía. Voluntarios Japoneses en Cooperación Técnica con el Extranjero. 148-156 pp.
- 5 Bartoli, C.; Lamichhane, J. R.; Berge, O.; Varvaro, L. and Morris, C. E. 2015. Mutability in *Pseudomonas viridiflava* as a programmed balance between antibiotic resistance and pathogenicity. *Molecular Plant Pathology*. 16(8):860-869.
- 6 Beiki, F.; Busquets, A.; Gomila, M.; Rahimian, H.; Lalucat, J. and García, V. E. 2016. The new *Pseudomonas* spp. is pathogenic to citrus. *PLoS One*. 11(2):1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148796>.
- 7 Burkholder, W. H. 1930. The bacterial diseases of bean: an oomparativc study. *Mem. Cornell Uniu. Agric. Exp. StrL No. 127*.
- 8 Caballero, C. A.; Villacorta, L. M. and Pretell, C. V. 2016. Efecto del aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y su combinación sobre la acción antifúngica en *Aspergillus flavus* en agar chicha de maíz (*Zea mays* L.), variedad morada. *Pueblo Continente*. 22(1):123-132.
- 9 Cava, R. M.; Taboada, A.; Palop, A.; López, A. G. and Marin, F. I. 2012. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in semi-skim milk supplemented with vanillin. *Int. J. Food Microbiol.* 157(2):314-318. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.003.
- 10 Erosa, R. M. A.; Jiménez, M. J. M.; Ortiz, S. J. and Martínez, S. N. J. 2021. Efecto bactericida del aceite esencial de canela contra *Salmonella* spp. *RD-ICUAP*. 7(19):64-78. <http://rd.buap.mx/ojs-dm/index.php/rdicuap/article/view/505>.
- 11 Esquivel, F. P.; Pedroza, G. C.; Sandoval, N. M.; Mata, R. E.; Mendoza, L. O. y Balderas, I. R. 2010. Ensayo químico dirigido y estudio del efecto antimicrobiano *in vitro* de algunos condimentos empleados en la cocina mexicana. *Rev Salud Públ Nutr.* 10(7):23-25.
- 12 Goszczynska, T.; Serfontein, J. J. and Serfontein, S. 2000. Introduction to practical phytobacteriology. South Africa, Safrinet Pretoria. 1(1):56-63.
- 13 Harzallah, D.; Sadallah, S. and Larous, L. 2004. Characterization of *Pseudomonas* pathovars isolated from rosaceous fruit trees in East Algeria. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. 69(4):443-447.
- 14 Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*. 29(1):65-87.
- 15 Hayward, A. C. 1994. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. *In: Hayward, A. C. and Hartman, G. L. Ed. Bacterial Wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, United Kingdom.123-135 pp.

- 16 Heydari, A.; Khodakaramian, G. and Zafari, D. 2012. Characterization of *Pseudomonas viridiflava* causing alfalfa root rot disease in Hamedan province of Iran. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*. 3(5):130-135. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000135>.
- 17 Hugh, R. and Leifson, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-bacteria. *Journal Bacteriology*. 66(1):24-26.
- 18 Jones, J. B.; Jones, J. P.; McCarter, S. M. and Stall, R. E. 1984. *Pseudomonas viridiflava*: causal agent of bacterial leaf blight of tomato. *Plant Disease*. 68(4):341-342.
- 19 Lelliott, R. A. and Stead, D. E. 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of Plants*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 99-112 pp.
- 20 Lieckfeldt, E.; Cavignac, Y.; Fekete, C. and Börner, T. 2000. Endo-chitinase gene based phylogenetic analysis of *Trichoderma*. *Microbiology Research*. 155(1):1-9. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(00\)80016-6](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(00)80016-6).
- 21 Lipps, S. M. and Samac, D. A. 2022. *Pseudomonas viridiflava*: An internal outsider of the *Pseudomonas syringae* species complex. *Molecular Plant Pathology*. 23(1):3-15.
- 22 Morris, C. E.; Lamichhane, J. R.; Nikoli#, I.; Stankovi#, S. and Moury, B. 2019. The overlapping continuum of host range among strains in the *Pseudomonas syringae* complex. *Phytopathology Research*. 1(4):1-16.
- 23 Ramírez, R. K.; Cristóbal, M. A. L.; Alvarado, R. D.; Serret, L. M. y Aranda, O. S. 2022. Identificación de *Pseudomonas viridiflava*, agente causal de la pudrición del bulbo de la cebolla (*Allium cepa* L.). *AGROProductividad*. 15(1):121-129.
- 24 Sarris, P. F.; Trantas, E. A.; Mpalantinaki, E.; Ververidis, F. and Goumas, D. E. 2012. *Pseudomonas viridiflava*, a multi host plant pathogen with significant genetic variation at the molecular level. *PloS one*. 7(4):1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036090>.
- 25 Saygili, H.; Aysan, Y.; Ustun, N.; Mirik, M. and Sahin, F. 2008. Tomato pith necrosis disease caused by *Pseudomonas* species in Turkey. Ed. *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens. Identification, epidemiology, and genomics. Dordrecht. Springer. 357-366 pp.
- 26 Schaad, N. W.; Jones, J. B. and Chun, W. 2001. *Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria* Ed. 3. American Phytopathological Society Press. Paul, USA. 72 p.
- 27 Tae, J. A. 2019. *Pseudomonas viridiflava*. *Revista de Ciencia de Pesticidas*. 23(4):304-311.
- 28 Thornley, M. J. 1960. The differentiation of other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *Journal Applied Bacteriology*. 23(1):37-52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00178.x>.
- 29 Tong, G.; Yulong, M.; Peng, G. and Zirong, X. 2005. Antibacterial effects of the Cu exchanged montmorillonite on *Escherichia coli* K88 and *Salmonella choleraesuis*. *Vet Microbiol*. 105(2):113-122. Doi: 10.1016/j.vetmic.2004.11.003.
- 30 Torres, G. I.; Casas, A. A.; García, M. A. J. and González, E. M. 2019. *Agave inaequidens*. The IUCN Red List of Threatened Species. 3-7 pp.
- 31 Tsuji, M. and Fuji, S. I. 2021. First report of bacterial streak and rot of onion caused by *Pseudomonas viridiflava* in Japan. *Plant Disease*. 105(10):3288.
- 32 Van-Zyl, R. L.; Seatholo, S. T; Van-Vuuren, S. F. and Viljoen, A. M. 2004. The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. *Essen Oil Res*. 18(1):129-133.
- 33 Weisburg, W. G.; Barns, S. M.; Pelletier, D. A. and Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173(2):697-703.



Pseudomona viridiflava patogenicidad en *Agave inaequidens* e inhibición con aceites esenciales

Journal Information
Journal ID (publisher-id): remexca
Title: Revista mexicana de ciencias agrícolas
Abbreviated Title: Rev. Mex. Cienc. Agríc
ISSN (print): 2007-0934
Publisher: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Article/Issue Information
Date received: 01 August 2024
Date accepted: 01 October 2024
Publication date: 17 December 2024
Publication date: Nov-Dec 2024
Volume: 15
Issue: 8
Electronic Location Identifier: e3841
DOI: 10.29312/remexca.v15i8.3841

Categories

Subject: Artículo

Palabras clave:

Palabras clave:

Agave inaequidens

Agave mezcadero

Pseudomona viridiflava

control biológico

Counts

Figures: 4

Tables: 2

Equations: 0

References: 33

Pages: 0