



Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional del Nordeste

TRABAJO FINAL DE GRADUACION MODALIDAD TESINA

Utilización de aceites esenciales para el control de bacterias fitopatógenas que afectan al cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Autora: Hebe Sherina Moglia

Asesora: Dra. María Cecilia Prieto

Lugar de realización: Laboratorio de Fisiología Vegetal e Interacción Planta-Microorganismo (FCA - UNNE - IBONE)

Año: 2024

Corrientes, 2024

Dedicatoria

A las personas que me acompañaron durante todo este tiempo y también a quienes, desde otro lugar, continúan guiándome en cada paso de este camino.

A mi familia, que con amor y trabajo me educó y apoyó en toda mi formación personal y profesional, impulsándome siempre a seguir mis sueños desde el día a día y a través de los kilómetros.

A los amigos que, brindando su ayuda y confianza, me acompañaron en cada cambio dentro del proceso e hicieron de esto algo divertido, memorable y único.

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a mi asesora, la Dra. Cecilia Prieto, por su inigualable compromiso, paciencia y disposición durante el desarrollo de este proyecto. También, por guiarme a profundizar conocimientos mediante participaciones en diferentes trabajos y congresos. Sin duda, lo adquirido durante este proceso trasciende lo académico.

A la Dra. Ernestina Galdeano por proporcionar el espacio y los recursos necesarios para el trabajo, permitiendo el desarrollo de las actividades dentro del laboratorio.

Finalmente, quisiera agradecer a la institución que hizo posible esta instancia de aprendizaje al abrir sus puertas y brindar la oportunidad de formarme profesionalmente. Lo aprendido durante estos años atravesó muchas partes de mi vida, marcando quien soy y quien puedo llegar a ser de aquí en adelante. Infinitas gracias.

ÍNDICE

1. Introducción y antecedentes	5
Las plantas y los productos naturales	5
Los aceites esenciales y su bioactividad	6
El cultivo de tomate y las bacterias fitopatógenas que lo afectan	7
2. Objetivos	7
Objetivo general	7
Objetivos específicos	7
3. Materiales y métodos	7
3.1 Materiales	7
3.2 Evaluación de la actividad antibacteriana	8
3.2.1 Método de difusión en disco	8
Construcción de la curva de calibración	8
Determinación de la concentración de trabajo	8
Tratamientos	8
Evaluación de los aceites esenciales y sus mezclas contra <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	8
3.2.2 Método de microdilución en caldo	8
3.3 Evaluación de la actividad fitotóxica	10
Desinfección de semillas	10
Técnica de fitotoxicidad en semillas	10
3.4 Análisis estadísticos	10
4. Resultados y discusión	10
4.1 Composición química de los aceites esenciales	10
4.2 Actividad antibacteriana	12
4.2.1 Curva de calibración	12
4.2.2 Técnica de difusión en disco	13
4.2.3 Técnica de microdilución en caldo y determinación de la concentración bactericida mínima	15
4.3 Ensayo de fitotoxicidad sobre semillas de tomate	18
5. Conclusión	19
6. Bibliografía	20

1. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

Las Plantas y Los Productos Naturales

Las plantas cuentan con la capacidad de sintetizar metabolitos de naturaleza volátil, algunas lo hacen en pequeñas proporciones mientras otras lo producen de manera casi ilimitada, siendo conocidas bajo el nombre de “plantas aromáticas” (Usano-Alemaný *et al.*, 2014). Estos productos naturales están compuestos por moléculas con variadas estructuras, con diferentes propiedades de solubilidad y distintos orígenes biosintéticos (Ringuelet & Viña, 2013), lo que las hace una fuente natural de sustancias con diversas propiedades biológicas (Usano-Alemaný *et al.*, 2014; Carezzano *et al.*, 2017; Zygadlo *et al.*, 2017). Entre ellos se diferencian los metabolitos primarios, aquellos que cumplen funciones vitales dentro del organismo, y los secundarios, que son aprovechados por el vegetal para interactuar con el medio cumpliendo funciones ecológicas como atraer insectos polinizadores o repeler predadores y patógenos, entre otras (Ringuelet & Viña, 2013).

Los Aceites Esenciales y su Bioactividad

Dentro de los productos naturales, se destacan los aceites esenciales (AEs). Estos compuestos son líquidos oleosos aromáticos que se pueden encontrar en diferentes órganos vegetales como hojas, raíces, semillas, flores y frutos (Martínez, 1996). Se trata de mezclas complejas de sustancias volátiles (Usano-Alemaný *et al.*, 2014; Cañigüeral & Vila, 2007) que forman parte del metabolismo secundario de las plantas (Usano-Alemaný *et al.*, 2014) y que en su mayoría se obtienen por destilación (Cañigüeral & Vila, 2007). Como productos del metabolismo secundario, están sujetos a cambios en función de las necesidades de la planta, condicionados por diversos factores que hacen variar su composición bioquímica característica, diferenciando así un individuo de otro, aun siendo de la misma especie. Estas variaciones determinan la composición y volumen del AE producido, proceso que resulta influenciado por factores como la especie, parte de la planta que se ha utilizado para la extracción, las condiciones climáticas, edáficas y de manejo, así como el proceso mismo de extracción o su almacenamiento (Usano-Alemaný *et al.*, 2014). Entre los posibles componentes de los AEs se destacan los terpenos, principalmente monoterpenos y sesquiterpenos, los fenilpropanoides, y los compuestos alifáticos de cadena corta. Esta diversidad estructural determina que muchos AEs puedan tener actividades muy variadas (Cañigüeral & Vila, 2007) tal como propiedades antifúngicas, que causan disminución en las tasas de crecimiento o incluso la muerte de diferentes especies de hongos (Barajas Pérez *et al.*, 2011), y antibacterianas (Ávila *et al.*, 2013), inhibiendo el crecimiento bacteriano en forma temporal (efecto bacteriostático) o produciendo la muerte bacteriana (efecto bactericida) (García-Roche Saracco, 2014). Adicionalmente, la aplicación de mezclas binarias de diferentes AEs puede incrementar su diversidad estructural, pudiendo a su vez mejorar su efectividad como antimicrobianos. Esto depende de la interacción de los compuestos constituyentes de los AEs implicados en cada mezcla, ya que estos compuestos pueden presentar interacciones sinérgicas, antagónicas o neutras (Zygadlo *et al.*, 2017).

Los AEs obtenidos de plantas de menta (*Mentha x piperita* L.: MP), lavanda (*Lavandula angustifolia* Miller: LA), y albahaca (*Ocimum basilicum* L.: OB), constituyen algunos ejemplos de AEs con bioactividad contra microorganismos. MP, LA y OB son plantas aromáticas pertenecientes a la familia Lamiaceae, las cuales tienen importancia económica al ser ampliamente utilizadas en la industria de cosméticos, alimentos y productos farmacéuticos a

nivel global. Los AEs obtenidos a partir de estas especies de plantas han demostrado poseer actividad antifúngica (Camiletti *et al.*, 2014) y antibacteriana (Rivas *et al.*, 2015; Moussii *et al.*, 2020; Prieto *et al.*, 2020) contra diferentes especies de microorganismos.

El Cultivo de Tomate y las Bacterias Fitopatógenas que lo Afectan

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las tres hortalizas más demandadas en el mundo, en conjunto con la papa y la cebolla, registrando una producción de 160 millones de toneladas anuales (Bergougnoux, 2014). En Argentina, su producción promedio anual, tanto para industria como para consumo en fresco, ronda las 1.100.000 toneladas y 17.000 hectáreas productoras (Scarpatti, 2020). El cultivo de tomate se desarrolla en distintas zonas productoras a lo largo del país, como Mendoza y San Juan (región cuyana), Salta y Jujuy (región NOA), Corrientes y Formosa (región NEA), Río Negro, y Buenos Aires (cinturones hortícolas) (Scarpatti, 2020). De las regiones nombradas, NEA y NOA son las principales encargadas de producir tomate en contra-estación de marzo a diciembre, asegurando un abastecimiento continuo del mercado para consumo en fresco (Scarpatti, 2020). En este contexto, la provincia de Corrientes se posiciona como la principal productora de tomate bajo cubierta (CNA, 2002). Sin embargo, las condiciones climáticas, con temperaturas medias máximas que alcanzan los 33,2°C y humedad relativa de hasta 81,2% (SMN, 2022), benefician el desarrollo de diferentes enfermedades fitopatógenas provocando grandes pérdidas al alterar la calidad del fruto, el rendimiento de la producción y la viabilidad de las plantas.

En la actualidad, el tomate es susceptible a cerca de 200 enfermedades y plagas. Entre las principales bacterias que lo afectan se destacan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*), causantes de las enfermedades Cancro Bacteriano del tomate y Peca Bacteriana del tomate, respectivamente (Rivera González, 2021). Ambas bacteriosis presentan distribución mundial y su transmisión se da a través de semillas infectadas (sólo *Cmm*), material vegetal y equipamiento contaminado, y se dispersan naturalmente por aerosoles y salpicaduras de lluvia, ingresando posteriormente a los tejidos por medio de heridas, estomas, tricomas o hidátodos de las hojas (López, 1984; Borboa *et al.*, 2009; García-Roche Saracco, 2014; Rivera González, 2021). El cancro bacteriano es producido por *Cmm*, un bacilo Gram positivo, no móvil, aeróbico, que en agar nutritivo desarrolla colonias de color amarillo claro a naranja. Esta patología es considerada una enfermedad vascular grave, poco frecuente pero severa y de gran importancia económica (López, 1984), que causa la marchitez de la planta por obstrucción de los vasos xilemáticos y produce lesiones costrosas en los frutos (cancros) (Sen *et al.*, 2015; Martínez *et al.*, 2018). El primer síntoma consiste en el decaimiento y marchitez de las hojas basales, seguido de coloración amarillenta en el interior del tallo, aparición de estrías necróticas desde el peciolo, folíolos castaños que quedan curvados hacia abajo y finalmente formación de lesiones en los frutos (López, 1984; Gleason *et al.*, 1993; Borboa *et al.*, 2009). Por otro lado, la peca bacteriana es causada por *Pst*, una bacteria Gram negativa cuyo ciclo infectivo se divide en una fase epífita sobre la superficie de los tejidos vegetales y otra fase endofítica donde las bacterias ingresan al tejido y colonizan el espacio apoplástico intercelular (Payá Montes, 2017; Rivera González, 2021). Se manifiesta sobre hojas como manchas de color marrón oscuro rodeadas por un halo clorótico (López, 1984; García-Roche Saracco, 2014), lesiones en el fruto (1 mm) y, si no se controla a tiempo, puede provocar un amarillamiento generalizado, seguido de desecación foliar (Rivera González, 2021) y posterior merma en el rendimiento.

Las recomendaciones para el tratamiento de estas enfermedades se basan principalmente en la prevención por medio de prácticas culturales y sanitización, y su control se realiza mayormente utilizando compuestos sintéticos (Csizinszky, 2005; Bhat *et al.*, 2010; Sen *et al.*, 2015; Potnis *et al.*, 2015; Mitidieri *et al.*, 2018). Sin embargo, los mismos no han resultado del todo efectivos y todavía no ofrecen una solución económicamente aceptable para los productores (Martínez *et al.*, 2018; Sen *et al.*, 2015). La dificultad que representa el manejo de las enfermedades bacterianas en la actualidad está dada por el empleo inadecuado de

antibióticos y compuestos de cobre que pueden generar toxicidad bajo uso prolongado, tanto para consumidores como para el ambiente, agravándose por la rápida generación de resistencias a antibióticos por parte de los microorganismos (Carezzano *et al.*, 2017). Esto sumado a lo imprevisto de sus ataques y las escasas posibilidades de control de las enfermedades una vez instaladas, las convierten en un riesgo potencial para el cultivo (López, 1984).

En este marco, la utilización de productos naturales como los AEs es cada vez más reconocida como estrategia válida para el control de microorganismos fitopatógenos que afectan a los distintos cultivos de interés (Camiletti *et al.*, 2014; Carezzano *et al.*, 2017; Prieto *et al.*, 2020; Sotelo *et al.*, 2021), siendo necesario encontrar compuestos que tengan efectos antibacterianos con nuevos mecanismos de acción, que puedan contribuir a la prevención del desarrollo de enfermedades (Coy Barrera & Acosta, 2013; Carezzano *et al.*, 2017), que dificulten la generación de resistencia por parte de los microorganismos (Falleh *et al.*, 2020), y que permitan reducir la liberación de productos contaminantes no deseados al ambiente (Coy Barrera & Acosta, 2013; Carezzano *et al.*, 2017).

En este contexto, el presente trabajo propone evaluar el uso de AEs de las especies vegetales *M. x piperita* L., *L. angustifolia* Miller y *O. basilicum* L. como potenciales controladores de las bacterias fitopatógenas *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* y *P. syringae* pv. *tomato*.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar el uso de aceites esenciales como potenciales controladores de la peca bacteriana del tomate y del cancro bacteriano del tomate bajo condiciones *in vitro*.

Objetivos específicos

- Caracterizar químicamente los aceites esenciales en estudio.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de las plantas aromáticas *M. x piperita* L., *O. basilicum* L., *L. angustifolia* Miller, y sus combinaciones, contra las bacterias fitopatógenas *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* y *P. syringae* pv. *tomato* en condiciones *in vitro*, y determinar las combinaciones de aceites esenciales más efectivas contra ambas bacterias.
- Estudiar el efecto fitotóxico de las combinaciones de aceites esenciales seleccionadas sobre la germinación de semillas de tomate.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales

Los AEs utilizados en este trabajo pertenecen a las especies *Mentha x piperita* L., *L. angustifolia* Miller y *O. basilicum* L., y fueron obtenidos mediante hidrodestilación por un productor de la ciudad de Merlo (San Luis). La composición de los AEs fue analizada por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC – MS) en el laboratorio de tecnología de alimentos (LabTA - FCA - UNC). La identificación de los compuestos constituyentes se llevó a cabo por comparación utilizando la base datos NIST (versión 2.0) y bibliografía específica. La composición relativa de cada compuesto se calculó teniendo en cuenta el porcentaje (%) de cada compuesto en relación a la composición total del AE.

Las especies fitopatógenas utilizadas (*P. syringae* pv. *tomato* y *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*), fueron provistas por el Laboratorio de Fisiología Vegetal e Interacción Planta Microorganismo (IBONE - CONICET - UNNE). Las semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. var. *platense*) fueron provistas por el INTA (Corrientes).

3.2. Evaluación de la actividad antibacteriana

3.2.1. Método de difusión en disco

La actividad antibacteriana de los AEs en estudio y de sus mezclas fue evaluada inicialmente sobre *Pst*, por medio de la técnica de difusión en disco. Para ello, en primer lugar, se construyó una curva de concentración bacteriana vs. absorbancia, que fue utilizada en la determinación de la concentración de trabajo de inóculo, para luego enfrentar los diferentes AEs y sus combinaciones contra *Pst*.

Construcción de la curva de calibración

Se construyó una curva de calibración entre la absorbancia del inóculo (medida a 600 nm) y el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en placa. Para ello se realizó un cultivo de *Pst* en caldo tripteína-soja (TSB), y se lo incubó a temperatura ambiente (~25°C) durante 24 h en agitación. Una vez crecido el inóculo, se realizaron diluciones seriadas (con factor 1/2) para medirles la absorbancia. Paralelamente, se realizaron diluciones seriadas (con factor 1/10), de las cuales se sembraron 20 µl en agar tripteína-soja (TSA), para realizar el recuento de colonias mediante la técnica de la microgota (Sotelo *et al.*, 2021), realizando recuentos en aquellas placas que desarrollaron un número menor a 30 UFC. Los datos obtenidos fueron utilizados para realizar un gráfico de dispersión, para luego ajustar una curva de tendencia utilizando el software Excel (Microsoft Office). Esto permitió encontrar una ecuación matemática que represente la absorbancia equivalente a la concentración del inóculo, lo que posibilitó la posterior elaboración de inóculos de concentración conocida.

Determinación de la concentración de trabajo

Se realizó un cultivo de *Pst* en caldo tripteína-soja (TSB), y se lo incubó a temperatura ambiente (~25°C) durante 24 h en agitación. Luego de la incubación, se midió la absorbancia del inóculo y se determinó su concentración utilizando la ecuación obtenida. El inóculo obtenido fue llevado a una concentración de 1×10^{15} (UFC/mL) utilizando la ecuación:

$$\text{Volumen final} \times \text{Concentración final} = \text{Volumen inicial} \times \text{Concentración inicial}$$

Tratamientos

Se analizaron combinaciones de los AEs de OB, LA y MP, realizando mezclas binarias en diferentes proporciones: 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 3:1 y 0:1. Como control negativo se utilizó agua destilada estéril. En total, los tratamientos se constituyeron por 3 AEs puros, 15 combinaciones y 1 control con agua estéril.

Evaluación de los AEs y sus mezclas contra *Pst*

Para realizar la técnica de difusión en disco, se dispersaron superficialmente 100 µL de inóculo bacteriano de *Pst* (1×10^{15} UFC/mL) sobre placas de Petri con medio nutritivo Tripteína Soya Agar (TSA). Luego se colocaron discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro, embebidos en 10 µL de los AEs o sus combinaciones, ubicándolos cuidadosamente sobre el medio inoculado con las suspensiones bacterianas, a razón de 2 discos por placa. Las placas se incubaron a 28°C durante 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se midió el halo de inhibición de cada disco. Los ensayos fueron realizados utilizando dos réplicas y fueron repetidos tres veces.

3.2.2 Método de microdilución en caldo

En base a los resultados obtenidos a partir de la técnica de difusión en disco, se seleccionaron dos combinaciones de AEs para realizar la técnica de microdilución en caldo, siguiendo a Prieto *et al.* (2020) con algunas modificaciones. Este método se utilizó a fin de obtener una valoración cuantitativa de la actividad antibacteriana de los AEs y sus combinaciones contra *Pst* y *Cmm*, a través de la determinación de la CIM (concentración inhibitoria mínima) y de la CBM (concentración bactericida mínima).

La técnica se realizó siguiendo tres pasos:

- 1) *Determinación de la concentración de trabajo*: Se realizaron dos cultivos bacterianos en medio TSB (tripteína soya caldo), uno de *Pst* y otro de *Cmm*. Los cultivos se dejaron crecer en agitación durante 48 hs, para luego realizar diluciones seriadas (factor 1/10). De cada dilución se tomaron 170 μ l, los cuales fueron trasvasados a un tubo Eppendorf. Finalmente, a cada tubo se le agregaron 10 μ l de solución de sal sódica de resazurina (0,01%), compuesto que vira de color de azul a rosado cuando la concentración de inóculo es $\sim 10^6$ UFC/ml, y se incubó a 28°C durante dos horas antes de realizar la lectura. La técnica requiere tomar la dilución 10 veces menos concentrada ($\sim 10^5$ UFC/ml) que la dilución que vira de color. (Figura 1).
- 2) *Preparación de las diluciones para los distintos tratamientos*: Se realizaron 8 diluciones seriadas de los AEs de OB, LA y sus mezclas binarias en proporciones 1:2 y 2:1. Para ello, la primera dilución se realizó en dimetilsulfóxido (DMSO), a fin de favorecer la solubilidad de los AEs, utilizando una relación AE/mezcla: DMSO igual a 2:3. Las diluciones subsiguientes se realizaron en un factor 1/2 en medio TSB.
- 3) Para evaluar la actividad antibacteriana de cada dilución de AE o mezcla de AEs, se colocaron 170 μ l de la solución de trabajo (cultivo bacteriano) en un tubo Eppendorf, al que se le agregaron 20 μ l de la dilución a evaluar. Los tubos fueron incubados durante 22 hs a 28°C. Pasado este tiempo, se agregaron 10 μ l de solución de resazurina, y se dejó nuevamente en incubación durante 2 hs. Como control de viabilidad del cultivo (control positivo), se realizó la misma técnica utilizando medio TSB en lugar de la dilución de AE, y como control de inocuidad del medio utilizado (control negativo), también se utilizó solamente el medio TSB (190 μ L por tubo). Por último, se procedió a la lectura de los tubos, teniendo en cuenta los cambios de color del indicador redox resazurina, y se determinó la CIM como la mínima concentración del AE que inhibió completamente el crecimiento. Aquellos tubos que permanecieron azules luego de la incubación, fueron sembrados en placas de petri con medio TSA, aplicando 5 μ l del contenido del tubo sobre el medio. Luego de la siembra, las placas fueron incubadas durante 48 hs. a 28°C, para finalmente determinar la CBM como la mínima dilución a la que no se visualizó crecimiento bacteriano. Los ensayos se realizaron utilizando dos réplicas y tres repeticiones.

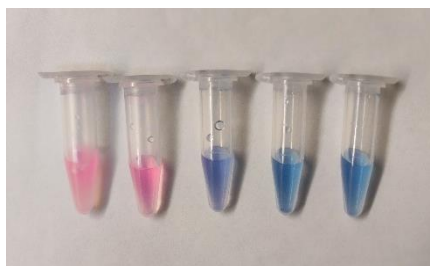


Figura 1. Diluciones seriadas (1:10) para hallar concentración de trabajo en técnica de microdilución en caldo, identificadas con el indicador resazurina.

3.3 Evaluación de la actividad fitotóxica

Una vez establecidos los resultados de la técnica anterior se seleccionó una combinación de AEs y se continuó con la evaluación de su actividad fitotóxica frente a la germinación de semillas de tomate, utilizando los valores de 1 y 2 veces la CBM siguiendo a Raliya *et al.* (2015), realizando algunas modificaciones.

Desinfección de semillas

Inicialmente, las semillas fueron colocadas en un tubo Falcon al cual se agregaron 30 mL de una solución de agua lavandina (NaClO) al 2,5%, y se las mantuvo en agitación constante durante 4 minutos. Luego, las semillas fueron agregadas a 30 mL de etanol 70%, manteniéndolas en agitación durante 2 minutos. Finalmente, se realizaron enjuagues sucesivos de las semillas usando agua destilada estéril, y se dejaron secar sobre papel absorbente estéril.

Técnica de fitotoxicidad en semillas

El procedimiento consistió en embeber las semillas previamente desinfectadas, cubriéndolas completamente con 2 µl de la solución correspondiente a cada tratamiento y dejarlas secar. Seguido de esto, se colocaron las semillas en cajas de Petri sobre papel secante humedecido con agua esterilizada, para luego llevarlas a incubación a 28°C durante 7 días. Finalizada la incubación, se cuantificó el porcentaje de semillas germinadas y la longitud de las radículas. Los tratamientos utilizados fueron 1 y 2 veces la concentración bactericida mínima (CBM) de la combinación seleccionada de OB y LA (1:2). Estas soluciones fueron realizadas utilizando una solución de etanol al 5% como solvente. El control se elaboró utilizando únicamente una solución de etanol al 5%. Se emplearon 10 semillas de tomate para cada tratamiento y para el control en cada repetición. Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.4 Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2018). Para ello se analizó en primer lugar la normalidad de los datos utilizando el test de Shapiro-Wilk. Aquellos conjuntos de datos cuya distribución no fue normal, fueron analizados con el test Kruskal-Wallis para datos no paramétricos, mientras que aquellos que resultaron positivos para normalidad y homocedasticidad se analizaron mediante análisis de varianza (ANAVA).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Composición química de los AEs

En la Tabla 1 se observan los resultados de la composición química de LA, MP y OB, obtenidos mediante cromatografía gaseosa acoplada con espectrometría de masas.

Tabla 1. Abundancia relativa de los componentes de los AEs de *Lavandula angustifolia* (LA), *Mentha x piperita* (MP) y *Ocimum basilicum* (OB), según análisis GC – MS.

Compuesto	Tiempo de retención (minutos)	LA	MP	OB
α -Pino	6.35	-	<1	-
β -Pino	6.98	-	<1	-
α -Terpino	7.53	-	<1	-
o-Cimeno	7.65	-	<1	-
Limoneno	7.73	-	1%	-
Eucalipto	7.80	13%	8%	7%
γ -Terpino	8.1	-	<1	-
Linalol	8.16	39%	-	55%
Cis-sabineno-hidrato	8.30	-	2%	-
Terpinoleno	8.54	-	<1	-
β -Linalol	8.60	-	<1	-
Trans-sabineno-hidrato	8.69	-	<1	-
Alcanfor	9.34	15%	-	-
Mentona	9.39	-	24%	-
Isomentona	9.49	-	4%	-
Neomentol	9.53	-	3%	-
Mentol	9.66	-	40%	-
Isomentol	9.78	-	<1	-
Terpineol	9.82	-	<1	-
Borneol	9.97	6%	-	-
4-Terpineol	10.18	5%	-	-
Pulegona	10.36	-	<1	-
Piperitona	10.55	-	<1	-
Estragol	10.61	-	-	10%
Neomentilioacetato	10.68	-	<1	-
Mentil acetato	10.88	-	3%	-
Isomentil acetato	11.10	-	<1	-
Piperitenona	11.56	-	3%	-
Bergamiol	11.90	5%	-	-
β -Bourboneno	12.11	-	<1	-
β -Cariofileno	12.54	-	2%	-
β -Terpinil acetato	12.76	-	-	-
γ -Muroleno	13.19	-	2%	-
Eugenol	14.59	-	-	3%
β -Bourboneno	15.37	-	-	3%
β -Elemeno	15.51	-	-	1%
β -Cariofileno	16.27	<1	-	-
α -Bergamoteno	16.58	-	-	4%
α -Guaiano	16.64	-	-	1%
β -Farneseno	17.04	4%	-	-
α -Cariofileno	17.14	-	-	<1

β -Cubebeno	17.30	-	-	<1
Germacreno D	17.76	-	-	1%
γ -Gurjuneno	18.11	-	-	<1
δ -Guaieno	18.26	-	-	1%
β -Elemeno	18.39	-	-	<1
γ -Muroleno	18.53	-	-	2%
δ -Cardineno	18.63	-	-	<1
Calameneno	18.69	-	-	<1

El AE de LA resultó compuesto mayoritariamente por linalol (39%), alcanfor (15%) y eucaliptol (13%), valores que resultan similares a los reportados por Lakušić *et al.* (2014) para AEs de LA obtenidos a partir de flores, los cuales presentaron una composición dominada por linalol (28,1% - 38,7%), eucaliptol (7,1% - 18,1%), alcanfor (3,7% - 5,2%) y borneol (12,9% - 14,8%). Adicionalmente, Marqués (2016) también reportó al linalol entre los compuestos mayoritarios del AE de LA (31,55%), pero además halló dentro de estos compuestos al acetato de linalilo (37,34%) y β -ocimeno (4,8%), mostrando una diferencia en la composición con lo visto en el presente trabajo. Estas diferencias en la composición química del AE de LA pueden deberse a diferencias en los órganos utilizados para la extracción del AE, así como también variaciones en la estación y estadio fenológico de las plantas durante la cosecha (Lakušić *et al.*, 2014). El AE de MP presentó mayores concentraciones de mentol (40%), mentona (24%) y eucaliptol (8%), composición similar a la obtenida en el estudio de Verma *et al.* (2010), quienes reportaron mentol (22,56% - 42,83%), mentona (3,46% - 33,77%) y eucaliptol (2,25% - 15,94%) dentro de los compuestos del AE de MP, dependiendo de los diferentes tiempos de cosecha (30 – 180 días de vida de la planta) y variedades utilizadas. Finalmente, el AE de OB obtuvo una mayor proporción de linalol (55%), seguido por estragol (10%) y eucaliptol (7%), acercándose estos valores a lo expresado por Acosta *et al.* (2003) quienes detallaron la presencia mayoritaria de linalol (54,28%) y eucaliptol (4,21%) pero también de anisol (26,50%) y eugenol (9,54%).

El análisis de la composición química de los AEs permitió observar la presencia de eucaliptol en la conformación de los tres AEs en estudio. Asimismo, permitió destacar la importante participación del linalol en dos de los AEs estudiados, LA y OB. En cuanto a la comparación de la composición química de cada AE con lo reportado en la bibliografía, pudieron observarse patrones similares a los reportados en trabajos previos, aunque en algunos casos se encontraron diferencias en la composición, que podrían responder a múltiples factores externos relacionados al ambiente de desarrollo de las plantas de donde se obtuvieron los AEs, a las variedades utilizadas, o bien, al estado fenológico en el que se encontraban las plantas al momento de la cosecha.

4.2. Actividad antibacteriana

4.2.1. Curva de calibración

En la Figura 2 se observa la curva de concentración de inóculo vs. absorbancia. En la misma se encuentra la ecuación de ajuste de la curva que fue utilizada posteriormente para obtener la concentración de trabajo adecuada para realizar la técnica de difusión en disco. La curva se

construyó midiendo los valores de absorbancia de una serie de diluciones realizadas a partir del cultivo de *Pst* con un espectrofotómetro y realizando el recuento de UFC/mL (Figura 3), obteniendo de esta manera los datos suficientes para realizar la curva de concentración del inóculo vs. absorbancia.

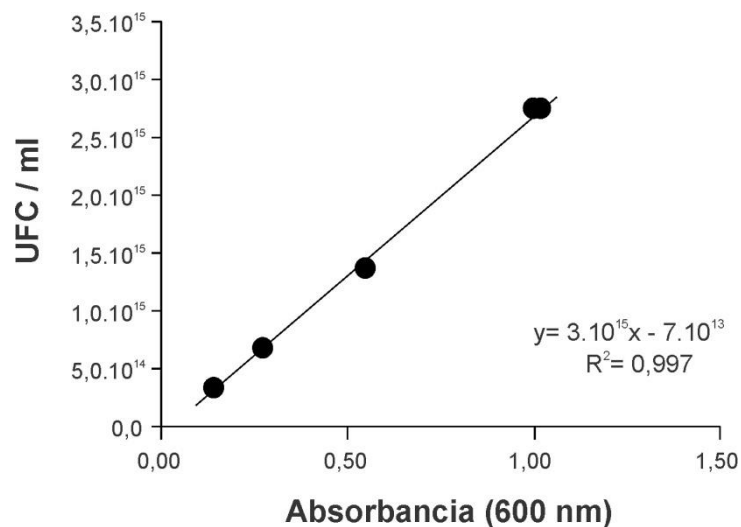


Figura 2. Curva de relación entre la concentración del inóculo (expresado como unidades formadoras de colonias o UFC/mL) y la absorbancia medida a 600 nm.

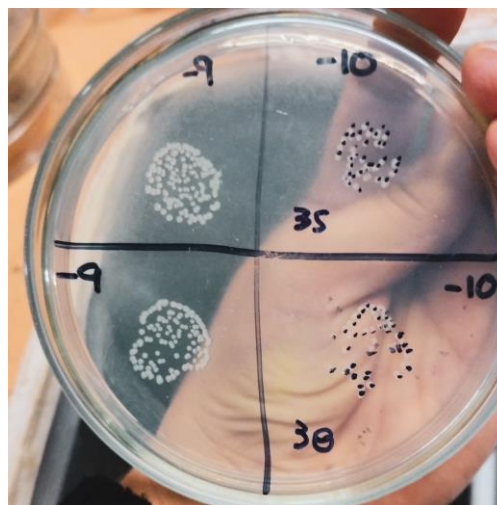


Figura 3. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de Petri, utilizando la técnica de recuento en microgota.

4.2.2. Técnica de Difusión en Disco

Analizando los resultados obtenidos con la técnica de difusión en disco, expuestos en la tabla 2, se pudo observar que todos los AEs en estudio y sus combinaciones mostraron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Pst* diferenciándose significativamente del control (ANOVA, $p=0,01$), y presentando halos de inhibición de entre 7,80 y 10,20 mm (Figura 4). Resultados similares fueron obtenidos en el trabajo realizado por Rivas *et al.* (2015) donde demuestran la efectividad del uso de AE de OB sobre distintos microorganismos, mostrando halos de inhibición de entre 11 y 12 mm contra bacterias Gram-positivas y de 8 a 9 mm contra bacterias Gram-negativas. Estos resultados también se condicen con lo expuesto por Camele *et al.*, (2021) quienes reportaron

que el AE de MP presentó un efecto inhibitorio contra otro patovar de *P. syringae* (*P. syringae* pv. *phaseolicola* -*Psp*) mostrando halos de inhibición entre 19,5 y 39,5 mm al ser expuesto a diferentes concentraciones del AE de MP (0,1 mg/mL – 10 mg/mL). La presencia de halos de inhibición de mayor diámetro, indica que *Psp* resultó mucho más susceptible al AE de MP en comparación con *Pst*, según los resultados obtenidos en el presente trabajo. Asimismo, también existen registros de resultados positivos en cuanto a la actividad antibacteriana del AE de LA tal como lo evidencian Moussii *et al.* (2020) mostrando halos de inhibición de entre 8,67 y 43 mm sobre bacterias diferentes, variando concentraciones de trabajo.

Tabla 2. Inhibición de AEs de *Lavandula angustifolia* (LA), *Mentha x piperita* (MP), *Ocimum basilicum* (OB) y sus combinaciones sobre *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

Tratamiento*	Diámetro del halo de inhibición \pm DE (mm)**
Control (Agua)	6,0 \pm 0,00 ^A
LA	8,5 \pm 0,96 ^B
OB	8,5 \pm 1,30 ^B
MP	7,8 \pm 1,40 ^B
OB:LA (1:1)	9,6 \pm 0,50 ^B
OB:LA (1:2)	10,2 \pm 0,90 ^B
OB:LA (1:3)	9,9 \pm 1,70 ^B
OB:LA (2:1)	10,2 \pm 2,20 ^B
OB:LA (3:1)	9,3 \pm 0,80 ^B
MP:LA (1:1)	9,7 \pm 1,50 ^B
MP:LA (1:2)	9,1 \pm 0,50 ^B
MP:LA (1:3)	9,4 \pm 1,70 ^B
MP:LA (2:1)	8,5 \pm 0,90 ^B
MP:LA (3:1)	9,25 \pm 0,20 ^B
MP:OB (1:1)	9,13 \pm 0,53 ^B
MP:OB (1:2)	8,25 \pm 0,71 ^B
MP:OB (1:3)	9,37 \pm 0,17 ^B
MP:OB (2:1)	9,25 \pm 0,35 ^B
MP:OB (3:1)	10,03 \pm 1,68 ^B

*Entre paréntesis se detallan las proporciones de cada AE utilizadas para preparar las mezclas correspondientes a cada tratamiento.

**Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (ANAVA, $\alpha=0,05$).

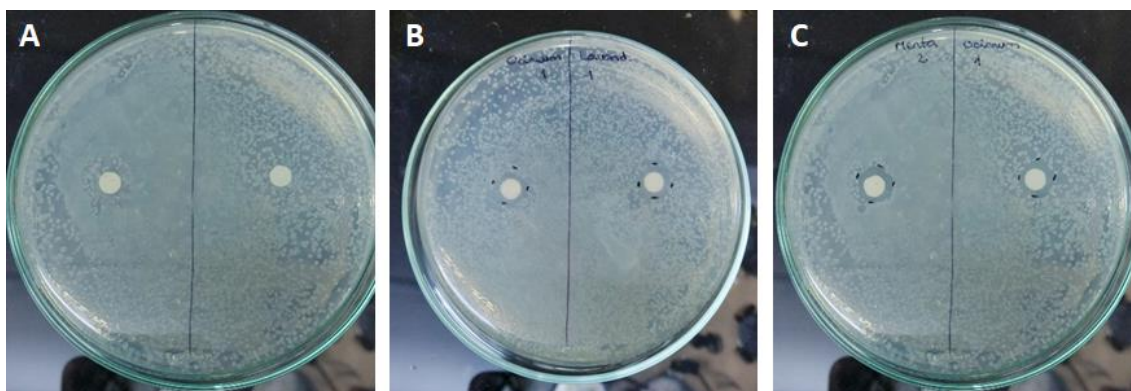


Figura 4. Técnica de difusión en disco en placas de Petri. A) Placa control (agua) sin halo de inhibición, y tratamientos OB:LA (1:1) (B), y MP:OB (1:2) (C), con halos de inhibición, respectivamente.

Las diferentes combinaciones de AEs evaluadas no mostraron diferencias significativas con respecto a los tratamientos con AEs puros (Tabla 2). Las diferentes combinaciones de AEs estudiadas en este trabajo, han reportado diferentes efectos (aditivo, sinérgico o indiferente) dependiendo de las especies bacterianas contra las que se enfrentaron. Angane *et al.* (2023) reportaron que las combinaciones de AEs de LA y MP ejercen un efecto sinérgico en su actividad antibacteriana contra las bacterias *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. En otro estudio, de Rapper *et al.* (2013) mostraron que la combinación de AEs de LA y OB ejercen un efecto aditivo sobre *Staphylococcus aureus* y *P. aeruginosa*. Adham (2015) reportó que la combinación de AEs de MP y OB ejercieron un efecto indiferente al enfrentarla contra *S. aureus*, y un efecto sinérgico cuando fue enfrentada contra *S. auricularis*, *Streptococcus mitis*, *S. pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*. Estas variaciones en el efecto de los AEs y sus combinaciones parecen responder a la susceptibilidad de las diferentes especies bacterianas ante estos compuestos.

Si bien no se encontraron diferencias significativas entre los efectos de los AEs tratados, la presencia de una ligera expresión superior del halo de inhibición en los tratamientos OB:LA (1:2) y OB:LA (2:1) permitió seleccionarlos, en conjunto con sus AEs constitutivos puros, para realizar los análisis subsiguientes.

4.2.3. Técnica de microdilución en caldo y determinación de la CBM

En la Tabla 3 se encuentran los resultados de la CIM y la CBM obtenidas para estos AEs y sus combinaciones al enfrentarlos contra *Pts* y *Cmm*.

La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), tal como se ve en la Figura 5, se pudo determinar para todos los tratamientos aplicados a las dos especies bacterianas en estudio. Lo mismo sucedió con la determinación de la CBM (Figura 6). Estos resultados indican que todos los AEs analizados y sus combinaciones presentaron actividad bacteriostática y bactericida. También se observó que dichos valores de CIM y CBM (Tabla 3), tanto para *Pst* como para *Cmm*, coincidieron dentro de cada tratamiento, es decir que la dosis de AE o de las combinaciones utilizada para inhibir el crecimiento bacteriano en cada tratamiento también es capaz de eliminar al patógeno en cuestión.

Tabla 3. Concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) de AEs de *Lavandula angustifolia* (LA), *Ocimum basilicum* (OB) y sus combinaciones sobre *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Bacteria fitopatógena	Tratamiento	Técnica	Concentración \pm DE (ml/L)*
<i>Pst</i>	LA	CIM	26,66 \pm 11,55 ^a
		CBM	26,66 \pm 11,55 ^A
	OB	CIM	23,33 \pm 8,16 ^a
		CBM	23,33 \pm 8,16 ^A
	OB: LA (1:2)	CIM	20,00 \pm 0 ^a
		CBM	20,00 \pm 0 ^A
	OB:LA (2:1)	CIM	20,00 \pm 0 ^a
		CBM	20,00 \pm 0 ^A
	Control	CIM	-
		CBM	-
<i>Cmm</i>	LA	CIM	20,00 \pm 0 ^a
		CBM	20,00 \pm 0 ^A
	OB	CIM	20,00 \pm 0 ^a
		CBM	20,00 \pm 0 ^A
	OB:LA (1:2)	CIM	20,00 \pm 0 ^a
		CBM	20,00 \pm 0 ^A
	OB:LA (2:1)	CIM	20,00 \pm 0 ^a
		CBM	20,00 \pm 0 ^A
	Control	CIM	-
		CBM	-

*Letras iguales indican que no existe diferencias significativas entre los tratamientos para ($\alpha=0,05$) analizado por medio del análisis de la varianza no paramétrico Kruskal-Wallis.

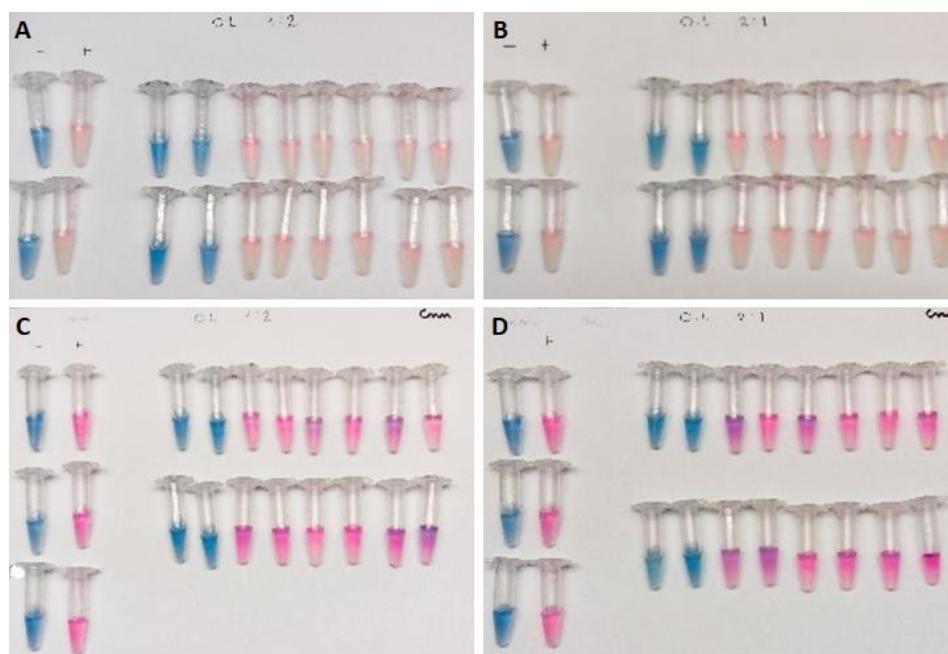


Figura 5. Resultados de los tratamientos OB:LA (1:2) y OB:LA (2:1) mediante la técnica de microdilución en caldo sobre *Pst* (A y B, respectivamente), y sobre *Cmm* (D y C, respectivamente).

En el caso de *Pst* se obtuvieron valores de CIM y CBM menores con las combinaciones OB:LA (1:2) y OB:LA (2:1) ($20,00 \pm 0$) que con los AEs puros de LA y OB ($26,66 \pm 11,55$ y $23,33 \pm 8,16$, respectivamente). coincidiendo con los resultados obtenidos para la técnica de difusión en disco. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. En el caso de *Cmm* no se vieron diferencias en cuanto a dosis de aceites utilizadas entre los distintos tratamientos, siendo todos los resultados iguales a $20,00 \pm 0$, tanto para la CIM como para la CBM.

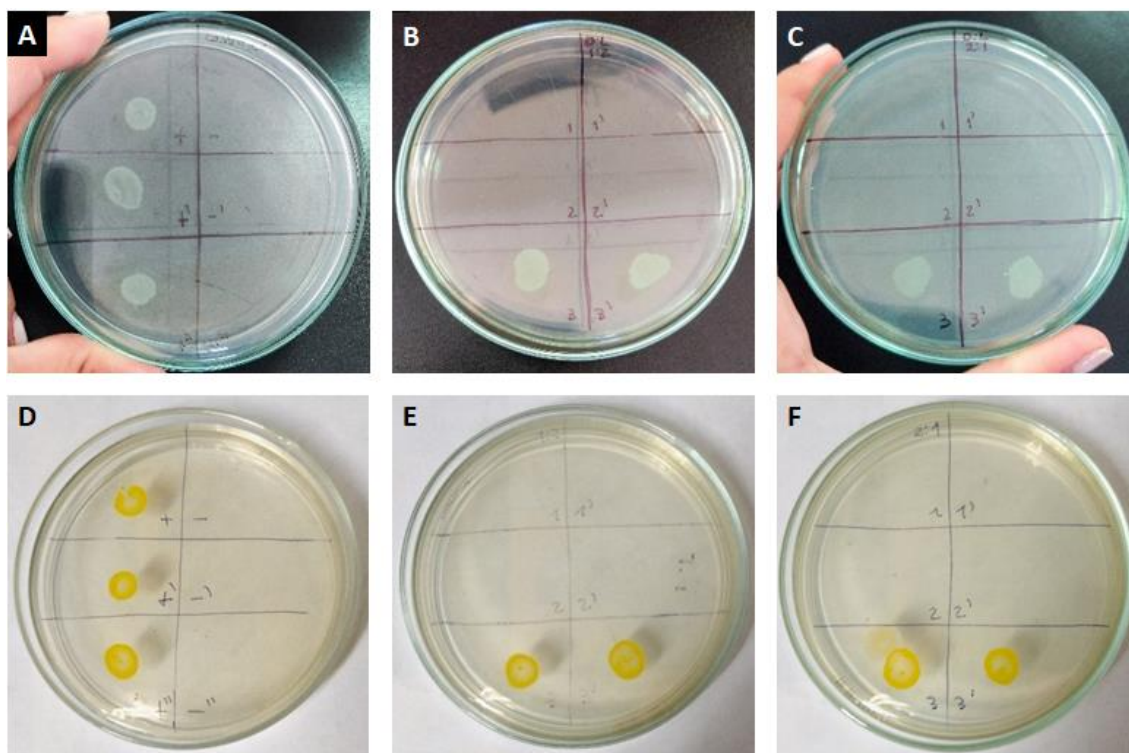


Figura 6. Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM). A y D corresponden a los controles positivos y negativos para *Pst* y *Cmm*, respectivamente; B y E corresponden al tratamiento OB: LA (1:2) para *Pst* y *Cmm*, respectivamente; C y F corresponden al tratamiento OB: LA (2:1) para *Pst* y *Cmm*.

Analizando estos resultados en contraste con los obtenidos por otros autores se pudo observar que las dosis de AEs requeridas en el presente estudio son mayores que los hallados por Araújo Silva *et al.* (2016) en cuanto al AE de OB sobre representantes del género *Pseudomonas* (CIM de $1024 \mu\text{g/mL}$). Del mismo modo, Rapper *et al.* (2013) reportaron un valor de CIM de 1g/mL para la combinación de OB: LA (1:1) contra *P. aeruginosa*. Por otro lado, Végh *et al.* (2012) expresan valores de CIM de entre $12,5$ a 50 mL/L para el AE de *Lavandula* sobre diferentes especies de *Pseudomonas*, como se discutió previamente, la susceptibilidad de cada especie bacteriana ante el tratamiento con los distintos aceites o sus combinaciones, podría explicar en gran medida estas variaciones. Estos resultados nos muestran que *Pst* tendría una susceptibilidad intermedia cuando se la compara con las especies bacterianas citadas en estos trabajos.

Esta misma disparidad puede observarse al analizar los resultados de los diferentes tratamientos sobre *Cmm*. Orzali *et al.* (2020) reportaron un valor considerablemente menor de CIM ($1,26 \text{ mL/L}$) y CBM ($>1,6 \text{ mL/L}$) para el AE de OB sobre *Cmm*. Mientras que Soyly *et al.* (2006), quienes describen la actividad antibacteriana de diversos AEs sobre *Cmm*, reportaron para *Lavandula* valores de CIM de $50 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Estos resultados nos muestran que no solo podría haber variaciones en la susceptibilidad entre especies bacterianas, sino que también entre cepas dentro de la misma especie, como se observa para *Cmm*.

4.3 Ensayo de fitotoxicidad sobre semillas de tomate

Finalmente, se evaluó el efecto fitotóxico de la combinación de AEs OB: LA (1:2) sobre semillas de tomate, tomando en cuenta tanto el porcentaje de germinación como la longitud de la radícula de las semillas germinadas. Los resultados de estos ensayos se observan en la Tabla 4. A pesar de que todos los tratamientos mostraron resultados similares en cuanto a su actividad antibacteriana para ambas especies fitopatógenas, al momento de seleccionar uno de estos para continuar los ensayos, se optó por elegir una combinación de AEs: OB: LA (1:2), pensando en sus posibles aplicaciones futuras. Las combinaciones de AEs presentan una mayor diversidad de moléculas en su composición y, por tanto, podrían presentar un menor riesgo a generar resistencia por parte de los patógenos tratados, siendo más efectivas para realizar tratamientos a largo plazo.

Tabla 4. Actividad fitotóxica de AEs de *Ocimum basilicum* (OB) y *Lavandula angustifolia* (LA) en una mezcla binaria de proporciones 1:2 respectivamente, aplicados a diferentes concentraciones sobre la germinación y desarrollo de semillas de *Solanum lycopersicum* (L.).

Concentración	OB:LA (1:2)	
	Germinación (%)*	Longitud radícula (cm)*
1 CIM	80 ± 10^A	$4,93 \pm 2,46^A$
2 CIM	$76,7 \pm 6^A$	$5,93 \pm 2,88^A$
CONTROL	80 ± 10^A	$6,33 \pm 2,43^A$

*Letras iguales indican que no existe diferencias significativas entre los tratamientos.

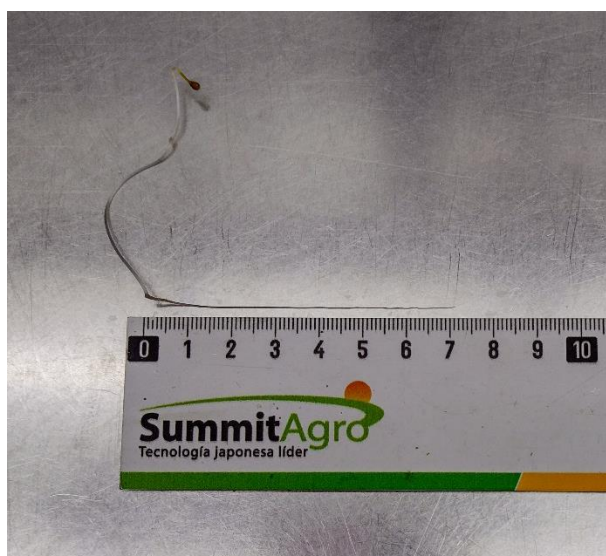


Figura 7. Medición de longitud de radícula en plántula de tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

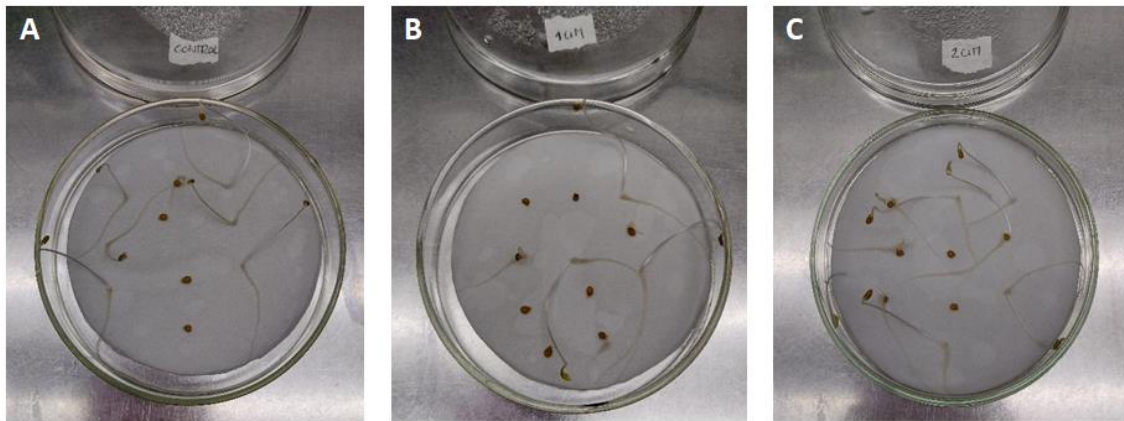


Figura 8. Plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) variedad Platense tratadas con diferentes concentraciones de la combinación OB: LA (1:2) luego de 7 días de incubación. A) Control, B) CIM y C) 2 veces la CIM.

Como se pudo observar en la Figura 8, las pruebas de fitotoxicidad en semillas de tomate con AEs de OB y LA combinados en proporción 1:2 y aplicados en dos concentraciones, no afectaron el poder germinativo de las mismas. Esto se evidencia dado que el porcentaje de plántulas germinadas en ambos tratamientos fue semejante al control, con respecto al cual no se hallaron diferencias significativas. En todos los casos, los porcentajes de germinación de las semillas rondaron al 80%. Córdoba *et al.* (2023) hallaron valores semejantes entre tratamientos en cuanto al poder germinativo en semillas de tomate tratadas con AEs de orégano (*Origanum vulgare* L.) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.), alcanzando un 84,75% de germinación en el tratamiento control, 86,25% con AE de orégano y 86% con AE de tomillo. A su vez, Pino *et al* (2012), desarrollaron un trabajo similar evaluando el efecto fitotóxico del AE de Anís (*Pimpinella anisum* L.) sobre semillas de tomate, en el cual no encontraron variaciones en el porcentaje de germinación (valores de entre 12 a 16% tomados luego de 48 horas de incubación) en relación con los controles correspondientes. Con respecto a la longitud de la radícula (Figura 7), los resultados obtenidos coincidieron con los de las pruebas de germinación al mostrar valores similares entre los tratamientos y el control, entre los que no se observaron diferencias significativas. Estos resultados indican que las semillas de tomate no presentan mayor sensibilidad frente a la aplicación de los distintos AEs estudiados en las concentraciones utilizadas, por lo que su efecto fitotóxico resulta despreciable.

5. Conclusión

Los aceites esenciales (AEs) utilizados en el presente estudio poseen propiedades antimicrobianas frente a las bacterias fitopatógenas Gram positivas y Gram negativas evaluadas en condiciones *in vitro*.

Los AEs de *Lavandula angustifolia*, *Mentha x piperita* y *Ocimum basilicum*, aplicados puros o en mezclas binarias ejercen efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*), mostrando un efecto similar en todos los casos. Adicionalmente, los AEs de *L. angustifolia* y *O. basilicum*, utilizados de forma individual o como mezclas binarias, presentan tanto actividad bacteriostática como bactericida contra *Pst* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), y en todos los casos las concentraciones de AEs necesarias para alcanzar ambos efectos coinciden, llegando a inhibir el crecimiento bacteriano y eliminar las células viables utilizando la misma cantidad de AE. Asimismo, la aplicación de AEs de *L. angustifolia* y *O. basilicum* aplicados en

combinación sobre semillas de tomate no genera efectos fitotóxicos sobre las mismas, en las concentraciones utilizadas.

En resumen, los AEs estudiados en la presente contribución constituyen herramientas promisorias para el control de la Peca bacteriana del tomate y del Cancro bacteriano del tomate, dado su alto potencial antibacteriano ante *Pst* y *Cmm*, su sostenibilidad al obtenerse de recursos naturales renovables y no causar efectos negativos en el ambiente, y a que las dosis necesarias para alcanzar su actividad antibacteriana no presentan efectos fitotóxicos sobre la planta de tomate, por lo que su aplicación no representa un riesgo para este cultivo. En este sentido, estos AEs se ubican como una opción ingeniosa para el desarrollo de métodos antimicrobianos que podrían ser explotados intensivamente en futuros estudios, con el propósito de desarrollar opciones ecológicas y eficientes. Por lo mismo, son necesarios nuevos estudios en los que se evalúe el potencial de estos AEs y sus combinaciones como controladores del cancro y la peca bacteriana sobre plantas de tomate.

6. Bibliografía

- Acosta, M., González, M., Araque, M., Velazco, E., Khouri, N., Rojas, L., Usubillaga, A., 2003.** Composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. var *basilicum*, *O. basilicum* L. var *purpurens*, *O. gratissimum* L., y *O. tenuiflorum* L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial. *Revista De La Facultad De Farmacia* Vol. 45 (1) 2003.
- Adham, A.N., 2015.** Synergistic Effects between *Mentha Piperita*, *Mentha Longifolia* and *Ocimum Basilicum* on Different Bacterial Strains. *International Journal of Chemistry*; Vol. 7, No. 2, 170-176
- Angane, M., Swift, S., Huang, K., Perera, J., Chen, X., Butts, C. A., Quek, S. Y., 2023.** Synergistic antimicrobial interaction of plant essential oils and extracts against food borne pathogens. *Food Science & Nutrition*, 00, 1–18. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3834>
- Araújo Silva, V., Pereira da Sousa, J., de Luna Freire Pessôa, H., Fernanda Ramos de Freitas, A., Douglas Melo Coutinho, H., Beuttenmuller Nogueira Alves, L., Oliveira Lima, E., 2016.** *Ocimum basilicum*: Antibacterial activity and association study with antibiotics against bacteria of clinical importance. *Pharmaceutical biology*, 54(5), 863-867.
- Ávila, L. D., Lina, M., Castaño-Peláez, H. I., Mejía-Gómez, C. E., 2013.** Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Salvia officinalis* L. sobre microorganismos patógenos transmitidos por alimentos. *Actualidades biológicas*, 35(98), 77-83
- Barajas Pérez, J. S., Montes-Belmont, R., Castrejón Ayala, F., Flores-Moctezuma, H. E., Serrato Cruz, M. Á., 2011.** Propiedades antifúngicas en especies del género *Tagetes*. *Revista mexicana de micología*, 34, 85-91.
- Bhat K., Masood S., Bhat N., Bhat M., Razvi S., Mir M., Akhtar S., Wani N., Habib M., 2010.** Current status of post harvest soft rot in vegetables: A Review. *Journal of Plant Science*. 9(4): 200-208.
- Bergougnoux, V., 2014.** The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*. 32: 170–189.
- Borboa Flores, J., Rueda Puente, E. O., Acedo Félix, E., Ponce, J. F., Cruz, M., Grimaldo Juárez, O., García Ortega, A. M., 2009.** Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *Revista fitotecnia mexicana*, 32(4), 319-326.
- Camiletti, B., Asensio C., Giménez Pecci M., Lucini E., 2014.** Natural control of corn Postharvest fungi *Aspergillus flavus* and *Penicillium* sp. using essential oils from plants grown in Argentina. *Journal of Food Science*. 79(12): 2499-2506.

- Cañigüeral, S., Vila, R., 2007.** LOS ACEITES ESENCIALES EN FITOTERAPIA Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, vol. 6, núm. 5, 2007, p. 146.
- Camele, Ippolito, Daniela Grul'ová, Hazem S. Elshafie., 2021.** "Chemical Composition and Antimicrobial Properties of *Mentha × piperita* cv. 'Kristinka' Essential Oil" *Plants* 10, no. 8: 1567. <https://doi.org/10.3390/plants10081567>
- Carezzano, M., Sotelo J., Primo E., Reinoso E., Paletti Rovey M., Demo M., Giordano W., Oliva M., 2017.** Inhibitory effect of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* essential oils on virulence factors of phytopathogenic *Pseudomonas syringae* strains. *Plant Biology*. 19: 599-607.
- CNA (Censo Nacional Agropecuario). 2002.** <http://indec.gob.ar/indec/Nivel4-Tema3-8-87>.
- Córdoba, V., Viotti, G., Oliva, M. M., 2023.** Efectos de aceites esenciales sobre la germinación de semillas de *Solanum lycopersicum* L. e inhibición de *Alternaria* spp. *Ab Intus*, 6(12).
- Coy Barrera, C. A., Acosta, E., 2013.** Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) de Colombia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2), 237-246.
- Csizinszky, A. A., 2005.** Production in the open field. In *Tomatoes* (pp. 237-256). Wallingford UK: CABI Publishing.
- De Rapper, S.; Kamatou, G.; Viljoen, A.; van Vuuren, S., 2013.** The in vitro antimicrobial activity of *Lavandula angustifolia* essential oil in combination with other aroma-therapeutic oils. *J. Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2013, 852049
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M., Robledo C.W., 2018.** InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>
- Falleh H., Jemaa M., Saada M., Ksouri, R., 2020.** Essential oils: a promising eco-friendly food preservative. *Food Chemistry*. 330:127268.
- García-Roche Saracco, M. M., 2014.** Aplicación de aceites esenciales para el control de bacteriosis que afectan la producción de *Solanum lycopersicum* L. (tomate).
- Gleason, M. L., Gitaitis, R. D., Ricker, M. D., 1993.** Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in eastern North America. *Plant Disease*, 77(11), 1069-1076.
- Martínez-Castro E., Gálvez R., Alpuche-Solís A., Vallejo-Pérez M., Colli-Mull J., Ávila P., 2018.** Bacterial wilt and canker of tomato: fundamentals of a complex biological system. *Euphytica*. 214: 72.
- Martucci, J. F., Gende, L. B., Neira, L. M., Ruseckaite, R. A., 2015.** Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. *Industrial Crops and Products*, 71, 205–213.
- Moussii, I. M., Nayme, K., Timinouni, M., Jamaledine, J., Filali, H., Hakkou, F., 2020.** Synergistic antibacterial effects of Moroccan *Artemisia herba alba*, *Lavandula angustifolia* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Synergy*, 10, 100057.
- Mitidieri M., Peralta R., Barbieri M., Brambilla V., Piris E., Sasía F., Obregón V., Vasquez P., Iriarte L., Reybet G., Barón C., 2018.** Harper Adams Univ. Inter Biof Net. https://cdn.harperadams.ac.uk/document/page/2_Biofumigation-Experiences-in-Argentina.pdf
- Lakušić B., Lakušić D., Ristic M., Marčetić M., Slavkovska V., 2014.** Seasonal Variations in the Composition of the Essential Oils of *Lavandula angustifolia* (Lamiaceae). *Natural Product Communications*, 9(6).
- López, M. M., 1984.** Bacteriosis del tomate en España. *Horticultura: Revista de industria, distribución y socioeconomía hortícola: frutas, hortalizas, flores, plantas, árboles ornamentales y viveros*, (17), 35-44.
- Orzali, L., Valente, M. T., Scala, V., Loreti, S., Pucci, N., (2020).** Antibacterial activity of essential oils and *Trametes versicolor* extract against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Ralstonia solanacearum* for seed treatment and development of a rapid in vivo assay. *Antibiotics*, 9(9), 628.

- Payá Montes, C., 2017.** Estudio del Papel Defensivo y del Mecanismo de Acción de los Ésteres del Z-3-hexenol en Plantas de Tomate Frente a *Pseudomonas Syringae*. Tesis Doctoral Universitat Politècnica de València.
- Pino, O., Sánchez, Y., Rojas, M. M., Abreu, Y., Correa, T. M., 2012.** Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimpinella anisum* L. Revista de Protección Vegetal, 27(3), 181-187.
- Potnis, N., Timilsina, S., Strayer, A., Shantharaj, D., Barak, J.D., Paret, M.L., Vallad, G.E., Jones, J.B., 2015.** Bacterial spot of tomato and pepper: diverse Xanthomonas species with a wide variety of virulence factor posing a worldwide challenge. Molecular Plant Pathology. 16(9):907-920.
- Prieto, M.C., Lapaz, M., Lucini, E., Pianzola, M., Grosso, N., Asensio, C., 2020.** Thyme and suico essential oils: promising natural tools for potato common scab control. Plant Biology. 22:81-89.
- Raliya, R., Nair, R., Chavalmane, S., Wang, W-N., Biswas, P., 2015.** Mechanistic evaluation of translocation and physiological impact of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles on the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plant. Metallomics.7: 1584.
- Rapper, S., Kamatou, G., Viljoen, A., Van Vuuren, S., 2013.** The in vitro antimicrobial activity of *Lavandula angustifolia* essential oil in combination with other aroma-therapeutic oils. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013.
- Ringuelet, J., Viña, S., 2013.** Productos Naturales Vegetales, CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN A LOS PRODUCTOS NATURALES VEGETALES.
- Rivas, K., Rivas, C. & Gamboa, L., 2015.** Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum* L.). Multiciencias, Vol. 15, N° 3, 2015, pp. 281-289.
- Rivera González, J. P., 2021.** Caracterización de bacteriófagos contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* como parte de una estrategia de biocontrol de la Peca Bacteriana en cultivos de tomate. Repositorio académico de la Universidad de Chile.
- Scarpatti, N. 2020.** La producción de tomate en Argentina. Disp. en: <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/produccion-tomate-argentina-diciembre-2020.pdf>
- Sen, Y., Wolf, J., Visser, R., Heusden, S., 2015.** Bacterial Canker of Tomato: Current Knowledge of Detection, Management, Resistance, and Interactions Plant Disease. 99: 4–13.
- SMN (Servicio Meteorológico Nacional). 2020.** Disp. en: <https://www.smn.gob.ar/estadisticas>
- Sotelo, J., Oddino, C., Giordano, D., Carezzano, M., Oliva, M., 2021.** Effect of *Thymus vulgaris* essential oil on soybeans seeds infected with *Pseudomonas syringae* Physiological and Molecular Plant Pathology.116: 101735.
- Soylu, S., Soyly, E. M., Baysal, O., Zeller, W., 2006.** Antibacterial activities of the essential oils from medicinal plants against the growth of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem. 408, 82
- Usano-Aleman, J., Palá Paúl, J., Díaz, S., 2014.** Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana. Revista Reduca Vol. 7, Núm. 2 (2014).
- Végh, A., Bencsik, T., Molnár, P., Böszörményi, A., Lemberkovics, É., Kovács, K., Horváth, G., 2012.** Composition and antipseudomonal effect of essential oils isolated from different lavender species. Natural Product Communications, 7(10), 1934578X1200701039.
- Verma, R. S., Rahman, L., Verma, R. K., Chauhan, A., Yadav, A. K., Singh, A., 2010.** Essential oil composition of menthol mint (*Mentha arvensis*) and peppermint (*Mentha piperita*) cultivars at different stages of plant growth from Kumaon region of Western Himalaya. Open Access Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 1(1), 13-18.
- Zygadlo, J. A., Zunino, M. P., Pizzolitto, R. P., Merlo, C., Omarini, A., Dambolena, J. S., 2017.** Antibacterial and anti-biofilm activities of essential oils and their components including modes of action. In Essential oils and nanotechnology for treatment of microbial diseases (pp. 99-126). CRC Press.