

Extractos vegetales para el control de *Ralstonia solanacearum* Smith agente causal de la marchitez bacteriana del tomate

Yinerby Quintana*, Yonis Hernández y Rafael Mejías

*Instituto de Botánica Agrícola, Laboratorio de Bacterias Fitopatógenas, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Apdo. 4579. Maracay 2101. Aragua Venezuela

RESUMEN

Se evaluó el efecto de extractos acuosos y etanólicos sobre el control de *Ralstonia solanacearum* bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*. Los extractos acuosos fueron preparados con material foliar fresco de diecinueve especies y los etanólicos, a partir de hojas de guayaba (*Psidium guajava*) y tártago (*Ricinus communis*). De los extractos etanólicos fueron probadas cuatro concentraciones (1%, 5%, 10% y 15%). El efecto bactericida *in vitro*, se determinó midiendo el diámetro del halo de inhibición de crecimiento bacteriano. Para este ensayo, se utilizó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial. Para las pruebas en umbráculo, se utilizaron plantas sanas de tomate de 30 días de edad, cuyas raíces fueron sumergidas en los extractos acuosos y etanólicos (10 y 15%) de guayaba y tártago y trasplantadas a un sustrato previamente inoculado con la suspensión bacteriana, dos días antes de la aplicación de los tratamientos. Se realizaron aplicaciones semanales de los extractos a razón de 10 mL por planta. El diseño estadístico fue un completamente aleatorizado con siete repeticiones y se evaluó el porcentaje de plantas con marchitez bacteriana. En los dos extractos se determinó los metabolitos presentes. *In vitro* el mayor efecto bactericida de los extractos acuosos fue observado con tártago, guayaba y cundeamor (*Momordica charantia*) y las concentraciones de 10% y 15% de los extractos etanólicos de guayaba y tártago. En los ensayos *in vivo*, los extractos acuosos y etanólicos de guayaba tuvieron el mejor efecto bactericida ya que ninguna planta mostró síntomas de marchitez, con tártago un 14,28% y en el testigo el 71,28% de las plantas presentó marchitez. En ambos extractos se evidenció la presencia de taninos, saponinas, alcaloides y aceites esenciales, no hubo flavonoides. Ambas especies pueden ser consideradas promisorias para su potencial uso en el manejo de *Ralstonia solanacearum* con los dos tipos de extractos.

Palabras clave: bacteria, halo de inhibición, metabolitos secundarios, *Psidium guajava*, *Ricinus communis*.

Plant extracts for the control of *Ralstonia solanacearum* Smith causal agent of bacterial wilt of tomato

ABSTRACT

The effect of aqueous and ethanolic extracts on the control of *Ralstonia solanacearum* under *in vitro* and *in vivo* conditions was evaluated. The aqueous extracts were prepared with fresh foliar material of nineteen species and ethanol extracts, from guava (*Psidium guajava*) and castor bean (*Ricinus communis*) leaves. Four concentrations (1%, 5%, 10% and 15%) were tested from the ethanol extracts. The bactericidal effect *in vitro* was determined

*Autor de correspondencia: Yonis Hernández

E-mail: yonisbact@gmail.com

by measuring the diameter the bacterial growth inhibition halo. For this assay, a fully randomized design was used with factorial arrangement. For the *in vivo* tests, healthy tomato plants of 30 days old were used, whose roots were submerged in the aqueous and ethanolic (10% and 15%) extracts of guava and castor bean and transplanted to a substrate previously inoculated with the bacterial suspension two days before the treatments were applied. Weekly applications of extracts were made at the dose of 10 mL per plant. The statistical design was a completely randomized with seven repetitions and the percentage of plants with bacterial wilting was evaluated. In the two extracts the metabolites present were determined. *In vitro* the greatest bactericidal effect of aqueous extracts was observed with those of castor bean, guava and bitter melon (*Momordica charantia*) and concentrations of 10% and 15% of the ethanolic extracts of guava and castor bean. *In vivo* trials, aqueous and ethanolic extracts of guava had the best bactericidal effect since no plant showed symptoms of bacterial wilt, with castor bean, only 14.28% while in test plants 71.42% wilting plants were observed Both extracts showed the presence of tannins, saponins, alkaloids and essential oils, there were no flavonoids. Both species can be considered promising for their potential use in *Ralstonia solanacearum* management with both types of extracts.

Key words: bacteria, inhibition halo, *Ricinus communis*, *Psidium guajava*, secondary metabolites.

INTRODUCCION

El tomate (*Solanum lycopersicum* Mill), es una de las hortalizas más importantes en Venezuela y a pesar de que en los últimos años las cifras de producción han sido fluctuantes con una tendencia a la baja, según datos de FEDEAGRO (2018), hasta el 2017, este se mantiene como principal hortaliza de consumo. En la producción de este cultivo, las enfermedades constituyen un factor limitante en muchas partes del mundo y en Venezuela no es la excepción. Una de gran importancia, por los daños significativos que causa, es la marchitez bacteriana ocasionada por la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Rueda-Puente *et al.*, 2014; Álvarez *et al.*, 2010). Los síntomas de la enfermedad tienden a evolucionar rápidamente, provocando marchitamientos unilaterales de hojas, que se hacen acompañar de una epinastia del peciolo. Las plantas sobre las que se manifiestan estos síntomas no sobreviven más de dos semanas (Hayward, 1991; Agrios, 2005; Peeters *et al.*, 2013).

La marchitez bacteriana puede ser muy dañina si confluyen todas las condiciones favorables para su desarrollo. Su control no es fácil ya que el agente causal es un patógeno del suelo, además hay poca oferta de bactericidas comerciales en el mercado y que sean efectivos, y aunado a lo anterior, existe el problema del impacto del uso de esos productos tanto al hombre como al ambiente (Trujillo, 1998; Din *et al.*, 2016).

En los últimos tiempos, el hombre preocupado por el ambiente, ha incursionado con otros controles

de menor impacto, entre ellos el uso de plantas, que tienen la capacidad de producir diversos metabolitos con propiedades antimicrobianas, los cuales pueden ser empleados para controlar diferentes patógenos en productos hortofrutícolas. Se conoce que las plantas sintetizan una gran variedad de metabolitos secundarios relacionados con los mecanismos de defensa. El proceso para obtenerlos es variable; se pueden hacer extractos acuosos (Bautista *et al.*, 2002) o polvos (Barrera *et al.*, 2002) o utilizar otros disolventes para obtener diferentes compuestos, según su polaridad (Hernández *et al.*, 2007).

Algunas familias de plantas, tales como *Amaryllidaceae*, *Araceae*, *Fabaceae*, *Celastraceae*, *Combretaceae*, *Asteraceae* (*Compositae*), *Euphorbiaceae*, *Liliaceae*, *Malvaceae*, *Rutaceae* y *Verbenaceae* han sido citadas como promisorias para su uso en el combate de enfermedades causadas por fitopatógenos (Guevara *et al.*, 2000; Stauffer *et al.*, 2000).

Se han realizado pruebas con extractos de especies de plantas que pudieran ser promisorias para el control sobre patógenos fungosos como *Mycosphaerella*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora* (Vivero y Castaño, 2006; Vargas, 2008; Gamboa *et al.*, 2003; Araujo *et al.*, 2007; Rodríguez y Montilla, 2002; Rodríguez *et al.*, 2003) y también en bacterias de los géneros *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Ralstonia* (Guevara *et al.*, 1999; Stefanova *et al.*, 2005; Bdliya y Dahiru, 2006; Briceño, 2008; D'Anello, 2008; García, 2008, Arocha, 2010, Din *et al.*, 2016).

Una ventaja de los compuestos aleloquímicos en el desarrollo de pesticidas naturales es que son fácilmente biodegradables y muchos de ellos seguros y limpios desde el punto de vista ambiental (Rizvi *et al.*, 1992; Din *et al.*, 2016). Debido a la situación existente en la producción agrícola, se han encontrado nuevas vías para obtener una agricultura sostenible basada en recursos naturales y renovables (Fajardo *et al.*, 2005).

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de extractos vegetales de diferentes especies sobre el control de *Ralstonia solanacearum* que ocasiona la marchitez bacteriana del tomate en condiciones *in vitro* y en umbráculo.

MATERIALES Y METODOS

El ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Bacterias Fitopatógenas del Instituto de Botánica Agrícola de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, en Maracay, estado Aragua; trabajando tanto en laboratorio como en umbráculo.

Material vegetal utilizado

El material vegetal fue colectado en el Campus de la Universidad Central de Venezuela, ubicado en Maracay, estado Aragua, a 400 m.s.n.m. El material estaba aparentemente sano, libre de cualquier tipo de lesión causado por insectos, hongos, bacterias u otros. Se seleccionaron especies, las cuales ya habían sido señaladas en trabajos previos por sus propiedades antifúngicas, insecticidas, bactericidas, entre otras (Stauffer *et al.*, 2000; Maselli *et al.*, 2006; D'Anello, 2008). En la selección, se consideró la abundancia del material vegetal en la zona, con el propósito de garantizar su existencia para la elaboración de los extractos etanólicos (EE). Para las pruebas *in vitro* con extractos acuosos (EA), se emplearon 19 especies (Cuadro 1) y para el mismo tipo de prueba, con EE, se utilizaron los extractos de guayaba (*Psidium guajava*) y tártago (*Ricinus communis*), cuyos extractos acuosos produjeron los mayores halos de inhibición en las pruebas realizadas *in vitro*.

Preparación de los extractos acuosos (EA):

El extracto acuoso de cada una de las 19 especies colectadas fue preparado el mismo día de su utilización, obteniéndose a partir de material

fresco previamente lavado con agua destilada estéril (ADE), desinfectado con alcohol al 40% por un minuto y lavado nuevamente con ADE. Luego fue secado con toallas de papel estéril y macerado en un mortero estéril en proporción 1:3 P/V (1 g de material vegetal en 3 mL de agua destilada estéril). El líquido resultante fue filtrado en cuatro capas de gasa estéril, y envasado en un frasco ámbar para protegerlo de la luz. (Maselli *et al.*, 2006; D'Anello, 2008).

Obtención de los extractos etanólicos (EE):

Para la obtención de cada extracto etanólico, a partir de plantas de guayaba y tártago, se procedió a secar en sombra el material foliar por un período de 10 días, una vez seco se pulverizó en una licuadora convencional marca Oster, luego se maceró con etanol al 96% en proporción 1:7 (1 Kg de material vegetal en 7 L de etanol) y colocado en un envase de vidrio por un período de una semana en un lugar fresco y protegido de la luz. El macerado se filtró en cuatro capas de gasa estéril y fue colocado en un Rotavaporador marca Nahita RE52CS, a razón de 250 cc, con el fin de separar por destilación, el extracto del alcohol. Finalmente se dispensó el extracto puro en un frasco color ámbar y conservó 5 °C hasta su uso (Marcano y Hasegawa, 2002; D'Anello, 2008).

Efectividad *in vitro* de los extractos acuosos y etanólicos:

Esta prueba se realizó utilizando el método de disco de papel de filtro estéril de 6 mm de diámetro (Lorian, 1980; Balouiri *et al.*, 2016) y agar nutritivo (AN) como medio de cultivo. Los discos fueron impregnados con 10 μ L de cada extracto; para los EA se colocaron cinco discos por placa previamente estriadas por extensión en superficie con 100 μ L de la bacteria *R. solanacearum* de 24 h de crecimiento, a una concentración de 10⁸ cel/mL correspondiente al tubo N° 3 de la escala de Mcfarland (Barret, 1975) en solución salina. En el caso de los extractos etanólicos de guayaba y tártago, se probaron concentraciones de 1%, 5%, 10% y, 15% a razón de cuatro placas por cada concentración. Los discos testigos fueron impregnados con agua destilada estéril. Todas Las placas fueron colocadas en bolsas plásticas transparentes en condiciones de laboratorio y se evaluaron a partir de las 48 horas. Cuando se observó la presencia del halo de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor de cada disco, este fue medido con una regla graduada.

Cuadro 1. Especies vegetales seleccionadas para elaboración de extractos

Nombre común	Nombre científico	Familia
Onoto	<i>Bixa orellana</i> L.	Bixaceae
Noni	<i>Morinda citrifolia</i> L.	Rubiaceae
Orégano de palo	<i>Lippia alba</i> (Mill)	Verbenaceae
Flor escondida	<i>Phyllanthus niruri</i> L.	Phyllanthaceae
Orégano orejón	<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.	Lamiaceae
Eucalipto	<i>Eucalyptus cinerea</i> F.J. Muell. Ex Benth	Myrtaceae
Hierba boca	<i>Chamaesyce hirta</i> L. Millsp	Euphorbiaceae
Nim	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss	Meliaceae
Rabo de alacrán	<i>Heliotropium indicum</i> L.	Boraginaceae
Guayaba	<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Lamiaceae
Llantén	<i>Plantago major</i> L.	Plantaginaceae
Cundeamor	<i>Momordica charantia</i> L.	Cucurbitaceae
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae
Algodón de seda	<i>Calotropis procera</i> (Ait) R. Br	Apocynaceae
Tártago	<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae
Poleo o toronjil	<i>Melissa officinalis</i> L.	Lamiaceae
Bemba e`negro	<i>Euphorbia heterophylla</i> L.	Euphorbiaceae
Mastranto	<i>Hyptis suaveolens</i> L. Poit.	Lamiaceae

Efecto de los extractos acuosos y etanólicos sobre la marchitez bacteriana en condiciones de umbráculo

Para estos ensayos se utilizaron los extractos acuosos y etanólicos de guayaba y tártago. Los EA se prepararon en una proporción 1/3 (P/V) y para los EE, fueron utilizadas las concentraciones de 10 y 15%. Se utilizaron plantas de tomate híbrido Rio Grande de 30 días de germinadas. Al momento del transplante, el sistema radical de las plantas fue sumergido en el extracto acuoso o etanólico de acuerdo al tratamiento (Cuadro 2) y luego se plantaron a macetas de 1,5 Kg de capacidad que contenían sustrato estéril en relación 3:1 (suelo:turba) inoculado dos días antes con una suspensión de *R. solanacearum* a una concentración de 10^8 cel/mL, correspondiente al tubo N° 3 de la escala de Mc Farland (Barret, 1975). Se utilizaron siete plantas por tratamiento y se realizaron aplicaciones semanales con los extractos correspondientes, agregando 10 mL en la base de cada planta. En el umbráculo se registraron temperaturas máximas de 42 °C, mínima de 26 °C y humedad relativa de 60–80%.

La evaluación se realizó utilizando la escala propuesta por Winstead y Kelman (1952) para evaluar resistencia de varias especies, incluyendo el tomate a *R. solanacearum*, con seis grados, en la cual: 0= Planta sin síntomas, 1= Planta con una hoja parcialmente marchita, 2= Planta con dos o tres hojas marchitas, 3= Plantas con todas las hojas marchitas a excepción de 2 o 3 del ápice, 4= Planta con todas las hojas marchitas y 5= Muerte de la planta.

Identificación de metabolitos presentes en los extractos vegetales que inhibieron a *Ralstonia solanacearum*

Para la identificación de los metabolitos presentes en los extractos vegetales de tártago y guayaba con mayor efecto inhibitorio sobre *R. solanacearum*, se utilizaron pruebas químicas de campo siguiendo los procedimientos señalados por Marcano y Hasegawa (2002), las cuales fueron dirigidas a la detección de alcaloides, saponinas, taninos, aceites esenciales y flavonoides.

Cuadro 2. Tratamientos con extractos vegetales aplicados en las pruebas de umbráculo a plantas de tomate para el control de *Ralstonia solanacearum* Smith.

Tratamiento	Descripción del tratamiento
T1	Plantas a las que se les aplico solo agua
T2	Plantas inoculadas con <i>Ralstonia solanacearum</i>
T3	Plantas tratadas con el extracto acuoso de guayaba
T4	Plantas tratadas con el extracto acuoso de tártago
T5	Plantas inoculadas con <i>R. solanacearum</i> y tratadas con el extracto acuoso de guayaba
T6	Plantas inoculadas con <i>R. solanacearum</i> y tratadas con el extracto acuoso de tártago
T7	Plantas tratadas con el extracto etanólico de guayaba al 10%
T8	Plantas tratadas con el extracto etanólico de guayaba al 15%
T9	Plantas tratadas con el extracto etanólico de tártago al 10%
T10	Plantas tratadas con el extracto etanólico de tártago al 15%
T11	Plantas inoculadas con <i>R. solanacearum</i> y tratadas con el extracto etanólico de guayaba al 10%
T12	Plantas inoculadas con <i>R. solanacearum</i> y tratadas con el extracto etanólico de guayaba al 15%
T13	Plantas inoculadas con <i>R. solanacearum</i> y tratadas con el extracto etanólico de tártago al 10%
T14	Plantas inoculadas con <i>R. solanacearum</i> y tratadas con el extracto etanólico de tártago al 15%

Diseño experimental:

El diseño de los ensayos *in vitro* con extractos acuosos (EA), consistió en 19 tratamientos, correspondiente a los extractos de las plantas seleccionadas más un testigo (disco impregnado con ADE), con cinco repeticiones por tratamiento. La unidad experimental fue cada disco de papel de filtro colocado sobre el medio de cultivo agar nutritivo, bajo un arreglo factorial de dos factores (bacteria, especie), y un diseño completamente aleatorizado.

El diseño estadístico de los ensayos *in vitro* con extractos etanólicos (EE), correspondió a un arreglo factorial de tres factores (bacteria, especie, dosis), con un diseño completamente aleatorizado. La unidad experimental fue cada disco de papel de filtro colocado sobre el medio de cultivo agar nutritivo.

En el ensayo en umbráculo, la unidad experimental fue representada por cada planta de tomate con siete repeticiones, bajo un diseño completamente aleatorizado. Los resultados debido a que no cumplieron los supuestos de normalidad, se analizaron vía no paramétrica con el programa Statistix 8.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto *in vitro* de los extractos acuosos sobre el crecimiento de *R. solanacearum*

Se encontraron diferencias altamente significativas entre los extractos utilizados, lo que indicó que al menos un tratamiento tuvo efecto diferente a los demás (Cuadro 3), mientras que en el caso de los testigos no se observó efecto inhibitorio.

Con los extractos acuosos se formaron cinco grupos de medias (Cuadro 4), el que produjo mayores halos de inhibición sobre el crecimiento de *R. solanacearum* fue el de tártago ubicado en el grupo A, seguido por los de guayaba y cundeamor AB. Por otro lado los EA de eucalipto, hierba boca, onoto, flor escondida, mastranto, albahaca, nim, romero, noni y bamba e negro, quedaron ubicados dentro del grupo ABC, con un efecto bactericida menor, igual que el llantén, orégano orejón y orégano de palo que forman parte del grupo BC. El de poleo (C) tuvo muy poco efecto y los de algodón de seda y rabo de alacrán (D), no produjeron inhibición del crecimiento sobre *R. solanacearum*.

Cuadro 3. Análisis de varianza por Kruskal-Wallis, para los halos de inhibición producidos por los extractos acuosos de plantas sobre *Ralstonia solanacearum* Smith.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Valor de P
Tratamiento	16	28559,8	1784,99	11,1	0,0000**
Error	63	10126,2	160,73		
Total	79	38686,0			

En estudios realizados por otros investigadores, se ha comprobado el efecto de los extractos de plantas incluyendo el de guayaba, sobre el control de fitopatógenos, entre ellos Stauffer *et al.* (2000) con *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, Vudhivanich (2003) con *R. solanacearum*, y D'Anello (2008) con dos patovares de *Xanthomonas*; resultados que concuerdan con los obtenidos en esta investigación con *R. solanacearum*. Sin embargo, Guevara *et al.* (2000), utilizando varios extractos para el control de *Pseudomonas* sp. y *Erwinia* sp., no observaron efecto inhibitorio con el extracto de guayaba, lo que denota un comportamiento diferencial del tipo de extracto, dependiendo de la especie bacteriana de que se trate.

Efectividad *in vitro* de los extractos etanólicos:

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de los extractos

de tártago y guayaba (Cuadros 5, 6 y 7), los testigos tratados con agua, no produjeron halos de inhibición. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por D'Anello (2008), Briceño (2008) y García (2008), quienes encontraron que a medida que se incrementaban las dosis de los extractos etanólicos, se producía un mayor diámetro del halo de inhibición del crecimiento de los patógenos bacterianos evaluados.

Se han encontrado resultados similares con patógenos bacterianos que afectan a humanos como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhi* y extractos de *Punican granatum*, *Syzygium aromaticum*, *Zingiber officinales*, *Thymus vulgaris* y *Cuminum cyminum*, a mayor concentración, mayor actividad bacteriostática y bactericida de los extractos etanólicos (Gupta *et al.*, 2010; Mostafa *et al.*, 2018).

Cuadro 4. Pruebas de Medias de los halos de inhibición (cm) producidos por extractos acuosos de plantas sobre *Ralstonia solanacearum* Smith.

Extractos de	Medias (cm)	Grupos
<i>Ricinus communis</i> L.	0,5200	a
<i>Psidium guajava</i> L.	0,2760	ab
<i>Momordica charantia</i> L.	0,3320	ab
<i>Eucalyptus cinérea</i> F. J. Muell. Ex Benth	0,1800	abc
<i>Chamaesyce hirta</i> L. Millsp	0,1650	abc
<i>Bixa Orellana</i> L.	0,1425	abc
<i>Phyllanthus niruri</i> L.	0,1100	abc
<i>Ocimum basilicum</i> L.	0,1000	abc
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss	0,1000	abc
<i>Hyptis suaveolens</i> L Roit wilseng	0,1125	abc
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	0,1000	abc
<i>Morinda citrifolia</i> L.	0,1000	abc
<i>Euphorbia heterophylla</i> L.	0,0900	abc
<i>Plantago major</i> L.	0,0650	bc
<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.	0,0700	bc
<i>Lippia alba</i> (Mill)	0,0700	bc
<i>Melissa officinalis</i> L.	0,0500	c
<i>Calotropis procera</i> (Ait) R. Br	0,0000	d
<i>Heliotropium indicum</i> L.	0,0000	d

Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0.05$) para la prueba de Kruskal – Wallis.

Cuadro 5. Análisis de varianza por Kruskal-Wallis, para los halos de inhibición producidos por los extractos etanólicos de tártago sobre *Ralstonia solanacearum* Smith.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F.	Valor de P.
Tratamiento	3	3,19807	1,06603	3,14	0,0652ns
Error	12	4,07230	0,33936		
Total	15	7,27037			

Cuadro 6. Análisis de varianza por Kruskal-Wallis, para los halos de inhibición producidos por los extractos etanólicos de guayaba sobre *Ralstonia solanacearum* Smith.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F.	Valor de P.
Tratamiento	3	0,47648	0,15883	1,66	0,2277ns
Error	12	1,14690	0,09558		
Total	15	1,62338			

Cuadro 7. Medias de halos de inhibición producidos por concentraciones de extractos etanólicos de tártago y guayaba sobre *Ralstonia solanacearum* Smith.

Dosis	Tártago Medias (cm)	Guayaba Medias (cm)
1%	0,55	0,27
5%	0,84	0,41
10%	0,96	0,50
15%	1,76	0,74

En los ensayos *in vitro*, se pudo evidenciar que los extractos etanólicos de tártago y guayaba a las concentraciones de 5, 10 y 15% (Cuadro 7), produjeron mayores halos de inhibición que los acuosos (Cuadro 4), sobre *R. solanacearum*. En este sentido, Murthy *et al.* (2014), trabajando con extractos de albahaca morada (*Ocimum sanctum*), encontraron mayor actividad antibacteriana sobre *R. solanacearum* de los extractos obtenidos con solventes orgánicos en comparación con los extractos acuosos; otros investigadores como Kiran *et al.* (2017) señalan que los extractos obtenidos con alcohol son más eficaces ya que con este solvente se libera mayor cantidad de fitoquímicos, lo que mejora su eficacia contra el patógeno. Otros investigadores como Gupta *et al.* (2010) y Mostafa *et al.* (2018), encontraron resultados similares.

Efecto de los extractos acuosos y etanólicos sobre la marchitez bacteriana en condiciones de umbráculo

El análisis estadístico, arrojó diferencias significativas entre los tratamientos inoculados con la bacteria, lo que indicó que al menos un tratamiento tuvo efectos diferentes a los demás (Cuadro 8). Respecto a la prevalencia de los síntomas, el marchitamiento fue mayor en las plantas control inoculadas (71,42%), mientras que la presencia de síntomas en las plantas inoculadas y tratadas con extractos acuosos y etanólicos de tártago fue baja (14,28%) y las tratadas con los extractos de guayaba no presentaron síntomas (Cuadro 9) (Figura 1).

Cuadro 8: Análisis de varianza de la evaluación de extractos acuosos y etanólicos de tártago y guayaba y su efecto sobre la marchitez bacteriana en plantas de tomate.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F.	Valor de P.
Tratamiento	6	58,122	9,68707	5,79	0,0002*
Error	42	70,286	1,67347		
Total	42	128,408			

Cuadro 9. Porcentajes de plantas afectadas por *R. solanacearum* Smith, en los diferentes tratamientos con extractos vegetales de tártago y guayaba.

Tratamientos Aplicados	% de plantas afectadas
<i>R. solanacearum</i>	71,42
<i>R. solanacearum</i> + extracto acuoso de guayaba	0,00
<i>R. solanacearum</i> + extracto acuoso de tártago	14,28
<i>R. solanacearum</i> + extracto etanólico de guayaba al 10%	0,00
<i>R. solanacearum</i> + extracto etanólico de guayaba al 15%	0,00
<i>R. solanacearum</i> + extracto etanólico de tártago al 10%	14,28
<i>R. solanacearum</i> + extracto etanólico de tártago al 15%	14,28

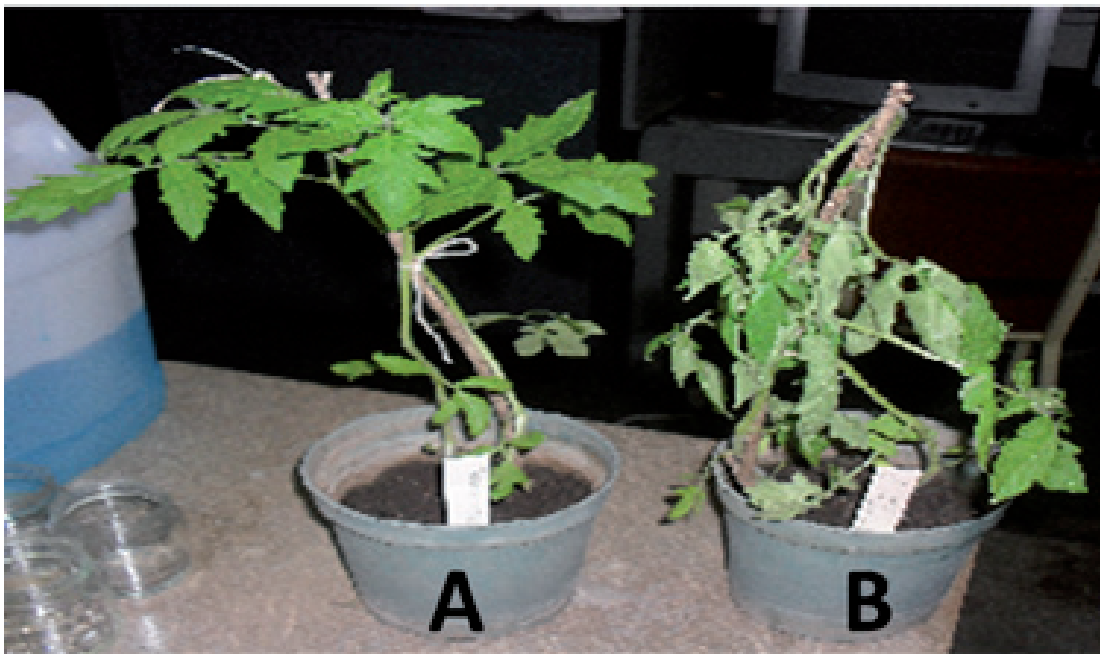


Figura 1. A: Planta de tomate sana y B: Planta con síntomas de marchitez por *Ralstonia solanacearum* Smith.

Los resultados obtenidos en las pruebas de umbráculo, concuerdan con los señalados por Assiri *et al.* (2018) con extractos de cebollín (*A. fistulosum*) y muñequita de agua (*H. bonariensis*) para el control de *R. solanacearum* en tomate, quienes encontraron que el marchitamiento fue menos grave en las plantas tratadas con extractos. Por su parte, Arocha (2010), observó reducción de la marchitez bacteriana en plantas de berenjena (*Solanum melongena*) inoculadas con *R. solanacearum* y tratadas con extractos etanólicos de mata ratón (*Gliricidia sepium*). Igualmente, D'Anello (2008), al aplicar extractos etanólicos a plantas de cala (*Anthurium* sp.) y de zinnia (*Zinnia elegans*) para el control de *Xanthomonas* sp., observó un control efectivo sobre las dos cepas evaluadas, manifestado por la ausencia o presencia de muy pocos síntomas, en las plantas inoculadas.

Identificación de metabolitos presentes en los extractos vegetales que inhibieron a *R. solanacearum*.

Tanto el tártago como la guayaba presentaron los alcaloides saponinas, taninos y aceites esenciales y estuvieron ausentes los flavonoides. Según Albornoz (1980), Marcano y Hasegawa (2002) y Al-Obaidi (2014), estos metabolitos secundarios le confieren a las plantas la cualidad de protegerse de diversas plagas por sí mismas.

Algunos investigadores han sugerido que la actividad de los componentes antibacteriales de los extractos de plantas como los terpenoides, alcaloides y compuestos fenólicos se debe a que interactúan con enzimas y proteínas de la membrana celular microbiana, causando su disrupción para dispersar un flujo de protones hacia el exterior de las células que induce la muerte celular o puede inhibir las enzimas necesarias para la síntesis de aminoácidos (Burt, 2004; Gill y Holley, 2006). Otros investigadores atribuyeron el efecto inhibitorio al carácter hidrofóbico de los extractos, el cual los capacita para reaccionar con proteínas de la membrana celular y mitocondrias, disturbando su estructura y cambiando su permeabilidad (Friedman *et al.*, 2004; Tiwari *et al.*, 2009).

Diferentes investigadores han señalado la presencia de compuestos en plantas, similares a los encontrados en esta investigación, asociados a efectos ya sea bactericidas, fungicidas y antioxidantes como es el caso de los aceites esenciales, saponinas, fenoles,

alcaloides, flavonoides, polifenoles y taninos entre otros (Tanaka *et al.*, 2006; Vargas *et al.*, 2006; Castillo *et al.* 2007; García, 2008; Briceño, 2008; Mainasara *et al.*, 2012; Sinha, 2013).

Din *et al.* (2016) encontraron en extractos acuosos de clavel de moro (*Tagetes patula*) y adatoda (*Adhatoda vasica*), alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas y terpenos que inhibieron la actividad de *R. solanacearum* tanto *in vitro* como *in vivo*, la mayoría de ellos, excepto los flavonoides fueron detectados en esta investigación en tártago y guayaba.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demuestran que los extractos acuosos y etanólicos de varias especies de plantas tienen efecto inhibitorio sobre *R. solanacearum*. Los halos de los extractos etanólicos de guayaba y tártago fueron más grandes *in vitro* que los extractos acuosos, sin embargo, en las pruebas *in vivo* ambos extractos tuvieron el mismo efecto bactericida y redujeron el porcentaje de plantas con marchitez bacteriana. Se comprueba la potencialidad de los extractos acuosos y etanólicos de guayaba y tártago para su posible uso en la formulación de programas de manejo integrado de la marchitez bacteriana del tomate.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. 2005. Plant Pathology. Fifth edition. (Ed.). Elsevier Academic Press. New York. USA pp. 647-651.
- Al-Obaidi, O. 2014. Studies on antibacterial and anticancer activity of Nerium oleander extracts. Eur. Chem. Bull. 3: 259-262.
- Albornoz, A. 1980. Productos naturales, sustancias y drogas extraídas de plantas. Universidad Central de Venezuela. Publicaciones U.C.V. Caracas. Venezuela. 592 p.
- Álvarez, B; E.G. Biosca; M.M. López. 2010. On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. 257-279. <https://www.researchgate.net/publication/267772811>.

- Araujo, D.; D. Rodríguez; M. Sanabria. 2007. Respuestas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, causante del Mal de Panamá, a algunos extractos vegetales y fungicidas. *Rev. Fitopatol. Venez.* 21:2-8.
- Arocha, A. 2010. Efecto de extractos etanólicos de *Gliricidia sepium* (Jacq) Stend, sobre el control de *Ralstonia solanacearum* Smith, en plantas de *Solanum melongena* L. Trabajo de Grado. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 40 p.
- Assiri, P.K; W. Koné; K. Séka; F. Fofana; F. K. Yao; H. A. Diallo. 2018. Bacterial wilt of tomato in central Côte d'Ivoire. Identification of the causal agent and control by extracts of *Allium fistulosum* and *Hydrocotyle bonariensis*. *Int. J. Adv. Res.* 6(7): 477-486.
- Balouiri, M.; M. Sadiki; S.K. Ibnsouda. 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical analysis* 6: 71-79.
- Barrera, L.; S. Bautista; M. Jiménez; R. Reyes. 2002. Influence of leaf, fruit and seed powders and extracts of *Pithecellobium dulce* (ROXB). Benth. (Fabaceae) on the *in vitro* vegetative growth of seven postharvest fungi. *Rev. Mex. Fitopatol.* 20: 66-71.
- Barret, T.J. 1975. Preparation of bacterial vaccine. *In: Proceeding of the first workshop of Phytobacteriology*. R.N. (Ed.). University of Missouri. Columbia. USA. pp 1-6.
- Bautista, S.; L. Barrera; L. Bravo; K. Bermúdez. 2002. Antifungal activity of leaf and stem extracts from plant species on the incidences of *Colletotrichum gloeosporioides* of papaya and mango fruits after storage. *Rev. Mex. Fitopatol.* 20: 8-12.
- Bdliya, B.S; B Dahiru. 2006. Efficacy of some plant extracts on the control of potato tuber soft rot caused by *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *J Plant Prot Res.* 46: 285-294.
- Briceño, G. 2008. Obtención de extractos etanólicos a partir de hojas de ruda (*Ruta graveolens* L.) y nim (*Azadirachta indica* Adr. Juss), evaluación de su efecto en bacterias fitopatógenas del genero *Erwinia*. Trabajo de Grado. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 41 p.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223-253.
- Castillo, I.; M. Sanabria; D. Rodríguez; O. Crescente; L. Cumana; J. Rodríguez; Z. Briceño, 2007. Metabolitos secundarios y cuantificación de fenoles totales en *Lippia organoides* H.B.K.; *Lantana achyranthifolia* Desf. y *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud. XVII Congreso Venezolano de Botánica. Maracaibo. Venezuela. pp. 705 (Resumen).
- D'Anello, K. 2008. Evaluación de extractos vegetales acuosos y etanólicos para el control de *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae* (Hopkins & Dowson) y *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* (Pammel). Trabajo de Grado. Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela. 32 p.
- Din, N.; M. Ahmad; M. Siddique; A. Ali; I. Naz; N. Ullah and F. Ahmad. 2016. Phytobiocidal management of bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi. *Spanish Journal of Agricultural Research* 14(3), e1006. <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2016143-9012>.
- Fajardo, C.; M. Puentes; S. Torres; A. Fierro; R. Espinosa. 2005. Efecto alelopático de extractos acuosos de girasol (*Helianthus annuus* L.) en la germinación y desarrollo de malezas en diferentes épocas del año. *In: Memorias XVII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas (ALAM)*. Varadero, Matanzas, Cuba. pp. 610-616.
- FEDEAGRO. 2018. Confederación Nacional de Asociaciones de Productores Agropecuarios. [En línea]. Dirección URL: <https://fedeaagro.org/estadisticas-agricolas/produccion-agropecuaria/produccion/>. [Consultado: Julio, 2018].

- Friedman, M.; P.R. Henika; C.E. Levin; R.E. Mandrell. 2004. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* 0157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *J. Agri. Food Chem.* 52: 6042-6048.
- García, J. 2008. Evaluación del efecto de extractos etanólicos vegetales de *Phyllanthus niruri* L. (Flor escondida) y *Heliotropium indicum* L. (Rabo de alacrán) en el control de bacterias fitopatógenas del género *Xanthomonas*. Trabajo de Grado. Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela. 53 p.
- Gamboa, R.; F. Hernández; E. Guerrero; A. Sánchez. 2003. Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora infestans* Mont. (De Bary) con extractos vegetales metanólicos de Hojasen (*Flourensia cernua* D. C.), Mejorana (*Origanum majorana* L.) y Trompetilla [*Bouvardia ternifolia* (Ca.) Schlecht]. *Rev. Mex. Fit.* 21: 13 -18.
- Gill, A.I.; R.A. Holley. 2006. Disruption on *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *Int. J. Food Microbiol.* 108: 1-9.
- Guevara, Y.; A. Maselli; M. Sánchez. 1999. Uso potencial de extractos de plantas para el control de bacterias pertenecientes a los géneros *Erwinia* y *Pseudomonas*. *Fitopatol. Venez.* 12: 40-41.
- Guevara, Y.; A. Maselli; M. Sánchez. 2000. Los extractos acuosos vegetales en el control de bacterias fitopatógenas. FONAIAP. *Divulga. Venezuela.* 66: 36-39.
- Gupta, R.N.; V. Kartik; P. Manoj; P.S. Singh; G. Alka. 2010. Antibacterial activities of ethanolic extracts of plants used in folk medicine. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm.* 1(2): 529-535. Disponible en línea www.ijrap.net. [Consultado: 20/01/ 2020].
- Hayward, A. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annun. Rev. Phytopathology.* 29: 65-87.
- Hernández, A.; Bautista, S.; Velázquez, M. 2007. Prospectivas de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Rev. Fitotec. Mex.* 30: 119-123.
- Kiran, N. K.; V.B. Sanath; S.E. Manjunatha and N. Mallikarjuna. 2017. Effect of botanicals on *Ralstonia solanacearum* and bacterial wilt incidence in tomato. *International Journal of Chemical Studies* 5(6): 737-740.
- Lorian, V. 1980. *Antibiotics in laboratory medicine.* Department of Pathology Albert Einstein College of Medicine New York. USA. 432 p.
- Mainasara M.; B. Aliero; A. Aliero; M. Yakubu. 2012. Phytochemical and antibacterial properties of root and leaf extracts of *Calotropis procera*. *Nigerian J Basic Appl Sci.* 20: 1-6.
- Marcano, D.; M. Hasegawa. 2002. *Fotoquímica Orgánica.* Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela 536 p.
- Maselli, A.; L. Rosales; Y. Guevara. 2006. Uso de extractos vegetales sobre *Xanthomonas phaseoli*, causante de la quemazón en *Phaseolus vulgaris* L. [En línea]. Dirección URL: [http://ceniaphoy.\(12\).www.ceniap.gov.ve/pbd/revtec/ceniaphoy/articulo/n12/arti/maselli_a.htm](http://ceniaphoy.(12).www.ceniap.gov.ve/pbd/revtec/ceniaphoy/articulo/n12/arti/maselli_a.htm). [Consultado: 17/05/2017].
- Mostafa, A.A.; A.A. Al-Askar; K.S. Almaary; T.M. Dawoud; E.N. Sholkamy; M.M. Bakri. 2018. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences* 25: 361-366.
- Murthy, K.N.; K. Nagendra; F. Uzma; K. Soumya and C. Srinivas. 2014. Efficiency of *Ocimum sanctum* L. leaf extracts against bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum* in tomato. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3(12): 234-245.
- Peeters, N.; A. Guidot; F. Vaillau; M. Valls. 2013. *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Molecular Plant Pathology.* 14 (7): 651-662.

- Rizvi, S.; H. Haque; V. Singh; V. Rizvi. 1992. A discipline called allelopathy. In: Allelopathy: Basic and applied aspects. Rizvi, S.J. y V. Rizvi (Eds.) Chapman, London. pp. 1-10.
- Rodríguez, D.; J. Montilla. 2002. Disminución de la marchitez causada por *Fusarium* en tomate con extracto de *Citrus paradisi*. Manejo integrado de plagas (Costa Rica) 63: 46-50.
- Rodríguez, D.; M. Sanabria; J. Rodríguez. 2003. Inhibición de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; *Phytophthora infestans* y *Rhizoctonia solani* con extractos etanólicos de *Heliotropium indicum*. L. Fitopatología Venezolana 13: 22-24.
- Rueda-Puente, E.O.; L. G. Hernández-Montiel; R. J. Holguín-Peña; F. H. Ruiz Espinoza; E.J. López; M.A. Huez Lopez, J. Jiménez León, J. Borboa Flores; J. Ortega-García. 2014. *Ralstonia solanacearum*: Una enfermedad bacteriana de importancia cuarentenaria en el cultivo de *Solanum tuberosum* L. INVURNUS 9: 24-36.
- Sinha, S.N. 2013. Phytochemical profiles and antioxidant activities of the leaf extracts of *Gliricidia sepium*. International Journal of Innovations in Bio-Sciences. 3 (3): 87-91.
- Stauffer, A.; A. Orrego; A. Aquenio. 2000. Selección de extractos vegetales con efecto fungicida y/o bactericida. Rev. Ci. Tec. (Paraguay). 1: 29-33.
- Stefanova, M.; S. Rizo; M. Coronado. 2005. Efecto *in vitro* de extractos de plantas sobre especies bacterianas del género *Xanthomonas*. Fitosanidad. Rev. Cub. 9: 49-51.
- Tanaka, J.C.A.; C.C. da Silva; A.J.B. de Oliveira; C.V. Nakamura; B.P. Dias. 2006. Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. Braz J Med Biol Res 39: 387-391.
- Tiwari, B.K.; V.P. Valdramidi; C.P. O`Donnell; K. Muthukumarappan; P. Bourke; P.J. Cullen. 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. J. Agri. Food Chem. 57: 5987-6000.
- Trujillo, G. 1998. Fundamentos de bacterias fitopatógenas. Alcance 56. Revista de la Facultad de Agronomía. Venezuela. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 72 p.
- Vargas, J. 2008. Evaluación del efecto de tres extractos vegetales sobre la Sigatoka Negra, el desarrollo y la producción, en el cultivo del plátano (Musa AAB cv. Hartón). Trabajo de grado. Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado. Barquisimeto, Venezuela. 46 p.
- Vargas, D.; M. Soto; V. González; E. Mark; A. Martínez. 2006. Cinética de acumulación y distribución de flavonoides en guayaba (*Psidium guajava* L.). Agrociencia. 40: 109-115.
- Vivero, J.; J. Castaño. 2006. Evaluación *in vitro* de extractos vegetales sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Rev. Agro. 14: 37-50.
- Vudhivanich, S. 2003. Potential of some thai herbal extracts for inhibiting growth of *Ralstonia solanacearum*, the causal agent of bacterial wilt of tomato. Kamphaengsaen Acad. J. 1(2): 70-76. (En línea). Dirección URL: <http://re.kps.ku.ac.th/web-journal/e%20journal%2046-49/Y%201/N%202/kpsvln2-1.pdf>. [Consultado: 08/05/2019]
- Winstead, N.; A. Kelman. 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology. 42: 628-634.