

Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales de orégano y tomillo contra *Ralstonia solanacearum*

Edgar Omar Rueda-Puente¹
José Jesús Juvera Bracamontes¹
Irma Gloria Romo López¹
Ramón Jaime Holguín Peña^{2§}

¹Universidad de Sonora-Departamento de Agricultura y Ganadería. Blvd. Luís Encinas y Rosales s/n, Col. Centro Hermosillo, Sonora, México. CP 83000. ²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Mar Bermejo núm. 195, Col. Playa Palo Santa Rita, La Paz, Baja California Sur. AP. 23090.

§Autor para correspondencia: holpe@hotmail.com.

Resumen

Ralstonia solanacearum (*Rs*), es una bacteria fitopatógena de gran importancia a nivel mundial conocida por provocar la enfermedad de la marchitez bacteriana. Esta es una enfermedad que devasta numerosos cultivos, entre ellos se encuentra la papa. Con el propósito de encontrar una alternativa natural para controlar la bacteria *Rs*, se evaluó el poder bactericida de los aceites esenciales de orégano (*Thymus vulgaris*) y tomillo (*Lippia graveolens*). La técnica utilizada para el análisis de la actividad antibacteriana fue la difusión en agar, utilizando discos de papel filtro estériles, se evaluaron 3 diferentes diluciones (1:1, 1:5 y 1:10) y se colocaron 7.5, 10 y 15 µl de cada una de las concentraciones de los aceites. Se utilizó alcohol al 70% en uno de los discos de papel filtro como control negativo. Además, se utilizó como control positivo un disco de estreptomycinina (10 µg disco⁻¹) y otro de ampicilina (10 µg disco⁻¹). Se utilizó medio de cultivo agar dextrosa y papa previamente inoculado con la cepa en estudio. Después de la incubación, se midieron los halos de inhibición del crecimiento bacteriano en milímetros. Los análisis fueron por triplicado. Los aceites esenciales de orégano y tomillo mostraron efectos inhibitorios sobre el crecimiento de *Rs* en la dilución 1:1 que resultó ser más efectiva que el resto de las diluciones evaluadas, y la cantidad aplicada más efectiva fue de 15 µl de aceite esencial de orégano y tomillo en comparación de los antibióticos utilizados. Los aceites esenciales se podrían considerar como una alternativa para el control de *Rs* en plantas.

Palabras clave: biobactericida, biocontrol, inhibición, marchitez bacteriana.

Recibido: enero de 2018

Aceptado: febrero de 2018

Introducción

Ralstonia solanacearum (Rs) es una bacteria fitopatógena de importancia a nivel mundial conocida como marchitez bacteriana (González *et al.*, 2009). El organismo causal de esta enfermedad previamente estaba denominado como *Pseudomonas solanacearum*. La mancha bacteriana también es conocida como podredumbre parda. Esta bacteria vive en el suelo (Zhou *et al.*, 2008) y se dispersa principalmente a través de éste, sobreviviendo en este medio por largos periodos de tiempo. Además, es posible su transmisión por medio del agua, equipo o por materiales infectados.

También se puede diseminar por medio del trasplante y la propagación de plantas infectadas, cuando se realizan cortes sin desinfectar el equipo que previamente ha tenido contacto con una planta infectada y una importante forma de diseminación se da por medio del riego (Aphis y PPQ, 2004). *R. solanacearum*, es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia de las Pseudomonadáceas. Con morfología de bastoncillo móvil por medio de uno a cuatro incluso más flagelos polares flagelo (Sen Yan *et al.*, 2005), es una enfermedad que devasta numerosos cultivos de importancia económica, dependiendo de la raza (se conocen tres razas de Rs: la raza 1 que afecta principalmente a solanáceas y a cultivos de interés ornamental, la raza 2 afecta a bananos, y la raza 3 que afecta papa) (Pradhanang *et al.*, 2003). En este cultivo (*Solanum tuberosum* L.), los síntomas inducidos por *R. solanacearum* aparecen generalmente en el follaje de las plantas.

Estos síntomas consisten en el marchitamiento de hojas jóvenes en las partes terminales de las ramas, además, los síntomas iniciales de amarillamiento leve en un solo lado de la hoja o en una rama y no en la siguiente (Brader *et al.*, 2007). En tallos jóvenes, infectados por Rs, pueden llegar a ser visibles como rayos largos y estrechos de color marrón oscuro. En infecciones avanzadas (severidades > 60%), las secciones transversales del tallo o del estolón pueden revelar una decoloración marrón de los tejidos infectados (Swanson *et al.*, 2005). Los síntomas pueden encontrarse en los tubérculos de papa. El tubérculo infectado puede revelar una decoloración gris-marrón.

Mientras la infección progresa, la decoloración puede extenderse a la corteza del tubérculo con un exudado de lechoso (mucilaginoso), que indica la presencia de células bacterianas, también puede ser observada en secciones recién cortadas de tubérculos infectados exudado bacteriano también puede ser visible en los ojos o en el punto donde el estolón se conecta al tubérculo. Estos signos o síntomas no pueden ser visibles temprano en el desarrollo de la enfermedad (Smith y Saddler, 2001).

Cuando el tubérculo está infectado de forma clara, si se corta transversalmente y se aplica una ligera presión, salen del anillo vascular gotas blanquecinas de exudado bacteriano. Este exudado se mezcla con tierra y la mezcla de exudado bacteriano y suelo se seca y se adhiere a la superficie del tubérculo. Los tubérculos dejados en la tierra siguen su proceso de podredumbre; las bacterias continúan destruyendo los tejidos que rodea al anillo vascular y se rompe la piel apareciendo grietas.

Por tanto, queda una masa viscosa de olor desagradable (Patrik y Maiss, 2000). Los productores con la finalidad de controlar la enfermedad y poder competir comercialmente, como principal alternativa recurren al uso de agroquímicos. No obstante, una de sus principales desventajas, es la resistencia que adquieren las plagas a los productos químicos, reportándose que la resistencia no se adquiere solo a algunas “sustancias activas” sino también a sustancias quimioesterilizantes, antibióticos, toxinas de bacterias, fungicidas, herbicidas, anticoagulantes, bromuro de metilo,

fosfamina y otros agentes. La resistencia a los plaguicidas es actualmente el problema principal en la producción agrícola en el ámbito mundial, desde 1990 se han reportado casos de plantas resistentes a los herbicidas y de hongos con resistencia a fungicidas además de la resistencia en insectos y ácaros (Champoiseau *et al.*, 2009).

Por otra parte, la sociedad al sector agrícola le demanda que el uso de los productos químicos como agroinsumos, sean cada vez menor, por lo que se buscan medidas alternativas que ayuden a reducir la incidencia de plagas y enfermedades, sin afectar la salud del consumidor y el medio ambiente (Palacio *et al.*, 2009). En los últimos años ha habido un creciente interés en el uso de compuestos orgánicos biológicamente activos, extraídos de especies de plantas que presentan la capacidad de eliminar a microorganismos patógenos por sí mismas, esto debido principalmente, a la resistencia que los microorganismos han desarrollado a los antibióticos (Daferera *et al.*, 2003). La agricultura del nuevo milenio debe establecer nuevas alternativas de control que produzcan un menor impacto ambiental, ya que día con día va en aumento el porcentaje de consumidores que demandan alimentos sanos y libres de productos químicos (Ponce *et al.*, 2004).

Los aceites esenciales obtenidos de plantas son una alternativa para el control de bacterias, debido a que son mezclas de sustancias obtenidas de plantas que presentan como características principales su compleja composición química y su carácter fuertemente aromático (Sánchez, 2006); son biodegradables, amigables con el ambiente y poseen bajos o inexistentes niveles de toxicidad, lo que permite que sean utilizados en cualquier ambiente (Cheng *et al.*, 2009), poseen características insecticidas, antioxidantes, antibacteriano, antifúngico y antiviral (Burt, 2004; Kordali *et al.*, 2005) y ser extraídos por diferentes métodos.

La técnica más utilizada es el de destilación por arrastre de vapor de agua, donde la muestra vegetal se coloca en un recipiente (tipo clavenger cerrado) y es sometida a una corriente de vapor de agua, así la esencia es arrastrada y posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa (Ortega, 2011). Las plantas aromáticas son importantes para la obtención de aceites esenciales como es el caso del tomillo (*Thymus vulgaris* L.) y el orégano (*Lippia graveolens* L.)

Con relación al tomillo, ésta especie pertenece a la Familia de labiadas (Muñoz, 1996), con una importancia medicinal en el sector farmacéutico; posee propiedades antisépticas, desinfectantes, antiespasmódico, desodorante, sedante y sus principales componentes son timol y carvacol (Muñoz, 1993; El-Hela, 2007). Por su parte el orégano mexicano (*Lippia graveolens*) se caracteriza por ser una planta perenne, de la familia *verbenaceae*, que crece en climas semiáridos y se utiliza tradicionalmente como antiséptico intestinal, antiespasmódico, analgésico y antiinflamatorio y tiene propiedades antibacterianas (Castillo *et al.*, 2007; Osorno *et al.*, 2009). Se ha demostrado que los géneros de *Lippia* y *Thymus*, entre otras plantas aromáticas, tienen propiedades antioxidantes, relacionadas con los compuestos fenólicos, carvacrol y el timol que pueden ser utilizados bajo ciertas condiciones como fungicidas y bactericidas (Aballa y Rosen, 2001).

Hoy en día, los aceites esenciales representan una nueva alternativa para el control de bacterias fitopatógenas y para el manejo del cultivo de papa, ya que no causa daños al ambiente, ni a la salud. Con base a lo anterior, surgió la presente investigación, donde se evaluó el efecto bactericida de los aceites esenciales de orégano (*Lippia graveolens*) y tomillo (*Thymus vulgaris*), contra la bacteria *Ralstonia solanacearum* que provoca la enfermedad de la marchitez bacteriana en el cultivo de papa.

Materiales y métodos

La evaluación de la actividad antibacteriana de dos aceites esenciales se realizó en el laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), mediante pruebas *in vitro* bajo condiciones controladas de temperatura a 30 °C y humedad de 90%.

Obtención de aceites

Los dos aceites esenciales utilizados fueron: orégano (*Lippia graveolens*) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.).

El orégano (*Lippia graveolens*) fue recolectado de plantas procedentes de Naica, Chihuahua, localizado en las coordenadas geográficas a 27° 51' 17" latitud norte y 105° 29' 33" longitud oeste. El aceite esencial de orégano se obtuvo por arrastre de vapor, siguiendo el método oficial de la Asociación de Análisis Químicos (AOAC) 6.006 (1975), dividiendo los compuestos volátiles del aceite esencial y empleando un destilador tipo Clavender de capacidad de 2 litros (Castillo *et al.*, 2007).

Las calidades de los aceites esenciales seleccionados para este estudio oscilaron entre 98 y 99% de pureza acorde a (Ortega *et al.*, 2005; Yesil *et al.*, 2007). Con relación al tomillo, se utilizó una muestra comercial, la cual se adquirió del comercio local ubicado en Hermosillo, Sonora, el aceite esencial de tomillo es de la marca Soria Natural y distribuido por la casa Herbofarm Madrid, España, los cuales son obtenidos por arrastre de vapor de agua en gran escala con un grado de pureza de 99%.

Cultivos bacterianos

La cepa bacteriana utilizada en el presente estudio fue *Ralstonia solanacearum*, la cual fue aislada y caracterizada de aislamientos de tubérculos de papa procedente de casas comerciales de alimentos del estado de Sonora, México (Alvarado, 2011).

Determinación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales

Preparación del inóculo

La cepa bacteriana se desarrolló en un cultivo de 24 h a 30° C, en caldo Nutritivo (Difco, Sparks, MD) (extracto de res 3 g y peptona 5 g) y se ajustó a una concentración de 1×10^8 UFC ml⁻¹ con buffer de fosfatos salino (PBS). El inóculo bacteriano se sembró de forma masiva en placas de agar dextrosa y papa, utilizando un hisopo de algodón estéril, para conseguir un crecimiento microbiano uniforme (Borboa *et al.*, 2010).

Método de difusión en disco

Una vez inoculadas las placas con la bacteria, fueron colocados en el centro de la misma, discos de papel filtro de aproximadamente 10 mm de diámetro, en los cuales, se aplicaron diferentes cantidades de los aceites esenciales en estudio.

Actividad antimicrobiana

Los aceites esenciales fueron preparados a diferentes concentraciones usando alcohol etílico al 70% como diluyente. Las diluciones usadas fueron 1:1, 1:5 y 1:10. De forma aséptica se colocaron 7.5, 10, 15 μl de cada una de las concentraciones de los aceites esenciales sobre los discos de papel filtro.

Se utilizó alcohol al 70% en uno de los discos de papel filtro como control negativo y para descartar la actividad antimicrobiana del mismo. Además, se utilizó un disco de estreptomina (10 μg disco⁻¹) y otro de ampicilina (10 μg disco⁻¹), como controles de referencia positivo. Después de impregnar los discos con el respectivo tratamiento, las placas fueron incubadas a 30° C por 24 h. Posterior al período de incubación, se midieron los halos de inhibición del crecimiento bacteriano en milímetros utilizando una regla. Los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

Análisis estadístico

El diseño experimental fue trifactorial A*B*C, donde el factor A son los 2 aceites (orégano y tomillo); el factor B: las tres diluciones (1:1, 1:5, 1:10) y el factor C: las 3 cantidades aplicadas 7.5, 10 y 15 μl . A los datos obtenidos se les realizó un Anova GLM, estimándose significativamente a una ($p \leq 0.05$). La comparación de medias también se realizó mediante la prueba de rango múltiple de Tukey. Todos los datos fueron procesados en el paquete estadístico NCSS (2001) y (Jerry y Kaysuville, 2007). Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición transformando previamente los valores con arcoseno (Sokal y Rohlf, 1988).

Resultados y discusión

Tanto los aceites esenciales de orégano como de tomillo presentaron halos de inhibición, como prueba de actividad antimicrobiana contra *Ralstonia solanacearum*, en todas las concentraciones y cantidades aplicadas.

Orégano

La actividad antibacteriana promedio porcentual obtenida de todas las concentraciones y diferentes cantidades de extracto de orégano aplicadas fue de 47.65%. Los porcentajes promedio de inhibición para las concentraciones estudiadas (1:1, 1:5 y 1:10), fueron de 67.6, 39.33 y 36.33% respectivamente (Figura 1 y Cuadro 1). En un estudio similar (Borboa, *et al.*, 2010), en el que se evaluó la actividad antibacteriana de los aceites de cuatro diferentes variedades de orégano sobre la bacteria *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* se encontraron valores promedio de 47.5, 35.6 y 30.8 mm de diámetro para las mismas concentraciones y en las que se usó la cantidad aplicada de 15 μl . Los resultados de inhibición obtenidos en el presente estudio, son mayores a los encontrados por Borboa *et al.* (2010), esto puede deberse no solo a la diferente sensibilidad de las bacterias en estudio, sino también a la diferente composición de los aceites de orégano utilizados (Pradhanang *et al.*, 2003).

La concentración de aceite esencial de orégano que mostró una mayor actividad antibacteriana contra la bacteria *Rs* fue la 1:1 en las diferentes cantidades aplicadas de 15 µl con 65%, 10 µl con 68% y 7.5 µl con 65% de inhibición (Figura 1). Por su parte en las concentraciones aplicadas de 7.5, 10 y 15 µl en las diluciones de 1:5 y 1:10, los valores porcentuales numéricos no muestran diferencia significativa, con excepción de la cantidad de 15 µl en la dilución 1:5 que arrojó un valor superior de 52% de inhibición, 10 a 18% superior de las demás cantidades aplicadas (Cuadro 1).

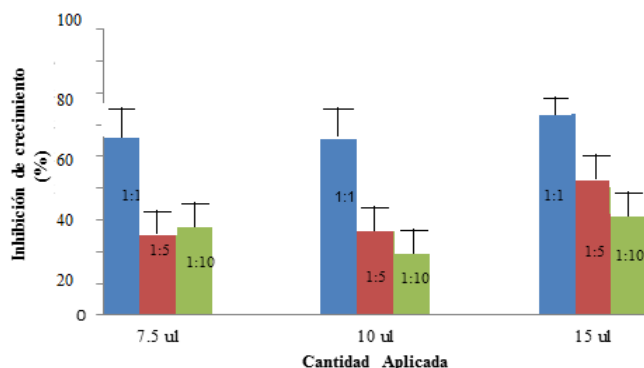


Figura 1. Porcentaje de inhibición de crecimiento de *R. solanacearum*, por efecto de aceite esencial de orégano en diluciones 1:1, 1:5, 1:10 a diferentes cantidades aplicadas 7.5, 10 y 15 µl.

Cuadro 1. Valores porcentuales (%) de inhibición de crecimiento de *Ralstonia solanacearum* por efecto de aceites esenciales (trifactorial AXBXC).

Aceite	Diluciones	Cantidad aplicada	Porcentaje de inhibición (%)
Orégano	1:1	15 µl	70.4 a
Tomillo	1:1	15 µl	70.2 a
Orégano	1:1	10 µl	68.1 ab
Tomillo	1:1	10 µl	65.5 abc
Orégano	1:1	7.5 µl	65.2 abc
Tomillo	1:5	15 µl	63.4 abcd
Tomillo	1:1	7.5 µl	62.5 abcde
Tomillo	1:5	10 µl	61.9 abcdef
Tomillo	1:10	15 µl	55.7 bcdef
Orégano	1:5	15 µl	52.1 cdef
Tomillo	1:5	7.5 µl	45.4 cdef
Orégano	1:10	15 µl	40.2 def
Orégano	1:10	7.5 µl	39.1 ef
Tomillo	1:10	10 µl	35.5 efg
Orégano	1:5	10 µl	34.4 efg
Orégano	1:5	7.5 µl	32.2 fg
Orégano	1:10	10 µl	30.4 fg
Tomillo	1:10	7.5 µl	15.4 g
* Alcohol 70%			0 h
+Estreptomicina (10 µg disco ⁻¹)	(10 µg disco ⁻¹)	(10 µg disco ⁻¹)	67.8 ab
+Ampicilina (10 µg disco ⁻¹)	(10 µg disco ⁻¹)	(10 µg disco ⁻¹)	66.2 abc

*= control negativo: inoculación por el hongo a evaluar sin presencia de extracto; += controles de referencia positivo. Literales diferentes indican diferencia significativa con $p < 0.05$.

Con relación a los controles positivos y negativos (alcohol como control negativo y estreptomycinina y ampicilina como controles de referencia positivo), los valores indican que la estreptomycinina fue superior que la ampicilina pero inferiores a los tratamientos de orégano en las cantidades de 15 y 10 μl en las diluciones de 1:1 y de tomillo en la cantidad de 15 μl de la dilución 1:1 (Cuadro 1), lo cual conlleva a considerar estas diluciones como posibles concentraciones adecuadas para el control de *Rs*; sin embargo, es importante indicar que además de estos estudios de efectividad biológica, se deben realizar estudios de fitotoxicidad para evaluar si estas concentraciones no repercuten o tienen acciones adversas en el buen desarrollo de la planta durante todo el ciclo fenológico (Castro, 2004; Osorno *et al.*, 2009).

Tomillo

La actividad antibacteriana porcentual promedio obtenida de todas las concentraciones y diferentes cantidades de extracto de tomillo evaluadas fue 46.64%. Los valores promedio de inhibición encontrados fueron de 65.83, 38.56 y 35.53% de inhibición, para las concentraciones 1:1, 1:5 y 1:10, respectivamente (Figura 2). Estos resultados coinciden con relación al estudio desarrollado por Borboa *et al.* (2010) para la bacteria *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*, quienes obtuvieron porcentajes de 50.3, 33 y 21 para las mismas concentraciones. Sin embargo, cabe indicar que para *Rs* la dilución 1:1 con diluciones de 7.5, 10 y 15 μl se comportaron numéricamente superiores a los que presenta el mismo autor Borboa *et al.* (2010).

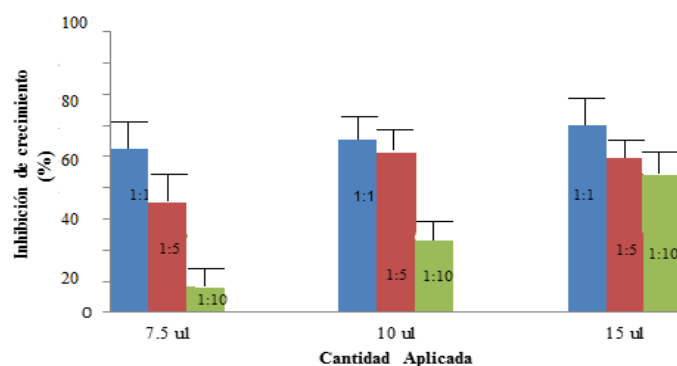


Figura 2. Porcentaje de inhibición de crecimiento de *Ralstonia solanacearum*, por efecto de aceite esencial de tomillo en diluciones 1:1, 1:5, 1:10 a diferentes cantidades aplicadas 7.5, 10 y 15 μl .

No obstante, aun cuando en el presente estudio no se hayan caracterizado los aceites en estudio, los resultados obtenidos sugieren que se debe a la participación de metabolitos secundarios que tienen la habilidad de inhibir el crecimiento de patógenos (Corella-Bernal y Ortega-Nieblas, 2013; Silva-Vázquez *et al.*, 2015). Estudios de Arango-Bedoya *et al.* (2015), reportan entre los componentes mayoritarios a Carvacrol, Timol, p-cimeno y cineol 1.8 como responsables de la actividad inhibitoria. En condiciones *in vitro* probaron el aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides*) vs el fitopatógeno *Phytophthora infestans*, obteniendo resultados significativos (20.53 $\mu\text{g ml}^{-1}$) en una inhibición en el crecimiento del patógeno de 50% (CE50).

Por su parte Ortega-Nieblas *et al.* (2011), reportan actividad antimicrobiana de aceites esenciales de *Lippia palmeri* contra cuatro bacterias Gram-positivas y seis bacterias Gram negativas, los resultados de estos autores muestran una mayor actividad contra *Escherichia coli* O157:H7 y

Staphylococcus aureus, bacterias importantes que se encuentran afectando la salud humana y además han sido reportadas presentes en productos hortofrutícolas. Los resultados obtenidos en el presente estudio, respaldan aún más, el uso de extractos vegetales como *Lippia palmeri* para apoyo en el control de hongos y bacterias patógenas.

Al realizar la comparación entre los aceites esenciales de orégano (*Lippia graveolens*) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.), de los valores porcentuales promedios de inhibición en el crecimiento de *Ralstonia solanacearum*, se puede apreciar que no existe diferencia significativa en orégano y tomillo. Los dos aceites se consideran con efecto inhibitorio del crecimiento de *Ralstonia solanacearum* efecto que en otras investigaciones se ha comprobado sus capacidades inhibitorias del crecimiento en bacterias patógenas de plantas tales como: *Agrobacterium tumefaciens*, *C. michiganensis* subespecie *michiganensis*, *Erwinia amylovora*, *E. carotovora* y *Xanthomonas vesicatoria* (Sivropoulou *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1997; Soylu *et al.*, 2006).

Respecto a la comparación de los valores medios de las diluciones (1:1, 1:5, 1:10 μ l.) de los aceites esenciales de orégano y tomillo en el porcentaje de inhibición de crecimiento de *Ralstonia solanacearum*, existieron diferencias significativas en la dilución 1:1 a diferencia de las siguientes diluciones 1:5 y 1:10. Además un resultado similar con la dilución 1:1 fue obtenido en el estudio de inhibición de crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* con aceites de orégano y tomillo (Borboa *et al.*, 2010). En la comparación de los valores porcentuales de inhibición de las cantidades aplicadas (7.5, 10, 15 μ l.) de orégano y tomillo vs crecimiento de *Ralstonia solanacearum*, existieron diferencias significativas en la cantidad aplicada de 15 μ l, 7.5 μ l y 10 μ l (Cuadro 1). Las Figuras 3 y 4, son una representación del efecto inhibitorio de los aceites evaluados.

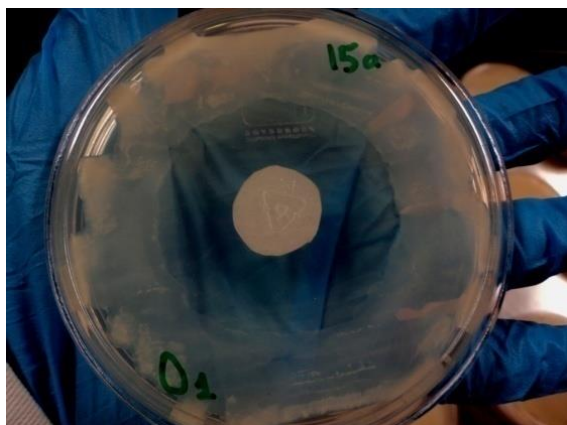


Figura 3. Halo de inhibición de crecimiento de *Ralstonia solanacearum* con aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens*) dilución 1:1, 15 μ l.



Figura 4. Halo de inhibición de crecimiento de *Ralstonia solanacearum* con aceite esencial de tomillo *Thymus vulgaris* L. dilución 1:1, 15 μ l.

Con relación a los controles positivos y negativos aplicados en el presente estudio (alcohol como control negativo y estreptomycin y ampicilina como controles de referencia positivo), los valores muestran un similar comportamiento al indicado con orégano, pero con la particularidad de que el tomillo fue superior en las cantidades de 15 μ l en la dilución de 1:1, vs controles de referencia positivo (Cuadro 1).

Conclusiones

Los aceites esenciales de orégano y tomillo mostraron efectos inhibitorios sobre el crecimiento de la bacteria *Ralstonia solanacearum* en la dilución 1:1 y en la cantidad de 15 µl. Los aceites esenciales de orégano y tomillo mostraron mejor efecto inhibitorio que los antibióticos utilizados estreptomycin (10 µg) y ampicilina (10 µg), lo cual conlleva a considerarlos como una alternativa de control biológico adecuado vs *Rs*; sin embargo, es importante indicar que se sugieren estudios de fito-toxicidad para evaluar si estas concentraciones no repercuten o tienen acciones adversas en el desarrollo adecuado de la planta durante todo el ciclo fenológico.

Agradecimientos

Al Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste CIBNOR, SC, por la disposición del Laboratorio de Fitopatología y Microbiología para el desarrollo del presente estudio. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) por el proyecto aprobado 12067: detección de bacterias de importancia cuarentenaria en la zona noroeste de México.

Literatura citada

- Aballa, A. and Rosen, J. P. 2001. The effects of stabilized extracts of sage and oregano on the oxidation of salad dressings. *Eur. Food Res. Technol.* 212(5):551-560.
- Aphis, P. P. Q. 2004. New pest response guidelines *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2; Southern wilt of Geranium. Edit. by Joel Floyd. Riverdale, USA. USDA. 19 p.
- Arango, B. O.; Hurtado, B. A. M.; Pantoja, D. D. y Santacruz, Ch. L. 2015. Actividad inhibitoria del aceite esencial de *Lippia origanoides* HBK sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans*. *Acta Agron.* 64(2):116-124.
- Alvarado, M. A. P 2011. *Ralstonia solanacearum*: una enfermedad bacteriana de importancia cuarentenaria y su situación actual en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) en las zonas agroproductoras de Sonora, México. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Baja California-Instituto de Ciencias Agrícolas. 123 p.
- Brader, G.; Djamei, A.; Teige, M.; Palva, T. and H. Hirt. 2007. The MAP kinase kinase MKK2 affects disease resistance in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Inter.* 20(5):589-596.
- Borboa, F. J.; Rueda, P. E.; Acedo, F. E.; Ponce, J. F.; Cruz, V. M.; García, H. J. L. y Ortega, N. M. M. 2010. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales contra *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. *Trop. Subtrop. Agroecosys.* 12(1):539-547.
- Burt, S. A. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Inter. J. Food Microbiol.* 94(10):223-253.
- Castillo, H. A. G.; García, F. A. J and Estarrón, E. M. 2007. Extraction method that enriches phenolic content in oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) essential oil. *J. Food Process Eng.* 30(6):661-669.
- Castro, H. 2004. Evaluación agronómica de frecuencias de corte y densidades de siembra de orégano (*Lippia graveolens*), en el centro de Agricultura Tropical Bulbuxya, San Miguel Panan. Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos Guatemala, Facultad de Agronomía Instituto de investigaciones agronómicas. Guatemala. 43 p.

- Corella, B. R. A. y Ortega, N. M. M. 2013. Importancia del aceite esencial y la producción de orégano *Lippia palmeri* watson en el estado de Sonora. Rev. Cienc. Biol. Salud. 15(1):57-64.
- Champoiseau, P.; Jones, J.; Sefah, K. and Tan, W. 2009. Selection of molecular aptamers for identification of live cells of *Ralstonia solanacearum*: a new method in plant pathology. Phytopathology. 99(6):S20-S20.
- Cheng, S.; Liu, J.; Huang, C. y Hsui, W. Ch. and Chang, S. 2009. Biores. Technol. 100(5):457-464.
- Daferera, D. J.; Ziogas, B. N. and Polissiou, M. G. 2003. The effectiveness of plant essential oils in the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Crop Protec. 22(1):39-44.
- El-Hela, A. A. A. 2007. Chemical composition and biological studies of the essential oil of *Thymus decussatus* Benth growing in Egypt. Egypt. J. Bio. Sci. 23(1):146-153.
- González, I.; Arias, Y. and Peteira, B. 2009. Plant-phytopathogen bacteria interaction: case study *Ralstonia solanacearum*-host plants. Rev. Protección Veg. La Habana, mayo-ago. 24-2.
- Jerry, L. H. and Kaysville, U. 2007. Quick start & self-help anual. cal system for windows. NCSS. User's guide-I. Published by Number Cruncher Statistical System. Kaysville. UTAH. USA. 25-50 pp.
- Kordali, S.; Kotan, R.; Mavi, A.; Fakir, A. Ala, A. and Yildirim, A. 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish. *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. J. Agric. Food Chem. 53(24):9452- 9458.
- Muñoz, F. 1993. Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 365 p.
- Muñoz, F. 1996. Plantas medicinales y aromáticas. Segunda reimpresión. Ediciones Mundi-Prensa. México. 281-283 pp.
- Ortega, N. M. M.; McCaughey, E. D.; Bagueño, M. R. y Serna, F. 2005. Estimación de materia vegetal del orégano (*Lippia palmeri* Watson) y su contenido de aceite esencial por planta en dos sitios nativos del estado de Sonora. Memorias del 5º Simposio Internacional de la Flora Silvestre de Zonas áridas. 234-249 pp.
- Ortega, N. M. M. 2011. Caracterización del aceite esencial del orégano *Lippia palmeri* wats y su actividad biológica. Tesis Universidad de Baja california. Instituto de ciencias agrícolas. Baja California, México. 11-12 pp.
- Osorno, H. T.; Flores, J. D.; Hernández, S. L. and Cisneros, R. 2009. Management and extraction of *Lippia graveolens* in the arid lands of Queretaro, Mexico. Econ. Bot. 63(3):314-318.
- Palacio-Bielsa, A.; Cambra, M. A. and López, L. 2009. PCR detection and identification of plant-pathogenic bacteria: updated review of protocols (1989-2007). J. Plant Pathol. 91(2):912-957.
- Pastrik, K. H. and Maiss, E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. J. Phytopathol. 148(1):619-626.
- Ponce, A. G.; Del Valle, C. and Roura, S. I. 2004. Evaluation of plant essential oil as natural posharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Inter. Soc. Hortic. Sci. 628(1):737-745.
- Pradhanang, P. M.; Momol, M. T.; Olson, S. M. and Jones, J. B. 2003. Effects of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. Plant Dis. 87(10):423-427.

- Sánchez, M. F. 2006. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. 1^{ra} edición. Editorial Aiyana. España. 7-14. pp.
- Sen, Y. S.; Zhuang, Zh. F.; Xu, T. C.; Yue, J. Y. and Li, X. M. 2005. Tomato resistance to *Ralstonia solanacearum* induced by chitosan. *Acta Phyto Sinica*. 32(2):120-124.
- Seal, S. E.; Jackson, L. A. and Daniels, M. J. 1992. Use of tRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(11):3579-3761.
- Silva, V. R.; Duran, M. L. A.; Santellano, E. E.; Rodríguez, M. C.; Villalobos, V. G.; Méndez, Z. G. and Hume, M. E. 2015. Performance of broiler chickens supplemented with Mexican oregano oil (*Lippia berlandieri* Schauer). *Rev. Bras. Zootec.* 44(8):283-289.
- Sivropoulou, A.; Papanikolaou, E.; Nikolaou, C.; Kokkini, S.; Lanaras, T. and Arsenakis, M. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 44(9):1202-1205.
- Smith, R. A.; Jones, P. J.; Elphinstone, G. and Forde, S. M. D. 1995. Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food Agric. Immunol.* 7(2):67-79.
- Smith, M. D. and Navilliat, P. L. 1997. A new protocol for antimicrobial testing of oils. *J. Microbiol. Methods.* 28(1):21-24.
- Smith, J. J. and Saddler, G. S. 2001. The use of avirulent mutants of *Ralstonia solanacearum* to control bacterial wilt disease. 159-176 pp.
- Sokal, R. and James, R. 1988. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. (3rd Ed.). Freeman & Co, San Francisco, CA. 132-145 pp.
- Soylu, S.; Soylu, E. M.; Baysal, Ö. and Zeller, W. 2006. Antibacterial activities of the essential oils from medicinal plants against the growth of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Biocontrol of Bacterial Plant Diseases*. In: 1st Symposium, 23-26 October, 2005, Darmstadt, Germany. Vol. 408. 82- 85 pp.
- Swanson, J. K.; J. Yao, J.; Tans-Kersten and C. Allen. 2005. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent infection of geranium. *Phytopathology.* 95(1):136-143.
- Yesil, C. O.; Hames, K. E. E.; Bedir, E.; Vardar, S. F.; Ozek, T. and Baser, K. H. C. 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* 100(1):553-559.
- Zhou, J.; Zhang, H.; Yang, Y.; Zhang Z.; Zhang, H. and Hu, X. 2008. Abscisic acid regulates SRF1-mediated resistance to *Ralstonia solanacearum* by modifying the expression of GCC box-containing genes in tobacco. *J. Exp. Bot.* 59(3):645-652.