76166

CAREZZANO, MARIA EVANGELIN

Un potencial de productos naturales de origen vegetal como herramienta de control de

2017 76166

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES

Departamento de Microbiología e Inmunología

CREER...CREAR...CRECER

USO POTENCIAL DE PRODUCTOS NATURALES DE ORIGEN VEGETAL COMO HERRAMIENTA DE CONTROL DE TIZÓN BACTERIANO EN SOJA

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Autora: Mic. María Evangelina Carezzano

Director: Dra. Mirta Susana Demo

Co-director: Dra. María de las Mercedes Oliva

Miembros del jurado: Dra. Ana María Romero

Dra. Marisa Rovera

Dr. Germán Barros

Río Cuarto, 29 de Marzo de 2017

Clasif.
T_1122
76166

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas Físico, Químicas y Naturales, y se presenta como requerimiento para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Tesista: Mic. María Evangelina Carezzano _____

Director: Dra. Mirta Susana Demo _____

Co-director: Dra. María de las Mercedes Oliva _____

APROBADA POR EL JURADO

Dra. Ana María Romero _____

Dra. Marisa Rovera _____

Dr. Germán Barros _____

Río Cuarto, 29 de Marzo de 2017

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme dado la vida.

A mi hijo BENJAMIN por ser mi vida, y ayudarme a crecer junto a él.

A Luis por acompañarme, apoyarme y ser mi sostén siempre en cada etapa y nuevo proyecto que emprendo.

A mi MAMA, LELA LITA Y LELO TERO que me apoyan y lo seguirán haciendo desde el lugar en el que cada uno está. Confiando en que siempre puedo hacer más cosas y crecer cada día.

A MECHI y MIRTA por ayudarme incondicionalmente en la realización de este doctorado, guiándome siempre, en lo profesional y en lo personal. Porque me enseñaron a trabajar en equipo, formándome siempre, ayudando a sortear las circunstancias de la vida y seguir siendo mi FAMILIA DE LABORATORIO!!!. Por todo esto, GRACIAS!!!!

A los jurados Dra. Ana María Romero, Dra. Marisa Rovera y Dr. Germán Barros, por su colaboración en este trabajo, por guiarme para siempre mejorar profesionalmente y aportar su apoyo como jurados.

A JESI, FER, DIANA, CAROLA, VIVI y CECI por los momentos compartidos, y por estar siempre.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por permitirme formarme como profesional.

A la gente de la sala de lavado, en especial a Mary, por la ayuda brindada, y siempre tener esa buena disponibilidad.

Resumen

Argentina es uno de los principales países productores de soja en el mundo, aportando grandes ingresos a la economía nacional. Este cultivo puede ser afectado por numerosos microorganismos los cuales provocan importantes pérdidas económicas. Dentro de estos se encuentran bacterias tales como *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, agente causal del tizón bacteriano, la cual produce manchas foliares y marchitamiento. Esta bacteria fitopatógena produce factores de virulencia (biofilm y fitotoxinas). El biofilm es una comunidad bacteriana adherida a una superficie inerte o a un tejido vivo embebida en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares, en cuyo interior se encuentran proteínas y ADN, permitiendo a las bacterias sobrevivir bajo condiciones adversas. Las toxinas son capaces de ocasionar clorosis o necrosis en la planta; se han descripto coronatina, faseolotoxina, siringomicina, tabtoxina y tagetoxina, entre otras. El control de bacterias fitopatógenas se realiza habitualmente con antibióticos y compuestos de cobre que generan alta toxicidad y resistencia. Como estrategia de manejo alternativa se está probando el uso de compuestos derivados de plantas medicinales, los cuales poseen actividad antimicrobiana confirmada por varios estudios. *Thymus vulgaris*, tomillo, y *Origanum vulgare* (L.) ssp. *vulgare*, orégano, poseen reconocida actividad antibacteriana y antifúngica, mediada mayormente por los compuestos fenólicos timol y carvacrol. Extractos vegetales y aceites esenciales (AE) obtenidos de estos vegetales podrían controlar a *Pseudomonas* fitopatógenas y/o a sus factores de virulencia. El objetivo de este estudio fue evaluar el uso potencial de productos naturales de origen vegetal para el manejo de bacteriosis del cultivo de soja. Se aislaron bacterias fitopatógenas de cultivos de soja ubicados en Córdoba, San Luis y Santa Fe; se obtuvieron productos naturales a partir de tomillo y orégano y se determinó la actividad antimicrobiana (AA) mediante diferentes técnicas: estrías radiales, difusión en disco, concentración inhibitoria mínima (CIM) por macro y microdilución y concentración bactericida mínima (CBM). Se evaluó la capacidad inhibitoria de decocciones y AE sobre la producción de fitotoxinas y biofilm de las *Pseudomonas* fitopatógenas. Se realizaron ensayos *in vivo*, a escala de laboratorio, de la capacidad inhibitoria de ambos AE sobre plantas de soja inoculadas con *Pseudomonas* fitopatógenas. Los aislamientos obtenidos presentaron características bioquímicas y moleculares coincidentes con el género *Pseudomonas*. Fueron capaces de reproducir los síntomas característicos de tizón bacteriano en plantas de soja. Las cepas de *Pseudomonas* sp. aisladas demostraron ser productoras de biofilm y fitotoxinas (coronatina, siringomicina y tabtoxina). En este trabajo se demostró la efectiva actividad antibacteriana que poseen los AE y decocciones y, en menor grado los extractos de *T. vulgaris* y *O. vulgare*, sobre *Pseudomonas* sp. fitopatógenas. Además, los AE fueron capaces de inhibir a concentraciones sub-inhibitorias y sub-bactericidas la formación de biofilm, coronatina, siringomicina y tabtoxina. En los ensayos *in vivo* sobre plantas de soja se obtuvo la concentración inocua del AE de *T. vulgaris* en la cual no se observaron manchas foliares causadas por el aceite. Se observó disminución significativa de la severidad en las plantas inoculadas con una cepa local *Pseudomonas* sp., al ser tratadas con el AE de *T. vulgaris* a una concentración de 0,71 mg/mL; en aquellas infectadas con *P. savastanoi* pv. *glycinea* B076 el efecto inhibitorio no se observó tan marcadamente. Sin embargo, en las plantas inoculadas y tratadas con AE se observaron menor cantidad de manchas que en las plantas control. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron que los AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* son capaces de inhibir a *Pseudomonas* sp fitopatógenas y a la producción de sus factores de virulencia; además a concentraciones no fitotóxicas, el AE de tomillo redujo la severidad de la enfermedad. La efectividad antibacteriana de los AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* permitirían desarrollar formulaciones basadas en estos para manejar las bacteriosis causadas por *Pseudomonas* fitopatógenas sobre cultivos de soja.

Abstract

Argentina is one of the main soybean producing countries in the world. This crop can be affected by numerous microorganisms which cause significant economic losses, such as *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, the causal agent of bacterial blight, which causes leaf spots and wilting. This phytopathogenic bacterium produces virulence factors (biofilm and phytotoxins). Biofilm is a bacterial community adhered to inert surfaces or living tissues embedded in a matrix of extracellular polymeric substances, where proteins and DNA are found; allowing bacteria to survive under adverse conditions. The toxins coronatine, phaseolotoxin, syringomycin, tabtoxin and tagetoxin, among others, produce chlorosis or necrosis in the plant. The control of phytopathogenic bacteria is usually carried out with antibiotics and copper compounds that generate toxicity and bacterial resistance. Compounds derived from medicinal plants are being tested as alternatives for the management of crops diseases as their antimicrobial activity have been reported by several studies. *Thymus vulgaris*, thyme, and *Origanum vulgare* (L.) ssp. *vulgare*, oregano, demonstrated antibacterial and antifungal activity, attributed to the main phenolic compounds, thymol and carvacrol. Plant extracts and essential oils (EO) obtained from these plants could be used to control phytopathogenic *Pseudomonas* and/or their virulence factors. The aim of this study was to evaluate the potential use of natural products of plant origin for the management of bacteriosis of soybean. Phytopathogenic bacteria from soybean fields located in Cordoba, San Luis and Santa Fe provinces were isolated and characterized; natural products from thyme and oregano were obtained and their antimicrobial activity (AA) was determined by different techniques: radial striae, disk diffusion, minimum inhibitory concentration (MIC) by macro and microdilution techniques and minimum bactericidal concentration (MBC). The ability of decoctions and EO to inhibit biofilm and phytotoxin production of phytopathogenic *Pseudomonas* was also evaluated. The antimicrobial activity of thyme EO was tested in a greenhouse, using soybean plants inoculated with phytopathogenic *Pseudomonas*. Isolates showed biochemical and molecular traits consistent with the genus *Pseudomonas* and reproduced the characteristic symptoms of bacterial blight in soybean plants. *Pseudomonas* sp. isolates produced both biofilm and phytotoxins (coronatine, syringomycin and tabtoxin). In this work the antibacterial effectiveness of EO, decoctions and extracts of *T. vulgaris* and *O. vulgare* on phytopathogenic *Pseudomonas* sp. was demonstrated. In addition, both EO were able to inhibit the biofilm, coronatine, syringomycin and tabtoxin production at sub-inhibitory and sub-bactericidal concentrations. The innocuous concentration on soybean plants of EO of *T. vulgaris* in which no leaf spots caused by the oil were observed, was obtained. A significant decrease in severity was observed in plants inoculated with a local strain of *Pseudomonas* sp., when treated with the EO of *T. vulgaris* at a concentration of 0.71 mg/mL, while in those infected with *P. savastanoi* pv. *glycinea* B076 the inhibitory effect was smaller. In those plants inoculated and treated with EO, fewer spots were detected. The results obtained in the present work demonstrated that the EO of *T. vulgaris* and *O. vulgare* were able to inhibit phytopathogenic *Pseudomonas* sp. and the production of their virulence factors. In addition thymus EO reduced the severity of the disease in soybean plants at non-phytotoxic concentrations. The antibacterial effectiveness of EO obtained from *T. vulgaris* and *O. vulgare* would allow the development of formulations useful for the management of bacteriosis caused by phytopathogenic *Pseudomonas* on soybean crops.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 1

1.*Glycine max* L. 1

2.Enfermedades del cultivo 5

3.Parámetros epidemiológicos 7

4.Enfermedades bacterianas del cultivo de soja 8

5.Factores de virulencia de *Pseudomonas syringae* 11

5.a-Biofilm bacteriano 12

5.b-Fitotoxinas 15

1.Coronatina 15

2.Faseolotoxina 16

3.Siringomicina 16

4.Tabtoxina 17

6.Control de bacterias fitopatógenas 18

7.Plantas medicinales 19

7.a-Obtención de productos naturales 20

7.b-Plantas aromáticas 21

1.*Thymus vulgaris* 22

2.*Origanum vulgare* 24

3.Aceites esenciales 26

8.Planteamiento del problema 28

HIPÓTESIS 31

OBJETIVOS 31

1.Objetivo general 31

2.Objetivos específicos 31

MATERIALES Y MÉTODOS 32

I.Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas 32

1.Recolección de muestras de soja 32

2.Procesado de las muestras de soja 32

3.Cepas utilizadas 32

4.Conservación de cepas 33

5.Identificación fenotípica de los aislamientos 33

-Características culturales 33
-Características morfológicas 33
-Propiedades fisiológicas y bioquímicas 33
-Pruebas LOPAT 34
a.Producción de levano 34
b.Producción de oxidasa 34
c.Podredumbre de papa 35
d.Arginina dehidrolasa 35
e.Hipersensibilidad en tabaco 36
6.Identificación genotípica de cepas por ARNr 16S 36
7.Test de patogenicidad 37
8.Producción de factores de virulencia por cepas de *Pseudomonas* sp. 37
8.1.Producción de biofilm 37
8.2.Producción de fitotoxinas 37
a.Producción de Coronatina 38
b.producción de Faseolotoxina 39
c.Producción de Siringomicina 40
d.Producción de Tabtoxina 41
II.Actividad antimicrobiana de productos naturales de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* 43
1.Obtención de productos naturales 43
1.1.Obtención de extractos vegetales 43
1.2.Obtención de decocciones 44
1.3.Obtención de aceites esenciales 44
1.4.Identificación y cuantificación de los componentes de aceites esenciales por cromatografía gaseosa y espectometría de masas 45
1.5.Concentraciones utilizadas de aceites esenciales 45
2.Determinación de la actividad antimicrobiana de productos vegetales 46
2.1.Técnica de estrías radiales 46
2.2.técnica de disco 47
2.3.Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima 47

a.Técnica de macrodilución en caldo 47
b.Técnica de microdilución en caldo 47
2.4.Determinanción de la Concentración Bactericida Mínima 48
-Método estático 48
-Método dinámico 48
3.Actividad antimicrobiana de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* sobre la producción de factores de virulencia producidos por *Pseudomonas* fitopatógenas 49
3.1.Inhibición de la producción de biofilm 49
a.Efecto de decocciones 49
b.Efecto de aceites esenciales 49
3.2.Inhibición de la producción de fitotoxinas 50
a.Inhibición de coronatina 51
b.Inhibición de siringomicina 51
c.Inhibición de tabtoxina 52
III.Bioactividad del aceite esencial de *Thymus vulgaris* sobre plantas de soja inoculadas con *Pseudomonas* sp. 53
1.Toxicidad de dimetilsulfóxido 53
2.Preparación de diluciones del aceite esencial de *Thymus vulgaris* 53
3.Germinación de semillas de soja 53
4.Preparación de plantas de soja 53
5.Efecto del aceite esencial de *Thymus vulgaris* sobre plantas de soja 53
6.Evaluación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de *Thymus vulgaris* sobre plantas de soja inoculadas con *Pseudomonas* fitopatógenas 54
7.Análisis estadístico 55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 57
I.Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas 57
1.Aislamiento de bacterias fitopatógenas de soja 57
2.Caracterización fenotípica de los aislamientos de soja 59
-Características bioquímicas 59

-Tipificación por LOPAT 61
3.Caracterización genotípica de los aislamientos de soja 63
-Tipificación por secuenciación del gen ARNr 16S 63
4.Test de patogenicidad 67
5.Producción de factores de virulencia 70
5.a.Producción de biofilm 71
5.b.Producción de fitotoxinas 73
-Detección de coronatina 73
-Detección de siringomicina 75
-Detección de tabtoxina 76
-Producción de faseolotoxina 78
II.Actividad antimicrobiana de productos naturales de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* 81
1.Obtención de productos naturales 81
2.Determiandción de actividad antimicrobiana de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* 83
a.Extractos naturales 84
b.Decocción 86
-Técnica de estrías radiales 86
-Técnica de macrodilución en caldo 87
c.Aceites esenciales 89
3.Efecto de decocciones y aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* sobre la formación de factores de virulencia 95
3.a.Biofilm 95
-Efecto de decocciones 95
-Efecto de aceites esenciales 97
3.b.Fitotoxinas 104
-Inhibición de coronatina 104
*Decocciones 104
*Aceites esenciales 105
-Inhibición de siringomicina 105

*Decocciones 105
*Aceites esenciales 105
-Inhibición de tabtoxina 107
*Decocciones 107
*Aceites esenciales 107
III.Bioactividad del aceite esencial de *Thymus vulgaris* sobre plantas de soja inoculadas con *Pseudomonas* sp. 112
1.Efecto del aceite esencial de *Thymus vulgaris* sobre plantas de soja 112
2.Evaluación de actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Thymus vulgaris* sobre plantas de soja inoculadas con *Pseudomonas* sp. fitopatógenas 114
CONCLUSIONES 120
PROYECCIONES 125
BIBLIOGRAFÍA 126
ANEXO 139
PUBLICACIONES 190

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Cepas de referencia de *Pseudomonas syringae*	33
Tabla 2:	Primers, temperatura de annealing y productos esperados utilizados para la detección de fitotoxinas por PCR, producidas por cepas de *Pseudomonas* sp. y *Pseudmonas syringae*	42
Tabla 3:	Rango de concentraciones de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*	46
Tabla 4:	Zonas de muestreos de cultivares de soja	58
Tabla 5:	Pruebas bioquímicas realizadas en bacterias aisladas de soja	61
Tabla 6:	Tipificación por LOPAT de aislamientos de soja	62
Tabla 7:	Identificación de aislamientos bacterianos de hojas de soja, basados en un máximo de similitud de la secuencia de ARNr 16S	64
Tabla 8:	Producción de biofilm por *Pseudomonas* fitopatógenas	71
Tabla 9:	Producción fenotípica y genotípica de fitotoxinas de *Pseudomonas* sp. y *Pseudomonas* de referencia	79
Tabla 10:	Obtención de productos naturales de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*	81
Tabla 11:	Actividad antimicrobiana de decocciones de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*	86
Tabla 12:	CIM y CBM de decocciones de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* sobre *Pseudomonas* fitopatógenas	88
Tabla 13:	CIM y CBM de aceite de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* sobre *Pseudomonas* fitopatógenas	90
Tabla 14:	Efecto de decocciones de *Thymus vulgaris* sobre la producción de biofilm de *Pseudomonas* sp.	96
Tabla 15:	Efecto de decocciones de *Origanum vulgare* sobre la producción de biofilm de *Pseudomonas* sp.	97
Tabla 16:	Efecto de aceite esencial de *Thymus vulgaris* sobre plantas de soja	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Estado fisiológico de la soja	4
Figura 2:	Etapas en la formación de biofilm bacteriano	14
Figura 3:	Métodos de obtención de aceites esenciales y extractos vegetales a partir de plantas medicinales	20
Figura 4:	*Thymus vulgaris*	23
Figura 5:	*Origanum vulgare*	25
Figura 6:	Sistema enzimático involucrado en la degradación de arginina	35
Figura 7:	Proceso de obtención de extractos vegetales	44
Figura 8:	Aparato Clevenger	45
Figura 9:	Escala logarítmica diagramática de severidad para mancha ojo de rana en folíolos de soja	55
Figura 10:	Hojas de plantas de soja	57
Figura 11:	Crecimiento bacteriano obtenido en AKB	59
Figura 12:	Árbol de distancia de aislamientos de hojas de Glycine max y miembros representativos, basados en alineamientos de secuencias de genes ARNr 16S	65
Figura 13:	Ensayos de patogenicidad. Plantas de soja con manchas características de tizón bacteriano inoculadas con el aislado de *Pseudomonas* sp. A5	68
Figura 14:	Ensayos de patogenicidad. Plantas de soja con manchas características de tizón bacteriano inoculadas con el aislado de *Pseudomonas* sp. C13	68
Figura 15:	Ensayos de patogenicidad. Plantas de soja con manchas características de tizón bacteriano inoculadas con el aislado de *Pseudomonas* sp. EM1	69
Figura 16:	Ensayos de patogenicidad. Plantas de soja con manchas características de tizón bacteriano inoculadas con el aislado de *Pseudomonas* sp. LS3	69

Figura 17: Ensayos de patogenicidad. Plantas de soja con manchas características de tizón bacteriano inoculadas con el aislado de *Pseudomonas* sp. Q 69

Figura 18: Ensayos de patogenicidad. Plantas de soja con manchas características de tizón bacteriano inoculadas con el aislado de *Pseudomonas* sp. VT2 69

Figura 19: Producción de biofilm por *Pseudomonas* sp. aislamientos de soja 72

Figura 20: Producción fenotípica de coronatina por *Pseudomonas* fitopatógenas 73

Figura 21 Producción fenotípica de siringomicina por *Pseudomonas* fitopatógenas 75

Figura 22: Producción fenotípica de tabtoxina por *Pseudomonas* fitopatógenas 77

Figura 23: Fragmentos de amplificación por PCR 78

Figura 24: Actividad antimicrobiana de decocciones de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* sobre *Pseudomonas* sp. aislamientos de soja 87

Figura 25: Efecto de CIM y ½ CIM de aceite esencial de *Thymus vulgaris* sobre la formación de biofilm en cepas fitopatógenas (48 h) 98

Figura 26: Efecto de CIM y ½ CIM de aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre la formación de biofilm en cepas fitopatógenas (48 h) 99

Figura 27: Efecto de aceite esencial de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* en la formación de biofilm de *Pseudomonas* sp. aisladas de soja 101

Figura 28: Efecto de aceite esencial de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* en la formación de biofilm de *Pseudomonas* fitopatógenas de referencia 102

Figura 29: Inhibición de la producción de siringomicina por aceite esencial de *Thymus vulgaris* 106

Figura 30: Inhibición de la producción de siringomicina por aceite esencial de *Origanum vulgare* 107

Figura 31: Inhibición de la producción de tabtoxina en *P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5 por aceite esencial de *Thymus vulgaris* 108

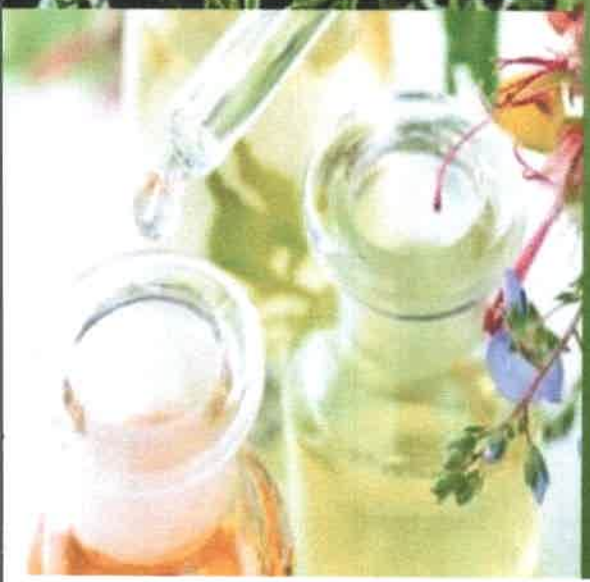
Figura 32: Inhibición de la producción de tabtoxina en *P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5 por aceite esencial de *Origanum vulgare* 109

Figura 33: Efecto del aceite esencial de *Thymus vulgaris* sobre plantas 114

Figura 34: Incidencia (%) de *Pseudomonas* tratadas con aceite esencial de *Thymus vulgaris* 115

Figura 35: Severidad (%) de Pseudomonas tratadas con aceite esencial de *Thymus vulgaris* 116

Figura 36: Tratamiento con aceite esencial de *Thymus vulgaris* sobre plantas de soja 116



INTRODUCCIÓN

1- *Glycine max* L.

Glycine max L., comúnmente conocida como soja, es una planta nativa del este asiático, probablemente originaria del norte y centro de China. Su producción estuvo localizada en esa zona hasta después de la guerra entre China y Japón (1894-1895). Las primeras semillas de Europa provenían de China (1740); años más tarde (1765) se introdujo en América (Georgia, EE.UU.) desde China, vía Londres. Sin embargo, no fue hasta la década del 40 donde se produce la gran expansión del cultivo en ese país, siendo el primer productor mundial de soja a partir de 1954 hasta la actualidad. En Brasil fue introducida en 1882, aunque su difusión se inició a principios del siglo XX y la producción comercial comenzó también en la década del 40, constituyéndose en el segundo productor mundial de granos de soja. De este modo, se fue expandiendo mundialmente siendo Estados Unidos, Brasil, Argentina e India los países que actualmente lideran dicha producción (Cabrera et. al, 2004; Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas, 2015).

Glycine max, pertenece a la familia de las leguminosas; es un cultivo de verano que necesita desde 75 hasta 200 días para madurar según el grupo de madurez de la variedad, el clima y el suelo. La altura que alcanza esta planta puede ser de 40 cm hasta 1,50 m. Las hojas, los tallos y las vainas son pubescentes, variando el color de los pelos de rubio a pardo más o menos grisáceo. Poseen tallo principal y los tallos secundarios son rígidos, erectos y leñosos, en algunas condiciones muy ramificados. Su sistema radical es potente, la raíz principal llega a los 40-50 cm aunque puede alcanzar hasta un metro de profundidad. En la raíz principal o en las secundarias se encuentran los nódulos donde viven las bacterias fijadoras del nitrógeno, que aportan dicho nutriente necesario para el desarrollo de la planta. Las hojas son alternas, compuestas y trifoliadas con folíolos ovalanceolados que miden de 5 a 10 cm y presentan un color verde que se torna amarillo en la madurez, para finalmente caer. Desarrollan un número variable de flores que se encuentran en inflorescencias racemosas axilares. Son pequeñas y se ubican en grupos de 5-10 flores blancas o violáceas-púrpuras. En las flores tempranas se forman pocas vainas que comienzan a aparecer entre los 10 días y las 2 semanas después de haber nacido las primeras flores (Scott y Aldrich, 1975; http://www.infoagro.com/herbaceos/industriales/soja.htm). Los frutos consisten en una

vaina dehiscente por ambas suturas, con una longitud de 2 a 7 cm. Cada fruto contiene de tres a cuatro semillas, siendo pubescentes cuando jóvenes y parduzcos al madurar. La semilla generalmente es esférica, del tamaño de un guisante y de color amarillo. Algunas variedades presentan una mancha negra o marrón que corresponde al hilo de la semilla. Su tamaño es mediano, rica en proteínas y en aceites. Esto le confiere propiedades nutricionales ya que las proteínas de soja poseen un buen balance de aminoácidos esenciales, destacando la lisina y leucina (Scott and Aldrich, 1975).

Las temperaturas óptimas para la siembra oscilan entre 15 °C y 18 °C y, para la floración, los 25 °C. Durante su cultivo, necesita al menos 300 mm de agua, que pueden ser en forma de riego, o bien, en forma de lluvia en aquellas zonas templadas húmedas donde las precipitaciones son suficientes. Se desarrolla en suelos neutros o ligeramente ácidos y no necesita suelos muy ricos en nutrientes, por lo que a menudo se emplea como alternativa para aquellos terrenos poco fertilizados que no son aptos para otros cultivos (Scott and Aldrich, 1975; http://www.infoagro.com /herbáceos/industriales/soja.htm).

Las etapas de crecimiento de la soja se pueden clasificar con distintas escalas; la más difundida es la desarrollada por Fehr et. al, (1971), la cual describe los estadios fenológicos externos del cultivo de soja, distinguiéndose dos etapas principales, una que describe los estados vegetativos y la otra los reproductivos (Figura 1).

- **Etapa vegetativa**

Los dos primeros estadios vegetativos se los identifican con letras.

VE - Emergencia - Se observa el hipocótile, en forma de arco, empujando al epicótile y a los cotiledones, haciéndolos emerger sobre la superficie del suelo.

VC - Etapa cotiledonar - El hipocótile se endereza, los cotiledones se despliegan totalmente y en el nudo inmediato superior los bordes de las hojas unifoliadas no se tocan.

A partir de aquí, al resto de los estados vegetativos se los identifica con el número de nudos.

V1 - (1er nudo) - El par de hojas opuestas unifoliadas están expandidas totalmente, y en el nudo inmediato superior se observa que los bordes de cada uno de los folíolos de la primer hoja trifoliada no se tocan.

V2 - (2do nudo) - La primer hoja trifoliada está totalmente desplegada, y en el nudo inmediato superior los bordes de cada uno de los folíolos de la segunda hoja trifoliada no se están tocando.

Vn- (n: número de nudos) - La hoja trifoliada del nudo (n) está expandida totalmente, y en el nudo inmediato superior los bordes de cada uno de los folíolos no se tocan.

- **Etapa reproductiva**

R1 - Inicio de Floración - Se observa una flor abierta en cualquier nudo del tallo principal.

R2 - Floración completa - Se observa una flor abierta en uno de los nudos superiores del tallo principal con hojas totalmente desplegadas.

R3 - Inicio de formación de vainas - Una vaina de 5 milímetros de largo en uno de los 4 nudos superiores del tallo principal, y con hojas totalmente desplegadas.

R4 - Vainas completamente desarrolladas - Una vaina de 2 cm en uno de los 4 nudos superiores del tallo principal con hojas totalmente desplegadas.

En esta etapa comienza el período crítico del cultivo; entre R4,5 y R5,5, ya que ha finalizado la floración y cualquier situación de estrés: déficit hídrico, de nutrientes, defoliación por orugas, enfermedades foliares, ataque de chinches, granizo, etc., afectará el número final de vainas y de granos, provocando la reducción de rendimiento.

R5 - Inicio de formación de semillas - Una vaina, ubicada en uno de los 4 nudos superiores del tallo principal, contiene una semilla de 3 mm de largo.

R6 - Semilla completamente desarrollada - Una vaina, en cualquiera de los 4 nudos superiores del tallo principal, contiene una semilla verde que llena la cavidad de dicha vaina, con hojas totalmente desplegadas. En esta etapa termina el período crítico del cultivo.

R7 - Inicio de maduración - Una vaina normal en cualquier nudo del tallo principal ha alcanzado su color de madurez. La semilla, en este momento, contiene el 60% de humedad.

R8 - Maduración completa - El 95% de las vainas de la planta han alcanzado el color de madurez.

Luego de R8, se necesitan 5 a 10 días de tiempo seco (baja humedad relativa ambiente), para que las semillas reduzcan su humedad por debajo del 15%.

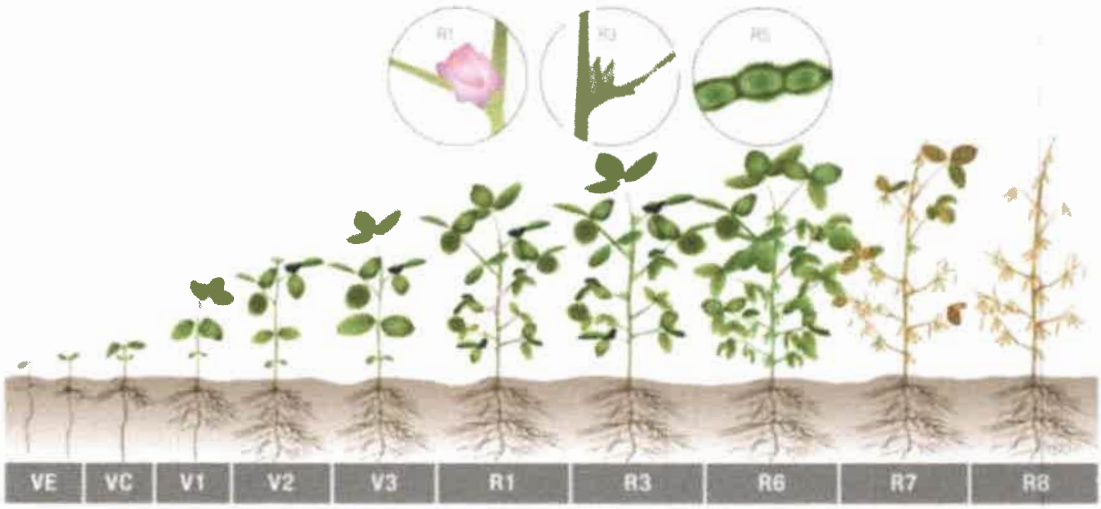


Figura 1: Estados fenológicos de la soja. Fuente: J. Rohrich (Julio, 2015). http://prairiecalifornian.com/soybean-growth-stages

Argentina es uno de los principales países productores de soja en el mundo, debido a su participación en el valor total de la producción y de las exportaciones. La superficie de soja cultivada es aproximadamente de 20 millones de hectáreas, ocupando el primer lugar en superficie sembrada. El 80% de esta superficie se encuentra repartida entre las provincias de Córdoba, Santa Fé y Buenos Aires. La producción nacional es de aproximadamente 55 millones de toneladas al año (Cabrera et. al, 2004; Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas, 2015). La disponibilidad de diferentes grupos de madurez permite implantar el cultivo en diferentes fechas de siembra y en una gran variedad de ambientes (Wrather et. al, 2001). La superficie sembrada de soja (campaña 2013/2014) llegó a un récord entre 53 y 54 millones de toneladas, gracias a un crecimiento del área dedicada al cultivo y a un clima favorable (http://www.produccion.com.ar/ver_nota.php?edicion=Sep_Oct2013&numero=204&id=1338).

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) proyectó la producción de soja de Argentina para la campaña 2016/17 en 57 millones de toneladas (http://comercioyjusticia.info/blog/economia/estiman-produccion-argentina-de-soja-para-la-campana-201617-en-57-millones-de-toneladas), la Bolsa de Comercio de Rosario aumentó recientemente su estimación con una flamante proyección de 59 millones de

toneladas, aludiendo a que los mejores rendimientos que se obtendrán compensarán las pérdidas provocadas por los excesos de precipitaciones. Por su parte, la Bolsa de Cereales de Buenos Aires mantiene su proyección de 58 millones de toneladas, lo que implicaría una merma del 4,6% en relación con lo obtenido en la campaña 2014/15 (http://www.ambito.com/832504-avanza-la-cosecha-de-soja-en-la-argentina). Las compras de soja por parte del sector exportador y del sector industrial, en lo que va de la campaña 2015/16 han alcanzado un volumen de 29 millones de toneladas, cifra que resulta inferior en un 8,7% al volumen registrado para la campaña precedente al mismo momento del año. Según el Panorama Agrícola Semanal de la Bolsa de Cereales, la cosecha de soja de la campaña 2015/16 se encuentra avanzada en un 97,7% sobre las 56 millones de toneladas estimadas a cosechar, estimación que de concretarse reflejaría una caída interanual de -8% en comparación al ciclo previo de producción 2014/15, el cual fue de 60,8 MTn (http://inta.gob.ar/documentos/rendimiento-y-calidad-de-la-soja-de-la-zona-nucleo-sojera-campana-2014-15).

2-Enfermedades del cultivo

El cultivo de la soja se ve afectado por enfermedades que varían su intensidad en función del estado fenológico, la región, las condiciones climáticas de cada campaña y las estrategias de manejo utilizadas. A nivel mundial las pérdidas de rendimiento causadas por las enfermedades en el cultivo de soja oscilan entre un 10 y un 15%. Para la Argentina, dichas pérdidas son de aproximadamente el 8 al 10% de la producción, pueden llegar hasta un 30%. Esto se debe a que, al afectar principalmente a las hojas, la capacidad del cultivo para captar la luz del sol disminuye y por lo tanto lo mismo ocurre con su rendimiento (http://mundoagrocba.com.ar/atencion-a-las-enfermedades-de-fin-de-ciclo-de-la-soja).
Además, se están produciendo infecciones poco documentadas que pueden llegar a representar un problema para los rendimientos de cultivos en un futuro cercano, como consecuencia del cambio climático y de la utilización de híbridos o variedades nuevas (http://agro.fauba.info/node/164).

En el sudeste de la provincia de Córdoba, enfermedades tales como podredumbre de raíz y tallo (*Phytophthora sojae*), tizón bacteriano (*Pseudomonas savastanoi*), mancha marrón (*Septoria glycines*), tizón de la hoja y mancha púrpura (*Cercospora kikuchii*),

mildiú (*Peronospora manshurica*), podredumbre carbonosa (*Macrophomina phaseolina*), síndrome de la muerte repentina (*Fusarium* spp.), tizón del tallo y vaina (*Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*), entre otras, se presentan durante todas las campañas del cultivo de soja, con niveles de incidencia y severidad que varían dependiendo de las condiciones climáticas, los criterios de manejo y los cultivares utilizados (Distéfano, 2014; http://inta.gob.ar/documentos/informe-sanitario-de-la-campana-de-soja-2012-13).

El monocultivo de soja, junto a la siembra directa generan excelentes condiciones para la multiplicación y supervivencia de patógenos causantes de enfermedades de fin de ciclo (EFC) debido a que éstos en su mayoría son necrotróficos, lo que significa que sobreviven y fructifican en semillas y rastrojos. También hay biotróficos, como es el caso del mildiú (*Peronospora manshurica*), que sobreviven en tejido vivo y semillas infectadas, requiriendo de tejido vivo para completar su ciclo de infección (Conforto, 2011). Como EFC se agrupa a aquellas enfermedades que afectan tallos, hojas, vainas y semillas durante estados reproductivos intermedios y avanzados del cultivo, causando un anticipo en la maduración de las plantas y disminución del rendimiento y calidad de la semilla producida. Los principales efectos son la disminución del número y peso de granos por una defoliación intensa y anticipada. Se consideran como un complejo de enfermedades porque se presentan en la misma época y se producen dificultades en su identificación individual (Conforto, 2011).

Entre las principales EFC se encuentran el tizón y pústula bacterianos, provocados por *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* y *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, respectivamente, las cuales se encuentran dentro de las principales enfermedades foliares (Formento et. al, 2008). En el departamento de Paraná, Entre ríos, se detectó alta incidencia de tizón bacteriano en cultivares de soja susceptibles en la campaña 2014 (Formento et. al, 2014). Posteriormente, en los departamentos de La Paz, Paraná y Diamante se encontró que la enfermedad de mayor impacto en la semana posterior a las lluvias fue el tizón bacteriano. Las hojas enfermas del tercio superior fueron muy sensibles al daño por el "temporal" (lluvias intensas y vientos).

3- Parámetros epidemiológicos

La cuantificación de la intensidad de una enfermedad se denomina Patometría (*pathos*: enfermedad, *metro*: medir); y es tan importante en epidemiología, como lo es el diagnóstico en fitopatología. Es necesario cuantificar la enfermedad cuando queremos obtener la curva epidémica de la misma, comparar la eficiencia de control químico, cuantificar las pérdidas de cosecha según nivel de enfermedad, evaluar diferentes propuestas de manejo, determinar el control biológico y manejo cultural. La cantidad de una enfermedad o intensidad se puede medir básicamente a través de dos parámetros: incidencia y/o severidad.

Incidencia: es el porcentaje (0< y <100%) o proporción (0< y <1) de individuos enfermos (plantas, hojas, frutos, raíces, semillas); para evaluar este parámetro se cuenta la cantidad de individuos enfermos (con síntomas visibles) en una población (muestra, parcela, cultivo). Es una variable binaria (enfermo o sano), sin considerar la expresión de los síntomas; por ejemplo en enfermedades foliares que producen manchas (viruela del maní, viruela de la alfalfa) es lo mismo que la hoja evaluada tenga una o varias manchas. Es una forma de cuantificar muy común y de mayor utilidad en enfermedades que presentan síntomas que llevan a la muerte de la planta, como en las podredumbres radicales, marchitamientos, algunas virosis sistémicas, e incluso manchas en frutos que afectan su calidad comercial (sarna del manzano). La incidencia es un parámetro fácil de calcular, seguro y reproducible. Numerosas enfermedades causadas por hongos producen como parte de los síntomas la defoliación, por lo que debe incluirse en el cálculo las hojas o folíolos desprendidos como consecuencia de la enfermedad, porque de lo contrario estaríamos subestimando la enfermedad (Agrios, 2005; March et. al, 2010).

Severidad: es el porcentaje (0< y <100%) o proporción (0< y <1) de tejido vegetal enfermo en un individuo. Es una variable continua que mide "cuanto" o "como" de enfermo se encuentra el individuo. Es más apropiada para el caso de patologías que producen manchas foliares como viruelas o aquellas con producción de pústulas, como es el caso de las royas y similares. Para la cuantificación se requiere utilizar escalas de severidad, las que pueden ser aritméticas, logarítmicas, diagramáticas o nominales. Cada escala de severidad (específica para cada enfermedad) debe representar las diferentes expresiones de la enfermedad; desde los síntomas más suaves y/o los valores más bajos a la máxima

expresión, en un gradiente de menor a mayor. La severidad permite un mejor ajuste estadístico, constituyendo por lo tanto una metodología adecuada cuando se requiere mayor precisión por ejemplo en trabajos de mejoramiento o en estudios epidemiológicos. En algunas enfermedades la severidad se cuantifica según grados, los que expresan diferentes niveles de afección; son en general las escalas aritméticas nominales (Agrios, 2005; March et. al, 2010).

4-Enfermedades bacterianas del cultivo de soja

Se ha descripto la "aparición" de nuevas y viejas enfermedades bacterianas en cultivos de soja en Argentina. Se trata de patologías que no se registraban hace dos o tres años atrás en el país, junto con otras afecciones que incrementaron su accionar sobre los cultivos extensivos en el mismo período (http://agro.fauba.info/node/164). En nuestro país, el daño ocasionado por enfermedades bacterianas de la soja ha provocado en el año 1998 pérdidas de hasta 18.400 toneladas métricas (Wrather et. al, 2001).

La soja puede ser afectada por al menos seis bacterias fitopatógenas las cuales pueden causar manchas foliares y marchitamiento; estas bacterias son capaces de sobrevivir en los residuos del cultivo y en las semillas (Boletín Fitosanitario. Cultivo de Soja. INTA. 2008; Formento et. al, 2008; Scandiani y Luque, 2009). Entre las bacterias más importantes se describe a *P. savastanoi* pv. *glycinea*, causante de tizón bacteriano y *X. axonopodis* pv. *glycines*, agente causal de pústula bacteriana. Estas enfermedades se encuentran entre las principales EFC, la principal diferencia entre ambas radica que en la pústula los primeros estados de la sintomatología no se manifiestan como lesiones acuosas y sus manchas son de centros sobreelevados (Boletín Fitosanitario. Cultivo de Soja. INTA; Formento et. al, 2008).

Tizón bacteriano: provocado principalmente por *P. savastanoi* pv. *glycinea* (*P. syringae* pv. *glicinea*) (Coerper). Esta enfermedad suele aparecer en el cultivo de soja en cualquier momento de su crecimiento, desde la emergencia de los cotiledones. Los síntomas más importantes se manifiestan en hojas, pero también puede afectar tallos, legumbres y cotiledones. Las hojas son los órganos más comúnmente atacados, observándose pequeñas manchas acuosas, semitransparentes a trasluz que luego se tornan

amarillas y por último marrones, las cuales se rodean de un margen humedecido envuelto por un halo verde amarillento. Las lesiones se agrandan presentando un desgarrado, especialmente luego de fuertes vientos y lluvias. Esta bacteria es capaz de sobrevivir en residuos del cultivo y en semillas, las cuales se cubren de un crecimiento bacteriano viscoso (Boletín Fitosanitario. Cultivo de Soja. INTA. 2008; Formento et. al, 2008; http://www.brnich.com.ar/agro/enfermedades; Fernández Valiela, 1975).

El proceso de infección por esta bacteria involucra varias etapas: colonización epífita, entrada al apoplasto de la planta, multiplicación dentro del tejido del hospedante y como consecuencia la manifestación de los síntomas de la enfermedad. Es un patógeno extracelular, capaz de crecer rápidamente en la plántula pre-emergente y luego colonizar las hojas cuando la planta crece (Madigan et. al, 2014; Ruffinatto, 2007).

Los aislamientos de *P. syringae* son taxonómicamente subdivididos en patovares, los cuales son variedades patogénicas basadas principalmente en el hospedante de aislamiento (Hwang et. al, 2005). Sin embargo, actualmente esta especie está sujeta a reclasificaciones taxonómicas continuas definiéndose un complejo denominado *P. syringae* el cual incluye aproximadamente 10 especies y 60 patovares (Young, 2010). Un análisis genético de homología total de ADN-ADN y ribotipificación ha indicado la existencia de nueve genomoespecies dentro de *P. syringae*. Como consecuencia de ello, muchas especies entre estos grupos fueron re-clasificadas y *P. syringae* fue re-nombrada como *P. savastanoi*, incluyendo a los pvs. *savastanoi*, *glycinea*, *tabaci* y *phaseolicola*. Esto implica que la diversidad genética de las especies *P. syringae* se debería a la adaptación de patovares individuales a su respectiva planta hospedante (Qi et. al, 2011).

La producción de fitotoxinas es una de las características de las bacterias fitopatógenas, las cuales desestabilizan el equilibrio fisiológico de la planta, por lo que poseen un papel importante en la patogénesis (Murillo y Rodriguez-Palenzuela, 2000; Ruffinatto, 2007). Estas toxinas se originan a partir del metabolismo secundario y hasta el momento se han descripto cinco tipos: coronatina, faseolotoxina, siringomicina, tabtoxina y tagetoxina. Las mismas son producidas por diferentes patovares de *P. syringae* capaces de ocasionar clorosis o necrosis en la planta (Bender et. al, 1990; Hwang et. al, 2005).

En esta especie se han identificado al menos dos exopolisacáridos (EPS) de alto peso molecular asociados a la virulencia: levano y alginato (Danhorn and Fuqua, 2007;

Schenk et. al, 2006). La formación de levano sirve como una característica taxonómica de *P. syringae* y la producción de alginato contribuye a la vida epífita y se ha asociado con la resistencia a la desecación, a moléculas tóxicas y a la inducción de lesiones acuosas en hojas infectadas (Hettwer et. al, 1998; Laue et. al, 2006). Estos EPS son importantes de destacar porque la mayoría de los microorganismos epífitos y patógenos los producen formando comunidades metabólicamente integradas, embebidas en una matríz, denominadas biopelículas o biofilms. Además, en su interior se encuentran proteínas y ADN, y están adheridos a una superficie inerte o a un tejido vivo. El biofilm es la suma de las células bacterianas, espacios intercelulares y la matriz extracelular que los rodea, entre otras cosas, formada por EPS a lo que se denomina "slime" (Costerton, 1999; Malamud, 2011).

En Córdoba, durante la campaña 2012/13 se registró la presencia de tizón bacteriano con niveles de incidencia del 100% y de severidad de hasta un 20%, desde los primeros estadíos vegetativos y durante casi todo el ciclo del cultivo (http://inta.gob.ar/documentos/informe-sanitario-de-la-campana-de-soja-2012-13).

El impacto económico de *P. syringae* está aumentando, con un resurgimiento de viejas enfermedades, incluyendo manchas bacterianas de tomate, y la aparición de nuevas infecciones de importancia mundial, como el sangrado del Castaño de Indias (Mansfield et. al, 2012).

En base al Manual Europeo de Enfermedades de las Plantas se describen 28 patovares, cada uno atacando a una especie hospedante diferente. Varios patovares causan problemas a largo plazo en los árboles, a menudo a través de la producción de distorsiones y cancros (por ejemplo: pvs. *savastanoi* y *morsprunorum*). Las infecciones de los cultivos anuales son más esporádicas y los brotes son a menudo causados por la siembra de semillas contaminadas. Muchos informes ponen de manifiesto la transmición por semilla de *P. syringae*, atribuyéndolo a la adaptación del patógeno a nuevos nichos, como por ejemplo aguas de deshielo. Una vez que se han establecido nuevas infecciones, dadas las condiciones favorables de lluvias y temperaturas, los brotes de enfermedades son a menudo devastadores, como el tizón con halo del poroto causado por *P. syringae* pv. *phaseolicola*. *Pseudomonas syringae* es considerada la bacteria lider en la comprensión de la patogenicidad en plantas. Los patovares de esta especie representan no sólo la agrupación

bacteriana patógena más importante de plantas, sino que además en un futuro podría ocupar el primer lugar de los patógenos habitualmente conocidos, incluyendo hongos y oomicetos (Mansfield et. al, 2012). La investigación de la biología molecular de la virulencia y la defensa de las plantas contra *P. syringae* ha abierto nuevas perspectivas sobre la patogenicidad microbiana. Los patovares de esta especie, *phaseolicola* y *tomato* han surgido como excelentes modelos para estudios fundamentales sobre el ataque bacteriano y la defensa de plantas (Arnold et. al, 2011; Preston et. al, 2000). Ejemplos notables son los descubrimientos relacionados con la respuesta hipersensible y el gen de la patogenicidad (*hrp*) que codifican el sistema de secreción de tipo III (SSTT), intervinientes en la supresión de las defensas del hospedante (Mansfield et. al, 2012). La patogénesis de *P. syringae* en cualquier especie de planta hospedadora, resulta tanto de la ausencia de factores de avirulencia como de la presencia de múltiples factores de virulencia que actúan coordinadamente para promover la enfermedad y suprimir respuestas inmunitarias del hospedante (Baltrus et. al, 2011).

Por otro lado, no hay suficientes datos sobre aislamiento de bacterias fitopatógenas del cultivo de soja en nuestra región. Por lo que resulta una necesidad la detección de bacteriosis y la caracterización de los microorganismos causales.

5-Factores de virulencia de *Pseudomonas syringae*

Los microorganismos patógenos producen diversos factores de virulencia que ayudan a la instalación y diseminación de la enfermedad. Estos factores dependen de la cepa bacteriana aislada y pueden estar presentes todos o algunos de ellos, otorgándoles diferentes grados de virulencia y ocasionando variaciones en la severidad de la lesión (Cracogna, 2007). El proceso de infección de bacterias fitopatógenas como *P. syringae* involucra la producción de gran variedad de esos factores durante el curso de la interacción con el hospedante dentro de los que se reconocen: biofilm, toxinas, proteínas "ice nucleations" y resistencia antimicrobiana (Danhornand Fuqua, 2005; Hwang et. al, 2005). La patogénesis en estas bacterias esta regulada por mecanismos de "Quorum sensing" (QS) y SSTT. El SSTT es codificado por el operón *hrp,* y puede despertar dos tipos de respuesta: hipersensibilidad en una planta no hospedante o patogenicidad en una planta hospedante. Este sistema libera proteínas efectoras al interior celular, las cuales son determinantes clave

de la virulencia y del rango de hospedante. El SSTT se encuentra altamente conservado en la mayoría de las bacterias fitopatógenas, induciendo alguna de estas dos respuestas. Los efectores activan la patogénesis interfiriendo o desactivando los sistemas de defensa de la planta. Además del SSTT, *P. syringae* produce fitotoxinas productoras de clorosis (por ej: coronatina, faseolotoxina, tabtoxina, tagetitoxina) o necrosis (por ej: siringomicina y siringopeptina), que aumentan la virulencia (Baltrus et. al, 2011; Chowdhury et. al, 2013; Madigan et. al, 2014).

El mecanismo de "QS"es un sistema de comunicación célula-célula que responde a señales ambientales, activando la expresión coordinada de determinados genes. Depende de la densidad celular y utiliza moléculas señales o autoinductores de peso molecular bajo o medio que funcionan como "palabras" de la comunicación celular. Estas moléculas señales varían de acuerdo a la especie microbiana y en bacterias Gram negativo se reconocen a las homoserinalactonas (AHL) dentro de los autoinductores. Cuando las células, y por ende los autoinductores aumentan en el ambiente, la expresión de genes se altera despertando procesos relacionados a la patogenicidad o a la vida epífita, los que incluyen la secreción de factores de virulencia, formación de biofilm, producción de antibióticos, bioluminiscencia, etc. Es por eso que interceptar el mecanismo de QS representa una estrategia para controlar las enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas. Existe mucho interés en encontrar moléculas capaces de bloquear o imitar los autoinductores y atenuar, de este modo, los efectos del QS. Estas moléculas servirían de herramientas para estudiar los mecanismos moleculares de este proceso, los sitios blancos involucrados y la capacidad antimicrobiana de las mismas (Geske et. al, 2007; Kim et. al, 2015, Masak et. al, 2014; Morris and Monier, 2003).

5a-Biofilm bacteriano

Las bacterias tienen capacidad para formar complejos celulares en las superficies bióticas (tejidos animales y vegetales) y superficies abióticas (sedimentos, partículas del suelo, instrumentos de laboratorio o médicos, etc), respondiendo a señales ambientales. Dependiendo de las cantidades de células y componentes extracelulares, tales complejos van desde agregaciones celulares aleatorias observadas en superficies o en suspensión

líquida, a complejos altamente desarrollados de células encapsuladas en una matriz exopolimérica unida a una superficie y conocidas como biofilm (Bogino et. al, 2013).

Estos compuestos pueden estar constituidos por bacterias patógenas u oportunistas y la composición del biofilm puede variar dependiendo de la cepa, la especie y las condiciones ambientales. Los biofilms son estructuras que le permiten a las bacterias sobrevivir bajo condiciones adversas y son considerados un importante factor de virulencia en el proceso de patogénesis, tanto de animales como de plantas (Bogino et. al, 2013; Danhorn y Fuqua, 2007). Las bacterias que conforman esta biopelícula tienen una fisiología diferente de las células de vida libre, ya que pueden vivir con nutrientes limitados, promover el intercambio de material genético y generar una mayor diversidad de poblaciones. Los biofilms protegen a las bacterias de las condiciones de estrés ambiental, de los mecanismos de defensa del hospedante y de los compuestos antimicrobianos (Rigano et. al, 2007).

La formación de biofilm puede describirse en etapas, la cual comienza respondiendo a señales ambientales que despiertan el proceso. Una de estas señales es el aumento de células, el cuál es sensado por bacterias circundantes. En primer lugar, las células se adhieren a una superficie abiótica o biótica por uniones reversibles; en segundo lugar se produce una agregación celular en las cuales los microorganismos se multiplican formando múltiples capas, y las bacterias transforman su estado planctónico a un estado inmovilizado. La tercer etapa consiste en la maduración del biofilm en donde se forman microcolonias y continua la proliferación de microorganismos hasta construir una arquitectura tridimensional que se considera como biopelícula madura. En esta etapa se producen las moléculas señales que van a ser las encargadas de disparar la expresión de genes específicos para la formación del biofilm. La última etapa consiste en la liberación de las células de biofilm de la superficie a la cual se encuentran adheridas para pasar nuevamente a un estado planctónico (Costerton et. al, 1999; Niu, 2006). En la figura 2 se muestra un esquema con las distintas etapas de este proceso.

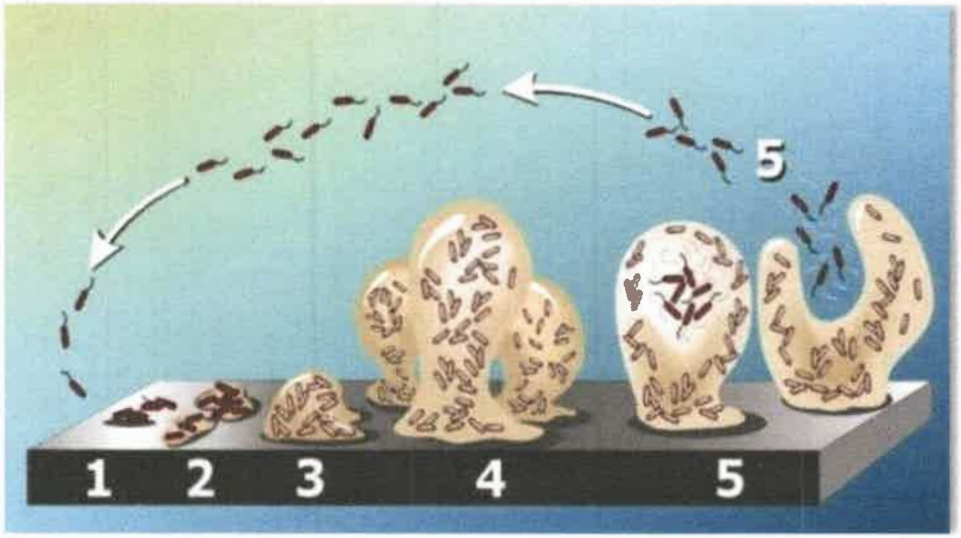


Figura 2: Etapas en la formación de un biofilm bacteriano. **Ref.: (1):** unión débil al inicio, **(2)**: unión irreversible, **(3):** formación de microcolonias, **(4)**: desarrollo de las macrocolonias, **(5):** biofilm maduro. Imagen tomada de Stoodley, 2002.

La estructura del biofilm es altamente organizada y consiste en sustancias de variada naturaleza química que incluyen principalmente exopolisacaridos, proteínas, ácidos teicoicos y ADN extracelular, con canales que permiten la circulación de nutrientes. En su interior las células están diferenciadas, siguiendo patrones de expresión génica propios y cumpliendo actividades metabólicas complejas. Esto permite compararlos con tejidos de organismos superiores (Bogino et. al, 2013; Costerton et. al, 1999).

Los componentes polisacáridos de la matriz de las biopelículas de bacterias Gram negativas, tales como el alginato y levano en *P. syringae* y xantano en Xanthomonas, desempeñan papeles importantes en la fisiología del biofilm (Rigano et. al, 2007). Las bacterias pueden variar la composición de la matriz y el uso de diferentes adhesinas para adaptarse a los cambios ambientales. La matriz conecta a las células en el interior del biofilm e imparte características claves incluyendo la capacidad de proteger a las células de la desecación y otros tipos de estrés (Danhorn y Fuqua, 2007).

Otros componentes estructurales, como los flagelos, desempeñan un papel importante, facilitando la iniciación de la formación de biopelículas debido a que ayudan a unirse a las superficies y son necesarios para que las bacterias puedan moverse en el

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO BIBLIOTECA

interior del biofilm, facilitando el crecimiento y la propagación del mismo (Pratt y Kolter, 1998).

Se ha demostrado que el proceso de formación de biofilm se encuentra regulado y dirigido por QS, mediante un sistema de sensores propios de las bacterias que perciben el aumento en la cantidad de bacterias y, por lo tanto, también el aumento de las moléculas señales AHL (Malamud, 2011). Este mecanismo permite a las bacterias actuar de manera coordinada y refuerza la idea de que células individuales se benefician del comportamiento grupal cooperativo para sobrevivir, competir y persistir en la naturaleza o colonizar un hospedante en particular (Bodman et. al, 2003).

5b-Fitotoxinas

Pseudomonas syringae produce cuatro toxinas primarias: coronatina, faseolotoxina, siringomicina y tabtoxina. Las cuatro contribuyen a la clorosis (amarillamiento del tejido de la hoja típicamente como resultado de la interrupción del cloroplasto) o necrosis. La producción de fitotoxinas es regulada de forma coordinada por el SSTT y pueden ser secretadas independientemente de los efectores, alterando el metabolismo del hospedante o imitando las hormonas vegetales, reemplazando o complementando la función de las proteínas efectoras (Baltrus et. al, 2011). El estudio de compuestos que ayuden a evitar o inhibir la producción y/o liberación de exotoxinas ayudaría a controlar la capacidad patogénica de los microorganismos.

1-***Coronatina***: es una molécula que imita al poliquetido metiljasmonato, actúa como un factor de virulencia porque promueve la entrada de las bacterias en la planta hospedante mediante la estimulación de la apertura de los estomas y suprime las defensas del mismo dependientes de ácido salicílico. Esta toxina se compone de ácido coronámico (CMA) unido al ácido coronafácico (CFA). Debido a la estrecha semejanza de CMA y CFA a los precursores de las hormonas endógenas de la planta, etileno y ácido jasmónico, respectivamente, se piensa que la coronatina impacta sobre la señalización en el hospedante a través de las vías de etileno y ácido jasmónico (Arrebola et. al, 2011). La producción de coronatina se relaciona con varios patovares de *P. syringae*, incluyendo los pvs. *atropurpurea*, *glycinea*, *macuolicola*, *morsprunorum* y *tomato* (Arrebola et. al, 2011; Schaad et. al, 2001). Los genes necesarios para la biosíntesis de CFA y CMA se organizan

en dos operones biosintéticos, *cfl*/CFA y CMA, respectivamente. Son positivamente regulados por la temperatura, activándose los operones a temperaturas menores a 18 °C. En el cluster CMA se han identificado siete genes; seis de ellos, *cma*ABCDET codifican las enzimas necesarias para la biosíntesis de CMA; el séptimo gen, *cma*U, aún no posee función conocida. El cluster biosintético CFA contiene nueve genes. Dos codifican una proteína sintetasa tipo I policétido (proteínas *cfa*6 y *cfa*7) y los genes *cfa*1, *cfa*2, y *cfa*3 codifican proteínas transportadoras y de síntesis (Braun et. al, 2009). El gen *cfl* codifica la enzima responsable de la formación del enlace amida entre el CMA y el CFA (Bereswill et. al, 1994). Aunque el grupo de genes que codifican para esta toxina ha sido asociado frecuentemente con plásmidos de gran tamaño (80 a 110 kb), estos genes también pueden ser cromosómicos (Bender et. al, 1999).

2-*Faseolotoxina:* esta toxina es un sulfodiaminofosfinil péptido, inhibe la ornitina carbamoil transferasa, una enzima central en el ciclo de la urea, lo que resulta en la deficiencia de arginina. El modo de acción de esta toxina es tan diverso como sus bases químicas; produce una zona clorótica o halo alrededor del sitio de la infección necrótica, y se propaga en la planta por el floema y xilema (Arrebola et. al, 2011).

3-*Siringomicina:* es una clase de lipodepsinonapeptido que causa fugas de electrolitos a través de los poros formados en la membrana plasmática del hospedante. Diferentes autores proponen que esta toxina es producida por *P. syringae* pv. *syringae* (Bull et. al, 1998; Fogliano et. al, 1999). Su síntesis está codificada por el grupo de genes *syr* que abarca una región de ADN de aproximadamente 37 kb en el cromosoma de *P. syringae* pv. *syringae* B301D. En el cluster de genes *syr* se encuentran seis ORFs implicados en la síntesis de proteínas (*syrB1*, *syrB2, syrC, y syrE*), en la secreción (*syrD*), y en la regulación de siringomicina (*syrP*) (Bender et. al, 1999). Los genes *syrB* y *syrD*, que se conservan entre cepas de *P. syringae* pv. *syringae*, codificarían proteínas que funcionan en la síntesis y exportación de lipodepsinonapeptidos cíclicos (CLP), respectivamente. Las variabilidades encontradas en la producción de CLP *in vitro* y las dificultades para su identificación química, hacen que la búsqueda de los genes *syrB* y *syrD* ofrezcan una herramienta más adecuada para la identificación de cepas productoras de CLP (Sorensen et. al, 1998). La regulación de la producción de siringomicina es compleja, siendo modulada principalmente por factores nutricionales y moléculas señales de plantas. Estas últimas juegan un papel

importante en la activación de la expresión génica de *syrB* y en la producción de siringomicina demostrando que diversos factores ambientales controlan la expresión de genes involucrados en la toxigénesis de *P. syringae* pv. *syringae* (Bender et. al, 1999).

4-*Tabtoxina:* es el precursor de la tabtoxinina-β-lactámica (TβL), la forma biológicamente activa. La estructura química consiste en la forma activa (TβL) unida a serina o treonina mediante un enlace amida. La hidrólisis de esta unión se lleva a cabo por una aminopeptidasa, activada por zinc presente en el periplasma, liberando de este modo la fracción tóxica (TβL). Su acción tóxica consiste en inhibir irreversiblemente la glutamina sintetasa (GS), enzima principal en la asimilación de nitrógeno en plantas, hongos y bacterias. El nitrato es la principal fuente de nitrógeno inorgánico disponible para la planta y es almacenado en vacuolas o convertido en nitrito por la nitrato reductasa (NR). Después de la conversión, el nitrito entra en el cloroplasto (citosol o en la raíz) y se reduce por la nitrito reductasa (NiR) a amoníaco, que posteriormente se convierte a glutamina por la GS usando glutamato como sustrato. El glutamato y la TβL compiten por el mismo sitio blanco en la enzima, aunque la actividad deTβL es dependiente del tiempo, y de la concentración de glutamato. La TβL inhibe irreversiblemente a la enzima alterando la acumulación de amoníaco, alterando la membrana tilacoidal del cloroplasto y produciendo un desacople en la fotorrespiración, llevando a la clorosis (Arrebola et. al, 2011).

La tabtoxina es un β-lactámico monocíclico producido por *P. syringae* pv. *tabaci*, *coronafaciens*, y *garcae*. Se han caracterizado tres genes de una región de 31 kb relacionados con la síntesis de tabtoxina: *tabA*, *tabB*, y *tblA* (Bender et. al, 1999; Lydon and Patterson, 2001). *TabA* codifica para una enzima que reconoce un sustrato análogo de un compuesto en la ruta biosintética de la lisina, el gen *tabB* codifica un producto con actividad transferasa que convierte un compuesto desconocido en un derivado de acetilo, que se metaboliza adicionalmente a TβL, y el gen *tbl*A está regulado por el gen *gacS* (*lem*A) en *P. syringae* pv. *coronafaciens*, el cual se encuentra conservado entre patovares de *P. syringae* y contiene dominios que son característicos de la proteína histidin quinasa que funcionan como sensores ambientales (Bender et. al, 1999).

6-Control de bacterias fitopatógenas

El manejo de las bacterias fitopatógenas se realiza mediante antibióticos y compuestos de cobre que poseen alta toxicidad para los consumidores y el ambiente, con el uso prolongado. Además, los microorganismos adquieren rápidamente resistencia contra éstos, tornando ineficaces los tratamientos (Lo Cantore et. al, 2004; Vasinauskiene et. al, 2006). Para evitar el tizón y la pústula bacteriana en la práctica se sugiere la rotación de cultivos y la utilización de semillas producidas en lotes sanos y/o certificadas mediante análisis sanitario (Formento et. al, 2008). Como estrategia alternativa para el manejo de estas enfermedades bacterianas, se está probando como pesticidas el uso de compuestos derivados de plantas medicinales (Vasinauskiene et. al, 2006). Estos productos naturales se pueden dividir en varias categorías fitoquímicas: fenoles, quinonas, flavonas y flavonoides, taninos, cumarinas, aceites esenciales (AE), alcaloides, lectinas y polipéptidos. Varios estudios confirman la actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral de los productos mencionados. En consecuencia, la preservación de especies vegetales nativas resulta crucial para mantener la biodiversidad (Bakkali et. al, 2008; ChingVoon et. al, 2012; Cowan,1999; Demo et. al, 2005; Demo and Oliva, 2008).

Los microorganismos han adquirido resistencia a compuestos químicos utilizados comunmente para su control, por lo que surge la necesidad de buscar otras alternativas eficaces. Los productos naturales se están reconociendo como estrategia válida para el biocontrol de microorganismos y los fitopatógenos no quedan excentos de estos. Así, entre otras, una correcta utilización de productos antimicrobianos de origen natural aplicados en reemplazo de pesticidas convencionales, sobre cultivos y/o sobre semillas evitaría el desarrollo de la enfermedad reduciendo la liberación al medio ambiente de productos contaminantes no deseados. Además, los productos derivados de vegetales son considerados más amigables con el medio ambiente, incapaces de generar desechos tóxicos y resistencia microbiana. Estos "pesticidas verdes" estan aprobados para su uso en la industria alimentaria y cosmética, no requieren demasiadas regulaciones legales. Además, la formulación y aplicación de productos en base a los mismos no demandaría tiempo y podrían ser rápidamente aprovechados para controlar y/o evitar las bacteriosis en el campo (Isman, 2004).

7-Plantas medicinales

Con la denominación de **plantas medicinales** se hace referencia a aquellos vegetales que poseen principios activos que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa para el organismo vivo. Un principio activo se define como aquella sustancia cuya principal utilidad es aliviar la enfermedad o restablecer la salud, confiriendo las propiedades terapéuticas a estas plantas y en base a ellos se clasifica y seleccionan. Todas las partes del vegetal pueden contener principios activos, ya sea semillas, frutos, hojas, tallos y raíces. Con el transcurso del tiempo se han aislado estos principios y se han realizado estudios químicos, fisiológicos y médicos. Muchos de estos productos naturales se fueron incorporando a las farmacopeas, continuando en la actualidad con el uso de ellos en la medicina humana y animal (Davies, 2004; Núñez y Cantero, 2000). Hay varias formas de preparación y aplicación de los productos naturales obtenidos de plantas para el tratamiento de diferentes dolencias. Estos incluyen infusiones, decocciones, aplicaciones en fresco, polvo, macerados, soluciones acuosas, alcohólicas, entre otras. Las infusiones y decocciones son los métodos más comunes utilizados en las preparaciones de estos remedios naturales (Polat and Satil, 2012).

A nivel mundial, especialmente en países de Sur y Centro América, el uso de plantas medicinales tiene un aporte significativo en el cuidado primario de la salud. Se cree que existen en el planeta alrededor de 250.000 a 500.000 especies de plantas de las cuales sólo entre el 1 al 10% son usadas como alimento para humanos y animales (Cowan, 1999). Se han aislado alrededor de 12.000 compuestos procedentes de organismos vegetales y se estima que constituyen tan solo el 10% de los metabolitos secundarios (Domingo y López Brea, 2003).

Las plantas tienen una capacidad ilimitada de sintetizar compuestos, lo que las hace fuente natural importante de sustancias que poseen propiedades biológicas. Entre los compuestos que sintetizan la mayoría de las plantas, se reconocen: aceites esenciales (AE); compuestos fenólicos, de los cuales los más simples consisten en un anillo fenólico sustituido; flavonoides que constituyen la familia más amplia de fenoles naturales, éstos son ubicuos en las células fotosintéticas y comúnmente son encontrados en frutos, vegetales, semillas, flores, té, vinos, propóleos y miel, alcaloides; cumarinas; lectinas y polipéptidos; quinonas y taninos (Arredondo et. al, 2004; Domingo y López-Brea, 2003).

7.a-Obtención de productos naturales

Existen diferentes técnicas para la extracción de productos naturales apartir de plantas medicinales, tales como los AE y extractos vegetales (EV). Las más empleadas se resumen en el siguiente esquema (Figura 3).

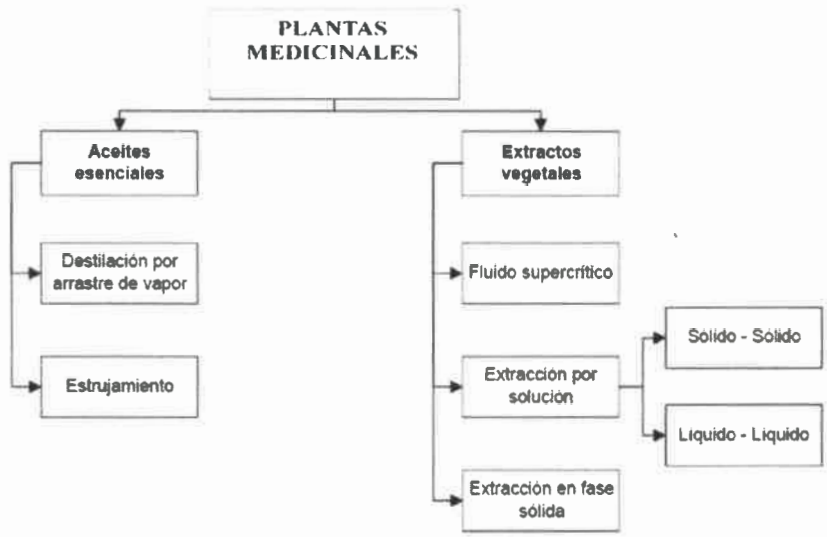


Figura 3: Métodos de obtención de aceites esenciales y extractos vegetales a partir de plantas medicinales.

La obtención de extractos es recomendable en plantas que contienen baja concentración de AE o no están presentes, pero sí lo están otros compuestos activos. Los AE constituyen la fracción volátil de los principios activos de una planta, y por tanto, su principal medio de obtención son las técnicas de destilación en la que se volatilizan estos principios utilizando el calor como estrategia. Los extractos consisten en la fracción no volátil de estos, es decir, son los compuestos no volatilizables o inestables a la temperatura, que no se pueden obtener mediante destilación, sino que se obtienen mediante diversas técnicas de extracción (Raaman, 2006).

La extracción se considera una operación de transferencia de materia basada en la disolución de uno o varios de los componentes de una mezcla (líquida o que forma parte de un sólido) en un disolvente selectivo inmiscible en la fase que contiene el extracto (Costa, 2004). La distinción entre extracción sólido-líquido y extracción líquido-líquido radica en

el estado del material, es decir si el material a extraer se encuentra en fase sólida o líquida. En general, se denomina extracción sólido-líquido al procedimiento consistente en poner en contacto un sólido triturado (material vegetal) con un líquido (disolvente de extracción) en el que son solubles algunas de las sustancias de las que se compone el sólido. Del proceso se obtiene un sólido agotado y una disolución o extracto formado por el disolvente y las sustancias disueltas en él (Ortuño, 2006).

La tintura alcohólica, tintura madre, tintura o simplemente extracto hidro-alcohólico (EHA) se obtiene por un proceso de extracción sólido-líquido a partir de la maceración de la planta, generalmente seca y con un tamaño de partícula no muy pequeño, con una disolución de alcohol:agua del 25 al 50%. El macerado o mezcla hidro-alcohólica se conserva en un recipiente hermético, en un lugar fresco y oscuro, agitando periódicamente para homogenizar la mezcla. Dependiendo de la planta y otros factores, se cambia la mezcla alcohol-agua y luego de un tiempo de maceración o extracción conveniente se cuela, se filtra el extracto, se envasa y se almacena en forma adecuada (Ortuño, 2006).

La extracción líquido-líquido se utiliza para separar los constituyentes de una solución acuosa y suele realizarse una vez obtenida la tintura alcohólica o el EHA. La extracción líquido-líquido puede aplicarse cuando uno o más de los constituyentes de la tintura son solubles en un líquido orgánico, prácticamente inmiscible con el agua, mientras que los restantes son mucho menos solubles (Glasstone y Sesonske, 2005).

La obtención de AE se realiza por un proceso de hidrodestilación. Este método de arrastre de la esencia con vapor es uno de los más clásicos y antiguos. Las plantas cortadas se sitúan en un recipiente con un doble fondo perforado, que posee agua en su parte inferior. Al aplicarle calor, los vapores de agua arrastran los AE o esencias, los cuales se condensan en un refrigerante, para luego ser depositados en un receptáculo en el cual el AE se separa del agua, permaneciendo en la capa superior (Beoletto et. al, 2016).

7.b-Plantas aromáticas

Algunas especies de plantas medicinales son aromáticas y se definen como aquellas que pueden generar por algún proceso fisicoquímico un producto aromático, caracterizado por poseer olor o sabor determinado, sin evaluar su calidad comercial o estética (Bamba et. al, 1993). Dentro de este grupo hay una gran diversidad de especies cuya característica en

común es la producción de AE y/o resinas, las cuales son una mezcla fragante de líquidos (Gunther, 1948). Los AE son producidos en pelos o tricomas glandulares, conductos oleosos o resinosos (Raut and Karuppayil, 2014).

Las plantas aromáticas suelen tener una variación en cuanto a calidades, debido a la presencia de los quimiotipos, es decir, individuos de una misma especie que se diferencian entre sí por la composición química en sus aceites (Zygadlo and Juliani, 2000). Estas variaciones pueden estar dadas por las condiciones ambientales, las cuales provocan un cambio permanente en los caracteres químicos de sus AE (Iaco et. al, 1998). La variación genética, variedad de planta, nutrición de la planta, aplicación de fertilizantes, ubicación geográfica, clima, variaciones estacionales, condiciones estresantes durante el crecimiento, cosecha y almacenamiento post cosecha, son factores que afectan la química de los AE. Por otro lado, el material vegetal y los métodos de extracción también determinan el rendimiento y la composición química; los solventes de extracción son capaces de extraer distintos compuestos según la naturaleza química de los mismos. Las distintas partes del vegetal del cual sean extraídos los AE también presentan composición química diferente, demostrando variaciones cuando son obtenidos de hojas, frutos, tallos, flores, etc. Todos estos factores influencian variaciones en las actividades biológicas que presentan los AE (Raut and Karuppayil, 2014).

7.b1-*Thymus vulgaris*

Thymus vulgaris, vulgarmente conocido como tomillo, pertenece a la familia Lamiaceae. Es una planta vivaz, leñosa, muy polimorfa, de 10 a 40 cm de altura, con numerosas ramas, leñosas, erectas, compactas, parduzcas o blanco-aterciopeladas. Las hojas, de 3 a 8 mm son lineares, oblongas, sentadas o brevemente pediceladas, opuestas, tomentosas, sin cilios, con el pecíolo o sus márgenes revueltos hacia abajo y blanquecinas por su envés (Figura 4). Las flores son axilares y agrupadas en la extremidad de las ramas, formando una especie de capítulo terminal, a veces, con inflorescencia interrumpida; las brácteas son verde grisáceas; el cáliz algo giboso, con pelos duros, con 3 dientes en el labio superior, cortos, casi iguales y 2 en el inferior, muy agudos, más largos, con pelos en sus bordes y de color rojizo; la corola, un poco más larga que el cáliz, con el labio superior erguido y el inferior trilobulado y de color blanquecino o rosado; los 4 estambres

sobresalen de la corola. El fruto es tetraquenio, lampiño, de color marrón. El nombre genérico proviene del verbo griego *Thym*, perfumar, en alusión al intenso y agradable aroma de la planta (Muñoz, 1993).

Figura 4: *Thymus vulgaris*
(https://es.wikipedia.org/wiki/Thymus)

El género *Thymus* consiste de 928 especies, originarias de Europa, el cual se ha expandido a América, Asia y Australia. Este género es rico en AE con compuestos terpénicos fenólicos, aldheídos, terpenos alcohólicos, cetonas y ésteres. Pueden ser divididos en 6 quimiotipos, basándose en los constituyentes terpénicos dominantes: carvacrol, timol, linalol, tujanol, α terpineol, borneol y p-cimeno (Nabavi et. al, 2015; Rota, 2008).

Thymus vulgaris, se emplea desde la antigüedad como condimento y como planta medicinal. Es una de las especies más representativas de este género con importantes utilidades en muchas industrias, principalmente en alimentos como aditivos y condimentos. Su uso en alimentos está aprobado por el Código Alimentario Argentino (CAA). Los AE de esta especie poseen actividad antimicrobiana ampliamente documentada contra bacterias y hongos, mediada mayormente por los compuestos fenólicos timol y carvacrol (Hudaib et. al, 2002; Nabavi et. al, 2015). Los usos más populares del tomillo se relacionan con transtornos digestivos, afecciones del sistema respiratorio y propiedades antisépticas. En la actualidad se estudia su acción sobre el sistema inmunológico y el posible efecto sinérgico

al asociarlo con otros inmuno estimulantes. Todas las propiedades medicinales del tomillo, unidas a su baja toxicidad, permiten su aplicación en tratamientos prolongados sin generar reacciones secundarias (Nabavi et. al, 2015).

La actividad antimicrobiana de esta especie ha sido ampliamente documentada encontrando efecto inhibitorio del AE sobre bacterias de importancia clínica, como *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, *Klebsiella pneumoniae, Bacillus cereus, Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Nabavi et. al, 2015). Además se ha demostrado el efecto inhibitorio sobre bacterias alteradoras de alimentos como *Salmonella tiphymurium, Listeria monocytogenes, B. cereus, E. coli, S. aureus,* entre otras, permitiendo mayor duración de los alimentos (Burt, 2004; Nabavi et. al, 2015). Es una de las especies más estudiadas con potencialidad para ser utilizado en formulaciones de pesticidas debido a que sus componentes fenólicos timol y carvacrol han demostrado capacidad antimicrobiana sobre bacterias y hongos fitopatógenos (Ismal and Machial, 2006).

7.b2-*Origanum vulgare*

Origanum vulgare (L.), ssp. *vulgare*, perteneciente a la familia Lamiaceae, es una especie originaria de Europa y Asia, desde donde se ha extendido hacia todo el mundo. Es una planta vivaz, de tallo erguido, de hasta 1 m de altura, velloso, generalmente ramificado en su parte superior, de color rojizo. Sus hojas pecioladas, poseen de 1 a 4 cm, son ovales, enteras, puntiagudas, lampiñas por el haz y vellosas por su envés (Figura 5). Las flores, se encuentran reunidas en glomérulos densos dispuestos en panojas terminales, las espiguillas poseen de 5 a 30 mm; las brácteas son más largas que el cáliz, pero sin duplicar su longitud, de 4 a 5 mm, son violáceas; el cáliz es tubuloso, con los 7 dientes casi iguales; la corola posee tubo erguido, saliente, de 4 a 7 mm de color generalmente rojizo, a veces pueden ser blancas; de los 4 estambres, los anteriores son mayores. El fruto es un tetraquenio, con cada parte ovoidea y lisa. Su nombre genérico deriva de los vocablos griegos *oros*, montaña y *ganos*, adorno, en alusión al carácter ornamental de las especies de este género en los montes (Muñoz, 1993).

Es una planta muy rica en AE, aunque la cantidad y calidad varía dependiendo de los diferentes quimiotipos. Tiene propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias y expectorantes, que son apreciadas por la industria farmacéutica. Posee

propiedades medicinales tales como digestiva, antiespasmódica y estomacal. Es efectiva contra el reumatismo, tortícolis, asma, debilidad estomacal, falta de apetito, infecciones del tracto urinario, infecciones de la piel e intoxicaciones alimentarias. Además, por su propiedad antioxidante es muy utilizada en la conservación de alimentos y muy útil como saborizante en gastronomía, por lo que su uso en alimentos está aprobado por el CAA (Alarcón Restrepo, 2011; Minagri, 2009).

Las especies de *O. vulgare* presentan gran variabilidad en la composición de sus AE, debido a que existen muchas subespecies, pero la composición y la cantidad de estos metabolitos secundarios dependen principalmente de factores climáticos, la altitud, la época de cosecha y su estado de crecimiento (Licina et. al, 2013). Como componentes principales se encuentran: carvacrol, timol, limoneno, β-cariofileno, p-cimeno, canfor, linalol y α-pineno (Arcila-Lozano et. al, 2004). Sin embargo, se reconocen dos quimiotipos principales hasta el momento, uno que posee como componentes mayoritarios a carvacrol y timol, ambos compuestos fenólicos y el otro, que posee D-germacreno, terpineno 4-ol y cis-transsabineno (Licina et. al, 2013).

Esta especia es bien conocida por su actividad antioxidante y por su actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-positivas como *S. aureus* y *Bacillus subtilis*, y Gram-negativas como *E.coli, S. typhimurium* y *P. syringae* (Klein et. al, 2013; Kotan et. al, 2014; Nostro, 2007; Albado Plaus et. al, 2001).

Figura 5: *Origanum vulgare (https://en.wikipedia.org/wiki/Origanum)*

7.b3-Aceites esenciales

Durante miles de años, los AE de plantas han sido utilizados como medicamentos, especias y perfumes (Bagci y Digrak, 1996; De Pooter et. al, 1995; Zygadlo and Juliani, 2000). Tradicionalmente se refiere a estas sustancias como metabolitos secundarios, los cuales están distribuidos entre grupos taxonómicos limitados dentro del reino vegetal (Cowan, 1999). Los aromas y sabores están determinados por la calidad y cantidad de los componentes terpénicos que forman parte de los mismos. Existen diferencias en el sabor y aroma de distintas muestras de una misma especie vegetal, debido a la variación química de la composición cuali y cuantitativa del aceite. Esta variación puede estar determinada por el lugar donde crecen las plantas, la época de cosecha, la morfología, el genotipo, quimiotipo, entre otros (Hirasa y Takemasa, 1998; Svoboda y Hampson, 1999; Zygadlo and Juliani, 2000).

Químicamente, los AE consisten en mezclas de lípidos sencillos llamados terpenos. Estructuralmente están constituidos por la unión de dos o más unidades de isopreno y se clasifican según el número de este que poseen; principalmente están formados por monoterpenos (2 isoprenos) y sesquiterpenos (3 isoprenos). Los compuestos oxigenados derivados de estos hidrocarburos incluyen alcoholes, aldehídos, ésteres, éteres, cetonas, fenoles y óxidos (Croteau et. al, 2000; Primo-Yúfera, 1995; Sikkema et. al, 1995; Svoboda and Hampson, 1999).

Los AE han mostrado tener destacadas propiedades funcionales en beneficio del hombre y su salud, pudiendo jugar un rol muy importante en el agregado a productos alimenticios y como quimioterápicos en enfermedades de origen humano y animal. Esto ha permitido su uso en la industria alimenticia, cosmética, farmacológica y de pesticidas (Raut and Karuppayil, 2014). Se ha sugerido el uso de los AE en urología, dermatología, en desordenes del sueño y nerviosos, como laxativos, en gastritis, sobre el sistema cardíaco y vascular, como inmunomoduladoras, en resfríos, etc. (Svoboda and Hampson, 1999).

Los AE o esencias, se elaboran en el citoplasma de ciertas células vegetales y se acumulan en diferentes partes de la planta, pudiendo localizarse en un determinado órgano vegetal: flores, hojas, frutos y hasta raíces o en toda la planta (Burt, 2004; Ojeda et. al, 2001). En algunas especies se distribuyen uniformemente por todas sus células, en otras se almacenan en bolsas secretoras, como ocurre con la corteza de la naranja, el limón o la

mandarina (Ojeda et. al, 2001). Estos compuestos oleosos juegan un rol defensivo muy importante en la planta, evitando el daño por insectos. Estos compuestos actúan como mecanismos de defensa directos, repeliendo a los herbívoros y a los patógenos, o como mecanismos indirectos atrayendo a artrópodos predadores de herbívoros (Banchio et. al, 2007).

El estudio de propiedades biológicas de AE y otros productos obtenidos de plantas ha resurgido en los últimos años, en parte debido a la aparición de cepas multirresistentes a antibióticos y a la excesiva utilización de productos contaminates para el medio ambiente. Entre las propiedades descriptas para los AE se encuentran: antimicrobianas, antivirales, antiparasitarias, antioxidantes, antimutagénicas, antitumorogénicas, antiinflamatorias e inmunomoduladoras. Dentro de estas, la actividad contra bacterias y hongos ha sido una de las más estudiadas. Algunos aceites son activos contra bacterias pero no contra hongos y viceversa, mientras que otros estimulan el crecimiento de estos microorganismos (Darouk et. al, 1995; Deans et. al, 1995; Nakamura et. al, 1999; Primo et. al, 2001; Zygadlo and Juliani, 2000). Además, los AE han demostrado capacidad inhibitoria tanto frente a bacterias Gram positivo como a Gram negativo, resultando ser estas últimas más resistentes (Carson et. al, 1996; Chinou et. al, 1997; Imai et. al, 2001). Por otro lado, existen evidencias de que la efectividad antimicrobiana es mayor contra levaduras que contra bacterias (De Pooter et. al, 1995; Raut and Karuppayil, 2014). Los principales registros sobre actividad antimicrobiana de AE corresponden a microorganismos relacionados a alteraciones en alimentos o causantes de enfermedades en animales y humanos. Sin embargo, hoy en dia su aplicación se esta extendiendo hacia la agricultura, para ser aplicados como pesticidas (Bakkali et. al, 2008; Isman and Machial, 2006).

Los componentes que forman parte de los AE son los que les confieren sus propiedades biológicas (Deans et. al, 1995; El-Sakhawy et. al, 1997, Raut and Karuppayil, 2014). Estas propiedades son atribuídas generalmente a los componentes mayoritarios que forman parte de los mismos, aunque se ha demostrado que los componentes minoritarios también son importantes en la actividad, estableciendo asociaciones sinérgicas entre los mismos, mejorando el efecto. Los terpenos principales poseen actividad antimicrobiana por sí mismos, pero no siempre esta actividad concuerda con la del AE completo. Esto indica que las mezclas complejas de estos terpenos determinan que se den asociaciones entre los

componentes terpénicos, las cuales pueden ser sinérgicas, aumentando el efecto individualo antagónicas disminuyendo el efecto antimicrobiano (Didry et. al, 1993; Fyfe et. al, 1998; Hirasa and Takemasa, 1998).

El mecanismo de acción primario de los AE sobre la célula bacteriana se basa en la desestabilización de la membrana plasmática produciendo como consecuencia alteración de los procesos respiratorios, de la incorporación de nutrientes, de la salida de desechos, etc. (Burt, 2004; Di Pasqua et. al, 2007).

Para determinar la actividad antimicrobiana se utilizan distintas metodologías que permiten comparar la efectividad de distintos AE sobre los microorganismos. Estas técnicas incluyen determinación de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), Concentración Bactericida/Fungicida Mínima (CBM/CFM), determinación de DL50 y CIM50 (Raut and Karuppayil, 2014).

8-Planteamiento del problema

Argentina es uno de los principales países productores de soja en el mundo. Sin embargo, se están produciendo enfermedades poco documentadas que pueden llegar a representar un problema para los rendimientos de cultivos en un futuro cercano, como consecuencia del cambio climático y de la utilización de híbridos o variedades nuevas (http://agro.fauba.info/node/164). El monocultivo de soja, junto a la siembra directa generan excelentes condiciones para la multiplicación y supervivencia de patógenos causantes de enfermedades de fin de ciclo (EFC). Entre las principales EFC se encuentran el tizón y pústula bacterianos, las cuales se encuentran dentro de las principales enfermedades foliares (Formento et. al, 2008). Estas bacterias producen diversos factores de virulencia que ayudan a la instalación y diseminación de la enfermedad. Estos factores dependen de la cepa bacteriana aislada y pueden estar presentes en todos o algunos de ellos, lo que le otorga diferentes grados de virulencia, en consecuencia podrían ocasionar variaciones en la severidad de la lesión (Cracogna, 2007). Los exopolisacáridos (EPS) y diversas toxinas están involucrados en este proceso (Schenk et. al, 2006).

Los microorganismos han adquirido resistencia a compuestos químicos utilizados comúnmente para su control, por lo que surge la necesidad de buscar otras alternativas

eficaces. Los productos naturales estan siendo reconocidos como estrategia válida para el biocontrol de microorganismos, y los fitopatógenos no quedan exentos de estos.

Los AE y sus componentes están generando cada vez mayor interés debido a su inocuidad y seguridad, a su amplia aceptación por parte de los consumidores y a sus potenciales y múltiples usos (Ben El Hadj Ali et. al, 2013). Los AE han demostrado tener destacadas propiedades funcionales en beneficio de la salud del hombre pudiendo jugar un rol muy importante en el agregado a productos alimenticios y como quimioterápicos en enfermedades de origen humano y animal. Entre las propiedades descriptas se encuentran: actividad antitumorogénica (Crowell, 1999), actividad antioxidante (Tiziana Baratta et. al, 1998; Zygadlo and Juliani, 2000) y actividad antimicrobiana, entre otras (El-Sakhawy et. al, 1997; Tiziana Baratta et. al, 1998; Demo et. al, 2005; Oliva et. al, 2011; Zygadlo and Juliani, 2000). Además, se está probando el uso de AE y extractos naturales provenientes de vegetales frente a bacterias fitopatógenas, encontrándose resultados promisorios. Se ha descripto buena actividad antimicrobiana de AE de *Coriandrum sativum* L. y *Foeniculum vulgare* Miller var. vulgare (Miller) y de miembros de la familia Lamiaceae contra bacterias Gram negativo como *E. coli* y bacterias fitopatógenas (Lo Cantore et. al, 2004; Soylu, 2003). También se está ensayando el uso de extractos sobre semillas como medida preventiva para evitar las infecciones bacterianas en las plantas (Kotan et. al, 2014; Van der Wolf, 2012).

Actualmente las medidas de control de los microorganismos fitopatógenos, especialmente bacterias, son escasas. Por un lado, se utilizan estrategias de prevención de enfermedades bacterianas mediante la siembra de semillas certificadas y libres de patógenos y prácticas culturales adecuadas. Por otro lado, se encuentran los antibióticos, los que no poseen demasiada eficacia, generan rápida resistencia bacteriana y por lo general se encuentran prohibidos en la mayoría de los países. En la práctica se utilizan compuestos basados en cobre el cual, a pesar de ser utilizado en formulaciones actuales de pesticidas, es altamente tóxico para el vegetal y el ambiente, ya que en este último caso, se acumula en el suelo.

Existen pocos productos antibacterianos adecuados disponibles en el mercado, por lo que resulta una necesidad cada vez mayor la búsqueda de alternativas eficaces para combatir las enfermedades de vegetales y que además no sean contaminantes del ambiente.

En este sentido las plantas medicinales son fuente de una gran cantidad de compuestos bioactivos, entre las cuales las plantas aromáticas poseen un lugar destacado debido a la capacidad de sintetizar AE. Estos compuestos oleosos, de naturaleza terpénica poseen actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos, provenientes de distintos orígenes y causantes de numerosas patologías. Además, al tener un origen natural no poseen elevada toxicidad, ni generan resistencia en el organismo hospedante; esto los convierte en una alternativa natural para el tratamiento de bacterias fitopatógenas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Los diferentes factores de virulencia bacterianos contribuyen a la fitopatogenicidad en soja. Productos naturales controlan a estos fitopatógenos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el uso potencial de productos naturales de origen vegetal para el manejo de bacteriosis del cultivo de soja.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo 1: Aislar y caracterizar *Pseudomonas* fitopatógenas del cultivo de soja.

Objetivo 2: Investigar la producción de factores de virulencia presuntamente asociados a la patogenicidad de los aislamientos.

a. Producción de fitotoxinas: tabtoxina, faseolotoxina, siringomicina, coronatina,

b. Producción de biofilm.

Objetivo 3: Determinar la capacidad antimicrobiana de productos naturales de especies vegetales sobre la producción de biofilm y fitotoxinas en *Pseudomonas* fitopatógenas.

Objetivo 4: Evaluar la bioactividad de los productos vegetales en soja.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS BACTERIANAS

1. Recolección de muestras de soja

Se recolectaron al azar hojas de plantas de soja enfermas con síntomas evidentes de bacteriosis en las campañas 2009/2010 y 2010/2011. Las muestras se obtuvieron de cultivos de diferentes provincias del país: Córdoba, Santa Fe, San Luis y Salta.

2. Procesado de las muestras y aislamiento bacteriano

Las hojas de soja se desinfectaron superficialmente por inmersión en alcohol al 70% durante 30 segundos y posteriormente en hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto. Luego se enjuagaron varias veces con agua destilada estéril y se trozaron asépticamente con una tijera estéril. Se las maceró en un mortero estéril y se las dejó durante un minuto en reposo, con el objetivo de obtener una suspensión. Utilizando la suspensión como inóculo se sembró en estrías por agotamiento sobre placas de Petri que contenían los medios de cultivo Agar King B (AKB, medio diferencial para *Pseudomonas*) y Agar Carbonato de Calcio, extracto de levadura, dextrosa (YDCA, para *Xanthomonas*) (Hwang et. al, 2005, López et. al, 2006; Rigano et. al, 2007). Se incubaron a 28-30 °C durante 24-48 h. Cada aislamiento fue purificado realizando sucesivos estriados en los medios de cultivo mencionados anteriormente.

3. Cepas utilizadas

Las cepas de referencia de *P. syringae* utilizadas en este trabajo se detallan en la tabla 1.

Tabla 1: Cepas de referencia de *P. syringae*

Cepas	Origen	Fuente
P. syringae pv. *atropurpurea* Ps5	avena	L. Gallarato
P. syringae pv. *syringae* P61	trigo	H. Huang
P. syringae pv. *tomato* DC3000	tomate	A. Collmer
P. syringae pv. *tabaci* 6605	tabaco	D. Studholmer
P. syringae pv. *syringae* B728a	poroto	S. Lindow
P. savastanoi pv. *glycinea* B076	soja	Y. Zhao
P. syringae pv. *macuolicola*	repollo	J. Dangl
P. syringae pv. *phaseolicola* 1448a	legumbres	A. Collmer

4. Conservación de cepas

Las cepas aisladas se mantuvieron en tubos con AKB, y Agar Tripticasa Soya (ATS) inclinado, a 4 °C y se repicaron mensualmente. Para la conservación de cepas a largo plazo se las repicaron en Caldo Tripticasa Soya (CTS), CKB y/o caldo YDCA con el agregado de glicerol al 20% y se conservaron a -80 °C.

5. Identificación fenotípica de los aislamientos

Se realizó la identificación de las bacterias aisladas teniendo en cuenta:

-Características culturales:

Se observaron características de las colonias: forma, consistencia, cromogénesis, opacidad, tamaño, halo de transparencia en medio YDCA y AKB.

-Características morfológicas:

Se observaron características tintoriales, morfológicas y estructurales mediante tinción de Gram.

-Propiedades fisiológicas y bioquímicas (Anexo I):

a- Prueba de catalasa (CAT)

b-Oxidación-Fermentación de la glucosa (OF)

c-Diferenciación de pigmentos en cultivos de *Pseudomonas* (King B)

d-Reducción de nitratos (NO_3)

e-Prueba para indol (I)

f-Prueba de rojo de metilo (RM) (fermentación ácida mixta)

g-Prueba de Voges Proskauer (VP) (fermentación butilenglicólica)

h- Prueba de citrato (CIT)

i- Movilidad (MOV)

j-Reacciones en agar triple azúcar hierro (TSI)

-Pruebas LOPAT

Pruebas realizadas para la diferenciación de bacterias fitopatógenas del género *Pseudomonas* de aquellas saprófitas. Estas incluyen los siguientes procedimientos:

a-Producción de levano (L)

Procedimiento: se sembró el microorganismo en la superficie de una placa con agar sacarosa (5%), se incubó a 28-30 °C durante 48 h y se observó el crecimiento.

Fundamento: esta prueba se fundamenta en la producción de polímeros de glucosa y levulosa en un medio con alta concentración de sacarosa.

Resultado positivo: colonias bacterianas blancas, muy convexas y mucoides o estrías muy abultadas (Cracogna, 2007).

b-Producción de oxidasa (O)

Procedimiento: un cultivo puro de 24-48 h de incubación fue suspendido en 0,2 mL de solución fisiológica y luego fue colocado un disco comercial de dimetil parafenilendiamina, reactivo que permite la detección de la enzima citocromo C-oxidasa (Finelgold et. al, 1992).

Fundamento: la prueba está basada en la producción de la enzima oxidasa. Esta reacción se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones.

Todas las especies que producen la enzima oxidasa, cuando se encuentran en presencia de oxígeno atmosférico, citocromo C y el reactivo de oxidasa oxidan al reactivo parafenilendiamina, formando indofenol, un compuesto coloreado. Estos sustratos artificiales son incoloros o coloreados según el estado en que se encuentren (oxidado o reducido) (Mc Faddin, 1980).

Reacción positiva: color rosado dentro de 30 segundos.

Reacción negativa: sin cambio de color.

c-Podredumbre de papa (P)

Procedimiento: se colocaron rodajas de papa, previamente lavadas con agua destilada estéril, en cámara húmeda y se inocularon 100 µl del cultivo de las bacterias fitopatógenas en la zona central de la rodaja. Se incubaron las rodajas durante 5 días a 28 °C.

Fundamento: esta prueba permite detectar la producción de protopectinasas por parte de bacterias fitopatógenas.

Resultado positivo: si la bacteria produce protopectinasas se observa el reblandecimiento de los tejidos de la papa (Cracogna, 2007).

d-Arginina dehidrolasa (A)

Procedimiento: se sembraron dos tubos con medio Moeller Decarboxilasa Base (Brittania); sólo a uno de los tubos se le agregó arginina. Se colocó una capa de parafina estéril en ambos tubos los cuales fueron incubados a 28-30 °C durante 24-48 h.

Fundamento: El sistema enzimático arginina dehidrolasa permite que ciertas *Pseudomonas* puedan crecer en condiciones anaeróbicas. La degradación de este aminoácido depende del ATP. Este sistema consiste en dos enzimas: arginina dehidrolasa y citrulina urenidasa, dando como producto final NH_3 el cual produce un cambio de color en el medio (Schaad, 1988) (Figura 6).

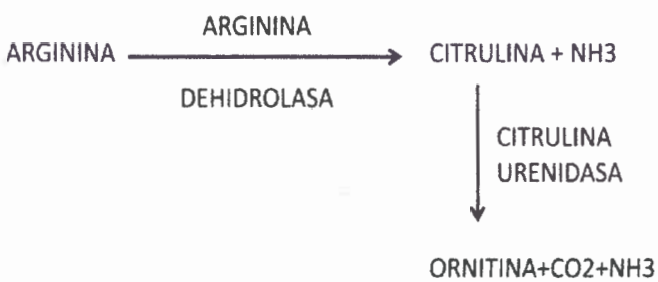


Figura 6: Sistema enzimático involucrado en la degradación de arginina.

e-Hipersensibilidad en tabaco (T)

Procedimiento: Se infiltró una hoja de una planta de tabaco con las suspensiones de cultivo bacteriano, utilizando micropipetas. Las plantas así inoculadas se colocaron en un ambiente controlado a 25 ± 2 °C, durante 24 a 48 h. Se consideró positivo cuando se observó necrosis del tejido infiltrado antes de las 48 h.

Fundamento: La reacción hipersensible es el resultado de un sistema incompatible hospedante-patógeno y se evidencia por el colapso de las células en la zona de infiltración, observando la reacción de los agentes patógenos como amarillamiento de las hojas (Scandiani and Luque, 2009).

6. Identificación genotípica de cepas por ARNr 16S

Se analizó la secuencia de nucleótidos del gen ARNr 16S de 13 cepas aisladas de soja con características fenotípicas coincidentes con *Pseudomonas* sp. (bacilos Gram negativo, quimiorganótrofos, y capaces de oxidar la glucosa). Los cultivos puros fueron repicados en CKB, e incubados a 28-30 °C durante 24-48 h. Fueron repicados en AKB y ATS, según corresponda, y se incubaron a 28-30 °C durante 24-48 h. Los mismos fueron enviados al servicio de secuenciación de la empresa MACROGEN (Corea) para ser analizados de acuerdo a la secuencia del gen que codifica el ARNr 16S. La amplificación del gen del ARNr 16S se llevó a cabo mediante el uso de primers P0 (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y P6 (5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3') (Lane, 1991). Las condiciones de PCR, purificación de los amplicones y secuenciación se realizaron por el Centro de Servicio Macrogen (Seúl, Corea). Las similitudes entre estas secuencias se determinaron utilizando el programa de búsqueda BLAST (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) (Altschul et. al, 1997). La secuencia de nucleótidos reconocida a partir del gen del ARNr 16S (longitud promedio 1400 pb) de las cepas aisladas de soja fueron depositadas en la base de datos en GenBank y se compararon con las secuencias disponibles de cepas conocidas (Oliva et. al, 2015).

Se realizó un análisis de distancia utilizando el programa MEGA versión 4 obteniendo alineamientos múltiples de secuencias de ARNr 16S, mediante el algoritmo de Clustal X 2,0 (Tamura et. al, 2007; Thompson et. al, 1997). Con los datos obtenidos se

construyó un árbol de distancias basado en algoritmos de Kimura (Kimura, 1980; Oliva et. al, 2015).

7. Test de patogenicidad

Con el propósito de reproducir la enfermedad en plantas sanas se realizó la metodología descripta por Schaad (1988).

Se sembraron semillas de soja, desinfectadas previamente con alcohol 70% e hipoclorito de sodio (10%), en macetas conteniendo una mezcla de tierra arena (2:1) y se mantuvieron en invernadero (28 °C, período de luz 12-14 h). Cuando las plantas se observaron con hojas trifoliadas fueron infectadas con cada una de las cepas a probar (DO_{620}: 0,03, equivalente a 10^{6-8} UFC/mL). Para ello se rociaron las hojas de soja con los diferentes cultivos bacterianos; luego se cubrieron las macetas con bolsas de nylon durante 2 días. Las plantas permanecieron en el invernadero hasta la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad. Se inocularon 5 plantas por cepa, y 5 con CKB como controles.

8. Producción de factores de virulencia por cepas de *Pseudomonas* sp.

8.1. Producción de biofilm

-Detección de biofilms por micrométodo espectrofotométrico cuantitativo: se siguió la metodología según Mathur et. al, (2006). Se inocularon microplacas de 48 pocillos con 900 µL de CKB y 100µL de cultivo bacteriano, y se incubaron a 28 °C durante 48 h. Las células libres fueron removidas y se tiñeron los pocillos con CV al 1% durante 30 min. a temperatura ambiente. Se realizaron lavados con agua destilada, realizando posteriormente una lectura visual usando un grado estimativo de producción de biofilm: fuerte (+++), moderado (++), débil (+), ausente (-). El biofilm se cuantificó por solubilización con 1500 µL de etanol al 95% y la absorbancia fue determinada en un espectrofotómetro a 570 nm. (O'Toole et. al, 1998).

8.2.Producción de fitotoxinas

Se realizó la detección fenotípica y genotípica de las fitotoxinas. Para la detección genética se realizó la extracción de ADN a partir de cada una de las cepas a ensayar.

✓ Extracción de ADN

Cada cepa de *Pseudomonas* sp. a analizar fue cultivada en CKB durante 16 h y luego centrifugada a 3000 rpm. durante 10 min. El sobrenadante fue descartado, resuspendiendo el pellet en 100 µL de TE (tris CLH 100mM pH:8 + EDTA 10mM pH:8). Se agregaron 200 µL de solución de lisis (SDS 1% + ClNa 25mM) y ARNasas, 5 µL de una concentración 5mg/mL). Se incubó a 37 °C durante 30 min. y a 65 °C, 5 min. Luego se agregaron 600 µL de cloroformo, agitando varias veces. Se centrifugó a 10000 rpm. durante 2 min.

Se preparó una solución precipitante (360 µL de agua y 40 µL de solución precipitante concentrada). Se transfirió la fase acuosa al tubo con solución precipitante preparada anteriormente, se invirtió varias veces, y se centrifugó a 10000 rpm. durante 2 min. El sobrenadante se descartó y se agregaron 50 µL de NaCl. Se agregaron también 300 µL de etanol frío, incubando a -20 °C durante 10 min. Luego se centrifugó a 10000 rpm. durante 3-4 min. Se descartó el etanol, y se realizaron lavados con etanol 70% frío, se dejó evaporar en estufa a 37 °C durante 12 h.

a) Producción de coronatina

✓ **Detección fenotípica:** Para la realización de esta técnica se siguió la metodología según Hwang et. al, (2005) y Chowdhury et. al, (2013), con modificaciones.

Se realizó la siembra de los microorganismos en CKB y se incubaron a 28 °C durante 48 h. Se tomaron 50 µL de cada cultivo y se colocaron en 1 mL de Medio Mínimo (MM); se incubaron en agitación a 20 °C, durante 4 días y luego se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min. Con 20 µL del sobrenadante se inoculó la parte apical de discos de papa, los cuales fueron incubados a 28 °C., durante 4 días, en cámara húmeda. Se realizó un control negativo con MM.

Se consideró positiva la producción de coronatina cuando se observó hipertrofia en el tejido vegetal del tubérculo.

✓ **Detección genotípica:** La reacción de PCR fue llevada a cabo utilizando el Primer 1 y el Primer 2 (Tabla 2) (Schaad et. al, 2001). En un volumen final de reacción de 50 µL se incluyeron:

Buffer	1X
$MgCl_2$	1.5 mM
dNTPs	0.2 mM c/u
Primer	2 µM
Primer	2 µM
Taq polimerasa	1.5 U
ADN	5 µL

Las amplificaciones se llevaron a cabo con el siguiente ciclo de temperaturas:

1 ciclo de:	94 °C	3 min.
30 ciclos de:	93 °C	1 min.
	58 °C	1,30 min.
	72 °C	1 min.
1 ciclo de:	72 °C	8 min.

Los productos de amplificación se resolvieron en gel de agarosa al 1,2% a 90 V durante 1 h. Los geles se tiñeron con 1 ml de tinción de gel de ADN SYBR Safe por 50 mL de agarosa fundida y se fotografiaron bajo luz UV con digitalización del gel por MiniBisPRO.

b- Producción de faseolotoxina

✓ **Detección fenotípica:** Para la realización de esta técnica se siguió la metodología según Sawada et. al, (1997), con modificaciones. Se realizó la siembra de los microorganismos en CKB, se incubaron durante 48 h a 28 °C. y 100 µL de cada cultivo fueron inoculados en MM+glucosa y se incubaron en agitación a 18 °C. durante 35 h. Se centrifugaron a 7000 rpm. durante 8 min. El sobrenadante fue fraccionado en dos, colocando en una fracción 10 mM de arginina. Se realizaron placas con medio mínimo (MM)+glucosa, las cuales fueron inoculadas con 4mL de ATS semisólido (0,7% agar) con el agregado de un cultivo de *E. coli* de 16 h de incubación. Se sembró sobre ellas 20 µL de las fracciones de sobrenadante previamente obtenidas. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 48 h.

La producción de la toxina se consideró positiva cuando se observó un halo de inhibición alrededor de la gota de sobrenadante sin el agregado de arginina. La arginina revierte el efecto de la toxina evitando la aparición del halo de inhibición de crecimiento alrededor de la gota del sobrenadante con el agregado de arginina.

c- Producción de siringomicina

✓ **Detección fenotípica:** Para la realización de esta técnica se siguió la metodología según Hwang et. al, (2005) con modificaciones.

Se realizó la siembra de los microorganismos en CKB; se incubaron durante 120 h a 28 °C y luego se centrifugaron los cultivos a 3000 rpm. durante 10 min.

Se realizaron placas con agar SRM (medio para siringomicina, Anexo I), se inocularon 20 µL con el sobrenadante de cada una de las crepas a probar, luego se colocó cloroformo durante 15 min, y se dejó evaporar. Posteriormente fueron exprayadas con una solución de esporas de *Geotrichum citrii auranti* y agua destilada estéril (1/10). Se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h.

La producción de siringomicina se consideró positiva cuando se observó un halo de inhibición de crecimiento de *G. citrii auranti* alrededor del inóculo.

✓ **Detección genotípica:** La reacción de PCR fue llevada a cabo utilizando dos pares de primers: Primer B1 y Primer B2 (Sorensen et. al, 1998; Schaad et. al, 2001) y primer D1 y primer D2 (Sorensen et. al, 1998) (Tabla 2). En un volumen final de reacción de 50 µL se incluyeron:

Buffer	1X
$MgCl_2$	1.5 mM
dNTPs	0.2 mM c/u
Primer	2 µM
Primer	2 µM
Taq polimerasa	1.5 U
ADN	5 µL

Las amplificaciones se llevaron a cabo con el siguiente ciclo de temperaturas:

1 ciclo de desnaturalización	95 °C	5 min

29 ciclos de:	93 °C	1 min.
	60 °C	30 seg.
	72 °C	1 min.
1 ciclo de polimerización:	72 °C	10 min.

Los productos de amplificación se resolvieron en gel de agarosa al 1,2% a 90 V durante 1 h. Los geles se tiñeron con 1 ml de tinción de gel de ADN SYBR Safe por 50 mL de agarosa fundida y se fotografiaron bajo luz UV con digitalización del gel por MiniBisPRO.

d-Producción de tabtoxina

✓ **Detección fenotípica:** Para la realización de esta técnica se siguió la metodología según Lydon and Patterson, (2001) y Barta et. al, (1992) con modificaciones.

Se realizó la siembra de los microorganismos fitopatógenos en CKB y se incubaron durante 48 h a 28 °C. Pasado este tiempo se centrifugaron a 3000 rpm. durante 10 minutos, reservando el sobrenadante con el cual se embebieron discos de papel de filtro (20 µL).

Se realizó la siembra de los microorganismos fitopatógenos en CKB y se incubaron durante 120 h a 28 °C. Pasado este tiempo se centrifugaron a 3000 rpm. durante 10 min. El sobrenadante fue fraccionado en dos, colocando a una fracción 5 µL/mL de glutamina. Se realizaron placas con MM+glucosa, las cuales fueron inoculadas con 4mL de ATS semisólido (0.7% agar) con el agregado de un cultivo de *E. coli* de 16 h de incubación. Se sembró sobre ellas 20 µL de las fracciones de sobrenadante previamente obtenidas. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 48 h.

La producción de la toxina se consideró positiva cuando se observó un halo de inhibición de crecimiento de *E. coli* alrededor de la gota del sobrenadante sin glutamina. La glutamina favorece la reversión del efecto de la tabtoxina, no observándose halo de inhibición de crecimiento alrededor de la gota del sobrenadante con glutamina.

✓ **Detección genotípica:** La reacción de PCR fue llevada a cabo utilizando el primer *tblA1* y el primer *tblA2* (Tabla 2) (Lydon and Patterson, 2001). En un volumen final de reacción de 50 µL se incluyeron:

Buffer	1X
$MgCl_2$	1.5 mM

dNTPs	0.2 mM c/u
Primer tblA1	2 µM
Primer tblA2	2 µM
Taq polimerasa	1.5 U
ADN	5 µL

Las amplificaciones se llevaron a cabo con el siguiente ciclo de temperaturas:

1 ciclo de:	95 °C	2.30 min.
38 ciclos de:	93 °C	1 min.
	57 °C	30 seg.
	72 °C	1.30 min.
1 ciclo de:	65 °C	15 min.

Los productos de amplificación se resolvieron en gel de agarosa al 1,2% a 90 V durante 1 h. Los geles se tiñeron con 1 ml de tinción de gel de ADN SYBR Safe por 50 mL de agarosa fundida y se fotografiaron bajo luz UV con digitalización del gel por MiniBisPRO.

En la tabla 2 se resumen los primers, las temperaturas de *annealing* y los productos de amplificación por técnica de PCR que se esperan obtener para la detección de las diferentes fitotoxinas mencionadas anteriormente.

Tabla 2: Primers, temperaturas de *annealing* y productos esperados utilizados para la detección de fitotoxinas por PCR, producidas por cepas de *Pseudomonas* sp. *y P. syringae.*

Gen	Fitotoxinas	Secuencias de Primer (5´–3´)	*Annealing* (°C)	Tamaño de Producto (pb)	Referencia
cfl	Coronatina	GGCGCTCCCTCGCACTT GGTATTGGCGGGGGTGC	58	650	Schaad *et al.* 2001
syrB	Siringomicina	CTTTCCGTGGTCTTGATGAGG TCGATTTTGCCGTGATGAGTC	60	752	Sorensen *et al.* 1998; Schaad *et al.* 2001
syrD	Siringomicina	AAACCAAGCAAGAGAAGAAGG GGCAATACCGAACAGGAACAC	60	446	Sorensen *et al.* 1998
tblA	Tabtoxina	CTGGTCACTGCGCTAGGC CTGGTCACTGCGCTAGGC	57	829	Lydon and Patterson 2001

II.- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PRODUCTOS NATURALES DE *THYMUS VULGARIS* Y *ORIGANUM VULGARE*

1. Obtención de productos naturales

Para la obtención de productos naturales se utilizaron las siguientes especies vegetales aromáticas: *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Origanum vulgare* (orégano), provenientes de cultivares de la provincia de San Luis (Establecimiento "LOS MOLLES").

1.1. Obtención de extractos vegetales:

Extracto alcohólico:

a) Se colocaron 10 g del material vegetal seco y molido en 100 ml de etanol durante 72 h a temperatura ambiente, agitando ocasionalmente. Posteriormente, el extracto se filtró a través de papel de filtro Whatman N° 4 para la eliminación de partículas. Por último, se evaporó hasta su completa sequedad a 65 °C y se resuspendió en dimetilsulfóxido (DMSO).

Extractos obtenidos con solventes de distinta polaridad:

b) A las muestras del material vegetal seco y molido de *T. vulgaris* y *O. vulgare* (10 g) se les realizó extracción sucesiva con hexano, cloroformo y propanol, utilizando un equipo Soxhlet durante 4-5 días con cada solvente hasta su completa clarificación. El líquido se filtró y posteriormente fue concentrado a presión reducida para evaporar el solvente utilizado (evaporador rotatorio IKA, modelo RV-10 digital), hasta obtener el material sólido. Por último, se evaporó con burbujeo de nitrógeno, hasta que se observó completamente seco a 65 °C. A partir de cada una de estas fracciones se realizaron soluciones a concentración de 100 mg/mL en dimetilsulfóxido (DMSO) (Figura 7) (Hossain et. al, 2013).

Figura 7: Proceso de obtención de extractos vegetales.
Ref.: a) Extractor de Soxlhet; **b)** Equipo de Rotavapor; **c)** Burbujeo con Nitrógeno

1.2. Obtención de decocciones

Para la preparación de decocciones se pesaron 10 g. de hojas de orégano y tomillo, las cuales se colocaron en un frasco Erlenmeyer, conteniendo 90 mL de agua destilada (concentración final: 10%). La mezcla se tapó y se calentó a temperatura de ebullición en la cual se mantuvo durante 20 min.; se filtró por papel Whattman N° 2 y se esterilizó por autoclave a 115 °C durante 20 min. Las deccociones obtenidas se conservaron a 4 °C en frascos color caramelo (Mongelli et. al, 1995).

1.3. Obtención de aceites esenciales

Para la extracción del AE de plantas aromáticas se utilizó la técnica de hidrodestilación, utilizando un aparato tipo Clevenger. Para ello se llenó una columna extractora con el material vegetal el cual fue depositado sobre una rejilla. En un balón de 1 litro de capacidad, conteniendo agua, se generó calor hasta ebullición; los vapores de agua arrastraron los componentes volátiles al atravesar el lecho vegetal de la columna, los cuales condensaron y por decantación se obtuvieron dos fases: AE-agua (Bamba et. al, 1993; De Feo et. al, 1998). El AE obtenido fue desecado con sulfato de sodio anhidro y conservado a 4 °C hasta el momento de su uso (Figura 8).

Figura 8: Aparato Clevenger

1.4. Identificación y cuantificación de los componentes de aceites esenciales por cromatografía gaseosa y espectrometría de masas (GC-MS)

La identificación y cuantificación de los AE de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* se realizaron en un aparato Perkin Elmer Q-910, usando una columna capilar cubierta con CBP-1, de 30m x 0.25 mm. La temperatura de la columna y del inyector fue la misma que la utilizada para la cromatografía gaseosa. El gas carrier fue He, con una velocidad de flujo de 1 mL/min. El espectro de masa fue registrado a 70 eV. Los componentes oleosos fueron identificados por comparaciones de sus índices de retención con aquellos de muestras auténticas, por el tamaño del pico de datos publicados, en la librería de espectros de masa del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST 3.0) y la librería de espectros de masa e índices de retención de los compuestos volátiles de la cátedra de Química Orgánica de Productos Naturales de la UNC, donde fueron analizadas las muestras oleosas. Los análisis de GC-MS fueron realizados utilizando una columna Supelcowax 10 con las mismas condiciones descriptas anteriormente (Adams, 1989).

1.5. Concentraciones utilizadas de aceites esenciales

Las concentraciones de los AE (mg/mL) se obtuvieron calculando la densidad del compuesto oleoso utilizando la siguiente fórmula:

$$\delta = \frac{m}{V}$$

δ: densidad (mg/mL)
m: masa (mg)
V: volumen (mL)

La masa de cada AE se obtuvo del promedio del peso de cinco fracciones de 1mL cada una. Los rangos de concentraciones de los AE utilizados para la determinación de la actividad antimicrobiana se detallan en la tabla 3.

Tabla 3: Rangos de concentraciones de AE de *T. vulgaris* (T) y *O. vulgare* (O) (mg/mL)

Diluciones / AE	P	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
T	91.98	45.99	22.99	11.49	5.74	2.87	1.43	0.71
O	92.52	46.26	23.13	11.56	5.78	2.89	1.44	0.72

Diluciones / AE	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	1/8192	1/16384
T	0.35	0.175	0.087	0.044	0.021	0.011	0.005
O	0.36	0.18	0.09	0.045	0.023	0.011	0.006

2. Determinación de la actividad antimicrobiana de productos vegetales

2.1. Técnica de estrías radiales: Se mezclaron en una placa de Petri estéril 4 mL de decocción con 16 mL de AKB fundido a 45 °C. Una vez solidificado el medio se procedió a sembrar en forma de estrías radiales las distintas especies de microorganismos. Estos fueron previamente inoculados en CKB e incubados 48 h a 28 °C. Se realizó una placa control con 20 mL de AKB, la cual fue sembrada del mismo modo que la anterior con los microorganismos correspondientes (Mongelli et. al, 1995). Pasado este tiempo se observó si hubo inhibición del crecimiento.

2.2. Técnica de disco: Se evaluó la actividad antibacteriana de los extractos vegetales obtenidos contra las cepas de *Pseudomonas* sp. aisladas de soja y cepas de referencia: *P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5, *P. syringae* pv. *tabaci* 6605, *P. syringae* pv. *tomato* DC 3000, *P. syringae* pv. *syringae* P61, *P. syringae* pv. *syringae* B728a, *P. savastanoi* pv. *glycinea* B076, *P. syringae* pv. *macuolicola* y *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448a. Las cepas bacterianas se cultivaron en CKB durante 24 h a 28 °C. Se sembraron en superficie cada una de las cepas antes mencionadas, y se colocaron discos estériles de papel de filtro (6 mm de diámetro) embebidos con 10 µl de cada extracto (alcohólico, hexánico, clorofórmico, propanólico). Se incubaron a 28 °C durante 24 h y se observó halos de inhibición alrededor de cada disco. Los ensayos fueron realizados por duplicado.

2.3. Determinacion de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

2.3.a- Técnica de macrodilución en caldo: Se utilizó para determinar la CIM de las decocciones. Las experiencias se realizaron según normas CLSI con modificaciones (Servicio Antimicrobianos-INEI–ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", 2001).

Para ello se realizaron diluciones al medio de las decocciones de *T. vulgaris* y *O. vulgare* utilizando CKB como diluyente; se colocó 1 mL de cada una en un tubo de hemólisis. Se agregó 1 mL del inóculo estandarizado (0,5 de la escala de Mc Farland) a cada tubo de dilución. Se realizó un tubo de control crecimiento, del mismo modo explicado arriba, pero sin el agregado del extracto. Se incubaron los tubos durante 24 h a 28 °C, y se determinó la CIM por DO_{620} nm.

2.3.b- Técnica de microdilución en caldo: Se utilizó para determinar la CIM de los AE. Se realizó la experiencia según Mann and Markham (1998).

Preparación de la dilución de trabajo: Se sembraron los microorganismos en CKB y se incubaron durante 24 h a 28-30 °C. Se realizaron diluciones factor 10 en CTS y CKB hasta la dilución 10^{-5}. En una microplaca se colocaron 170 µL de cada dilución a probar, 20 µL de DMSO:agua (1/8) y 10 µL de rezasurina. Se incubaron durante 48 h a 28-30 °C y se eligió aquella dilución incapaz de reducir la resazurina (azul). La visualización se fundamenta en la capacidad que tienen los microorganismos vivos, a determinada concentración, de reducir al indicador redox rezasurina (0,01%); produciendo un cambio de color cuando el medio circundante se reduce debido a la producción de oxígeno y ácido disueltos, el color azul

indicó baja concentración celular (estado oxidado) y el rosado presencia de crecimiento (estado reducido) (Mann and Markham, 1998).

Determinación de la CIM: El AE se diluyó (factor 2) en DMSO:agua (1/8). En una microplaca de 96 pocillos, desde el 1 al 10, se colocaron 170 µL del cultivo microbiano en CKB, con una densidad apropiada incapaz de reducir la resazurina. Se agregó a cada pocillo, 20 µL de cada dilución del AE. Se incubó la microplaca 24 h a 28 °C y luego se agregó 10 µL de una solución de resazurina en cada pocillo. La placa se incubó durante 24 h a 28 °C, determinando la CIM visualmente al observar si se producía cambio de color.

El control positivo consistió en 170 µL de cultivo de microorganismo a probar con 20 µL del diluyente sin el aceite (rosado) y el control negativo fue 170 µL de CKB suplementado con 20 µL del diluyente del AE (azul) (Carson, et al. 1995; Mann and Markham. 1998).

2.4.Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

• **Método estático:** Para determinar la CBM de las decocciones y de los AE, se sembraron en placas de ATS o AKB 100 µL de la CIM y las 5 diluciones anteriores, obtenidas en la microtécnica y la macrotécnica. Se incubaron a 28-30 °C durante 24-48 h y se observó la CBM. Se definió CBM como la mínima concentración a la cual menos del 0,01% del inóculo sobrevivió. Cada ensayo se realizó por duplicado (Finelgold et. al, 1992).

• **Método dinámico:** La actividad bactericida fue realizada con la adición de 100 µl de un cultivo overnight de cada cepa a tubos contiendo Medio Mínimo (MM) con diferentes diluciones de cada AE. Estos se incubaron a 28 °C. durante 24 h en un agitador (120 rpm.) y una gota (20 µl) de cada cepa bacteriana se colocó en placas con AKB. Se incubaron durante 5 días a temperatura ambiente; a continuación, se realizó la determinación, considerando CBM cuando se observó menos de 0,01% de crecimiento.

3. Actividad antimicrobiana de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* sobre la producción de factores de virulencia producido por *Pseudomonas* fitopatógenas.

3.1. Inhibición de la producción de biofilm

a- Efecto de decocciones

Las cepas productoras de biofilm fueron sometidas a la acción de las decocciones de *T. vulgaris* y *O. vulgare* a fin de evaluar la inhibición en la producción del mismo.

Inóculo microbiano: Las cepas fueron cultivadas a 28 °C durante 24 h en CKB a partir de las cuales se realizaron diluciones hasta obtener valores de 0.5 de la escala de Mc Farland y con un rango de recuento celular entre 10^6-10^8 UFC/mL.

Se probó el efecto de diferentes concentraciones de la decocción (50 mg/mL. a 0.39 mg/mL.) sobre la capacidad de formación de biofilm en placas de 48 pocillos. Se colocó en cada pocillo de la placa 500 µL del inóculo microbiano y 500 µL de cada dilución de decocción por triplicado. Se incubó a 28 °C y se observó el efecto de los productos naturales sobre la producción de biofilm a las 24 h de incubación. Al finalizar cada período, se descartó el medio de cada pocillo, se lavó dos veces con agua destilada, se tiñó con CV (1%) durante 30 min., se enjuagó con agua destilada y se dejó secar. Se determinó visualmente el desarrollo de biofilm. Posteriormente se agregó 1500 µL de etanol al 95% y se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 570 nm. (Niu and Gilbert, 2004).

Se realizaron controles negativos: control de medio de cultivo: CKB, control de la decocción y controles positivos: control de producción de biofilm: 1000 µL inóculo.

b- Efecto de aceites esenciales

Se realizó la experiencia según Niu and Gilbert (2004), con algunas modificaciones. Las cepas productoras de biofilm fueron sometidas a la acción de los AE a fin de evaluar la inhibición en la producción del mismo.

Inóculo microbiano: Las cepas fueron cultivadas a 28 °C durante 24 h en CKB a partir de las cuales se realizaron diluciones hasta obtener valores de DO_{620nm} similares a los obtenidos con cada cepa en la experiencia de actividad antimicrobiana, con un rango de recuento celular entre 10^6-10^8 UFC/mL.

- Inhibición a las 48 h: Se probó el efecto de diferentes concentraciones de AE (CIM y ½ CIM) (Tabla 5, Anexo II) sobre la capacidad de formación de biofilm en placas de 48 pocillos. En cada pocillo de la placa se colocaron 900 µL del inóculo microbiano y 100 µL de AE a concentraciones finales sub-inhibitorias (1/2 CIM) o inhibitorias (CIM), según corresponda. Cada concentración de AE se realizó por triplicado. Se incubó a 28 °C y se observó el efecto de los AE sobre la producción de biofilm a las 48 h de incubación. Al finalizar cada período, se descartó el medio de cada pocillo, se lavó dos veces con agua destilada, se tiñó con cristal violeta (CV) (1%) durante 30 min., se enjuagó con agua destilada y se dejó secar. Se determinó visualmente el desarrollo de biofilm. Posteriormente se agregó 1500 µL de etanol al 95% y se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 570 nm. (Niu and Gilbert, 2004).

Se realizaron controles negativos: control de medio de cultivo: se utilizó CKB, control del diluyente: medio de cultivo + DMSO:agua (1:8) y controles positivos: control de producción de biofilm: 1000 µL inóculo, control de viabilidad: inóculo + DMSO:agua (1:8).

- Inhibición a las 24 h: Se probó el efecto de diferentes concentraciones de AE (44.99 mg/mL. a 0.022 mg/mL.) sobre la capacidad de formación de biofilm a las 24 h de incubación en placas de 96 pocillos. Se utilizaron las microplacas en las cuales se había realizado previamente la determinación de CIM (2.3.b). Una vez obtenidos estos valores, se descartó el cultivo y se enjuagaron los pocillos con agua destilada esteril, se les colocó cristal violeta (CV) (1%) durante 30 min., se enjuagó nuevamente con agua destilada y se dejó secar. Se determinó visualmente el desarrollo de biofilm. Posteriormente se agregaron 200 µL de etanol al 95% y se midió la absorvancia en espectofotómetro a 570 nm. (Niu and Gilbert, 2004).

Se realizaron controles negativos: control de medio de cultivo: CKB, control del diluyente: medio de cultivo + DMSO:agua (1:8) y controles positivos: control de producción de biofilm: 1000 µL inóculo, control de viabilidad: inóculo + DMSO:agua (1:8).

3.2. Inhibición de la producción de fitotoxinas

Se evaluó fenotípicamente la capacidad de los AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* de inhibir la producción de toxinas. Para la realización de estas técnicas se siguieron las mismas

metodologías utilizadas para la producción de toxinas explicadas en el punto 8.2 de la parte I, con el agregado de distintas concentraciones de AE.

Los ensayos se realizaron por triplicado, con tres repeticiones independientes.

a. Inhibición de coronatina

Se sembraron los microorganismos en CKB con el agregado de diferentes concentraciones inhibitorias y subinhibitorias de decocciones o AE; se incubaron durante 48 h a 28 °C, en agitación. Se tomaron 50 µL de cada cultivo y se colocaron en 1 mL de MM; se incubaron en agitación a 20 °C durante 4 días y luego se centrifugaron a 3000 rpm. durante 10 min. Se inocularon 20 µL del sobrenadante en discos de papa, los cuales fueron incubados a 28 °C, durante 4 días, en cámara húmeda. Se realizó un control negativo con MM.

Se consideró la inhibición de la producción de coronatina cuando no se observó hipertrofia en el tejido vegetal del tubérculo.

b. Inhibición de siringomicina

Para la realización de esta técnica se siguió la metodología según Hwang et. al, (2005), con modificaciones.

Se evaluó la capacidad de los productos naturales para inhibir la producción de toxinas por las células y el efecto de los mismos sobre las toxinas ya producidas. Para ello se realizaron dos tratamientos: en el primero se sembraron los microorganismos en CKB con el agregado de concentraciones inhibitorias y sub-inhibitorias de aquellos productos naturales que presentaron actividad antibacteriana y se incubaron durante 120 h a 28 °C, en agitación. Pasado este tiempo se centrifugaron a 3000 rpm. durante 10 min., reservando el sobrenadante. En el segundo tratamiento se agregaron concentraciones inhibitorias y sub-inhibitorias de los productos naturales activos al sobrenadante que contiene la toxina de los cultivos de microorganismos previamente incubados durante 120 h. a 28 °C, en agitación.

Se prepararon placas con agar SRM (medio para siringomicina, anexo, I) y se colocaron sobre la superficie del agar 20 µL del sobrenadante de cada una de las cepas a probar; luego se colocó cloroformo durante 15 min, y se dejó evaporar. Posteriormente fueron rociadas con una solución de esporas de *G. citri aurantii* y agua destilada estéril (1/10). Se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h. La inhibición de la producción de siringomicina se

consideró positiva cuando no se observó halo de inhibición de crecimiento del *G. citri aurantii* alrededor del sobrenadante tratado con el producto natural. En el control positivo (efecto de la toxina) se observó la inhibición del crecimiento fúngico por la toxina. Los ensayos fueron realizados por duplicado.

c. Inhibición de tabtoxina

Para la realización de esta técnica se siguió la metodología descripta por Barta et. al, (1992) y Lydon and Patterson, (2001), con modificaciones.

Se evaluó la capacidad de los productos naturales para inhibir la producción de toxinas por las células y el efecto sobre las toxinas ya producidas.

Tratamiento 1.-Inhibición de la producción de toxina: se sembraron los microorganismos en CKB con el agregado de concentraciones inhibitorias y sub-inhibitorias de aquellos productos naturales que presentaron actividad antibacteriana y se incubaron durante 120 h a 28 °C, en agitación. Pasado este tiempo se centrifugaron a 3000 rpm. durante 10 min., reservando el sobrenadante.

Tratamiento 2.-Inhibición del efecto de la toxina producida: se agregaron concentraciones inhibitorias y sub-inhibitorias de los productos naturales activos al sobrenadante que contiene la toxina ya producida por los microorganismos previamente incubados durante 120 h a 28 °C, en agitación.

Cada sobrenadante producido en 1 y 2, fue fraccionado en dos partes, colocando a una fracción 5 µg/mL de glutamina (1+G, 2+G). Se realizaron placas con MM+sacarosa, las cuales fueron inoculadas con 4 mL de MM semisólido (0.7% agar) con el agregado de un cultivo de *E. coli* de 18 h de incubación. Utilizando la técnica de pozo se sembraron 100 µL de las fracciones de sobrenadante previamente obtenidas (1, 2, 1+G, 2+G). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 48 h. Se realizaron controles positivos (efecto de la toxina) sin el agregado de producto natural. Los ensayos fueron realizados por duplicado.

Se consideró inhibición de la producción de la tabtoxina por el efecto del producto natural cuando no se observó el halo de inhibición de crecimiento de *E. coli* alrededor del pozo del sobrenadante sin glutamina. La producción de tabtoxina se consideró positiva cuando se observó un halo de inhibición de crecimiento de *E. coli* alrededor del pozo

conteniendo sobrenadante sin glutamina. Este aminoácido favorece la reversión del efecto de esta toxina.

III. BIOACTIVIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE *T. VULGARIS* SOBRE PLANTAS DE SOJA INOCULADAS CON *PSEUDOMONAS* SP.

1. Toxicidad de DMSO: La toxicidad del DMSO se determinó en semillas y hojas de soja en ensayos realizados en el laboratorio de Microbiología, obteniendo valores de inocuidad de DMSO:Agua de 1/32 (Sotelo, 2015). Por lo tanto se tomó esta solución inocua como diluyente del AE de tomillo para realizar posteriormente los tratamientos en las plantas.

2. Preparación de diluciones de AE de *T. vulgaris*: Se realizaron diluciones factor 2 del AE de tomillo en DMSO:Agua (1/32) en botellas rociadoras. A las mismas se les agregó SILWET (0,04%) como aditivo para favorecer el contacto con la hoja y fueron conservadas hasta su uso a temperatura ambiente.

3. Germinación de semillas de soja: En bandejas plásticas con tapa, desinfectadas con anterioridad con hipoclorito de sodio se colocaron varias capas de papel absorbente. Sobre ellas se colocaron semillas de soja variedad Don Mario 4602 y 3810, cedidas por diferentes productores agropecuarios, desinfectadas previamente con alcohol 70% e hipoclorito de sodio (10%). Se humedeció el papel con agua estéril, y se taparon las bandejas. Las mismas fueron conservadas a temperatura ambiente y en oscuridad hasta la germinación.

4. Preparación de plantas de soja: Se realizó una mezcla de tierra:arena (2:1), la cual se utilizó para el llenado de macetas plásticas hasta ¾ del volumen de las mismas. Se colocaron 2 semillas por maceta y se incubaron en invernadero (28 °C, período de luz 12-14 h) hasta la observación de la primera hoja trifoliada. Una vez llegado a este estadío, se realizaron las distintas experiencias de patogenicidad, fitotoxicidad y tratamientos con distintas concentraciones de AE.

5. Efecto del AE de *T. vulgaris* sobre plantas de soja: A fin de determinar la concentración de AE de tomillo no tóxica para la planta de soja se cultivaron plantas en invernadero como fue previamente explicado en el inciso 4, y se rociaron con distintas concentraciones de AE (inciso 2). Se realizó una sola aplicación, asegurando que todas las hojas estuvieran

húmedas. Se observaron las hojas diariamente hasta la aparición de manchas en la superficie. Se procedió a determinar la concentración inocua del AE, la cual se definió como aquella concentración capaz de no producir manchas foliares. Además, se evaluaron los siguientes parámetros de crecimiento de la planta: longitud de la planta; longitud de la raíz; peso fresco y seco de la parte aerea; peso fresco y seco de la raíz (Carlier et. al, 2009).

6. Evaluación de la actividad antimicrobiana de AE de *T. vulgaris* sobre plantas de soja inoculadas con *Pseudomonas* fitopatógenas: El ensayo *in vivo* se realizó a escala de invernadero. Se evaluó el efecto de concentraciones inocuas inhibitorias y sub-inhibitorias del AE de tomillo sobre plantas de soja inoculadas con: una cepa fitopatógena aislada de soja (*Pseudomonas* sp. Q) y una cepa de referencia (*P. savastanoi* pv. *glycinea* B076).

Se cultivaron plantas en invernadero (inciso 4) y cuando las plantas se observaron con hojas trifoliadas fueron infectadas con cada una de las cepas a probar (DO: 0,03, equivalente a 10^{6-8}UFC/mL) (Young, 2010). Se inocularon 10 plantas por cepa para cada tratamiento, y se rociaron las hojas de soja con los diferentes cultivos bacterianos, a los cuales se les agregó SILWET como aditivo para favorecer el contacto del microorganismo y la superficie foliar. Luego se cubrieron las macetas con bolsas de nylon durante 2 días.

Pasado este tiempo se rociaron por única vez con las distintas concentraciones de AE de tomillo: CIM, ½ CIM y ¼ CIM (inciso 6), asegurando que todas las hojas estuvieran húmedas. Se observaron las hojas diariamente controlando la evolución de la enfermedad. Se procedió a determinar la concentración efectiva del AE en la cual se observó la disminución o ausencia de manchas foliares.

Como controles positivos se inocularon 10 plantas con cada una de las cepas a ensayar sin aplicarles tratamiento de AE. Como controles negativos 10 plantas con agua destilada estéril y 10 plantas con la dilución inocua de AE.

Se evaluaron los resultados en base a los parámetros de incidencia y severidad a los 7 días post-inoculación, utilizando para este último caso la escala de Mancha ojo de rana en soja (Figura 9), debido a que no existe una escala propia para tizón bacteriano. Mancha ojo de rana es causada por *Cercospora sojina Hara* que genera síntomas similares a los producidos por *P. savastanoi* pv. *glycinea* (Conforto, 2011).

La incidencia fue evaluada teniendo en cuenta el número de folíolos con síntomas sobre el total de folíolos analizados y expresada en porcentaje. La severidad se obtuvo comparando

los foliolos de cada planta con una escala logarítmica diagramática para mancha ojo de rana (*Cercospora sojina*) (Figura 9) y expresando los resultados en porcentaje.

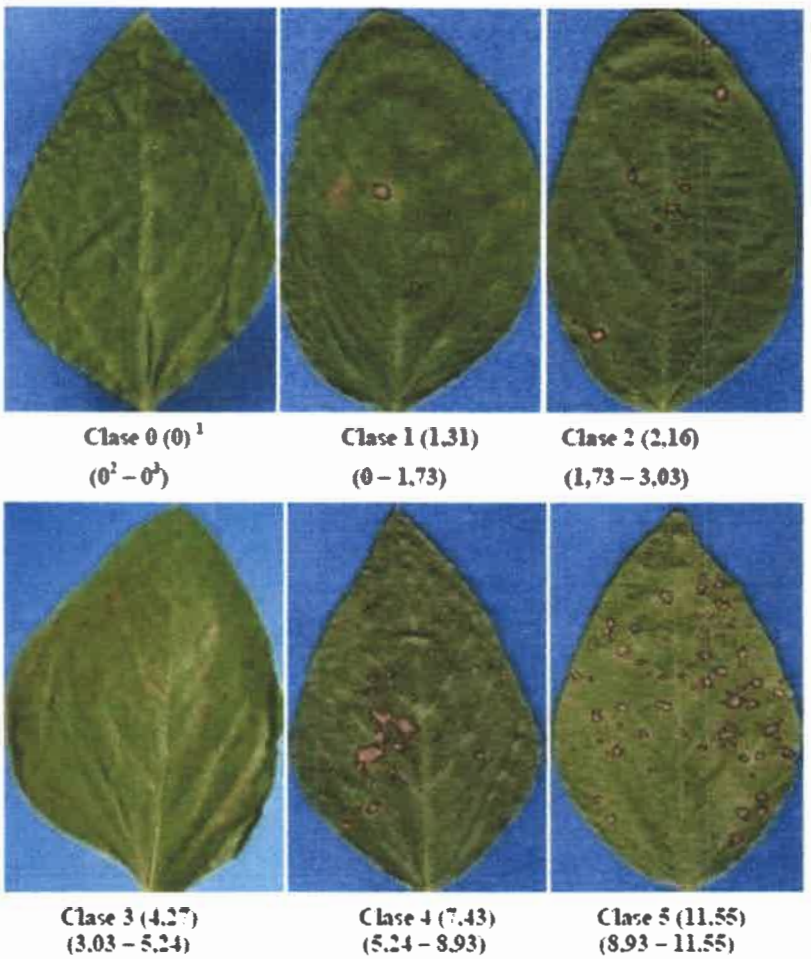


Figura 9: Escala logarítmica diagramática de severidad para mancha ojo de rana (*Cercospora sojina*) en foliolos de soja de variedad Don Mario 4800. Departamento Río Cuarto, Córdoba, 2007-2008. 1: Punto medio de clase, 2: Límite inferior de clase, 3: Límite superior de clase (Conforto, 2011).

7. Análisis estadístico

Los ensayos de producción e inhibición de biofilm, incidencia, severidad, toxicidad de DMSO, efecto del AE de *T. vulgaris* sobre plantas de soja y evaluación de la actividad antimicrobiana del AE sobre plantas de soja inoculadas fueron analizados estadísticamente. Se realizaron los siguientes cálculos estadísticos de los resultados obtenidos, utilizando el

software InfoStat (Di Rienzo et. al, 2012): determinación de medias y desvíos estándar, análisis de varianza y test de Duncan, $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I- AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS BACTERIANAS

1-Aislamiento de bacterias fitopatógenas de soja

A partir de lotes de soja ubicados en diferentes zonas agrícolas del país se recolectaron hojas enfermas con sintomatología característica de bacteriosis (Figura 10).

Figura 10: Hojas de plantas de soja. **a)** Hoja sana de planta de soja (campo experimental UNRC); **b)** Manchas foliares características de bacteriosis (zona rural Alcira Gigena)

Se evaluaron en total 20 lotes durante la campaña 2009/2010 y 22 lotes en 2010/2011. En la Tabla 4 se presentan las zonas de muestreo y el número de aislamientos bacterianos obtenidos a partir de plantas sintomáticas. Se seleccionaron 83 aislamientos, bacilos Gram negativo y catalasa positivo, los que fueron denominados teniendo en cuenta las siglas del establecimiento de origen.

Tabla 4: Zonas de muestreo de cultivares de soja

PROVINCIA	ORIGEN	N° DE LOTES	N° DE AISLAMIENTOS Gram Negativo
Santa Fe	Venado Tuerto (VT)	1	4
San Luis	Quines (Q)	1	2
Salta	Salta (S)	3	4
Córdoba	Alcira Gigena (A)	3	7
	Río Cuarto (UNRC)	3	3
	Paso del Durazno (M)	10	23
	Los Cisnes (LS)	6	34
	Alejandro Roca (EM)	15	6
Total		**42**	**83**

En estudios realizados por Mansfield et. al, (2012) se dieron a conocer las 10 bacterias patógenas más importantes de plantas, siendo la primera, por razones científicas y económicas, *Pseudomonas syringae* y sus patovares. Estas bacterias fitopatógenas han tenido un enorme impacto en la comprensión científica sobre patogenicidad microbiana, causantes de enfermedades de plantas de importancia económica.

Para el aislamiento y el posterior mantenimiento de las bacterias fitopatógenas se ensayaron diversos medios de cultivo: Agar Cetrimide (AC), Agar Tripticasa Soya (ATS), Agar King B (AKB) y Agar extracto de levadura, carbonato de calcio, dextrosa (YDCA); sugeridos en la bibliografía (Cantero, 2010; Cruz et. al, 2001; Fett and Jones, 1981; Hwang et. al, 2005; Kim et. al, 2003; López et. al, 2006; Romero et. al, 2002; Takeuchi et. al, 2003).

Los medios AKB e YDCA resultaron ser los más adecuados para el aislamiento bacteriano durante la campaña 2009/2010, en los demás medios probados no se detectó crecimiento de los aislamientos bacterianos. Estos, AKB e YDCA permitieron la observación de colonias con características similares a los géneros *Pseudomonas* y/o *Xanthomonas*, por lo que fueron seleccionados para el muestreo 2010/2011 (Tabla 4, Figura 11) (Schaad, 1988). Estos géneros incluyen especies causantes de bacteriosis vegetales en diversos cultivos de importancia

económica (Cinelli et. al, 2014; Golmohammadi et. al, 2007). En AKB crecieron colonias blancas, cremosas, redondeadas, con o sin pigmento visible, características de posibles cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* (Figura 11). En YDCA se observó el crecimiento de colonias aisladas de color amarillo, cremosas, mucoides, convexas, brillantes y de bordes regulares o irregulares, características del género *Xanthomonas*. Para el mantenimiento de las cepas aisladas se utilizaron el ATS y el AKB.

Figura 11: Crecimiento bacteriano obtenido en AKB.
Ref.: a) Aislado de soja VT2; **b)** Aislado de soja C13.

2-Caracterización fenotípica de aislamientos de soja

- ***Caracterización bioquímica*:** Se realizaron pruebas bioquímicas diferenciales para géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas*: catalasa, O-F glucosa, TSI, movilidad, nitrato, indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, utilización de citrato y producción de pigmentos en medio AKB (Anexo I).

El género *Pseudomonas* presenta las siguientes características: bacilos rectos o levemente curvos, Gram negativo, aerobios estrictos, catalasa positivo, móviles por uno o varios flagelos polares, quimioorganótrofos de metabolismo respiratorio con oxígeno como aceptor final de electrones y en algunos casos nitrato que permite el crecimiento anaeróbico. Utilizan los hidratos de carbono en forma oxidativa. No requieren factores de crecimiento, no crecen a pH ácidos, no realizan fermentación ácida mixta o butilenglicólica y son alcalinos en TSI. En su mayoría son

oxidasa positivo aunque algunas especies fitopatógenas, como *P. syringae*, son oxidasa negativo. Varias especies producen pigmentos verdes, pero no producen xanthomonadina (Garrity et. al, 2005).

Las bacterias del género *Xanthomonas* son quimioorganótrofas, con metabolismo estrictamente respiratorio, siendo el oxígeno el aceptor final de electrones, no reducen nitratos, son oxidasa negativo o débil, catalasa positivo y móviles con un solo flagelo polar. Son capaces de degradar la glucosa por vía oxidativa, no realizan fermentación ácida mixta ni butilenglicólica y no poseen triptofanasa. Las colonias son amarillas y mucoides debido a la producción de pigmentos característicos conocidos como xanthomonadina y xanthan; este último es un heteropolisacárido ácido (Cruz et. al, 2001; Garrity et. al, 2005).

De los 83 aislamientos bacterianos, 16 fueron capaces de utilizar la glucosa en forma oxidativa, característico de los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas*, por lo que se decidió continuar con estos la tipificación bioquímica. En paralelo se trabajó con cepas de referencia: *P. syringae* pv. *tomato* DC 3000 cedida por la Dra. Teresita Lisa del Dpto. de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, Fco-Qcas y Naturales (UNRC) y *Xanthomonas axonopodis* aislada de soja, cedida por la Dra. Nelly Canteros del INTA Bella Vista de Corrientes.

Los 16 aislamientos fueron positivos para catalasa, no realizaron fermentación butilenglicólica ni ácido-mixta, con la excepción de EM21. Ninguna cepa produjo indol a partir de triptófano y solamente LS3 y M2E7 fueron nitrato positivo. Se observó movilidad en 10 de los mismos y 15 arrojaron un resultado alcalino en la prueba de TSI y uno solo (M1E2) alcalino/ácido (Tabla 5). Ninguna de las cepas aisladas coincidió fenotípicamente con la cepa de referencia *X. axonopodis*. Del total de aislamientos, 14 presentaron características coincidentes con el género *Pseudomonas*.

De las 16 bacterias en estudio, EM16b no fue posible mantenerlo en subcultivos y no pudo ser recuperado de las muestras congeladas y M1E2 fue descartado debido a que el TSI resultó alcalino/ácido, por lo que se continuaron los ensayos con los 14 aislamientos restantes.

Tabla 5: Pruebas bioquímicas realizadas en bacterias aisladas de soja

AISLAMIENTOS	Pruebas bioquímicas											
	AC (Pig)	AKB (Pig)	YDCA (Pig)	CAT	OF	NO_3	TSI	MOV	CIT	I	RM	VP
A5	C(v)	C(v)	C(a)	+	O	-	Al	+	+	-	-	-
A6	C	C(v)	C	+	O	-	Al	+	+	-	-	-
A7	SC	C(v)	NR	+	O	-	Al	-	+	-	-	-
C11	SC	C(v)	C	+	O	-	Al	-	-	-	-	-
C12	SC	C(v)	C(v)	+	O	-	Al	+	+	-	-	-
C13	SC	C(v)	C	+	O	-	Al	+	-	-	-	-
C47	SC	C(v)	C	+	O	-	Al	-	-	-	-	-
EM1	SC	C	C	+	O	-	Al	+	+	-	-	-
EM16	C(v)	C(v)	C(a)	+	O	-	Al	-	+	-	-	-
EM16b	SC	C	C	+	O	-	Al	-	+	-	-	-
EM21	SC	C	C	+	O	-	Al	-	-	-	+	-
LS3	SC	C(v)	C	+	O	+	Al	+	+	-	-	-
M1E2	SC	C(v)	NR	+	O	-	Al/Ac	+	-	-	-	-
M2E7	C	C	NR	+	O	+	Al	+	-	-	-	-
Q	SC	C	C	+	O	-	Al	+	+	-	-	-
VT2	SC	C(v)	C	+	O	-	Al	+	+	-	-	-

Ref.: AC: agar cetrimide; **AKB**: agar King B; **YDCA**: agar extracto de levadura, dextrosa, CO_3Ca; **CAT**: catalasa; **OF**: oxidación y fermentación de la glucosa; **NO_3**: nitrato reductasa; **TSI**: agar triple azúcar hierro; **MOV**: movilidad; **CIT**: citrato; **I**: indol; **RM**: rojo metilo; **VP**: Voges Proskauer; **(+)**: positivo; **(-)**: negativo, **O**: oxida la glucosa; **Al**: alcalino; **Al/Ac**: alcalino/ácido; **C**: crecimiento; **SC**: sin crecimiento; **PIG**: pigmentos: **(v)**: verde; **(a)**: amarillo; **NR**: no realizado.

- Tipificación por LOPAT:

Para diferenciar *Pseudomonas* sp. fitopatógenas, Lelliot et. al, (1966) propusieron cinco pruebas que permiten separar en 5 grupos a las especies fluorescentes de *Pseudomonas*. Estas pruebas se conocen como LOPAT: **L**= producción de levano, **O**= oxidasa, **P**= podredumbre de papa, **A**= producción de arginina dehidrolasa, y **T**= reacción de hipersensibilidad en tabaco. Según Lelliot, las especies del **grupo I**, incluyen aquellas que provocan manchas foliares con y sin la presencia de halos cloróticos alrededor de la lesión. Algunos representantes de este grupo

son *P. syringae, P. tabaci, P. coronafaciens, P. phaseolicola* y *P. tomato.* El **grupo II** y **III** incluye bacterias causantes de lesiones necróticas en hojas y tallos (*P. viridiflava* y *P. cichorii*, respectivamente) y el **grupo IV** bacterias productoras de daños a nivel de la raíz (*P. marginalis*). El **grupo V** está representado por especies de *Pseudomonas* saprófitas, tales como *P. aeruginosa* y *P. fluorescens.*

En los ensayos de LOPAT, 4 cepas resultaron ser oxidasa positivo (A6, A7, C12 y EM16), por lo cual no se los clasificó dentro del **grupo I**. Además, los aislamientos C12, EM16 y A6 fueron capaces de producir podredumbre de papa. El aislamiento C47 no produjo la reacción de hipersensibilidad en tabaco. Las demás cepas restantes responden a la clasificación del **grupo Ia de LOPAT**, propuesto por Lelliot et. al, (1966) (Tabla 6). Por lo tanto los aislamientos A5, C11, C13, EM1, EM21, LS3, M1E2, M2E7, Q y VT2 podrían ser considerados como *Pseudomonas* fitopatógenas.

Tabla 6: Tipificación por LOPAT de aislamientos de soja

LOPAT / AISLAMIENTOS	LEV	O	PP	ARG	HT
A5	+	-	-	+	+
A6	+	+	+	+	-
A7	+	+	-	+	+
C11	+	-	-	NR	NR
C12	+	+	-	+	+
C13	+	-	-	-	-
C47	+	-	-	-	-
EM1	+	-	-	-	+
EM16	+	+	+	+	+
EM21	+	-	-	-	-
LS3	+	-	-	-	-
M2E7	+	-	-	-	NR
Q	+	-	-	-	+
VT2	+	-	-	-	-

Ref.: Lev: levano, **O**: oxidasa, **PP**: podredumbre de papa, **ARG**: arginina, **HT**: hipersensibilidad en tabaco, **(+)**: positivo, **(-)**: negativo, **(+/-)**: variable, **NR**: no realizado.

Dentro del **grupo I** se ubican *Pseudomonas* fitopatógenas donde se incluyen *P. syringae* y sus patovares; en este grupo la oxidasa, la podredumbre de papa y arginina dehidrolasa resultan negativas y las reacciones de hipersensibilidad en tabaco positiva (Ferrante and Scortichini, 2008; Young, 2010). Las cepas que pertenecen específicamente a *P. savastanoi* pv. *glycinae*, presentan las siguientes características: producción de levano positivo, degradación de esculina variable y no producen podredumbre de papa (Garrity et. al, 2005). Estudios más extensos demostraron la dificultad de distinguir entre las especies fitopatógenas de LOPAT **grupo I**, ya que no podían ser diferenciadas fenotípicamente mediante pruebas bioquímicas y nutricionales. Por lo tanto, se recurrió a herramientas moleculares que ayudan a la identificación. Por análisis preliminares de hibridación de ADN-ADN se observó diversidad genómica dentro de LOPAT **grupo I**, pero fueron insuficientes como base para conclusiones taxonómicas. Técnicas moleculares más avanzadas como MLST (análisis de multilocus) permitieron establecer la existencia de un complejo *P. syringae* representado como una sola especie que comprende aproximadamente 10 especies y 60 patovares. Por aproximaciones polifásicas los patovares fueron distribuídos en especies y genomoespecies (Young, 2010).

3- Caracterización genotípica de los aislamientos de soja

- ✓ ***Tipificación por secuenciación del gen ARNr16S***

Se realizó el análisis de ARNr 16S en los 14 aislamientos (Macrogen, Corea). Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 7 y en la Figura 12. Se realizaron comparaciones de las secuencias con la base de datos de GenBank, encontrándose máxima identidad (99%) n el género *Pseudomonas* en 10 de los mismos. De los aislamientos bacterianos restantes, 2 produjeron alineamientos significativos con *Acinetobacter* sp. y un aislado con *Achromobacter* sp., C11 no pudo ser identificado (Tabla 7).

Tabla 7: Identificación de aislamientos bacterianos de hojas de soja, basadas en un máximo de similitud de la secuencia de ARNr 16S

Aislamientos bacterianos	N° de Acceso	Origen	Máxima Identidad (%)	Identificación
A5	**KJ569376**	**Alcira Gigena (A)**	*Pseudomonas syringae* (AB001443.1) 99%	*Pseudomonas* sp.*
C13	**KJ569375**	Los Cisnes (LS)		
EM1	**KJ569377**	**Alejandro Roca (EM)**		
LS3	**KJ569373**	Los Cisnes (LS)		
Q	**KJ569372**	**Quines (Q)**		
VT2	**KJ569374**	Venado Tuerto (VT)		
A6	**KJ569369**	**Alcira Gigena (A)**	*Pseudomonas putida DE5* (JQ435693.1)99%	*Pseudomonas* sp.
EM16	**KJ569370**	Alejandro Roca (EM)		
A7	**KJ569368**	**Alcira Gigena (A)**		
C12	**KJ569371**	Los Cisnes (LS)	*Pseudomonas putidaW619* (CP000949) 98%	
C47	**KJ569367**	**Los Cisnes (LS)**	*Acinetobacter schindleri H56* (KC 934833.1) 97%	*Acinetobacter* sp.
EM21	**KJ569366**	Alejandro Roca (EM)		
M2E7	**KJ569364**	**Paso del Durazno(M)**	*Achromobacter xylosoxidans SR50-12* (KF 279368.1) 84%	*Achromobacter* sp.

Ref.: *: Identificación realizada por análisis de secuencia parcial del ARN16S

Fue construido un árbol de distancia con el fin de analizar la distancia evolutiva y las relaciones filogenéticas entre los aislamientos. El análisis de conglomerados realizado con secuencias de genes del *ARNr* 16S y el algoritmo NJ mostró que los aislamientos fueron similares a especies de *Pseudomonas* fitopatógenas. En el árbol de distancia se observan tres ramas en las cuales se distribuyen los aislamientos: *Pseudomonas, Acinetobacter y Achromobacter*. El grupo *Pseudomonas* fue el más representativo y se subdividió en dos: *P. syringae* y *P. putida*. Los aislamientos A5, C13, EM1, LS3, Q y VT2 se agruparon en *P. syringae* mientras A6, A7, C12 y EM16 estaban relacionadas con *P. putida*. Los aislamientos restantes fueron agrupadas en *Acinetobacter* sp. y *Achromobacter* sp. (Figura 12) (Oliva et. al, 2015).

Se utilizaron múltiples alineamientos y métodos de agrupamiento de cepas para construir los árboles, utilizando el software MEGA 4.0.2. Los aislamientos de soja se indican con negrita. Se dan valores de bootstrap en los nodos, expresados como porcentaje de las 1.000 replicaciones. Los números de acceso se indican entre paréntesis.

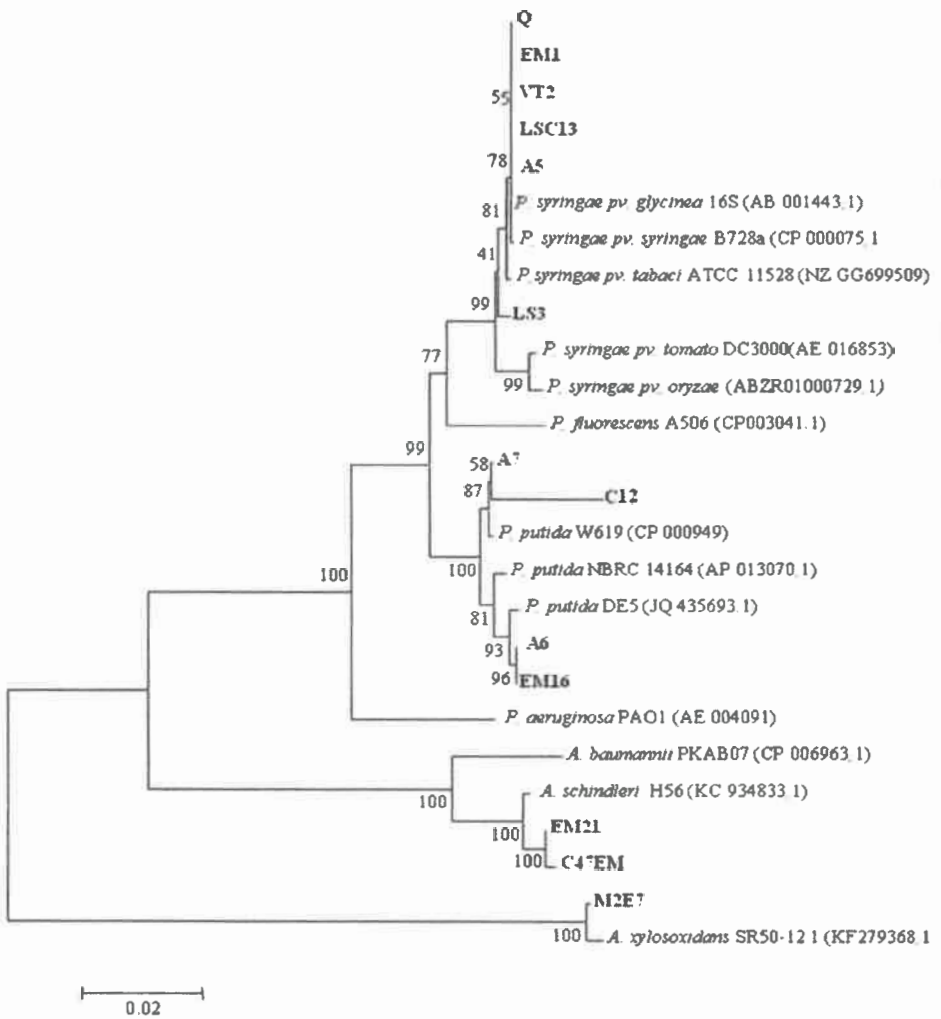


Figura 12: Árbol de distancia de aislamientos bacterianos a partir de hojas de soja y miembros representativos, basado en alineamientos de secuencias de genes *ARNr* 16S.
Ref.: Barra de escala: 1 sustitución por 200 nt.

La comparación de las secuencias de los ARNr 16S (o de los genes que los codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de

clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias. Representa una ventaja tanto en tiempo como en precisión, llegando incluso a competir de manera favorable con otras técnicas rápidas y eficaces, como las inmunológicas (Rodicio y Mendoza, 2004). La secuencia de ADN que codifica para ARNr 16S se considera que es un marcador neutro con respecto a presiones selectivas ambientales (Morris et. al, 2007). Una parte considerable del gen ARNr 16S se conserva en todos los géneros de bacterias, mientras que una pequeña parte es variable y esto permite estimar distancias genealógicas, de los cuales derivan las filogenias (Hauben et. al, 1997).

En taxonomía, se recomienda la identificación polifásica, que utiliza criterios fenotípicos junto con datos de secuenciación (Rodicio y Mendoza, 2004). Los resultados de identificación genotípica fueron necesarios para complementar las pruebas bioquímicas dado que estas últimas no fueron suficientes para caracterizar con certeza los aislamientos, sin embargo si fueron adecuados para la selección de cepas fitopatógenas.

En este trabajo, se demuestra la complementariedad de las técnicas bioquímicas y moleculares debido a que 10 aislamientos se alinearon con el género *Pseudomonas*, los cuales también se encontraban incluidos en el **grupo I** de LOPAT (Tabla 3). Los aislamientos A5, C13, EM1, LS3, Q y VT2 fueron agrupados en la rama de la especie *P. syringae*, coincidiendo con las pruebas bioquímicas y de LOPAT para esta especie (oxidasa negativo) y los 4 restantes: A6, A7, EM16 y C12 se agruparon bioquímica y molecularmente con *P. putida* (oxidasa positivo). Sin embargo, estas evaluaciones no fueron suficientes para definir la especie bacteriana, por lo que en este trabajo se denominarán a los aislamientos de soja como *Pseudomonas* sp. y el nombre del aislamientos (*Pseudomonas* sp. A5, etc.). Para determinar la especie bacteriana se deberían realizar otros ensayos moleculares que permitan clasificar estas bacterias. Esto demuestra que el marcador ARN 16S no fue muy informativo y se debería buscar un marcador más informativo específicamente para el grupo en estudio

La especie bacteriana se define, en taxonomía, como el conjunto de cepas que comparten una similitud del 70% o más en experimentos de reasociación ADN-ADN y presentan 97% o más de identidad a nivel de ADNr 16S (Rodicio y Mendoza, 2004).

Durante las últimas décadas, los análisis por ARNr 16S han sido los de elección para la identificación y clasificación de bacterias a nivel genético, permitiendo además una estimación de

la diversidad bacteriana en el ambiente, sin necesidad de cultivarlas en el laboratorio. De este modo los nuevos aislamientos son comparados con secuencias homólogas registradas en bases de datos como BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Sin embargo, no existe un valor límite acordado que defina la homología necesaria para identificar una especie y por lo tanto los resultados no resultan de confianza. Esto se puede deber a que en algunos casos existen diferencias menores al 0,5% de los genes 16S entre la cepa desconocida y la cepa más cercana; pero poseen bajos porcentajes de hibridación a nivel genómico, lo que no permite utilizarlo como identificación definitiva. En otros casos, algunas especies bacterianas con diferencias fisiologícas considerables poseen genes de 16S prácticamente idénticos. La presencia de mosaiquismos en los genes 16S debido a la transferencia horizontal es otro de los factores que pueden llevar a una identificación errónea de la especie. La presencia de operones y la heterogeneidad intra-genómica de estos genes constituye otro de los factores limitantes en la identificación. Para resolver la problemática de la identificación a nivel de especie y como herramienta complementaria a la evaluación de los genes 16S, se sugiere analizar aquellos genes que existan en una sola copia, los cuales están altamente conservados entre las bacterias y se conocen como "genes housekeeping". Dentro de estos se reconocen a los genes *rpoB*, que codifica para la subunidad beta de la ARN polimerasa, el gen *gyrB*, codifica para la subunidad beta de la DNA girasa y *dnaK*, codifica para proteínas del shock térmico, entre otros (Rajendhran and Gunasekaran, 2011).

4. Test de patogenicidad

El ensayo de patogenicidad se realizó a fines de evaluar si los aislamientos identificados como *Pseudomonas* sp. producían los síntomas típicos de bacteriosis. Para ello se tomaron en cuenta los postulados de Koch, los cuales proponen que:

1. El agente patógeno debe estar presente en cada individuo con sintomatología de la enfermedad y ausente en los individuos sanos.
2. El agente debe ser aislado en un cultivo puro a partir de las lesiones típicas de la enfermedad.
3. El agente patógeno debe provocar la enfermedad en un hospedante susceptible al ser inoculado.

4. El agente debe ser aislado de nuevo de las lesiones producidas en los hospedantees de experimentación y presentar las mismas propiedades que el microorganismo original. (Madigan et. al, 2015)

Se evaluaron los 6 aislamientos identificados con 99% de identidad por ARN 16S con *Pseudomonas* sp. Para ello se utilizaron plantas de soja cultivadas en condiciones controladas, las cuales fueron inoculadas con cada uno de los aisalmientos selccionados. Todas las cepas fueron capaces de reproducir los síntomas característicos de tizón bacteriano. A los 6-7 días se observaron pequeños puntos claros en la superficie de las hojas inoculadas, adquiriendo mayor tamaño con el transcurso del tiempo, observándose la mancha típica a los 10-12 días post inoculación: pequeñas, semitransparentes tornándose amarillas a marrones (Figuras 13, 14, 15, 16, 17 y 18). A partir de estas hojas enfermas se reaislaron las bacterias, a las cuales se les realizó nuevamente la identificación bioquímica y por LOPAT, coincidiendo con las cepas inoculadas.

Figura 13: Ensayos de patogenicidad. Plantas de soja con manchas características de tizón bacteriano inoculadas con el aislado de *Pseudomonas* sp. A5.

Figura 14: Ensayos de patogenicidad. Plantas de soja con manchas características de tizón bacteriano inoculadas con el aislado de *Pseudomonas* sp. C13.

Figura 15: Ensayos de patogenicidad. Planta de soja con manchas características tizón bacteriano inoculadas con el aislado de *Pseudomonas* sp. EM1.

Figura 16: Ensayos de patogenicidad. Plantas de soja con manchas características de tizón bacteriano inoculadas con el aislado de *Pseudomonas* sp. LS3.

Figura 17: Ensayos de patogenicidad. Plantas de soja con manchas características de tizón bacteriano inoculadas con el aislado de *Pseudomonas* sp. Q.

Figura 18: Ensayos de patogenicidad. Plantas de soja con manchas características tizón bacteriano inoculadas con el aislado de *Pseudomonas* sp. VT2.

Los aislamientos e identificaciones realizados en este trabajo demuestran la presencia de bacterias fitopatógenas pertenecientes al género *Pseudomonas* que ocasionan el tizón bacteriano, en las zonas rurales del sur de Santa Fe (Venado Tuerto) y sur de Córdoba (Alcira Gigena, Los Cisnes y Alejandro Roca) (Oliva et. al, 2015).

Los miembros de este género han sido descriptos como causantes de bacteriosis, que producen pérdidas de rendimiento importantes y por lo tanto graves perjuicios económicos. Datos epidemiológicos de la provincia de Córdoba confirmaron la presencia de tizón bacteriano, una de

las bacteriosis de soja causadas por *P. savastanoi* pv. *glycinea*, en la campaña 2012-2013, con una incidencia del 100%, no se han registrado datos para otras bacteriosis, como pústula bacteriana (http://inta.gob.ar/documentos/informe-sanitario-de-la-campana-de-soja-2012-13). En los cultivos de soja en los Dptos. La Paz, Paraná y Diamante (Entre Ríos), la enfermedad de mayor impacto detectada en las semanas posteriores a las lluvias fue tizón bacteriano; quedando las hojas enfermas del tercio superior muy sensibles al daño por lluvias intensas y vientos (Formento et. al, 2016).

Las infecciones bacterianas en este cultivo están siendo cada vez más frecuentes, probablemente como consecuencia del cambio climático y de la utilización de híbridos o variedades nuevas y pueden llegar a representar un problema para los rendimientos de cultivos en un futuro cercano (http://agro.fauba.info/node/164). La superficie de soja cultivada es aproximadamente de 20 millones de hectáreas, ocupando el primer lugar en superficie sembrada. El 80% de esta superficie se encuentra repartida entre las provincias de Córdoba, Santa Fé y Buenos Aires (Cabrera et. al, 2004; Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas, 2015). El cultivo de la soja reviste un valor singular para la economía de nuestro país, ya que es uno de los productos que provee mayores ingresos de divisas. Sin embargo, la siembra de este vegetal despierta muchas controversias respecto de los impactos que su expansión y la tecnología de producción tienen sobre suelos, aguas y la salud humana; además lainfluencia sobre los procesos de transformación del espacio rural, se conoce como "sojización", generando resistencia en la sociedad (Ybran y Lacelli, 2016).

5- Producción de factores de virulencia

Las cepas de *Pseudomonas* fitopatógenas son productoras de factores de virulencia que contribuyen al proceso de patogénesis. Dentro de estos factores están descriptos el biofilm y las fitotoxinas tales como: coronatina, faseolotoxina, siringomicina, tabtoxina, entre otras. En este trabajo se analizó la capacidad de los 6 aislamientos de *Pseudomonas* sp. para producir estos factores. Las siguientes cepas de referencia se utilizaron como control positivo para cada factor según correspondiera: *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, productora de coronatina; *P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5, productora de tabtoxina; *P. syringae* pv. *syringae* B728a, productora de siringomicina y *P. syringae* pv. *syringae* P61, fuerte productora de biofilm.

a. Producción de biofilm

La capacidad de formar biofilm se considera como una estrategia de colonización cada vez más importante entre bacterias patógenas y medioambientales. Un estudio de 185 aislamientos de *Pseudomonas* asociadas a plantas, suelo, río y fitopatógenas, dio como resultado un 76% de producción de biofilm por estos microorganismos (Ude et. al, 2006).

El método aquí utilizado permite detectar cualitativa y cuantitativamente la capacidad para formar biofilm de los microorganismos (Artini et. al, 2012). En esta investigación todas las cepas de *Pseudomonas* aisladas demostraron ser productoras de biofilm con variabilidad en la intensidad del color, demostrando diferencias en la capacidad de producir biofilm. Al realizar el análisis cuantitativo de los aislamientos y las cepas de referencia, se observó variabilidad en los valores de DO obtenidos, correspondiéndose con los resultados cualitativos. El biofilm producido por las cepas de *Pseudomonas* fitopatógenas fue cuantificado mediante DO_{570nm} después de 48 h de incubación obteniéndose valores promedio de DO entre DO=0,9 y DO=1,9 para todas las cepas. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8: Producción de biofilm por *Pseudomonas* fitopatógenas

CEPAS	CV	$DO_{(570)}$
***Pseudomonas* sp. A5**	+++	1,7
***Pseudomonas* sp. C13**	+	1,4
***Pseudomonas* sp. EM1**	+++	1,8
***Pseudomonas* sp. LS3**	+++	1,5
***Pseudomonas* sp. Q**	+++	1,6
***Pseudomonas* sp. VT2**	+++	1,6
***P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5**	+++	1,9
***P. syringae* pv. *syringae* P61**	+	0,9
***P. syringae* pv. *tomato* DC3000**	++	1,6

Ref.: CV: cristal violeta; **DO:** densidad óptica; **(+):** producción débil; **(++):** producción moderada; **(+++):** producción fuerte.

Es interesante notar que el biofilm producido por las cepas de *Pseudomonas* se encontraba formando una capa en la superficie del medio líquido, la cual variaba de muy abundante a apenas visible, según la cepa (Figura 19). Esta capa no se encontraba adherida a las paredes de las policubetas y era eliminada al realizar la técnica de tinción con cristal violeta. Como consecuencia la intensidad del color no siempre reflejó la producción real de cada cepa; el color medido correspondió al anillo que dejó el biofilm adherido a la parte superior de las paredes de las policubetas. Ude et. al, (2006) describieron esta estructura para una mutante rugosa de *P. fluorescens*, como aquella ubicada en la interface aire-líquido (A-L) de un cultivo líquido, la cual se mantiene unida a las paredes de los viales por la región del menisco gracias a su naturaleza hidrofóbica. La ventaja para estas cepas de formar la interface A-L es que le permite mejor disponibilidad de oxígeno, permitiendo una velocidad de crecimiento mayor que las cepas no formadoras de biofilm (Ude et. al, 2006).

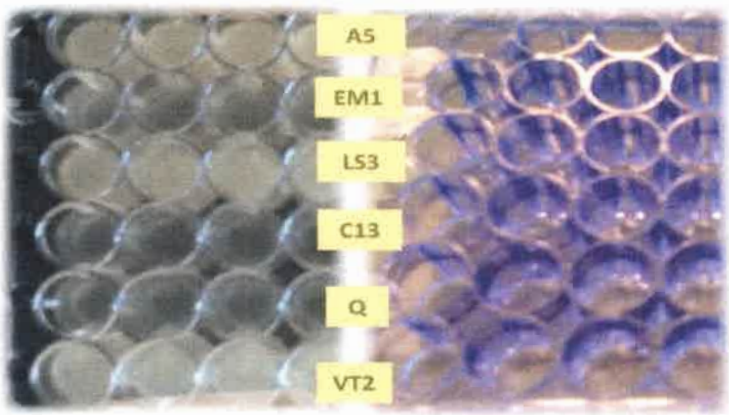


Figura 19: Producción de biofilm por *Pseudomonas* sp. aisladas de soja. (Método del cristal violeta).

El biofilm es utilizado por las bacterias como una estrategia para colonizar superficies de diversos ambientes bióticos y abióticos. En la naturaleza se pueden encontrar en tejidos animales, plantas, rizósfera y agua. La vida en el biofilm le confiere a las bacterias, tanto comensales como patógenas, ventajas para soportar las condiciones adversas del ambiente (Danhorn and Fuqua, 2007; Ude et. al, 2006). La formación de biofilm es un factor importante para comenzar el ciclo de enfermedad en bacterias fitopatógenas. La unión a la superficie es el primer paso en la

patogénesis y la agregación celular promueve la virulencia y la protección contra las respuestas de defensa de la planta (Danhorn and Fuqua, 2007).

b-Producción de fitotoxinas

La detección de fitotoxinas producidas por los aislamientos de *Pseudomonas* sp. y las cepas de referencia fue realizada por métodos fenotípicos y genotípicos.

✓ Detección de coronatina

Esta toxina promueve la entrada de las bacterias en la planta hospedera mediante la estimulación de la apertura de estomas y suprimiendo defensas del hospedante dependientes de ácido salicílico. La producción de coronatina se relaciona con varios patovares del complejo de *P. syringae*, incluyendo pv. *atropurpurea*, pv. *glycinea*, pv. *macuolicola*, pv. *morsprunorum* y pv. *tomato* (Arrebola et. al, 2011). En este trabajo se observó la producción fenotípica de coronatina en las *Pseudomonas* sp. EM1, LS3, Q, VT2, aisladas de soja y en las cepas de referencia *P. syringae* pv. *syringae* P61, *P. syringae* pv. *tomato* DC 3000 y *P. savastanoi* pv. *glycinea* B076 (Figura 20 y Tabla 9).

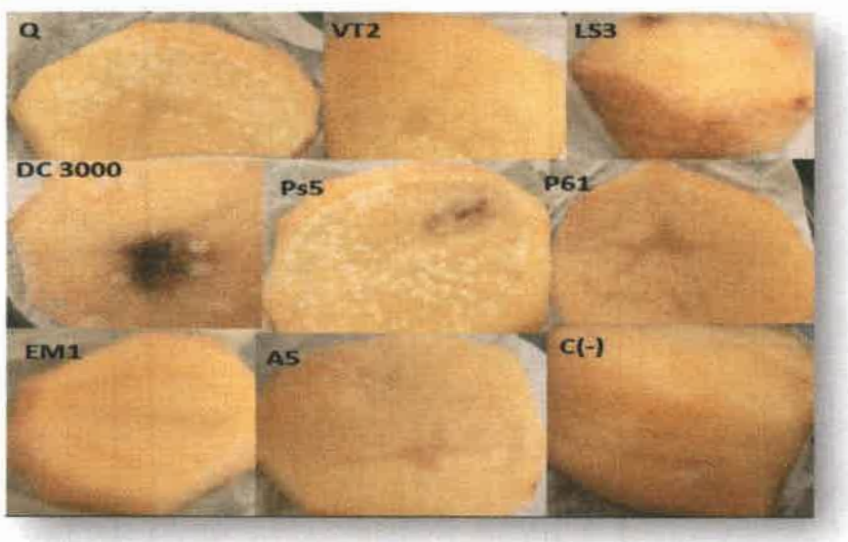


Figura 20: Producción fenotípica de coronatina por *Pseudomonas* fitopatógenas. **Ref.:** *Pseudomonas* sp. A5, EM1, LS3, Q, VT2 y *Pseudomonas syringae* Ps5, DC3000 y P61, **C (-):** control negativo.

En los ensayos moleculares de amplificación por PCR, para la detección genotípica de coronatina se utilizaron los cebadores 1 y 2. En el gel se observó un fragmento de aproximadamente 650 pb, correspondiente al gen *cfl*, en los aislamientos de *Pseudomonas* sp. C13, LS3, Q, y en las cepas de referencia *P. syringae* pv. *tomato* DC 3000, *P. savastanoi* pv. *glycinea* B076 y *P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5 (Figura 22a: calles 1, 2, 3, 4, 5 y 6; Tabla 9).

En los aislamientos de *Pseudomonas* sp. LS3 y Q se detectó la producción fenotípica y genotípica de coronatina, coincidiendo con las cepas de referencia *P. savastanoi* pv. *glycinea* BO76 y *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. La presencia de esta toxina ha sido indicada para el patovar *glycinea*, entre otros (Schaad et. al, 2001).

En el aislamiento de *Pseudomonas* sp. C13 y en *P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5 no se observó la producción fenotípica de la toxina, pero si se detectó la amplificación del gen *cfl*. Por el contrario, *Pseudomonas* sp. EM1 y *P. syringae* pv. *syringae* P61 fueron fenotípicamente positivas, sin detectar la presencia de este fragmento de aproximadamente 650 pb.

El bioensayo fenotípico semicuantitativo para coronatina, en el que se utiliza una reacción hipertrófica en tejido de papa para detectar la toxina puede mostrar cierta variabilidad dependiendo de la edad del tejido y de la variedad de papa utilizada por lo que en algunos casos la expresión fenotípica no es visible (Bender et. al, 1999). Esto estaría explicando lo que podría haber ocurrido en las cepas fenotípicamente negativas pero con presencia de los genes involucrados en la detección de la toxina.

La regulación genética de la coronatina está dada por un grupo de genes y los cebadores 1 y 2 amplifican específicamente una porción del gen *cfl* (Bereswill et. al, 1994). Además, el grupo de genes que codifican para esta toxina ha sido asociado frecuentemente con plásmidos grandes (80 a 110 kb) (Bender et. al, 1999). En aquellas cepas de *Pseudomonas* en donde no se observó el fragmento amplificado pero que fenotípicamente fueron positivas podría haber ocurrido la pérdida del plásmido portador de los genes.

Ullrich et. al, (1993) reportaron la presencia de cepas aisladas de un campo de soja e identificadas como *P. savastanoi* pv. *glycinea* que genéticamente codificaban para coronatina y que fenotípicamente resultaron ser en algunos casos productoras y en otros no productoras de la toxina, coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo.

✓ **Detección de siringomicina**

Esta toxina causa fugas de electrolitos a través de los poros formados en la membrana plasmática del hospedante. En este trabajo se observó fenotípicamente la producción de esta toxina en los aislamientos A5, C13, EM1, LS3, Q, VT2 y en las cepas *P. syringae* pv. *syringae* B728a, *P. syringae* pv. *tabaci* 6605, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 y *P. savastanoi* pv. *glycinea* B076 (Tabla 9). En la figura 21 se observan los halos de inhibición producidos por esta toxina sobre *G. citri aurantii*.

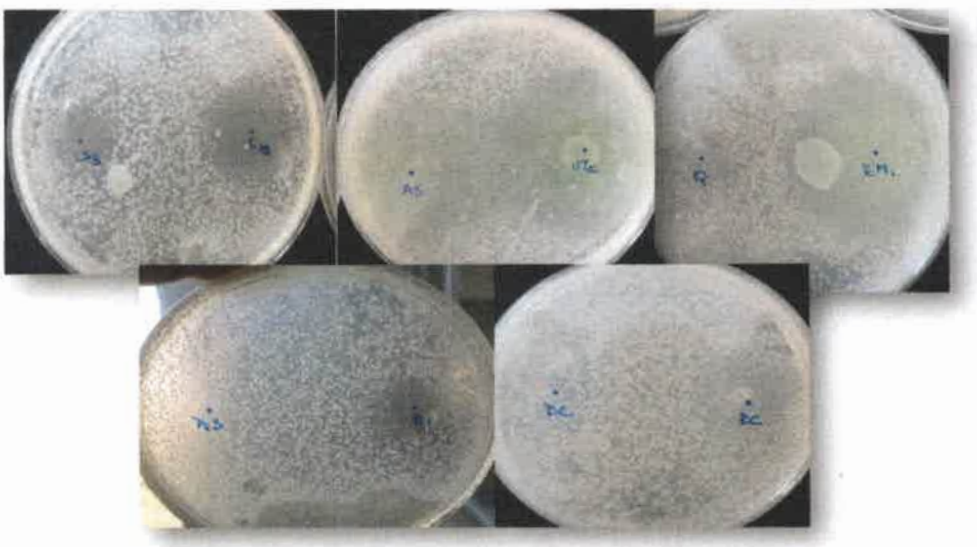


Figura 21: Producción de siringomicina por aislamientos de *Pseudomonas* fitopatógenas. **Ref.:** *Pseudomonas* sp. A5, C13, EM1, LS3, Q, VT2, y *Pseudomonas syringae* Ps5, DC3000 y P61.

Diferentes autores describen a *P. syringae* pv. *syringae* como productor de esta toxina (Bull et. al, 1998; Fogliano et. al, 1999). Sin embargo, en este trabajo se observó fenotípicamente que otros patovares también poseían la capacidad de producir esta fitotoxina. La prueba utilizada para la visualización fenotípica de la misma implica utilizar un hongo que puede ser inhibido por diversos compuestos liberados por especies de *Pseudomonas* y no solo por siringomicina. Se han propuesto diversos mecanismos para explicar la inhibición del crecimiento de un organismo por otro como la competencia por un suministro limitado de nutrientes, producción de sideróforos,

antibióticos, enzimas y sustancias volátiles. *P. syringae* produce péptidos de la familia pseudomicina, que inhiben a *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y otros fitopatógenos incluyendo *Ralstonia solani* y *Fusarium oxysporum* (Kerr, 1999).

Para los ensayos moleculares se utilizaron dos cebadores que amplifican un producto de 752 bp para *syrB* y 446 bp para *syrD* (Sorensen et. al, 1998). En la cepa de referencia *P. syringae* pv. *syringae* B728a se amplificaron ambos productos de reacción, tanto para el gen *syrB* como para *syrD*, coincidiendo con el resultado fenotípico (Figura 22). Las demás cepas de *P. syringae* y *Pseudomonas* sp. ensayadas, en las cuales fenotípicamente se había observado la producción de siringomicina, no amplificaron los fragmentos de ambos genes (Tabla 9).

La regulación de la producción de siringomicina es compleja e implica varios genes (Bender et. al, 1999). Para determinar la presencia de otros genes relacionados a la producción de siringomicina en aquellas *Pseudomonas* fitopatógenas, fenotípicamente positivas, aquí ensayadas, se deberían probar primers relacionados a la detección de genes involucrados en la síntesis de esta toxina.

✓ Detección de tabtoxina

Esta toxina es responsable de la acumulación de amoniaco, alterando la membrana tilacoidal del cloroplasto y produciendo un desacople de la fotorrespiración, llevando a la clorosis. Es producida por los patovares de *P. syringae* pv. *tabaci* (tabaco), pv. *coronafaciens* (avena) y pv. *garcae* (café) (Hwang et. al, 2005; Young et. al, 2008). Otros autores también observaron esta toxina en cepas de *P. syringae* pv. *aureofacines*, pv. *phaseolicola* y pv. *syringae* (Lydon and Patterson, 2001). Los aislamientos analizados en este trabajo: *Pseudomonas* sp. A5, C13, EM1, LS3, Q, VT2 y las de referencia *P. syringae* pv. *syringae* P61, *P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5 y *P. syringae* pv. *tabaci* 6605 fueron capaces de producir fenotípicamente esta toxina (Tabla 9). En la figura 22 se observan los halos de inhibición (transparencia) de *E. coli* generados por aquellos cultivos de *Pseudomonas* productores de tabtoxina.

Figura 22: Producción fenotípica de tabtoxina por aislamientos de *Pseudomonas* fitopatógenas.
Ref.: *Pseudomonas* sp. A5, C13, EM1, LS3, Q, VT2 y *Pseudomonas syringae* Ps5, DC3000 y P61.

En este trabajo, no se observó el efecto de reversión de glutamina con algunas de las cepas ensayadas, esto no indica la ausencia de la tabtoxina. Otros estudios obtuvieron resultados semejantes en los cuales muestran cepas productoras de tabtoxina tales como *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* NPS3121, *P. syringae* pv. *aureofaciens* ATCC13985 y *P. syringae* pv. *syringae* 3366 que no revirtieron el efecto en presencia de glutamina (Lydon and Patterson, 2001).

Para el análisis molecular se utilizó como cebador al gen *tblA*, el cual permite la diferenciación de cepas de *P. syringae* productoras de tabtoxina de aquellas que no la sintetizan (Lydon and Patterson, 2001). Se realizaron los ensayos de PCR utilizando las células de aquellos aislamientos bacterianos que fenotípicamente fueron productores de tabtoxina como *Pseudomonas* sp. C13, EM1, LS3, Q, VT2 y cepas de referencia como *P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5, *P. syringae* pv. *tabaci* 6605 y *P. syringae* pv. *syringae* B728a. Se observó la amplificación de un producto de aproximadamente 829 pb en *P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5, lo que correspondería al gen *tblA*. En las cepas restantes no se observaron fragmentos amplificados, incluyendo a *P. syringae* pv. *tabaci* 6605 (Tabla 9). Los resultados se observan en la figura 23. A pesar de que estas cepas fenotípicamente demostraron ser productoras de tabtoxina, no se observaron fragmentos amplificados correspondientes al gen involucrado. Esto estaría indicando que la cepa de *P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5 posee el gen *tblA*. Lydon y Paterson, (2001) realizaron un estudio en el cual analizaron la producción fenotípica y genotípica de tabtoxina por diferentes cepas de *P. syringae* utilizando dos cebadores diferentes: *tblA* y *tabA*. En este encontraron que algunas cepas que fenotípicamente expresaban la producción de toxina

se detectaban ambos genes, mientras que en otras sólo se detectaba uno de los mismos. En este trabajo se estaría dando una situación semejante en la cual el primer (gen *tblA)* utilizado se detectó solo en *P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5. Otros de los cebadores anteriormente mencionados podrían ser utilizados para detectar la presencia de los genes involucrados en la producción de la tabtoxina de las demás *Pseudomonas* ensayadas.

✓ Producción de faseolotoxina

La faseolotoxina es una fitotoxina producida por *P. syringae* pv. *phaseolicola* y pv. *actinidiae*, que causan halos en leguminosas y chancro bacteriano en kiwis, respectivamente. La estructura de la faseolotoxina consiste en un resto sulfodiaminofosfinilo unido a un tripéptido que consiste en ornitina, alanina y homoarginina (Bender et. al, 1999; Sawada et. al, 1997).

En el presente trabajo no se observó la producción fenotípica de faseolotoxina en ninguna de las cepas ensayadas, por lo que no se continuaron los ensayos moleculares para la detección de genes involucrados en la síntesis de la toxina.

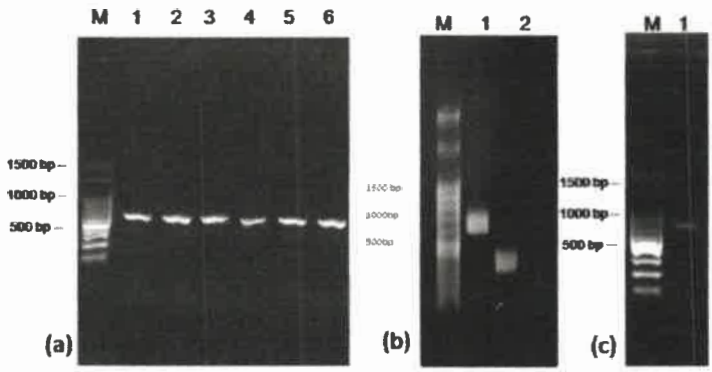


Figura 23: Fragmentos de amplificación por PCR. **Ref.: (a):** fragmentos de 650 pb correspondientes al gen *cfl*, para coronatina (**1:** *Pseudomonas* sp. Q; **2:** *Pseudomonas* sp. C13; **3**: *Pseudomonas* sp. LS3; **4:** *P. syringae* pv. *atropurpurea Ps5;* **5:** *P. syringae* pv. *tomate* DC 3000 y **6:** *P. savastanoi* pv. *glycinea* B076); **(b):** fragmentos correspondientes a genes *syrB* y *syrD* para siringomicina con tamaños de 700 pb (1), 446 pb (2); **(c):** fragmentos correspondientes al gen *tblA*, codifica para tabtoxina, tamaño de 829 pb (1); **M:** 100 pb marcador de peso molecular (Gibco).

La capacidad de producir fitotoxinas, moléculas reconocidas como factores de virulencia de la especie *P. syringae*, contribuyó a la identificación, por ensayos fenotípicos y genotípicos, de los aislamientos bacterianos obtenidos de cultivos de soja. En la tabla 9 se observa que en los aislamientos de *Pseudomonas* sp. y en las cepas de referencia la producción fenotípica de las fitotoxinas no siempre se correspondió con la genotípica. Estos resultados estarían indicando que se necesitarían ensayar otros primers mencionados anteriormente para confirmar la presencia de los genes productores cada toxina.

Tabla 9: Producción fenotípica y genotípica de fitotoxinas en *Pseudomonas* sp. y *Pseudomonas* de referencia

Toxinas	Tabtoxina		Coronatina		Siringomicina	
	F	G (*tblA*)	F	G (P1-P2)	F	G (*syrB -syrD*)
AISLAMIENTOS DE SOJA						
***Pseudomonas* sp. A5**	+	NR	-	NR	+	NR
***Pseudomonas* sp. C13**	+	-	-	+	+	-
***Pseudomonas* sp. EM1**	+	-	+	-	+	-
***Pseudomonas* sp. LS3**	+	-	+	+	+	-
***Pseudomonas* sp. Q**	+	-	+	+	+	-
***Pseudomonas* sp. VT2**	+	-	+	-	+	-
CEPAS DE REFERENCIAS						
***P. s.* pv. *atropurpurea* Ps5**	+	+	-	+	-	-
***P. s.* pv. *tomato* DC3000**	-	NR	+	+	+	-
***P. s.* pv. *syringae* P61**	+	NR	+	-	-	-
***P. s.* pv. *tabaci* 6605**	+	-	-	NR	+	NR
***P. s.* pv. *syringae* 728a**	-	-	-	NR	+	+
***P. s.* pv. *glycinea* B076**	NR	NR	+	+	+	-

Ref.: F: producción fenotípica; **G:** producción genotípica; **NR:** no realizado

De acuerdo a los resultados fenotípicos y genotípicos observados con respecto a la producción de fitotoxinas, y a la reproducción de la enfermedad en soja, se podría inferir que los aislamientos obtenidos en este trabajo podrían ser incluidos en el complejo *P. syringae*. Varios autores describen la evolución de los procesos de clasificación, identificación y nomenclatura de

Pseudomonas syringae. Esta especie llegó a incluir más de 40 poblaciones patógenas específicas de hospedante como patovares. Los estudios de hibridación ADN-ADN y análisis recientes de secuencias multilocus (MLSA) indican un complejo *P. syringae* que abarca hasta diez especies de *Pseudomonas* y 60 patovares. Una reevaluación del complejo utilizando enfoques polifásicos permitiría la revisión de estas especies y la distribución de patovares en una serie de especies o genomospecies (Young, 2010). Estudios realizados por Baltrus et. al, (2011) proponen subdividir a los aislamientos de *P. syringae* en aproximadamente 50 patovares, basado en el rango de hospedante y en las características de cada cepa. La clasificación reciente por análisis de secuencias multilocus (MLST) agruparon a patovares de *P. syringae* en al menos 5 clados filogenéticos distintos, que en gran parte reflejan 9 genomospecies basados en la hibridación del ADN. Si bien las presiones de selección que determinan el rango de hospedante pueden ser similares en toda la especie, no ha sido lo suficientemente exhaustivo tanto el muestreo fenotípico como la secuenciación de los genomas a través de la especie para determinar las tendencias que indican la diferenciación evolutiva entre los clados (Baltrus et. al, 2011).

Los genomas de cepas de *P. syringae* difieren en el contenido de genes, plásmidos y en la presencia/ausencia de muchos genes relacionados con la virulencia. Estas cepas representan sólo una fracción de la diversidad conocida dentro de las cepas aisladas de *Pseudomonas;* gran parte de la diversidad filogenética, ecológica y de hospedante para este patógeno vegetal sigue siendo inexplorada (Baltrus et. al, 2011).

Algunos autores proponen diferenciar los patovares de *P. syringae* según la habilidad de producir fitotoxinas. La identificación de patovar resulta de mayor complejidad que la identificación de especie, requiriendo muchas pruebas moleculares y de especificidad de hospedante. Para la identificación de cepas y de patovares de la especie *P. syringae* es necesario utilizar caracteres fenotípicos, genotípicos o una combinación de ambos. De este modo, la detección de toxinas y genes productores de las mismas resultan de utilidad para detectar diferentes patovares (Schaad et. al, 2001).

Los estudios realizados en este trabajo intentan aportar conocimientos sobre cepas de *Pseudomonas* fitopatógenas que ocasionan el tizón bacteriano en soja. Ante la diversidad y controversia de opiniones sobre la identificación del agente causal del tizón está claro que se requieren mayores estudios específicos para determinar la identidad de los aislamientos de *Pseudomonas* en soja que ocasionan la bacteriosis en los cultivos del centro del país.

II.- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PRODUCTOS NATURALES DE *THYMUS VULGARIS* Y *ORIGANUM VULGARE*

1-Obtención de productos naturales

Se obtuvieron diferentes productos naturales de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*: extractos vegetales, decocciones y AE.

Los extractos vegetales consisten en la fracción no volatilizable o inestable a la temperatura, que se obtienen mediante diversas técnicas de extracción (Raaman, 2006). Se utilizaron solventes de distinta polaridad como etanol, hexano, cloroformo y propanol para la obtención de los distintos extractos. Los resultados obtenidos fueron variables dependiendo del solvente utilizado en la extracción. Los rendimientos de los diferentes extractos y AE se muestran en la tabla 10.

Tabla 10: Obtención de productos naturales de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*

Productos vegetales	Rendimientos (%)					
	Extractos				AE	
	EA	EH	EC	EP	R	δ (mg/mL)
T	12,563	3,9	0.435	0,97	1,9	919,8
O	11,924	0,44	0,573	3,2	0,5	925,2

Ref.: O: *O. vulgare*; **T:** *T. vulgaris*; **EA:** extracto alcohólico; **EH:** extracto hexánico; **EC:** extracto clorofórmico; **EP:** extracto propanólico; **R:** rendimientos; **δ:** densidades.

La actividad biológica de extractos vegetales depende de las técnicas de extracción utilizadas, incluyendo el tipo de disolvente y la polaridad, tamaño de partícula, estado de la materia prima y parámetros de extracción (Bracco et. al, 1981). Debido a que la pared celular vegetal es un complejo altamente resistente que incorpora hemicelulosa, celulosa, pectina, lignina y moléculas de proteína, dentro de las cuales los compuestos fenólicos están atrapados, el acondicionamiento de la materia prima puede promover la extracción de compuestos bioactivos (Cerda et. al, 2013). La aplicación de extractos vegetales tiene una larga tradición en la sociedad

humana, ya que estos manifiestan efectos biológicos notables (antibacterianos, fungistáticos, virostáticos, antioxidantes, analgésicos) y tienen actividad preventiva y terapéutica frente a muchas enfermedades (Kozics et. al, 2013). Miron et. al, (2011) determinaron la composición química de varios extractos, caracterizando a orégano como el más rico en compuestos fenólicos totales, seguidos de tomillo y estragón. La capacidad antioxidante estuvo altamente correlacionada con la cantidad de fenoles totales (Mirón et. al, 2011).

Las decocciones son extractos obtenidos de plantas medicinales, presentando mayor concentración de ácidos fenólicos y flavonoides, seguidas de las infusiones y los extractos hidroalcohólicos (EHA). Aunque de manera general todas poseen actividad contra los microorganismos, las decocciones poseen mejores propiedades antioxidantes respecto a los EHA, que presentan mejores características antimicrobianas (Martins et. al, 2014).

Los AE son metabolitos secundarios los cuales están distribuidos entre grupos taxonómicos limitados dentro del reino vegetal, entre los que se encuentran las plantas medicinales (Cowan, 1999). Estos se elaboran en el citoplasma de ciertas células vegetales y se acumulan en diferentes partes de la planta (Burt, 2004; Ojeda et. al, 2001). Los AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* se extrajeron por hidrodestilación y luego se determinó la composición terpénica de ambos por CG-MS (Anexo II, Tabla 2 y 3).

La cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (GC-MS) de los AE ensayados fueron realizadas en el Laboratorio de Química Orgánica de la Universidad Nacional de Córdoba, bajo la dirección del Dr. Julio Zygadlo. En las mismas se observó que los AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* poseen elevados porcentajes de carvacrol (19,7 y 29,5%, respectivamente) y bajos de timol (<1,5%). En ambos AE también se identificaron componentes principales a p-cimeno y terpineno y, además en el aceite de orégano, cis-sabineno (Anexo, II, Tabla 2 y 3).

El género *Thymus* tiene numerosas especies y variedades con seis quimiotipos: geraniol, linalol, c-terpineol, carvacrol, timol y trans-thujan-4-ol/terpinen-4-ol (Rota, 2008). En consecuencia, el quimiotipo utilizado en esta investigación parece ser carvacrol. La cromatografía del aceite de *T. vulgaris* mostró que p-cimeno fue el terpeno principal (31,5%); el cuál carece del grupo hidroxilo y es un precursor biosintético de timol y carvacrol (Veldhuizen et. al, 2006).

Las especies de *O. vulgare* presentan gran variabilidad en la composición de sus AE, debido a que existen muchas subespecies. Asensio et. al, (2014) estudiaron la composición de los

AE de 4 quimiotipos diferentes de *O. vulgare*: Mendocino, Compacto, Criollo y Cordobés. El AE proveniente de la variedad Cordobés se caracterizó por presentar como componentes mayoritarios a carvacrol y p- cimeno, con porcentajes similares al presentado en el aceite utilizado en este estudio. Además, se evaluó la actividad antimicrobiana de las cuatro muestras, obteniéndose buenos resultados. Se reconocen dos quimiotipos principales de *O. vulgare* hasta el momento, uno que posee como componentes mayoritarios a los compuestos fenólicos carvacrol y timol y el otro, que posee D-germacreno, terpineno 4-ol y cis-transsabineno (Licina et. al, 2013). El quimiotipo utilizado en esta investigación coincide con el que posee como componentes característicos a carvacrol y timol.

La evaluación del AE de *Origanum onites*, especie nativa de Turquia, arrojó resultados similares a los obtenidos en este trabajo, presentando este AE elevados porcentajes de p-cimeno (13,97%) y carvacrol (70,50%) y bajos de timol (2,19%) (Kotan et. al, 2014).

Ha sido ampliamente estudiada la composición química de los AE de numerosas plantas aromáticas, encontrando variabilidad tanto cuali como cuantitativa de una misma especie vegetal. Se observó que la composición química está determinada por el lugar donde crecen las plantas, la época de cosecha, la morfología, el genotipo, quimiotipo, etc. Los cuales afectan la biosíntesis de los mismos, y como consecuencia, la variación de la composición y proporción relativa de los principales compuestos característicos que definen a un quimiotipo (Lisbalchin and Roth, 1997; Svoboda and Hampson, 1999; Zygadlo and Juliani, 2000).

2-Determinación de actividad antimicrobiana de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*

En los últimos años se ha generado un creciente interés en el uso de compuestos orgánicos biológicamente activos de especies vegetales que presentan la capacidad de eliminar sus propios microorganismos patógenos. La utilización de productos naturales obtenidos de estas plantas con propiedades bactericidas, entre otras, representa una nueva alternativa para el control de bacterias fitopatógenas (Barboa-Flores et. al, 2010). Uno de los géneros bacterianos que posee especies fitopatógenas de gran importancia y de difícil control es *Pseudomonas* (Mansfield et. al, 2012). Este género posee como característica la alta resistencia a numerosos antimicrobianos (Garrity et. al, 2005). La resistencia de bacterias Gram negativo a algunos compuestos hidrocarbonados está

dada por la composición química de la membrana externa, ubicada por fuera de la pared de peptidoglicano, que funciona como una barrera en donde las moléculas mayores de 600-1000 Da. no pueden penetrar, a pesar de la presencia de porinas, las cuales permiten que pequeños solutos hidrofílicos atraviesen la membrana externa. Esta membrana muestra muy baja permeabilidad para compuestos hidrofóbicos, lo que ha sido adjudicado a la presencia de lipopolisacáridos lipofílicos. Este hecho es lo que marca la resistencia de las bacterias Gram negativo a los antibióticos hidrofóbicos, drogas y probablemente a algunos AE. Además estas bacterias y particularmente *Pseudomonas* sp., pueden presentar una serie de adaptaciones que incluso les permiten desarrollarse en presencia de compuestos hidrocarbonados tóxicos (Helander et. al, 1988; Pierozan et. al, 2009; Sikkema et. al, 1995).

Las plantas medicinales están siendo consideradas para la búsqueda de nuevos compuestos capaces de ser utilizados en el tratamiento de bacteriosis vegetales (Lo Cantore et. al, 2004). La familia *Lamiaceae* incluye gran cantidad de especies aromáticas a las cuales se les ha reconocido actividad antimicrobiana; dentro de estas especies se encuentran *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* (Pierozan et. al, 2009). En la presente investigación se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos, decocciones y AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* sobre *Pseudomonas* sp., aisladas de soja y cepas de *P. syringae* de diferentes patovares.

✓ a. Extractos naturales

Se probó la actividad antimicrobiana de los extractos alcohólicos, hexánicos, clorofórmicos y propanólicos sobre *Pseudomonas* sp. aisladas de soja C13, EM1, LS3, Q y VT2 aislamientos de soja y sobre cepas de referencia *P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5, *P. syringae* pv. *syringae* P61, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, *P. syringae* pv. *tabaci* 6605, *P. savastanoi* pv. *glycinea* B076, utilizando la técnica de difusión en disco. El extracto alcohólico de *T. vulgaris* tuvo actividad contra *P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 y *P. syringae* pv. *tabaci* 6605, con halos de inhibición promedio de 1 cm.; mientras que el de *O. vulgare* tuvo actividad contra *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. No se observó actividad antimicrobiana de estos extractos sobre los aislamientos de soja. Los extractos obtenidos con hexano, cloroformo y propanol no presentaron actividad antimicrobiana sobre ninguna de las *Pseudomonas* ensayadas (Anexo II, Tabla 4).

Ensayos de actividad antimicrobiana realizados con extractos hexánicos, clorofórmicos, acetónicos y metanólicos de la especie aromática *O. onites* demostraron que todos los extractos fueron capaces de inhibir a 14 especies fitopatógenas entre las cuales se encontraba *P. syringae*, exceptuando el metanólico que no presentó actividad (Kotan et. al, 2014).

En ensayos *in vitro* e *in vivo*, fue demostrado que extractos de *Allium sativum* y *Ficus carica* poseen efectos antimicrobianos, en plantas infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas vesicatoria* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Balestra et. al, 2009).

Los productos naturales vegetales también están siendo estudiados como antimicrobianos en las áreas de medicina veterinaria y humana y en la de alimentos.La incorporación de especias en los alimentos se remonta a cientos de años, cuando las mismas se añadieron para mejorar el sabor y el tiempo de almacenamiento de los alimentos. Estas plantas se utilizan como hojas enteras, molidas o como extractos. Entre las plantas de especias más reconocidas se destacan: albahaca, orégano, tomillo, romero y salvia; todas ellas pertenecientes a la familia Lamiaceae (Cerda et. al, 2013).

Licina et. al, (2013) demostraron actividad inhibitoria y bactericida de extractos acuosos, etanólicos, éter etílico y di-etilacetato de *O. vulgare* sobre bacterias, hongos unicelulares y filamentosos causantes de infecciones en humanos, animales y alimentos.

Se evaluaron extractos etanólicos, clorofórmicos, hexánicos y acuosos de *Thymus lanceolatus* obtenidos de Argelia, los cuales demostraron actividad antimicrobiana interesante sobre bacterias Gram positivos, entre las cuales se encontraban *S. aureus* y *B. cereus*, Gram negativos, como *E. coli, K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* y sobre levaduras, siendo el etanólico y el clorofórmico los más efectivos (Benbelaid et. al, 2013).

La protección de las plantas contra las enfermedades bacterianas se basa principalmente en el uso de compuestos químicos, Europa utiliza esencialmente cobre. Sin embargo, en la actualidad este control de bacteriosis se está orientado hacia un uso racional de moléculas y extractos, generalmente de origen natural, con menor toxicidad intrínseca y menor impacto ambiental negativo.

✓ **b.Decocciones**

-Técnica de estrías radiales

Se realizó la técnica de estrías radiales como metodología para evaluar la actividad antimicrobiana de las decocciones de *T. vulgaris* y *O. vulgare* sobre los 13 aislamientos de soja, presentados en tabla 11. Las decocciones se probaron a una concentración de 10%. Se observó que ambas inhibieron al 54% (7) de las bacterias probadas. La decocción de *T.vulgaris* presentó actividad antimicrobiana sobre *Pseudomonas* sp. A5, A6, C12, C13, EM1 y VT2 y sobre el aislado M2E7. La decocción de *O. vulgare* inhibió a *Pseudomonas* sp. C13, EM1, LS3 y Q, y a los aislamientos C47, EM21 y M2E7 (Tabla 11 y figura 24).

Tabla 11: Actividad antimicrobiana de decocciones de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*.
Técnica de estrías radiales

AISLAMIENTOS	*T. vulgaris*	*O. vulgare*
***Pseudomonas* sp. A5**	I	NI
***Pseudomonas* sp. A6**	I	NI
***Pseudomonas* sp. A7**	NI	NI
***Pseudomonas* sp. C12**	I	NI
***Pseudomonas* sp. C13**	I	I
***Acinetobacter* sp. C47**	NI	I
***Pseudomonas* sp. EM1**	I	I
***Pseudomonas* sp. EM16**	NI	NI
***Acinetobacter* sp. EM21**	NI	I
***Pseudomonas* sp. LS3**	NI	I
***Achromobacter* sp. M2E7**	I	I
***Pseudomonas* sp. Q**	NI	I
***Pseudomonas* sp. VT2**	I	NI

Ref.: I: inhibe; **NI:** no inhibe.

En los resultados se observa buen efecto antimicrobiano de las decocciones sobre todos los microorganismos ensayados. Es de destacar que las decocciones de *T. vulgaris* y *O. vulgare* demostraron actividad antimicrobiana sobre las *Pseudomonas* sp. fitopatógenas aisladas de soja (A5, C13, EM1, LS3, Q y VT2).

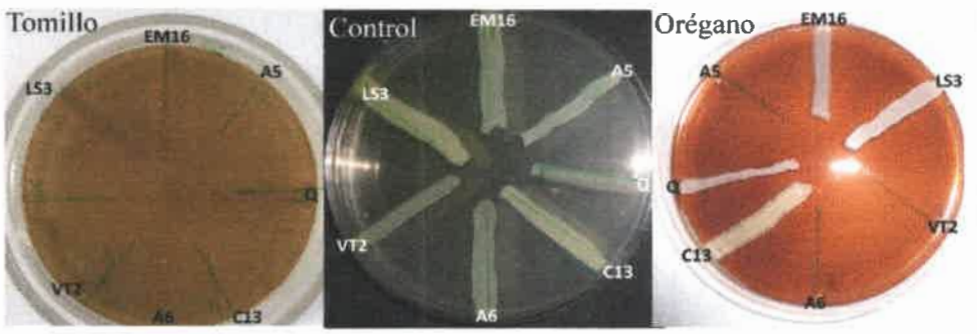


Figura 24: Actividad antimicrobiana de decocciones de *T. vulgaris* y *O. vulgare* sobre *Pseudomonas* sp. aisladas de soja.

Los trabajos de investigación sobre las propiedades biológicas de las plantas medicinales están aumentando, debido al interés que estas plantas están generando para el tratamiento de múltiples patologías. En este sentido las decocciones y los extractos hidroalcohólicos de *O. vulgare* demostraron efecto antibacteriano y antioxidante sobre bacterias Gram positivo (*S. aureus* y *S. epidermidis*) y Gram negativo (*E. coli, Enterobacter sakazani, P. aeruginosa,* etc.), siendo mejor esta actividad sobre bacterias Gram negativo y principalmente sobre *P. aeruginosa* (Martins et. al, 2014).

Estudios realizados por Faria et. al, (2013) demostraron la efectividad de decocciones de diferentes vegetales sobre un nemátodo de pino, *Bursaphelenchus xylophilus,* el cual amenaza los bosques de Portugal (Faria et. al, 2013).

-Técnica de macrodilución en caldo

Se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima de las decocciones de *T. vulgaris* y *O. vulgare*. El rango de concentraciones utilizado fue de 50 mg/mL a 0.0976 mg/mL. Ambas decocciones resultaron ser efectivas para inhibir el crecimiento de *Pseudomonas* sp. fitopatógenas aisladas de soja. La decocción de *O. vulgare*

resultó ser más efectiva que *T. vulgaris* debido a que presentó efecto inhibitorio en un rango más amplio (menores concentraciones), destacándose valores de CIM de 0,0976 mg/mL. para 4 de los aislamientos. En la tabla 12 se detallan las CIM obtenidas. Además, la decocción de *O. vulgare* tuvo efecto bactericida frente a 2 de los aislamientos de *Pseudomonas* sp., mientras que *T. vulgaris* no demostró actividad bactericida (Tabla 12).

Tabla 12: CIM y CBM de decocciones de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* sobre *Pseudomonas* fitopatógenas

MICROORGANISMOS	*T. vulgaris* (mg/mL)		*O. vulgare* (mg/mL)	
	CIM	CBM	CIM	CBM
***Pseudomonas* sp. A5**	25	NI	0.0976	NI
***Pseudomonas* sp. C12**	6.25	NI	3.125	NI
***Pseudomonas* sp. C13**	12.5	NI	0.0976	3.125
***Pseudomonas* sp. EM1**	12.5	NI	0.0976	NI
***Pseudomonas* sp. LS3**	0.0976	NI	50	50
***Pseudomonas* sp. Q**	6.25	NI	3.125	NI
***Pseudomonas* sp. VT2**	6.25	NI	0.0976	NI
***P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5**	12.5	NI	0.0976	NI
***P. syringae* pv. *syringae* P61**	25	NI	0.0976	NI
***P. syringae* pv. *tomato* DC3000**	3.125	NI	0.0976	NI

Ref.: NI: no inhibe

La información sobre actividad antimicrobiana de decocciones obtenidas de plantas medicinales es escasa; sin embargo la efectividad de los resultados obtenidos con *T. vulgaris* y *O. vulgare* en este estudio, presentan a estos compuestos como una alternativa promisoria para la elaboración de nuevos productos fácilmente aplicables a campo. Estas formulaciones naturales, al no generar resistencia bacteriana, no dejar residuos tóxicos en el ambiente y obtenerse en grandes cantidades a un bajo costo, permitirían desarrollar en un futuro estrategias de control de bacteriosis vegetales. Debido a la efectividad antimicrobiana de estas especies vegetales se deberían realizar estudios posteriores para determinar los principios activos de las mismas.

✓ **c.Aceites esenciales**

-Técnica de microdilución en caldo

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* sobre los aislamientos de *Pseudomonas* sp. fitopatógenos y las cepas de *P. syringae* de referencia. Se determinó la CIM y la CBM utilizando la técnica de microdilución en caldo.

Los dos AE presentaron actividad inhibitoria sobre todas las cepas estudiadas, excepto sobre *Pseudomonas* sp. VT2, que resultó ser resistente al AE de *T. vulgaris*. Los valores de CIM para el AE de *T. vulgaris* se encontraron entre 11,5 mg/mL y 5,7 mg/mL. y para *O. vulgare* entre 46,3 mg/mL y 5,8 mg/mL (Tabla 13). No se observó efecto bactericida de los AE sobre ninguno de los microorganismos ensayados.

El método de microdilución en caldo posee la ventaja de realizar un mayor número de repeticiones, además de usar pequeños volúmenes de las sustancias a ensayar y de los medio de crecimiento (Sokovic et. al, 2007). Este método permite también determinar el efecto "cida" de una sustancia. Sin embargo, con esta técnica los AE no demostraron este efecto. La naturaleza oleosa de los AE hace que su disolución en un medio acuoso se dificulte, por lo que no hay una distribución uniforme de estos compuestos en el medio de cultivo. Esto lleva a que se deban usar emulsificantes que favorezcan el contacto de los AE con el medio acuoso. En este trabajo se utilizó DMSO, logrando buen efecto emulsificante a medida que la concentración de AE disminuía. Sin embargo, se observó que los AE formaban nuevamente dos fases en las concentraciones más elevadas cuando el recipiente en el cual permanecían las diluciones se estabilizaba. Por lo tanto, se decidió evaluar la actividad bactericida realizando una técnica con agitación.

La actividad bactericida de los AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* fue probada frente a todas las cepas de *Pseudomonas* sp., las cuales fueron incubadas con distintas concentraciones de AE y en agitación. Se demostró que las fracciones oleosas de ambos vegetales presentaron actividad bactericida efectiva, con valores de CBM entre 5,7 mg/mL a 0,022 mg/mL en *T. vulgaris* y 0,36 mg/mL a 0,012 mg/mL en *O. vulgare* (Tabla 13).

Utilizando la técnica de agitación para la determinación de la actividad "cida", los AE de *T. vulgaris*y *O. vulgare* fueron capaces de mostrar este efecto (CBM: 5,7mg/mL a 0,012 mg/mL). En este último método, las concentraciones de activos que producen un efecto "cida" fueron más

pequeñas en comparación con las concentraciones que produjeron un efecto inhibitorio, lo que podría atribuirse a que la incubación con agitación permitió un mejor contacto entre los AE y las células bacterianas.

Tabla 13: CIM y CBM de AE de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* sobre *Pseudomonas* fitopatógenas

MICROORGANISMOS	*Thymus vulgaris* (45.99-0.022 mg/mL)		*Origanum vulgare* (46.3-0.022mg/mL)	
	CIM	CBM	CIM	CBM
Pseudomonas sp. C13	11.5	5.7	5.8	0.022
Pseudomonas sp. EM1	11.5	0.71	11.6	0.09
Pseudomonas sp. LS3	11.5	0.17	46.3	0.36
Pseudomonas sp. Q	11.5	0.71	23.1	0.022
P. syringae pv. *atropurpurea* Ps5	2.9	-	11.6	0.012
P. syringae pv. *tomato* DC3000	11.5	0.022	23.1	0.045
P. syringae pv. *syringae* B728a	1.4	0.022	5.8	0.045
P. savastanoi pv. *glycinea* B076	5.8	0.17	5.8	0.022
P. syringae pv. *tabaci* 6605	11.5	0.089	11.6	0.18

Se han propuesto varias técnicas para estudiar la actividad antimicrobiana que presentan diferencias en la sensibilidad y por lo tanto variabilidad en los resultados, atribuído a que los métodos empleados se basan en distintos principios. Los ensayos se pueden llevar a cabo en un medio líquido o en medio sólido, con la ventaja de que el método en medio líquido permite determinar a qué concentración un extracto tiene actividad antimicrobiana y si esa acción es "cida" o "estática". Otro factor a considerar es la composición del medio de crecimiento que puede afectar en gran medida la actividad antibacteriana de un compuesto (Cos et. al, 2006).

El estudio del efecto antimicrobiano de los AE sobre bacterias fitopatógenas está tomando mayor importancia en la actualidad. Lo Cantore et. al, (2004) encontraron buen efecto inhibitorio de AE obtenidos de *Coriandrum sativum L.* y *Foeniculum vulgare* Miller var. vulgare (Miller) sobre *E. coli*, *Bacillus megaterium* y 27 especies bacterianas fitopatógenas, entre las cuales se encontraba *P. syringae*, *X. axonopodis*, *Erwinia* sp., *Agrobacterium* sp., *Clavibacter* sp., *Curtobacterium* sp. y *Rhodococcus* sp., sugiriendo que estos AE podrían ser utilizados como

biocidas naturales para el control de enfermedades bacterianas en plantas y para el tratamiento de semillas, sobre todo en la agricultura orgánica (Lo Cantore et. al, 2004). En otro trabajo, Sokmen et. al, (2004) demostraron buen efecto antimicrobiano de extractos metanólicos y AE de *Thymus spathulifolius* sobre un amplio espectro bacteriano entre el cual se encontraban las bacterias fitopatógenas de *Clavibacter michiganensis, P. syringae* pv. *tomato* y *X. campestris.*

El AE de *O. onites* fue efectivo al ser ensayado sobre bacterias fitopatógenas de los géneros *Erwinia, Pseudomonas, Xanthomonas* y *Clavibacter*, demostrando buena actividad inhibitoria; siendo atribuída esta actividad al componente mayoritario de este AE, carvacrol (Kotan et. al, 2014).

La actividad antibacteriana de AE de otros miembros de la familia Lamiaceae, lavanda (*Lavandula stoechas* ssp. *stoechas*), romero (*Rosmarinus officinalis* L.), *O. vulgare* (*Origanum onites* L.), y *T. vulgaris* (*Thymbra spicata* L. var. *spicata*) fue evaluada *in vitro* contra *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, agente causal de las manchas de poroto. La mayor actividad fue descripta para *T. vulgaris*, seguida por *O. vulgare*, lavanda y romero (Soylu, 2003). Vasinauskiene et. al, (2006) también encontraron buena actividad antimicrobiana del AE de *O. vulgare* sobre bacterias fitopatógenas.

La capacidad de AE provenientes de diversas especies de *T. vulgaris* y *O. vulgare* de retardar y de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas de plantas tales como: *Agrobacterium tumefaciens, Clavibacter michiganensis subespecie michiganensis, Erwinia amylovora, E. caratovora, P. syringae, P. viridiflava, X. vesicatoria* fue documentado en otras investigaciones (Borboa-Flores et. al, 2010).

Se han realizado evaluaciones de la actividad antimicrobiana de AE de otras especies de tomillo, *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus var. rosulans* y de orégano, *O. acutidens*, y *O. rotundifolium* sobre bacterias Gram positivo, Gram negativo, levaduras y hongos filamentosos, observando buen efecto inhibitorio sobre todos los microorganismos ensayados, demostrando tomillo el mejor efecto antimicrobiano (Cetin et. al, 2011). En otros estudios, se evaluó el efecto de los AE obtenidos de tres especies de *Thymus, T. vulgaris, T. zygis* y *T. hyemamelis* sobre bacterias Gram positivo, Gram negativo y levaduras causantes de intoxicaciones alimentarias, observando buen efecto inhibitorio y bactericida de todas las variedades (Rota et. al, 2008).

Estudios más recientes han demostrado que las especies de *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* poseen fuerte actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitaria,

antiespasmódica y antioxidante. Se ha documentado la actividad antimicrobiana de este vegetal contra hongos y contra bacterias Gram positivo y negativo (Ghasemi Pirbaloutti et. al, 2011).

El grado de toxicidad de compuestos aromáticos sobre la células está relacionado a la concentración y la ubicación de éstos en la membrana citoplasmática y la interacción con los constituyentes de la misma, esto provoca una variación en el espesor de la membrana dependiendo de la hidrofobicidad y grupo funcional presente, tal como hidroxilo, carboxilo o fenilo (Sikkema et. al, 1995). Las propiedades hidrofóbicas que presentan los AE y sus componentes, permiten que estos se intercalen entre los lípidos tanto de la membrana celular bacteriana, eucariótica y mitocondrial, alterando la estructura y haciéndola más permeable (Burt, 2004; Sikkema et. al, 1995).

Evaluaciones de la actividad antimicrobiana y el mecanismo de acción realizadas con el AE de *O. compactum* sobre *S. aureus* y *P. aeruginosa* demostraron valores de CIM mayores para inhibir a la bacteria Gram negativo que a la Gram positivo. Además, se investigó el mecanismo de acción por el cual este AE ejercía su efecto antimicrobiano, determinando por técnicas de microscopia electrónica que *P. aeruginosa* sufrió mayores alteraciones celulares y funcionales que *S. aureus*. El AE de orégano indujo daños en la membrana plasmática que llevaron a la liberación de iones, alteraciones ultraestructurales y pérdida de la viabilidad celular (Bouhdid et. al, 2009). Los aislamientos de *Pseudomonas* sp. y las cepas de *P. syringae* evaluadas en la presente tesis, pertenecen al género *Pseudomonas* y son bacilos Gram negativo, por lo que se podría sugerir que el AE de *O. vulgare* ensayado estaría causando su efecto de forma semejante al de *O. compactum*.

La actividad antimicrobiana de los AE está atribuida principalmente a los terpenos y los componentes fenólicos de los mismos, los cuales en forma pura han demostrado poseer actividad antimicrobiana (Zygadlo et. al, 2000).

Diversos trabajos afirman que los AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* tienen propiedades antioxidantes y antimicrobianas, relacionadas al elevado porcentaje de los compuestos fenólicos carvacrol y timol (Bagamboula et. al, 2004; Barboa-Flores et. al, 2010; Kotan et. al, 2007; Sokovic et. al, 2007). En este sentido se demostró actividad antimicrobiana efectiva de AE de distintas especies de *Thymus: T. canoviridis, T. haussknechtii, T. sipyleus y T. sipyleus rosulans* y de sus componentes mayoritarios (carvacrol y timol) frente a *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, patógena de tomate (Kotan et. al, 2007).

Otros investigadores también estudiaron el AE de *T. vulgaris*, demostrando elevada actividad antimicrobiana sobre una gran variedad de cepas Gram positivo y Gram negativo, atribuyendo esta capacidad a la presencia de timol y carvacrol (Cosentino et. al, 1999).

Se analizó la actividad antimicrobiana del AE de *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* y su componente principal (metileugenol) frente a cinco hongos fitopatógenos: *Alternaria humicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora cactorum* y *Fusarium solani*, los cuales inhibieron fuertemente su crecimiento (Dan et. al, 2010).

La acción antimicrobiana de los AE depende de su carácter hidrófilo o lipófilo, el tipo de terpenoide, la cantidad en la que se encuentren en el aceite y las interacciones que se dan entre estos componentes (Delaquis et. al, 2002; Radulovic et. al, 2007). El grado de actividad inhibitoria de los AE está relacionado con la estructura química de los componentes presentes en los mismos. Los terpenoides que contienen grupos fenoles se les atribuye la mayor actividad antimicrobiana, seguidos por los alcoholes, luego los que poseen grupos aldehídos y por último los que tienen grupos cetónicos en su estructura (Delaquis et. al, 2001; Sánchez et. al, 2009). Los terpenos poseen estructuras químicas diversas, las cuales permiten asociarlos en diferentes grupos basándose en la estructura aromática, la presencia/ausencia de grupos OH y la ubicación de estos en su estructura. Diferentes autores describieron que existe una relación entre la estructura química y la actividad biológica del compuesto, teniendo mayor actividad aquellos que poseen grupos alcoholes con respecto a los que poseen grupos carbonilos (Di Pasqua et. al, 2007; Zygadlo et. al, 2000). Es interesante destacar que la posición de los sustituyentes respecto al grupo OH produce cambios significativos en la actividad antimicrobiana (Turina et. al, 2006; Veldhuizen et. al, 2006).

Se ha descripto previamente la actividad antimicrobiana de carvacrol y timol, atribuyéndose la fuerte actividad antimicrobiana al sistema de electrones deslocalizados que poseen en su estructura fenólica (Ultee et. al, 2002). Ambos compuestos se encuentran presentes mayoritariamente en *Thymus* spp. y *Origanum* spp. y se han utilizado por muchos años como preservantes en alimentos (Guarda et. al, 2011; Ultee et. al, 2002).

Previamente, se presentaron los componentes de los AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* analizados en este trabajo, los cuales presentaron elevados porcentajes de carvacrol (29,5% y 19,7%, respectivamente) y bajos de timol (<1,5%) (Anexo II, Tabla 2 y 3).

Tanto carvacrol como timol son compuestos fenólicos que contienen un grupo OH en su estructura química y poseen actividad antimicrobiana reconocida, ejerciendo su efecto a nivel de membrana citoplasmática, la cuál se torna más permeable y desintegrando la membrana externa de bacterias Gram negativas, lo que produce liberación de los lipopolisacáridos (Gallucci et. al, 2014; Lambert et. al, 2001; Veldhuizen et. al, 2006).

En la cromatografía se observó a p-cimeno (31.5%) como componente mayoritario del AE de *T. vulgaris*. Este terpeno es precursor en la biosintesis de timol y carvacrol, diferenciándose por la falta de un grupo oxhidrilo en su estructura. Se ha descripto escasa actividad antimicrobiana por si solo, pero al ser utilizado en combinación con carvacrol se observó un efecto sinérgico sobre *B. cereus* el cuál fue atribuido a las características hidrofóbicas de p-cimeno debido a que facilitaría el ingreso de carvacrol al interior citoplasmático (Veldhuizen et. al, 2006).

Estos datos permiten inferir que la capacidad inhibitoria de los AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* utilizados podría ser atribuída principalmente a carvacrol, y/o a las mezclas terpénicas que se generan en el AE completo.

Los resultados obtenidos demuestran la efectiva actividad antibacteriana que poseen los AE y decocciones y, en menor grado los extractos de *T. vulgaris* y *O. vulgare*. Los mismos fueron capaces de inhibir a bacterias Gram negativo pertenecientes al género *Pseudomonas*, de reconocida resistencia natural contra compuestos antimicrobianos. Por lo tanto, estos productos constituyen una alternativa promisoria para el tratamiento de enfermedades bacterianas de cultivos de soja, hortalizas, frutales, legumbres, cereales, ornamentales, entre otros, también atacados por estos fitopatógenos. La ventaja potencial radica en que estos compuestos naturales no generan resistencia bacteriana, no dejan residuos tóxicos en el ambiente y pueden ser obtenidos en grandes cantidades y a un bajo costo. Aunque, existen antibióticos, estos generan rápida resistencia y se encuentran prohibidos en la mayoría de los países. Además, se utilizan compuestos de cobre el cuál es altamente fitotóxico y se acumula en el ambiente. Es por ello que hoy en día existen pocas medidas efectivas de control de estos microorganismos patógenos, así como de pocos productos antibacterianos adecuados disponibles en el mercado.

Como estrategia de control se propone el uso de sustancias naturales como los AE y/o decocciones, aunque todavía se requieren numerosos estudios tales como la fitotoxicidad en plantas, semillas, etc. previo a la aplicación a campo de los mismos (Ballestra et. al, 2009).

3. Efecto de decocciones y AE de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* sobre la formación de factores de virulencia

✓ a. Biofilm

Efecto de decocciones: Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de decocciones de *T. vulgaris* y *O. vulgare* sobre la formación de biofilm producido por los diferentes aislamientos de *Pseudomonas* sp. La producción de biofilm frente a las distintas concentraciones de estos productos se cuantificó mediante la técnica de CV, midiendo DO a 570nm.

Para la decocción de *T. vulgaris*, las concentraciones de 50 mg/mL fueron capaces de disminuir considerablemente la producción del polisacárido en los aislamientos de *Pseudomonas* sp. A5 y C13 y en las cepas de referencia *P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5 y *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 mientras que las demás cepas no mostraron diferencias con el control. En la tabla 14 se exponen los resultados obtenidos. Se destaca la inhibición de biofilm producido por *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 por la decocción de tomillo a todas las concentraciones ensayadas.

Tabla 14: Efecto de decocción de *Thymus vulgaris* sobre la producción de biofilm de *Pseudomonas* sp.

PSEUDOMONAS	C+	Concentraciones (mg/mL.)							
		50	25	12.5	6.25	3.12	1.156	0.78	0.39
***Pseudomonas sp.* A5**	1.6^{ef}	0.24^{a}	1.02^{b}	1.4^{c}	1.4^{cd}	1.5^{de}	1.7^{f}	1.7^{f}	1.7^{f}
***Pseudomonas sp.* C13**	0.4^{cde}	0^{a}	0^{b}	0.3^{c}	0.4^{cd}	0.5^{def}	0.6^{fg}	0.7^{g}	0.6^{efg}
***Pseudomonas sp.* EM1**	0.11^{a}	0.26^{a}	1.15^{d}	0.94^{cd}	0.89^{bcd}	0.9^{bcd}	0.85^{bcd}	0.62^{b}	0.83^{bc}
***Pseudomonas sp.* LS3**	1.15^{a}	1.75^{b}	1.76^{b}	2.24^{c}	2.21^{c}	2.27^{c}	1.53^{ab}	1.17^{a}	1.19^{a}
***Pseudomonas sp.* Q**	0.11^{a}	0.15^{a}	0.14^{a}	0.77^{a}	0.78^{a}	0.15^{a}	0.16^{a}	0.14^{a}	0.14^{a}
***Pseudomonas sp.* VT2**	2.32^{a}	2.34^{a}	2.09^{b}	2.29^{a}	2.34^{a}	2.31^{a}	2.29^{a}	2.29^{a}	2.29^{a}
***P. s. pv atropurpurea* Ps5**	1.4^{e}	0.89^{a}	0.18^{ab}	0.49^{abc}	0.66^{bcd}	1.14^{de}	0.69^{bcd}	0.78^{cd}	0.99^{cde}
***P. s. pv syringae* Ps1**	0.54^{a}	0.96^{b}	0.52^{a}	0.58^{a}	0.36^{a}	0.4^{a}	0.44^{a}	0.38^{a}	0.54^{a}
***P. s. pv tomato* DC 3000**	1.4^{d}	0^{a}	0.18^{b}	0.69^{c}	0.86^{c}	0.74^{c}	0.67^{c}	0.74^{c}	0.86^{c}

Ref.: C(+): control de crecimiento, ($p \leq 0,05$)

La decocción de *O. vulgare* fue capaz de disminuir con diferencia significativa la producción del biofilm en *Pseudomonas* sp. A5 y *P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5 a una concentración de 50 mg/mL, mientras que la producción del polisacárido no se vio afectada o con variabilidad en los resultados en las demás cepas. También, se destaca la inhibición por esta decocción sobre *Pseudomonas* sp. A5 a todas las concentraciones ensayadas (50-0.39 mg/mL). En la tabla 15 se exponen los resultados obtenidos.

Se pudo observar que ambas decocciones tuvieron efecto inhibitorio sobre la formación de biofilm en algunas cepas ensayadas, cuando se compararon con los controles positivos de cada una.

Tabla 15: Efecto de la decocción de *Origanum vulgare* sobre la producción de biofilm de *Pseudomonas* sp.

PSEUDOMONAS	C (+)	Concentraciones (mg/mL)							
		50	25	12.5	6.25	3.12	1.156	0.78	0.39
Pseudomonas sp. A5	1.72^{d}	1.2^{e}	1.01^{bc}	0.74^{a}	0.71^{a}	0.83^{ab}	0.84^{ab}	0.92^{ab}	0.82^{ab}
Pseudomonas sp. C13	1.51^{ab}	2.02^{b}	1.5^{ab}	1.8^{b}	0.94^{b}	1.54^{b}	1.08^{a}	0.85^{a}	0.84^{a}
Pseudomonas sp. EM1	1.02^{a}	1.62^{b}	1.09^{a}	1.8^{b}	0.94^{a}	1.5^{a}	1.09^{b}	0.94^{a}	0.99^{a}
Pseudomonas sp. L83	1.19^{a}	2.16^{cd}	2.55^{de}	2.58^{e}	2.06^{bc}	2.09^{bc}	2.16^{cd}	1.73^{b}	2.27^{cde}
Pseudomonas sp. Q	1.78^{d}	1.7^{d}	0.7^{abc}	1.1^{c}	0.7^{abc}	0.8^{bc}	0.3^{ab}	0.31^{ab}	0.28^{a}
Pseudomonas sp. VT2	1.18^{abc}	1.6^{c}	1.4^{bc}	1.3^{abc}	1.2^{abc}	1.02^{abc}	0.83^{ab}	0.71^{a}	0.96^{abc}
P. s. pv atropurpurea Ps5	2.41^{d}	0.61^{a}	1.59^{bcd}	2.33^{d}	1.38^{bc}	1.24^{ab}	1.82^{bcd}	0.6^{a}	2.02^{cd}
P. s. pv syringae P61	1.3^{de}	1.06^{cd}	0.96^{bc}	0.74^{ab}	1.04^{cd}	0.54^{a}	0.48^{a}	0.58^{a}	1.51^{e}
P. s. pv tomato DC 3000	1.83^{bc}	1.77^{bc}	1.4^{abc}	1.23^{ab}	1.89^{c}	1.38^{abc}	1.12^{a}	1.13^{a}	1.31^{ab}

Ref.: C(+): control de crecimiento; ($p \leq 0,05$)

Se han evaluado productos naturales sobre factores de virulencia o toxinas de diferentes microorganismos con el fin de lograr la inhibición de estas moléculas. Adonizio et. al, (2008) realizaron investigaciones del efecto de extractos acuosos de seis plantas (*Conocarpus erectus*, *Chamaesyce hypericifolia*, *Callistemon viminalis*, *Bucida buceras*, *Tetrazygia bicolor* y *Quercus virginiana*) sobre los factores de virulencia de *P. aeruginosa* y el sistema QS, los cuales presentaron efectiva actividad inhibitoria.

Existen escasos reportes sobre la acción de decocciones vegetales sobre la producción de biofilm por lo que estos estudios incentivan la continuidad en la búsqueda de sustancias efectivas que disminuyan la producción de factores de virulencia y como consecuencia la enfermedad.

Efecto de AE: En este trabajo se evaluó el efecto de AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* sobre la formación de biofilm a dosis inhibitorias (CIM) y sub-inhibitorias (1/2 CIM) (Anexo II, Tabla 5)

La producción de biofilm frente a las distintas concentraciones de los AE se cuantificó mediante la técnica del CV, midiendo la DO a 570nm. Se pudo observar que ambos AE tuvieron efecto sobre la formación de biofilm cuando se compararon con los controles positivos de cada cepa. Para el AE de *T. vulgaris*, las concentraciones sub-inhibitorias (1/2 CIM) probadas fueron

capaces de disminuir considerablemente la producción del polisacárido, mientras que las concentraciones inhibitorias (CIM) mostraron total inhibición en todas las cepas analizadas. A dosis sub-inhibitorias se detectó reducción significativa en la producción de biofilm en *Pseudomonas* sp. EM1, LS3, Q, *P. syringae* pv. *syringae* P61y *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 a las 48 h. En la figura 25 se exponen los resultados obtenidos. El control del diluyente (DMSO:agua) no afectó la producción de biofilm ni la viabilidad celular. El análisis estadístico fue realizado por cepa (control, CIM y ½ CIM) (Figura 25).

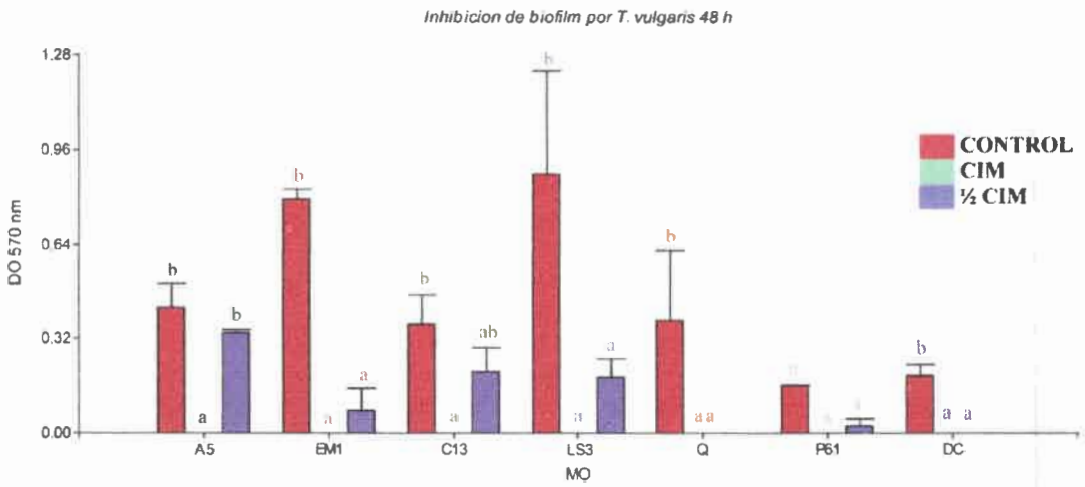


Figura 25: Efecto de CIM y ½ CIM de AE de *Thymus vulgaris* sobre la formación de biofilm en cepas fitopatógenas (48 h)

Cuando las cepas fueron expuestas a dosis inhibitorias del AE de *O. vulgare* se observó una total inhibición en la producción de biofilm en las cepas de *Pseudomonas* sp. A5, LS3 y *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. A dosis sub-inhibitorias se detectó reducción significativa en la producción de biofilm en los aislamientos de soja A5 y LS3 a las 48 h. (Figura 26).

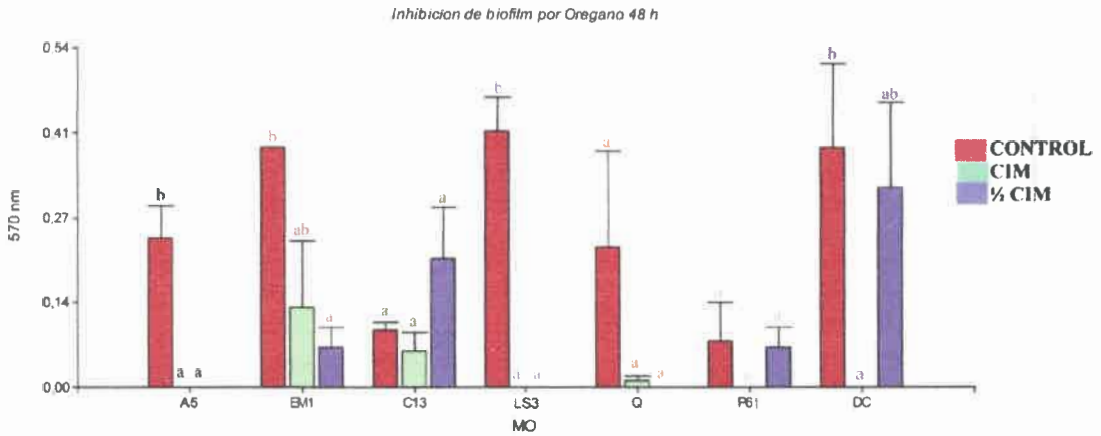


Figura 26: Efecto de CIM y ½ CIM de AE de *Origanum vulgare* sobre la formación de biofilm en cepas fitopatógenas (48 h)

Los datos expuestos en esta experiencia muestran que la inhibición de biofilm fue más efectiva con el aceite de *T. vulgaris* ya que en todas las cepas ensayadas no se observó producción del polisacárido, mientras que el AE de *O. vulgare* fue efectivo en solo 2 de los aislamientos. Además, se destaca que a concentraciones inhibitorias el AE de *T. vulgaris* afectó la producción de biofilm en mayor medida que a concentraciones sub-inhibitorias.

La inhibición de la producción de biofilm por ambos AE fue ensayada a las 24 h, (Giuliano, 2013), observándose resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo a las 48 h. Los mismos describen buen efecto inhibitorio a concentraciones de CIM y ½ CIM del AE de *T. vulgaris* para todas las cepas y de *O. vulgare*, inhibición en la producción de biofilm en las *Pseudomonas* sp. A5 y LS3 (Anexo II, figura 1 y 2).

Teniendo en cuenta estos resultados, se analizó la inhibición de la producción de biofilm en un rango de valores de AE más amplio (44,99 mg/mL. a 0,022 mg/mL.), con el propósito de obtener una concentración inhibitoria mínima de biofilm (CIB). Los resultados obtenidos mostraron que la formación de biofilm fue inhibida por los AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* en todas las cepas de *Pseudomonas* ensayadas; como es de esperar, la inhibición del exopolisacárido fue más eficaz a mayores concentraciones de ambos AE (Figura 27 y 28). Con todas las concentraciones ensayadas de AE de *T. vulgaris* se observó inhibición de la biopelícula por lo tanto no se pudo determinar la CIB. El AE de *O. vulgare* presentó actividad anti-biofilm más

variable, obteniendo los siguientes valores de CIB: *Pseudomonas* sp. C13: 0,71 mg/ml; LS3: 0,022 mg/ml; *P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5: 0,35 mg/ml; *P. syringae* pv. *tomato* DC3000: 0,35 mg/ml y *P. savastanoi* pv. *glycinea* BO76: 0,089 mg/ml. Las cepas de *Pseudomonas* sp. Q y *P. syringae* pv. *tabaci* 6605 fueron inhibidas a todas las concentraciones probadas, no se obtuvieron valores de CIB, por lo que se debería ampliar el rango de diluciones de AE a ensayar. En la figura 27 y 28 se observan los resultados.

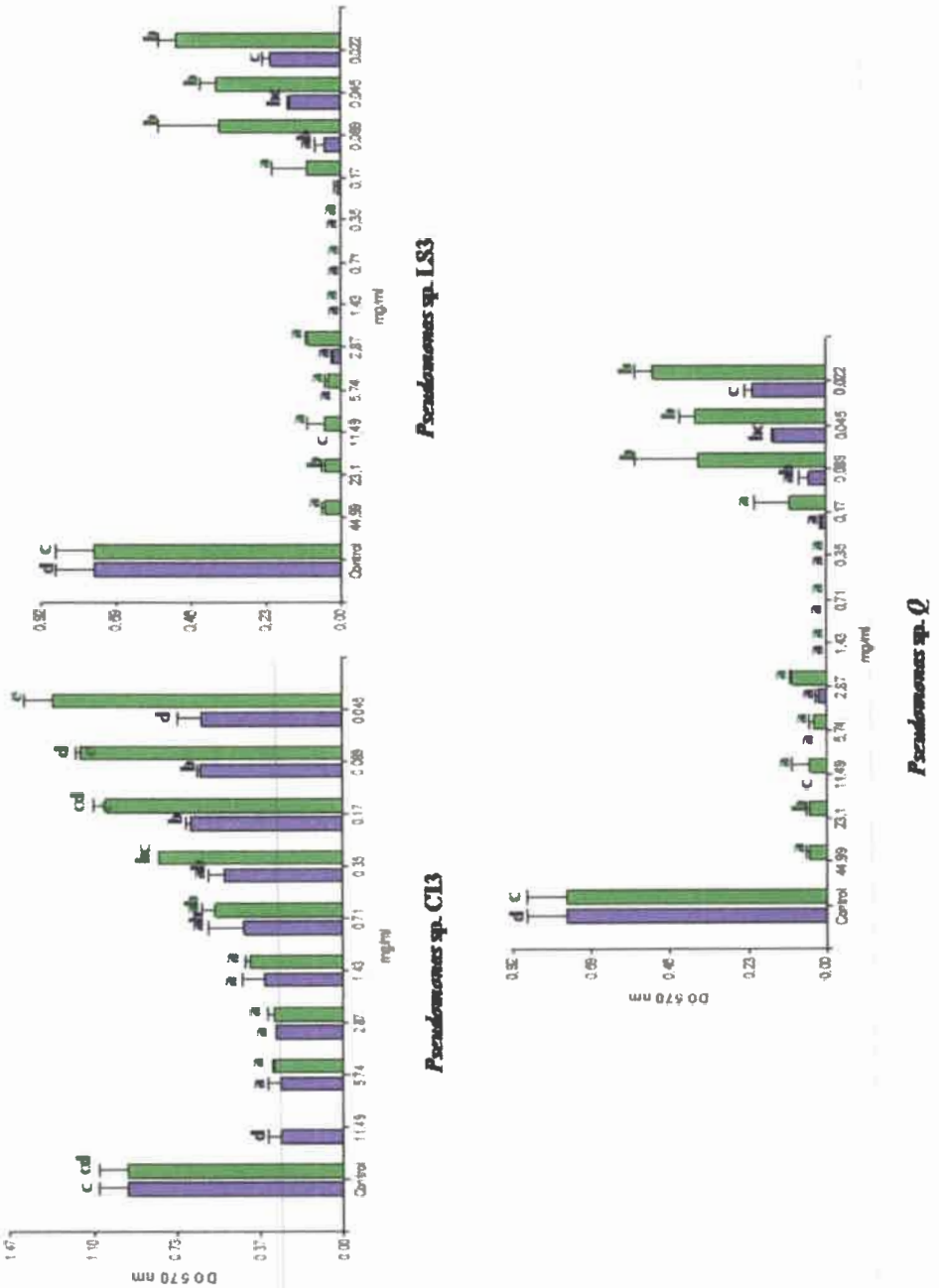


Figura 27: Efecto de AE de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* en la formación de biofilm de *Pseudomonas* sp. aisladas de soja. Ref.: **DO:** densidad óptica; **AET:** Aceite esencial de *T. vulgaris*; **AEO**: Aceite esencial de *O. vulgare*; ($p \leq 0.05$).

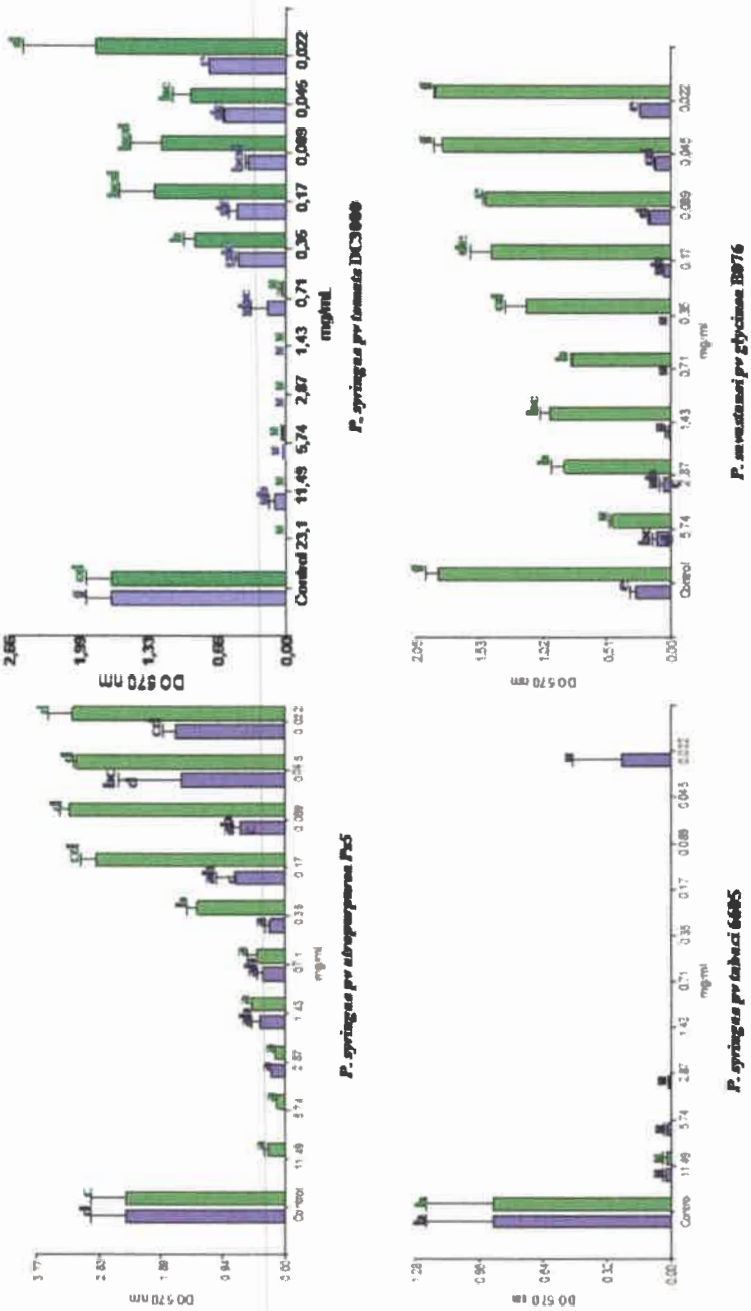


Figura 28: Efecto de los AE de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* en la formación de biofilm de *Pseudomonas* fitopatógenas. Ref.: **DO:** densidad óptica; AET: Aceite esencial de *T. vulgaris*; AEO: Aceite esencial de *O. vulgare;* ($p \leq 0.05$).

Schillaci et. al, (2013) demostraron que concentraciones sub-inhibitorias del AE de *O. vulgare* inhibieron la formación de biofilm de patógenos de alimentos tales como *S. aureus* y *P. aeruginosa*. En otro estudio, Kim et. al, (2015) estudiaron el efecto del AE de canela y sus componentes mayoritarios sobre biofilm y factores de virulencia de *P. aeruginosa*, demostrando que este aceite fue capaz de inhibir la formación de biofilm y reducir la producción de piocianina, swarming y la actividad hemolítica.

Busso Aberastain (2010) demostró que concentraciones inhibitorias y sub-inhibitorias del AE de *Aloysia triphylla* afectan la formación de biofilm disminuyendo su producción en cepas del género *Staphylococcus*.

Los terpenos también han demostrado actividad antibiofilm, sobre todo se han realizado muchos estudios en el campo de la industria alimentaria. De este modo se encuentran revisiones que describen la efectividad como sanitizante de carvacrol, el cual fue capaz de evitar la formación de biofilm sobre frutas, vegetales de hoja y otros alimentos por *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella entérica* (Friedman, 2014).

Carvalho and Fonseca (2007) observaron que terpenos (salvipisona, carveol y carvona) aislamientos del AE de *Salvia sclarea* fueron capaces de evitar la agregación celular y la formación de biopelículas en *S. aureus*, *S. epidermidis* y *Rhodococcus erythropolis* ya que provocaron un cambio en la composición de los ácidos grasos y en la hidrofobicidad de las membranas celulares, afectando además los sistemas de comunicación entre las bacterias.

El Abed et. al, (2011) demostraron que cuatro terpenos (eugenol, carveol, carvona y β-ionona), que forman parte de AE de varias especies vegetales, son capaces de inducir inhibición tanto en la adherencia celular como en la formación de las biopelículas en cepas de *P. aeruginosa*.

Los AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* demostraron la capacidad para inhibir la formación de biofilm en cepas de *Pseudomonas* fitopatógenas de soja, siendo el aceite de *T. vulgaris* el más efectivo contra la mayoría de las cepas analizadas. Actualmente, las investigaciones que tienen el propósito de controlar los procesos de patogénesis en las plantas se centran en interceptar las moléculas señales del QS y la producción de biofilm (Geske et. al, 2007). Se propone controlar los microorganismos fitopatógenos interfiriendo en los distintos mecanismos de producción de los factores de virulencia, por lo tanto deberían

aumentar las investigaciones destinadas a esclarecer estas vías y las moléculas o enzimas relacionadas. Las plantas medicinales están siendo estudiadas en este sentido, ya que son fuente de gran cantidad de principios activos con actividad biológica comprobada.

✓ b.Fitotoxinas

Los ensayos de inhibición de fitotoxinas por productos naturales se realizaron utilizando la visualización fenotípica del efecto. Se evaluó la actividad de decocciones y AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare,* sobre la toxina ya formada y sobre su producción, a un amplio rango de concentraciones (inhibitorias, sub-inhibitorias y sub-bactericidas). En el caso de los AE se evaluó la inhibición en aquellas cepas que fueron fenotípica y genotípicamente positivas en la producción de fitotoxinas. Cuando las concentraciones requeridas fueron sub-bactericidas se probaron todas las cepas fenotípicamente positivas. La organización de los ensayos fue realizado de este modo con el fin de utilizar la misma partida de AE para todas las experiencias, debido a que se conoce que la composición terpénica de los mismos varía en cantidad y calidad, según la época de cosecha, método de extracción, clima, composición del suelo, el quimiotipo, etc. (Lisbalchin and Roth, 1997; Svoboda and Hampson, 1999; Zygadlo and Juliani, 2000). De este modo se optimizó el uso de estas muestras oleosas para estas experiencias evitando posibles variaciones en la actividad antimicrobiana ocasionadas por partidas de AE diferentes.

No se detectó efecto inhibitorio directo sobre la actividad de las toxinas coronatina, siringomicina y tabtoxina (Figura 30). Por lo tanto, los resultados que se exponen a continuación se refieran a los ensayos realizados para evaluar el efecto de los productos naturales sobre la producción de estas toxinas.

-Inhibición de coronatina

Decocciones: Se evaluó el efecto de las decocciones de ambos vegetales a concentraciones inhibitorias y sub-inhibitorias sobre la producción de coronatina en cepas *Pseudomonas* sp. EM1, LS3, Q, VT2, *P. syringae* pv. *syringae* P61, *P. syringae* pv. *tomato*

DC3000 y *P. savastanoi* pv. *glycinea* B076. No se observó efecto de las decocciones sobre la producción de esta toxina.

Aceites esenciales: El ensayo de inhibición de coronatina se realizó en los aislamientos *Pseudomonas* sp. LS3 y Q, y en *P. syringae* pv. *tomate* DC 3000 y *P. savastanoi* pv. *glycinea* BO76. Se demostró la inhibición de esta toxina por ambos AE ya que no se observó hipertrofia en el tejido vegetal de la papa. La producción en *Pseudomonas* sp. Q fue inhibida hasta concentraciones de 0,71 mg/mL con *T. vulgaris* y 0,09 mg/mL con *O. vulgare*, mientras que en *Pseudomonas* sp. LS3 el aceite de *O. vulgare* fue efectivo hasta una concentración de 0,045 mg/mL. La producción de coronatina no fue afectada por los AE en las cepas de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 y *P. savastanoi* pv. *glycinea* B076.

La coronatina es una toxina que imita al metil jasmonato el cual es una hormona producida por las plantas. La capacidad virulenta de esta toxina está dada al activar la vía del jasmonato e interferir en la elongación de raíces, causar hipertrofia, clorosis, liberación temprana de etileno, entre otras (Bereswill et. al, 1994, Onrubia et. al, 2013). Los resultados obtenidos permiten inferir que la presencia de los AE podrían estar interviniendo en la vía de producción de coronatina, evitando que la misma ejerza su efecto virulento en el tejido vegetal. Por lo tanto, los AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* podrían ser utilizados en el control de los síntomas producidos por esta toxina en enfermedades de cultivos de interés agroalimentario.

-Inhibición de siringomicina

Decocciones: Se evaluó el efecto de las decocciones de *T. vulgaris* y *O. vulgare* a concentraciones inhibitorias y sub-inhibitorias sobre la producción de siringomicina en: *Pseudomonas* sp. C13, EM1, LS3, Q, VT2, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, *P. syringae* pv. *tabaci* 6605, *P. syringae* pv. *syringae* B728, *P. savastanoi* pv. *glycinea* B076. En este ensayo no se observó efecto inhibitorio de ambas decocciones sobre la producción de la toxina.

Aceites esenciales: Se evaluó el efecto de los AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* sobre la producción de siringomicina; los mismos mostraron inhibición de la producción a

concentraciones sub-bactericidas. El AE de *T. vulgaris* fue eficaz en 87,5% de las cepas en un rango de concentración de 11,49 mg/mL a 0,006 mg/mL. Mientras que el aceite de *O. vulgare* inhibió esta fitotoxina en el total de las cepas ensayadas (100%) a concentraciones de 0,11 mg/mL a 0,003 mg/mL (Figuras 29 y 30) (Anexo II).

La siringomicina químicamente está constituida por lipodepsinonapeptidos; ejercen su acción patógena sobre las células vegetales formando poros que permiten la entrada y salida de iones, produciendo un desbalance de iones que llevan a la muerte celular (Bender et. al, 1999). La búsqueda de productos capaces de actuar sobre la formación de esta toxina permitiría disminuir la virulencia de estos microorganismos y, por lo tanto, la severidad de estas infecciones.

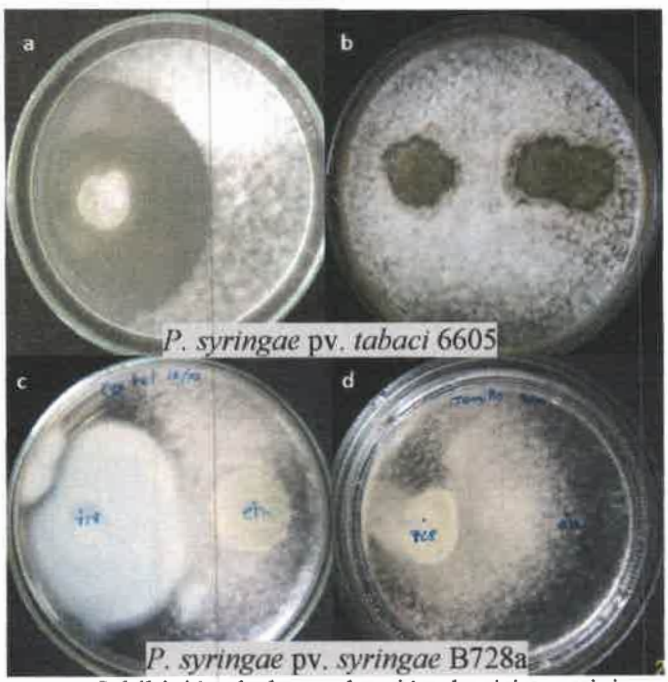


Figura 29: Inhibición de la producción de siringomicina por AE de *Thymus vulgaris*. **Ref.: (a, c):** Producción de la toxina; **(b, d):** Inhibición de la producción de siringomicina.

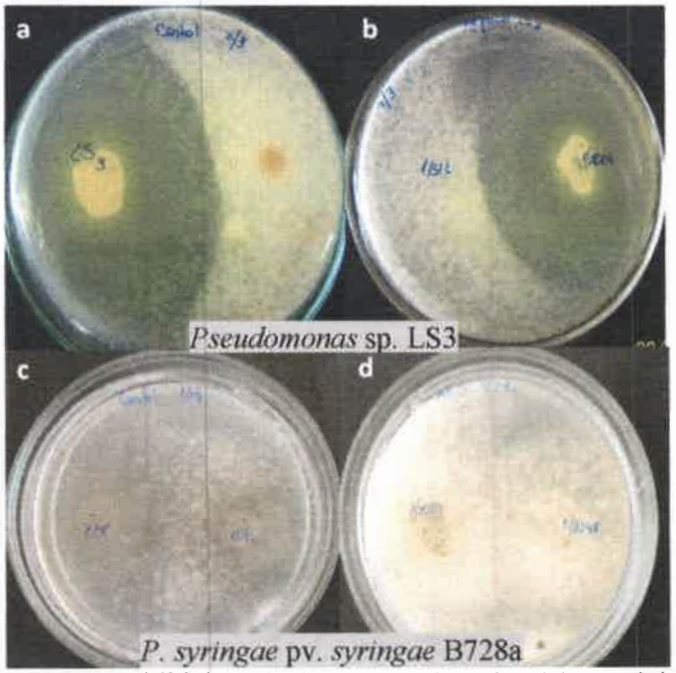


Figura 30: Inhibición de la producción de siringomicina por AE de *O. vulgare*. **Ref.: (a, c):** Producción de la toxina **(b, d):** Inhibición de la producción de siringomicina.

-Inhibición de tabtoxina

Decocciones: Los ensayos se realizaron en cepas productoras de tabtoxina: *Pseudomonas* sp. A5, C13, EM1, LS3, Q, VT2, *P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5, *P. syringae* pv. *syringae* P61 y *P. syringae* pv. *tabaci* 6605. En los resultados se observó que las concentraciones inhibitorias y sub-inhibitorias de las decocciones de *T. vulgaris* y *O. vulgare* no inhibieron la producción de la toxina en las cepas ensayadas.

Aceites esenciales: Los ensayos fueron realizados con ambos aceites sobre *P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5, observando inhibición del AE de *T. vulgaris* sobre la producción de la toxina hasta una concentración de 2.85 mg/mL.

En los resultados se detectó el crecimiento de *E. coli* indicando que esta cepa fue incapaz de producir la tabtoxina en presencia de concentraciones sub-inhibitorias de AE de *T. vulgaris*. En el control positivo (sin AE) se observó el halo de inhibición del crecimiento de *E. coli* provocado por tabtoxina (Figura 31).

El AE de *O. vulgare* inhibió la producción de la toxina a concentraciones sub-bactericidas (0.006 mg/mL). Claramente se detectó la ausencia de inhibición de crecimiento de *E. coli* indicando que *P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5 fue incapaz de producir la tabtoxina en presencia de concentraciones sub-bactericidas del AE (25-0.006 mg/mL.). En la figura 32 se observan los resultados obtenidos.

La tabtoxina es un betalactámico producido por *P. syringae* pv. *tabaci*, pv. *coronafaciens* y pv. *atropurpurea* causante de clorosis en las plantas, debido a que inhibe la enzima glutamina síntetasa en los vegetales (Bender et. al, 1999). La inhibición de la producción de estos factores contribuiría al control de bacteriosis causadas por estos microorganismos.

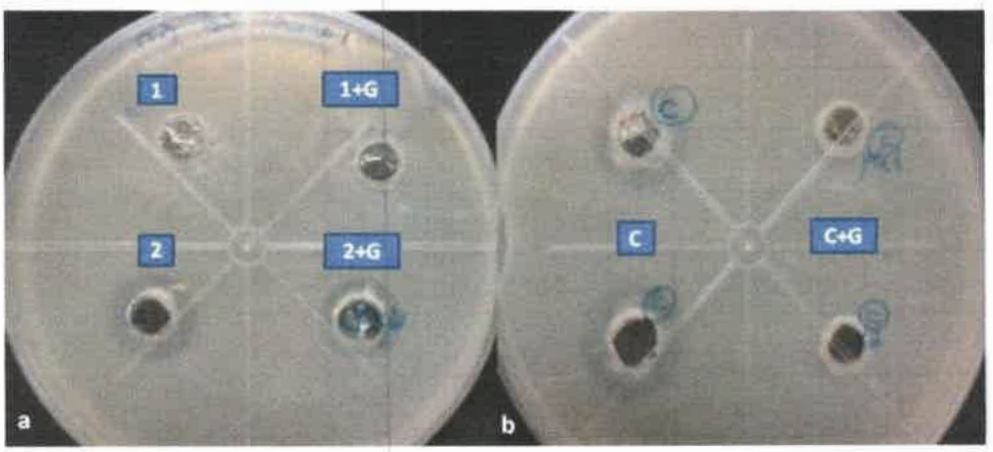


Figura 31: Inhibición de tabtoxina en *P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5 por AE de *T. vulgaris*. **Ref.: a)** Tratamiento 1 (producción de toxina). Tratamiento 2 (toxina preformada); 1+G: tratamiento 1 más glutamina; 2+G: tratamiento 2 más glutamina; **b)** Producción de la tabtoxina. C: control; C+G: control más glutamina.

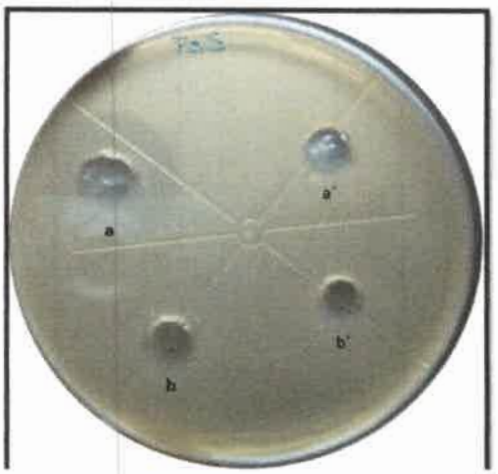


Figura 32: Inhibición de tabtoxina en *P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5 por AE de *O. vulgare*. **Ref.: (a)** Producción; **(b)** Inhibición; **(a', b'):** control.

Actualmente, las investigaciones para controlar los procesos de patogénesis en las plantas se centran en conocer las vías y mecanismos de QS por los cuales se sintetizan estos factores de virulencia de modo de interceptar las moléculas señales de este sistema de comunicación (Geske et. al, 2007; Tarkowski and Vereeke, 2014). Las plantas medicinales están siendo estudiadas con este objetivo, ya que son fuente de gran cantidad de moléculas con actividad biológica comprobada. Se han evaluado los efectos de productos naturales sobre factores de virulencia o su producción como las toxinas, biofilm, swarming y swimmining de diferentes microorganismos con el fin de lograr la inhibición de estos mecanismos (Cady et. al, 2012; El Abed et. al, 2011; Kalia, 2013; Khan et. al, 2009). Estas investigaciones se centran principalmente en el campo de la medicina y de la conservación de alimentos. Sin embargo, todavía no hay demasiados registros relacionados al efecto de productos naturales sobre los factores de virulencia, especialmente de bacterias fitopatógenas. Las *Pseudomonas* fitopatógenas producen una gran variedad de factores de virulencia en el proceso de interacción con el hospedante, encontrándose entre los más importantes las fitotoxinas (Hwang et. al, 2005). La búsqueda de sustancias naturales capaces de evitar o disminuir la formación de esta fitotoxinas contribuiría a disminuir las bacteriosis de cultivos de gran importancia económica de nuestro país.

Se utilizaron diferentes AE para evaluar la actividad anti-QS sobre *P. aeruginosa*, utilizando la bacteria biosensora de acil homoserin lactona (AHL), *Chromobacterium*

violaceum, demostrando una reducción en la producción del pigmento de este biosensor y en la motilidad de *P. aeruginosa* (Khan et. al, 2008).

Cady et. al, (2012) evaluaron los efectos de sulfóxidos de cisteína y sus derivados disulfuros, moléculas extraídas de *Allium cepa*, sobre la formación del biofilm producido por *P. aeruginosa* PAO1, demostrando una reducción significativa de la misma. Además, se observó inhibición de genes reporteros de QS por estos compuestos alterando diferentes vías del microorganismo.

Khalia et. al, (2013) proponen a extractos de plantas como inhibidores de QS (QSI) debido a la similitud en su estructura química con los de las moléculas señales (AHL) y también debido a su capacidad para degradar los receptores de señal (LuxR/LasR).

La curcumina, constituyente principal de las raíces/rizomas de cúrcuma (*Curcuma longa* L.), redujo la patogenicidad de *P. aeruginosa* a concentraciones sub-inhibitorias provocando una disminución en la regulación de los factores de virulencia, tales como la formación de biofilm, biosíntesis de piocianina, actividad elastasa/proteasa, y producción de AHL, molécula señal de QS (Rudrappa and Bais, 2008).

En investigaciones realizadas por Song et. al, (2006) con extractos metanólicos obtenidos de la raíz de *Polygonum cuspidatum*, planta utilizada en la medicina popular de Corea para mejorar la higiene oral, encontraron una efectiva actividad inhibitoria del extracto sobre la viabilidad bacteriana y los factores de virulencia de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*.

Derakhshan et. al, (2008) realizaron estudios del efecto de AE y extractos alcohólicos de semillas de *Cuminum cyminum* L. (comino) sobre la morfología, la expresión de la cápsula y la actividad ureasa de *K. pneumoniae* ATCC 13883, microorganismo Gram negativo, observando inhibición de estos factores cuando utilizaron concentraciones sub-inhibitorias de estos productos.

Los resultados de actividad antimicrobiana obtenidos en este trabajo son promisorios, demostrando la capacidad potencial de los AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* de inhibir la formación de biofilm y de fitotoxinas producidas por la especie fitopatógena *P. syringae*. Los estudios sobre el conocimiento de los factores de virulencia de especies fitopatógenas están en auge debido a la gran necesidad de controlar las mismas y evitar las cuantiosas pérdidas que ocasionan en los cultivos. En la presente investigación se detectan factores de virulencia

presentes en *Pseudomonas* fitopatógenas de soja y como controlar los mismos utilizando una alternativa natural. Estos resultados contribuyen y alientan a continuar las investigaciones referidas a los mecanismos por los cuales se producen estos factores en las células y como disminuir o evitar su producción utilizando los AE de estas especies aromáticas.

De los productos naturales de *T. vulgaris* y *O. vulgare* ensayados: decocciones, aceites esenciales y extractos, se observaron distintos resultados de actividad antimicrobiana.

Las decocciones presentaron actividad antimicrobiana sobre los aislamientos de *Pseudomonas* fitopatógenas y, por su facilidad en la obtención, su bajo costo y la solubilidad en agua podrían ser utilizadas a campo, para el control de bacteriosis vegetales. En un futuro, deben realizarse estudios in vivo que permitan determinar las dosis a aplicar y el estado fenológico del vegetal más apropiado para tal fin.

Los AE resultaron los más activos, siendo capaces de inhibir a las cepas de *Pseudomonas* sp. aisladas de soja y a las *Pseudomonas* de referencia (Tabla 7, Anexo 1). Es de destacar que los AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* fueron capaces de disminuir la producción de biofilm y de inhibir la producción de fitotoxinas tales como coronatina, siringomicina y tabtoxina.

Una aplicación de estos compuestos oleosos para el control de estas bacteriosis seria utilizarlo sobre semillas infectadas, las cuales son propagadoras de la enfermedad. Se ha probado la citotoxicidad de estos AE en semillas de soja obteniendo la dosis inocua adecuada, la cual no afectó la germinación de la misma y los parámetros de crecimiento del vegetal, encontrándose dentro de las concentraciones bactericidas de los AE (Sotelo, 2015).

III-BIOACTIVIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE *THYMUS VULGARIS* SOBRE PLANTAS DE SOJA INOCULADAS CON *PSEUDOMONAS* SP.

Los ensayos *in vivo* se realizaron en plantas de soja con el fin de evaluar si la actividad antimicrobiana de los AE obtenida *in vitro*, era efectiva en la planta sin afectar su normal crecimiento. En estas experiencias se utilizó el AE de *T. vulgaris* debido a que presentó muy buen efecto inhibitorio sobre la mayoría delas cepas de *Pseudomonas* probadas y sus factores de virulencia, además de menor variabilidad en las concentraciones inhibitorias. El AE utilizado fue el mismo para todos los ensayos descriptos anteriormente (mismo quimiotipo, lugar y fecha de cosecha, composición terpénica, etc).

Para estos estudios se seleccionó el aislado de soja *Pseudomonas* sp. Q, debido a que es productor de biofilm, coronatina, siringomicina y tabtoxina, los cuales fueron inhibidos por el AE de *T. vulgaris*. Los demás aislamientos no produjeron algunos de los factores de virulencia o estos factores no fueron inhibidos en todos los casos por el AE.

Se utilizó como control la cepa de referencia *P. savastanoi* pv. *glycinea* B076, patógena de soja

1-Efecto del aceite esencial de *T. vulgaris* sobre plantas de soja

Se probó el efecto de diferentes concentraciones de este AE en plantas de soja, a fin de evaluar la toxicidad del mismo. Es necesario establecer la concentración inocua de los productos fitoterápicos en la cual no se observen daños en el tejido vegetal del hospedante para poder ser utilizada en los ensayos posteriores de infección. Al aplicar el AE se midieron, a los 30 días pos-siembra, diferentes parámetros de crecimiento: longitud de la planta, longitud de la raíz, peso fresco y seco de parte aérea y raíces. El rango de concentraciones utilizado para evaluar el efecto del AE de *T. vulgaris* fue de 14,37 mg/mL a 0,89 mg/mL, dentro del cual se encuentra incluido el valor de CIM para *Pseudomonas* sp. Q (11,5 mg/mL) y *P. savastanoi* pv. *glycinea* B076 (5,8 mg/mL). Como control negativo se utilizó el diluyente del AE, DMSO, a una dilución no fitotóxica ni antimicrobiana (1/32) (Sotelo, 2015).

En los resultados se observó que los siguientes parámetros no fueron afectados en las plantas de soja a partir de: 3,59 mg/mL para la longitud de la raíz; 1,79 mg/mL para peso fresco y seco de la parte aérea. La longitud de la planta, peso fresco y peso seco de la raíz no fueron afectados a ninguna de las concentraciones probadas (Tabla 16). Por lo tanto la concentración inocua del AE de *T. vulgaris* fue de 1,79 mg/mL; en la cual no se observaron manchas en las hojas causadas por el aceite en comparación a dosis más elevadas (Figura 33). A partir de esta concentración no fitotóxica (1,79 mg/mL), se realizaron diluciones del AE para poder evaluar la capacidad antimicrobiana del mismo en los tratamientos de las plantas infectadas con las *Pseudomonas* fitopatógenas.

Tabla 16: Efecto del aceite esencial de *Thymus vulgaris* sobre plantas de soja

Parámetro / Concentración	Longitud de la planta(cm)	Longitud de la raiz(cm)	Peso fresco de PA(g)	Peso seco de PA(g)	Peso fresco de raiz(g)	Peso seco de raiz(g)
AGUA (C-)	52 ^{b}	19,33 ^{ab}	1,57 ^{bc}	0,24 ^{b}	0,29 ^{a}	0,20 ^{a}
DMSO 1/32(C-)	40 ^{a}	23 ^{ab}	1,68 ^{c}	0,29 ^{c}	0,23 ^{a}	0,19 ^{a}
AE(mg/mL)						
0,89	39 ^{a}	19,67 ^{ab}	1,61 ^{c}	0,25 ^{bc}	0,23 ^{a}	0,20 ^{a}
1,79	38,67 ^{a}	17,33 ^{a}	1,55 ^{bc}	0,25 ^{bc}	0,24 ^{a}	0,20 ^{a}
3,59	39 ^{a}	25,33 ^{b}	1,36 ^{ab}	0,21 ^{ab}	0,19 ^{a}	0,09 ^{a}
7,18	35 ^{a}	15,67 ^{a}	1,27 ^{a}	0,20 ^{ab}	0,22 ^{a}	0,16 ^{a}
14,37	38,33 ^{a}	18 ^{ab}	1,22 ^{a}	0,19 ^{a}	0,26 ^{a}	0,16 ^{a}

Ref.: PA: Parte Aérea; Test de Duncan: a, b, c, ab, bc; diferencia significativa: $p<0,05$

Figura 33: Efecto del AE de *Thymus vulgaris* sobre plantas de soja.

Ref.: a) Planta de soja expuesta a 1,79 mg/mL del AE; **b)** Planta de soja expuesta a 3,59 mg/mL del AE

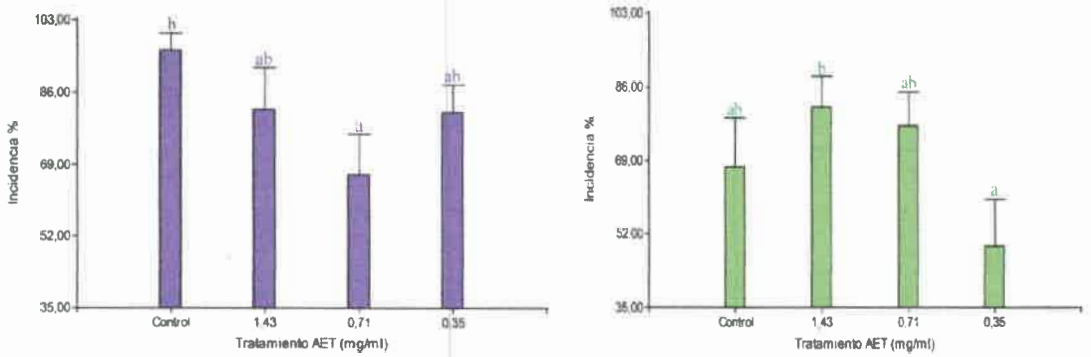
2- Evaluación de la actividad antimicrobiana del AE de *Thymus vulgaris* sobre plantas de soja inoculadas con *Pseudomonas* fitopatógenas

En este ensayo se inocularon plantas de soja con el aislamiento *Pseudomonas* sp. Q y como control positivo, la cepa *P. savastanoi* pv. *glycinea* B076. Se aplicó una sola dosis de AE de *T. vulgaris* a distintas concentraciones sub-bactericidas e inocuas, 48h después de realizada la inoculación con estos microorganismos.

A partir de los 7 días se comenzaron a observar las manchas típicas de bacteriosis en todas las plantas de soja inoculadas. En las plantas que habían sido sometidas a las distintas concentraciones de AE se detectaron visualmente menor cantidad de manchas en hojas que en aquellas plantas control. Al final del ensayo (21 días) se calcularon los parámetros epidemiológicos de incidencia y severidad sobre el total de plantas ensayadas. En la figura 36 está representada la incidencia de la enfermedad en las plantas de soja producida por *Pseudomonas* sp. Q y por *P. savastanoi* pv. *glycinea* B076. Se observó una mayor incidencia de la enfermedad en las plantas control, infectadas con *Pseudomonas* sp. Q (95,83%), con respecto a aquellas infectadas con *P. savastanoi* pv. *glycinea* B076 (67,36%) (Figura 33).

En los tratamientos con el AE de *T. vulgaris*, los parámetros de incidencia y severidad arrojaron resultados variables. La menor incidencia registrada se observó con *Pseudomonas* sp. Q a la concentración de 0.71 mg/mL del AE; en el caso de *P. savastanoi* pv. *glycinea*

B076 no se detectó diferencia significativa con el control a ninguna de las concentraciones ensayadas (Figura 34).

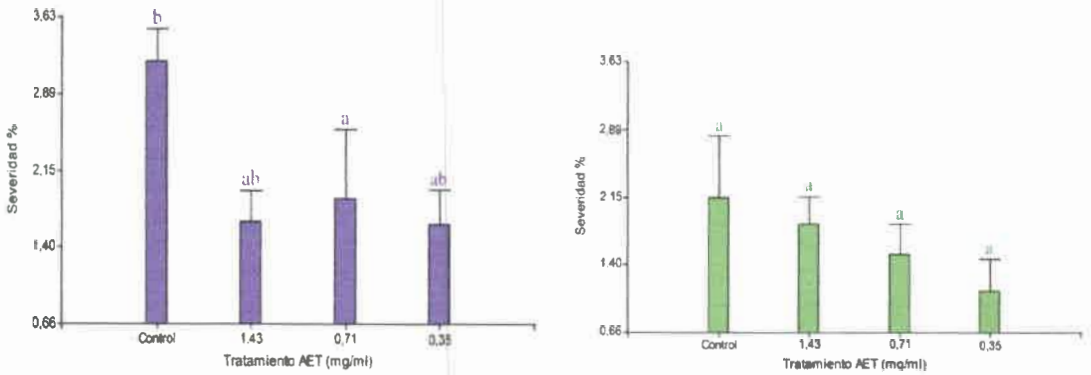


***Pseudomonas* sp. Q** **P. *savastanoi* pv. *glycinea* B076**

Figura 34: Incidencia (%) de *Pseudomonas* tratada con aceite esencial de *T. vulgaris*.
Letras diferentes son significativamente diferentes de acuerdo al test de Duncan ($p<0,05$)

En la figura 35 se observan los datos obtenidos de severidad de la enfermedad, demostrando mayores valores con la cepa aislada de soja *Pseudomonas* sp. Q (3,21%), con respecto a la de referencia *P. savastanoi* pv. *glycinea* B076 (2,14%).

En las plantas inoculadas con *Pseudomonas* sp. Q, se observó disminución significativa de la severidad al ser tratadas con el AE de *T. vulgaris* a una concentración de 0,71 mg/mL. Para el caso de *P. savastanoi* pv. *glycinea* B076 no se observaron diferencias significativas de los tratamientos con el control (Figura 35).



***Pseudomonas* sp. Q** ***P. savastanoi* pv. *glycinea* B076**

Figura 35: Severidad (%) de *Pseudomonas* tratada con aceite esencial de *T. vulgaris*.
Letras diferentes son significativamente diferentes de acuerdo al test de Duncan ($p<0,05$)

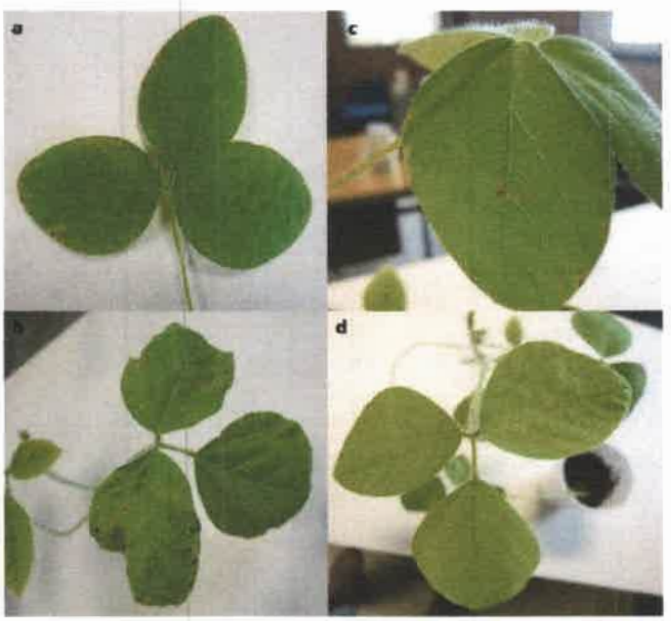


Figura 36: Tratamiento con AE de *T. vulgaris* de plantas de soja.
Ref.: **(a y c)** *Pseudomonas* sp. Q y con *P. savastanoi* pv. *glycinea* B076 **(b y d)** tratadas con AE de T. vulgaris; **(c)** 0,35 mg/mL. **(d)** 0,17 mg/mL. Letras diferentes son significativamente diferentes de acuerdo al test de Duncan ($p<0,05$)

Según los resultados informados en este trabajo se observa disminución de la incidencia y la severidad de la bacteriosis en plantas inoculadas con el aislado de soja a una

de las concentraciones del AE de *T. vulgaris* ensayadas. Sin embargo, durante la realización de las experiencias se detectó visualmente disminución en las manchas características de bacteriosis en las plantas tratadas con las dosis ensayadas (Figura 36). Por lo tanto, se deberían optimizar los ensayos aumentando el número de plantas a evaluar, ampliando el rango de concentraciones no fitotóxicas del AE a utilizar, aumentando el número de cepas patógenas y el número de repeticiones de todas las experiencias. Dentro de las dificultades en las experiencias *in vivo* se encontró la baja capacidad de disolución de los AE en medios acuosos. Estos compuestos oleosos de alta densidad, son dificilmente miscibles en agua por lo cual se debe utilizar una sustancia adecuada para emulsionarlos en este medio. Dentro de estas se reconocen a DMSO, polietilenglicol, Tween 80, hexano, etanol, etc. entre otros, aunque ninguno logra la completa disolución, provocando variabilidad de los resultados y dificultad de visualización de los mismos cuando se utilizan AE. Otro inconveniente ocurrido durante el último año de esta tesis doctoral, fue la imposibilidad de realizar suficientes repeticiones de los ensayos al ser la soja un cultivo de verano y no contar con un invernadero adecuado.

Existen pocos estudios realizados a campo de tratamientos con productos naturales oleosos sobre enfermedades bacterianas en plantas. Ji et. al, (2005) evaluaron timol para controlar el marchitamiento bacteriano del tomate *in vivo*, obteniendo muy buenos resultados. En otras investigaciones fueron probados AE de palmarosa (*Cymbopogon martini*), hierba de limón (*C. citratus*), y eucalipto (*Eucalyptus globulus*) por sus efectos sobre *Ralstonia solanacearum* Race 4 y su potencial uso como biofumigante para la reducción de la marchitez bacteriana de jengibre comestible (*Zingiber officinale*), resultando efectiva su actividad (Paret et. al, 2010).

La producción agrícola en nuestro país ha crecido en los últimos años, en gran medida debido al uso generalizado de fertilizantes sintéticos, pesticidas, riego, etc. Esta tasa de producción no es sostenible a causa de los impactos ambientales de las prácticas modernas de agricultura. Además, existe gran incidencia de enfermedades causadas por microorganismos, tales como hongos, bacterias, virus, etc. que provocan grandes pérdidas económicas. El control de las mismas presenta grandes dificultades para la agricultura sustentable de nuestro país, por la aplicación excesiva e incorrecta de agroquímicos. Es por ello que la identificación y el desarrollo de nuevas alternativas para el control de

enfermedades de cultivos amigables con el medio ambiente resultan altamente necesarias. En los últimos años el estudio de plantas medicinales para el tratamiento de estas infecciones ha ido aumentando, debido a que poseen principios activos con potencial actividad biológica y que no generan resistencia bacteriana. Estos principios pueden estar presentes en distintas partes de las plantas y son extraídos con metodologías adecuadas según la naturaleza química de las moléculas. Estos fitoquímicos pueden ser fenoles, quinonas, flavonas, flavonoides, cumarinas, taninos, lectinas, alcaloides, polipéptidos y terpenos.

Los AE y los terpenos son utilizados por su capacidad antimicrobiana para la conservación de alimentos, además de otorgarle sabor a los mismos. La FDA (Food and Drug Administration) los considera como sustancias **Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS)**, lo que implica que pueden ser utilizados como aditivos alimentarios sin necesidad de realizarle controles exhaustivos debido a que su seguridad de uso ha sido científicamente comprobada (Lambert et. al, 2001). Esta clasificación como "producto inocuo o verde" permitió su rápida incorporación como saborizantes, cosméticos, insecticidas, repelentes, antiparasitarios, pesticidas, etc., logrando mayor aceptación por los consumidores. Esto contribuye a aumentar la formulación de nuevos pesticidas basados en AE o sus derivados terpénicos con el fin de ser aplicados en la producción orgánica de alimentos (Isman, 2004).

Una correcta utilización de productos antimicrobianos de origen natural aplicados como pesticidas sobre cultivos y/o sobre semillas infectadas con bacterias fitopatógenas evitaría la dispersión de la enfermedad y además contribuiría con la no eliminación al medio ambiente de productos contaminantes no deseados, evitando la acumulación de residuos tóxicos y la rápida generación de resistencia bacteriana.

En este trabajo de investigación se propusieron dentro de los objetivos el aislamiento e identificación de microorganismos causantes de bacteriosis en cultivos de interés agrícola de nuestro país. Se escogió como sistema vegetal de estudio a *Glycine max*, soja, por la disponibilidad de lotes en distintas regiones del país, principalmente la zona centro que es la mayor productora de estos granos y porque es una leguminosa de fácil reproducción y cultivo.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la presencia de *Pseudomonas* sp. fitopatógenas en cultivos de soja en la zona centro agrícola del país y la producción de

factores de virulencia tales como biofilm y fitotoxinas (coronatina, siringomicina y tabtoxina) de los aislamientos en estudio. También se obtuvieron diferentes productos naturales, extractos, decocciones y AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* utilizando distintas metodologías. Estas plantas aromáticas poseen reconocida actividad antimicrobiana sobre distintos microorganismos, especialmente sobre bacterias Gram negativas. Se evaluó la actividad antimicrobiana de los productos naturales obtenidos de ambos vegetales sobre *Pseudomonas* sp. aisladas de soja y sobre la producción de sus factores de virulencia. Los resultados demostraron capacidad inhibitoria efectiva de las decocciones y los AE sobre estos microorganismos, destacando el efecto de los AE. Resultados similares se obtuvieron al evaluar las decocciones y los AE sobre la producción de fitotoxinas y biofilm características de estas bacterias (coronatina, siringomicina y tabtoxina). Hoy en día, la búsqueda de alternativas para controlar bacterias fitopatogenas se orienta hacia la obtención de sustancias naturales capaces de frenar el crecimiento microbiano o de intervenir en las vías de producción de sus factores de virulencia.

Los ensayos a escala de laboratorio para evaluar la actividad antimicrobiana *in vivo* fueron realizados utilizando el AE de *T. vulgaris* y el aislamiento de soja *Pseudomonas* sp. Q. Los resultados obtenidos indicaron que estos compuestos, a concentraciones no fitotóxicas, podrían ser efectivos para inhibir *Pseudomonas* fitopatógenas sobre la planta enferma. Para ser utilizados en un futuro sobre cultivos con bacteriosis se deberían realizar estudios sobre la adecuada utilización de estos AE, teniendo en cuenta la dosificación, el modo de aplicación, estado fenológico del vegetal, entre otros. Se deberían realizar también ensayos sobre la influencia de estos AE en el ecosistema de la soja asegurando la inocuidad del producto sin alterar las poblaciones circundantes.

CONCLUSIONES

I. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS BACTERIANAS

- Se lograron aislar bacterias fitopatógenas que presentaron características bioquímicas y moleculares coincidentes con el género *Pseudomonas;* por análisis de ARN16S se agruparon con *Pseudomonas syringae.* Se demuestra la complementariedad de las técnicas bioquímicas y moleculares para la identificación de los aislamientos.

- Los seis aislamientos identificados como *Pseudomonas* sp. (A5, C13, EM1, LS3, Q y VT2) fueron capaces de reproducir los síntomas característicos de tizón bacteriano en plantas de soja.

- En las zonas rurales del sur de Santa Fe (Venado Tuerto) y sur de Córdoba (Alcira Gigena, Los Cisnes y Alejandro Roca) se demuestran la presencia de *Pseudomonas* que ocasionan el tizón bacteriano.

- Las cepas de *Pseudomonas* sp. aisladas fueron capaces de producir biofilm en grado variable y las fitotoxinas coronatina, siringomicina y tabtoxina. La producción fenotípica de las fitotoxinas no siempre se correspondió con la genotípica.

- La producción de fitotoxinas contribuyó a la caracterización de los aislamientos microbianos obtenidos de cultivos de soja. De acuerdo a los resultados fenotípicos y genotípicos observados y a la reproducción de la enfermedad en soja, se podría inferir que los aislamientos obtenidos en este trabajo podrían ser incluidos en el complejo *P. syringae.*

II. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PRODUCTOS NATURALES DE *THYMUS VULGARIS* Y *ORIGANUM VULGARE*

- Se demuestra la efectiva actividad antibacteriana que poseen los AE y decocciones y, en menor grado los extractos, de *T. vulgaris* y *O. vulgare* sobre cepas de *Pseudomonas* fitopatógenas aisladas de soja.
- Las decocciones y AE de ambos vegetales demostraron efecto inhibitorio sobre la formación de factores de virulencia, biofilm y fitotoxinas.

Extractos vegetales

- De los cuatro extractos obtenidos a partir de ambas plantas aromáticas (alcohólico, hexánico, clorofórmico y propanólico) sólo el extracto alcohólico fue el que demostró actividad antimicrobiana.

Decocciones

- Todas las cepas de *Pseudomonas* fitopatógenas aisladas de soja fueron inhibidas por las decocciones de *T. vulgaris* y *O. vulgare*; la decocción de *O. vulgare* demostró además efecto bactericida.

- Las decocciones de *T. vulgaris* y *O. vulgare* tuvieron efecto inhibitorio sobre la formación de biofilm en algunas cepas ensayadas, mientras que no tuvieron actividad sobre la producción de fitotoxinas.

Aceites esenciales

- Los AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* contenían elevados porcentajes de carvacrol y bajos de timol, por lo que el quimiotipo del género *Thymus* utilizado en esta investigación es carvacrol. El quimiotipo del género *Origanum* es carvacrol-timol. También

- se identificaron en ambos AE a p-cimeno, terpineno y, además en el aceite de *O. vulgare*, cis-sabineno.
- Los AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* presentaron actividad inhibitoria y bactericida sobre todas las *Pseudomonas* fitopatógenas.
- Los dos AE demostraron efecto inhibitorio sobre la formación de biofilm en las *Pseudomonas* sp. aisladas de soja y en las *P. syringae* de referencia.
- La inhibición de biofilm presentó mayor efectividad con el aceite de *T. vulgaris*, ya que no se observó producción del polisacárido en todas las cepas ensayadas, mientras que el AE de *O. vulgare* fue efectivo en un número menor de aislamientos. Además, se destaca que a concentraciones inhibitorias el AE de *T. vulgaris* afectó la producción de biofilm en mayor medida que a concentraciones sub-inhibitorias.
- Ambos AE ejercieron efecto inhibitorio sobre la producción de coronatina, siringomicina y tabtoxina a concentraciones sub-inhibitorias y sub-bactericidas.

III-BIOACTIVIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE *THYMUS VULGARIS* SOBRE PLANTAS DE SOJA INFECTADAS CON *PSEUDOMONAS* SP.

- El AE de *T. vulgaris* no presentó fitotoxicidad sobre plantas de soja. Este dato permitió considerar y evaluar este AE como antibacteriano sobre plantas.

- El aislado de soja *Pseudomonas* sp. Q produjo mayor incidencia y severidad en plantas de soja, que aquellas infectadas con *P. savastanoi* pv. *glycinea* B076.

- El AE de *T. vulgaris* produjo disminución significativa de la severidad en las plantas inoculadas con *Pseudomonas* sp. Q. Sin embargo, se deberían realizar mayor número de repeticiones para disminuir la variabilidad en los resultados obtenidos.

- En las plantas inoculadas y tratadas con distintas concentraciones de AE se detectaron visualmente menor cantidad de manchas en las hojas que en aquellas plantas control. Se deberían optimizar los ensayos aumentando el número de plantas a evaluar, ampliando el rango de concentraciones no fitotoxicas del AE a utilizar, aumentando el número de cepas patógenas y el número de repeticiones de todas las experiencias.

- El AE de *Thymus vulgaris* podría ser considerado para la formulación de nuevos compuestos antimicrobianos que sean utilizados en el tratamiento de enfermedades fitopatógenas de importancia en cultivos agrícolas de nuestro país.

- Los AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* presentaron efecto antimicrobiano sobre cepas de *Pseudomonas* sp. fitopatógenas de soja, inhibieron la producción de sus factores de virulencia y disminuyeron la severidad de la enfermedad en ensayos *in vivo* (en invernadero). Estos resultados son promisorios ya que demuestran la capacidad antimicrobiana de los productos naturales de ambas plantas aromáticas sobre bacterias fitopatógenas causantes de bacteriosis, una problemática de importancia creciente. Este trabajo representa el comienzo

- de investigaciones destinadas a generar estrategias de manejo de estas bacteriosis utilizando una alternativa natural y amigable con el medio ambiente.

PROYECCIONES

PROYECCIONES

- Realizar mayor número de aislamientos de bacteriosis en soja de diferentes zonas de nuestro país a partir de hojas, semillas y rastrojos, utilizando diseños experimentales para poder obtener mejores estimaciones de Incidencia y Severidad.

- Evaluar la actividad antimicrobiana de AE y decocciones de *T. vulgaris* y *O. vulgare* en ensayos *in vivo* a campo.

- Determinar los mecanismos por el cual los AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* ejercen su actividad antimicrobiana sobre *Pseudomonas* sp. fitopatógenas de soja, evaluando el sitio blanco de acción de los mismos y el efecto de factores ambientales como la temperatura sobre la capacidad inhibitoria.

BIBLIOGRAFÍA

Adams, R.P. 1989. Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy.Ac. Press. NY.

Adonizio, A.; Kong, K.-F.; Mathee, K. 2008. Inhibition of Quorum Sensing-Controlled Virulence Factor Production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida Plant Extracts. Antimicrobial agents and chemotherapy. 52: 198-203.

Agrios, G. Plant pathology. 5 th edition. N.Y. Academic Press; 2005. (Edición en castellano, Ed. LIMUSA.

Alarcón Restrepo, J.J. 2011. Plantas aromáticas y medicinales. Enfermedades de importancia y sus usos terapéuticos. Produme dios. Bogotá D.C., Colombia.

Albado Plaus, E.; Saez Flores, G.; Grabiel Ataucusi, S. 2001.Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). Revista Médica Herediana, 12: 16-19.

Altschul, S.; Madden, T.; Schäffer, A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search. Nucleic acids research. 25: 3389-3402.

Arcila-Lozano, C. C.; Loarca-Pina, G.; Lecona-Uribe, S.; Gonzalez de Mejia, E. 2004. Orégano: propiedades, composición y actividad biológica. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 54: 100-111.

Arnold, D. L.; Lovell H. C.;Jackson,R. W.;Mansfield,J. W. 2011. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola:* from 'has bean' to supermodel. 12(7): 617-627.

Arrebola, E.; Cazorla, F. M., Perez-García, A.; Vicente, A. 2011. Chemical and Metabolic Aspects of Antimetabolite Toxins Produced by *Pseudomonas syringae* Pathovars. *Toxins: 3*, 1089-1110.

Arredondo, M.; Blasina, F.; Echeverry, C.; Morquio, A.; Ferreira, M.; AbinCarriquiry, J.; Lafon, L.; Dajas, F. 2004. Cytoprotection by Achyrocline satureioides (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. Journal of Ethnopharmacology. 91: 13-20.

Artini,M.; Papa, R.; Barbato, G.; Scoarughi, G.L.; Cellini, A.; Morazzoni, P.; Bombardelli, E., Selan, L. 2012. Bacterial biofilm formation inhibitory activity revealed for plant derived natural compounds. Bioorganic and Medicinal Chemistry. 20: 920-926.

Asensio, C. M.; Galluci, N.; Oliva M. M.; Demo, M. S. 2014. Sensory and bio-chemical preservation of ricotta cheese using natural products. International Journal of Food Science and Technology. 49: 2692-2702.

Bagamboula, C.; Uyttendaele, M.; Debevere, J. 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri.* Food Microbiology. 21: 33-42.

Bagci, E.; Digrak, M. 1996. Antimicrobial Activity of Essential oils of some Abies (Fir) species from Turkey. Flavour and Fragrance Journal. 11: 251-256.

Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils. Food and Chemical Toxicology. 46: 446-475.

Ballestra, G.M.; Heydari, A.; Ceccarelli, D.; Ovidi, E.; Quattrucci, A. 2009. Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. Crop Protection 28: 807-811.

Bamba D.,Bessiere J. M., Pélisser Y. and Fourasté I. 1993. Essential oils of *Eupatorium odoratum*. Planta Médica. 59: 184.

Baltrus, D.A.; Nishimura, M.T.; Romanchuk, A.; Chang, J.H.; Mukhtar, M.S.; Cherkis, K.; Roach, J.; Grant, S.R., Jones, C.; Dangl, J.L. 2011. Dynamic Evolution of Pathogenicity Revealed by Sequencing and Comparative Genomics of 19 *Pseudomonas syringae* Isolates. PLoS Pathog 7(7): 1-22. e1002132.

Bamba, D.; Bessiere, J. M.; Pélissier, Y.;Fourasté, I. 1993. Essential oil of *Eupatorium odoratum*. Planta Médica. 59:184.

Banchio, E., Bogino, P., Zygadlo, J. and Giordano, W. 2008 Plant growth promoting rhizobacteria improved growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. Biochemical Systematics and Ecology. 36: 766-771.

Barta, T. M.; Kinscherf, T. G.; Willis, D. K. 1992. Regulation of Tabtoxin Production by the lemA Gene in *Pseudomonas syringae*. Journal of Bacteriology. 3021-3029.

Ben El Hadj Ali, I.; Guetat, A.; Boussaid, M. 2013. A combined approach using allozymes and volatiles for the characterization of Tunisian *Thymbra capitata* (L.) Cav. (Lamiaceae). Industrial Crops and Products. 43: 477-483.

Benbelaid, F.; Abdoune, M.A.; Khadir, A.; Bendahou, M. 2013. Drying effect on yield and antimicrobial activity of essential oils. International Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 3: 93-101.

Bender, C.; Malvick, D.; Conway, K.; George, S.; Pratt, P. 1999. Characterization of pXV1OA, a copper resistance plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Applied and Environmental Microbiology. 56 (1): 170-175.

Beoletto V.G., Oliva M.M., Marioli J.M., Carezzano M.E., Demo M.S. 2016. Antimicrobial natural products against bacterial biofilms. Ed. Elsevier Inc, London: 290-307. Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches.

Bereswill, S.; Bugert, P.; Volksch, B.; Ullrich, M.; Bender, C. L.; Geider, K. 1994. Identification and relatedness of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analysis and sequence determination of the amplification products. Applied and Environmental Microbiology. 2924-2930.

Bouhdid, S; Abrini, J.; Zhiri, A.; Espuny, M.J.; Manresa, A.J. 2009. Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. Applied Microbiology. 106(5):1558-68.

Bogino P.C., Oliva M.de las M., Sorroche F.G., Giordano W. 2013. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. International Journal of Molecular Sciences. 14: 15838-15859.

Boletín Fitosanitario. Cultivo de Soja. INTA. 2008

Borboa-Flores, J.; Rueda-Puente, O.; Acedo-Félix, E.; Ponce, J.; Cruz-Villegas, M.; García-Hernández, J.; Ortega-Nieblas, M. 2010. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 12: 539-547.

Bracco, U.; Löliger, J. and Viret, J.L. 1981. Production and use of natural antioxidants. Journal of the American Oil Chemists Society. 58: 686.

Braun, Y.; Smirnova, A.V.; Weingart, H.; Schenk, A.; Ullrich, M.S.; 2009. Coronatine gene expression in vitro and in planta, and protein accumulation during temperature downshift in *Pseudomonas syringae*. Sensors. 9: 4272-4285.

Bull, C. T.; Wadsworth, M. L,; Sorensen, K. N.; Takemoto, J. Y.; Austin, R. K.; Smilanick, J. L. 1998. Syringomycin E produced by biological control agents controls green mold on lemons. Biological Control. 12: 89-95.

Burt, S. 2004. Essential oils: antibacterial properties and potential aplications in food: a review. International Journal of Food Microbiology. 94: 223-253.

Busso Aberastain, R.S. 2012. Aplicación de aceites esenciales de *AloysiaTriphylla* como herramienta de biocontrol en cepas de *Staphylococcus* productoras de biofilm. Tesis de grado.UNRC.

Cabrera, M.; Alvarez, R.; Raimondo, M.; Cúndom, M.; Gutiérrez, S. 2004. Importancia de las enfermedades de fin de ciclo de la soja (*Glycine max*), en el NEA. Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen A-027.

Cady, N.C.; McKean, K.A.; Behnke, J.; Kubec, R.; Mosier, A.P. 2012. Inhibition of biofilm formation, quorum sensing and infection in *Pseudomonas aeruginosa* by natural products-inspired organosulfur compounds. Plos One. 7(6): 1-12.

Cantero, N. 2010. Procedimientos técnicos. Laboratorio de sanidad vegetal. INTA. Bella Vista Corrientes.

Carlier, E.; Rovera, M.; Rossi Jaume, A.; Rosas, S. B. 2009. Improvement of growth, under field conditions, of wheat inoculated with *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* SR1. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 24: 2653-2658.

Carson, C. F.; Hammer, K. A.; Riley, T. V. 1995. Broth microdilutión method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococus aureus*. Microbios. 82: 181-185.

Carvalho, C.; Fonseca, M. 2007. Preventing biofilm formation: promoting cell separation with terpenes. Federation of Europeans Microbiological Societies, Microbiology Ecological. 61(3): 406-413.

Cerda, A.; Martínez, M.E.; Soto, Carmen; Poirrier, P.; Perez-Correa, J.R.; Vergara-Salinas, J.R.; Zúñiga, M.E. 2013. The enhancement of antioxidant compounds extracted from *Thymus vulgaris* using enzymes and the effect of extracting solvent. Food Chemistry. 139: 138-143.

Cetin, B.; Cakmakci, S.; Cakmakci, R. 2011. The investigation of antimicrobial activity of thyme and oregano essential oils. Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 35:145-154.

Chan, W.C., Coyle, B.J.; Williams, P. 2004. Virulence regulation and quorum sensing in staphylococcal infections: competitive agrc antagonists as quorum sensing inhibitors. Journal of Medicinal Chemistry. 47 (19): 4633-4641.

Ching Voon, H.; Bhat, R.; Rusul, G. 2012. Flower extracts and their essential oils as potential antimicrobial agents for food uses and pharmaceutical applications. Comprehensive Reviews Food Science and Food Safety. 11: 34-55.

Chinou, J. B.; Vassilios Roussis, D.; Perdetzoglou, O. T. and Anargios L. 1997. Chemical and antibacterial studies of two *Helichrysum* species of greek origin. Planta Médica. 63: 181-183.

Chowdhury, C.; Venkata Jagannadham, M. 2013. Virulence factors are releasedin association with outer membrane vesicles of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* T1 during normal growth. Biocgimica et Biophysica acta. 1834: 231-239.

Cinelli,T.; Marchi, G.; Cimmino, A.; Marongiu, R.; Evidente, A. and Fiori, M. 2014. Heterogeneity of *Pseudomonas savastanoi* populations infecting *Myrtus communis* in Sardinia (Italy). Plant Pathology. 63: 277-289.

Conforto, C. 2011. Desarrollo y validación de escalas logarítmicas diagramáticas de severidad para enfermedades de fin de ciclo del cultivo de soja. Tesis de posgrado para optar al título de Magíster en Ciencias Agropecuarias.

Cos, P.; Vlietinck, A.J.; VandenBerghe, D.; Maes, L. 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. Journal of Ethnopharmacology. 106: 290-302.

Cosentino, S.; Tuberso, C. I. G.; Pisano, B.; Satta, M.; Mascia, V.; Arzedi, E. and Palmas, F. 1999. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardian *Thymus* essential oils. Letters in Applied Microbiology. 29: 130-135.

Costa, J.; Cervera, S.; Cunill, F.; Esplugas, S.; Mans, C.; Mata, J. 2004. Curso de ingeniería química: Introducción a los procesos, las operaciones unitarias y fenómenos de transporte. Capítulo 2: las operaciones unitarias; pp. 37-92. Barcelona, España. Reverté, S.A.

Costerton, J.W. 1999. Introduction to biofilm. International Journal of Antimicrobial Agents. 11: 217-221.

Cowan, M. 1999. Plant Products as antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews. 12 (4): 564-582.

Cracogna. 2007. Identificación de las bacteriosis de la soja en dos zonas agrícolas y cálculo de la función de daño para el tizón bacteriano. Tesis magíster scientiae. Universidad Nacional de Mar del Plata.

Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N.G. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). Chap 24: 1250-1319. Ed. American Society of Plant Physiologists. Biochemistry & Molecular Biology of Plants.

Crowell, P. 1999. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. Journal nutrition. 129(3): 775-778.

Cruz, S.; Ramírez, P.; Tlapal, B.; Ramírez, I.; García, R.; Sandoval, J.; Castillo, F. 2001. Producción masiva de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) dye. Agrociencia. 35 (005): 575-581.

Dan, Y.; Liu, H.-Y.; Gao, W.-W.; Chen, S.-L. 2010. Activities of essential oils from Asarum heterotropoides var. mandshuricum against five phytopathogens. Crop Protection. 29: 295-299.

Danhorn, T.; Fuqua, C. 2007. Biofilm formation by plant-associated bacteria. Annual Review Microbiology. 61: 401-22.

Davies, P.; Villamil, J.J.; Ashfielld, R. 2004. Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas. Instituto nacional de investigación agropecuaria. Uruguay. Capítulo 6: Fichas técnicas de cultivo: 63-66.

Darouk, K.; Shawky, M.; Sattout, E. 1995. Antifungal activity of essential oil of *Origanum syriacum* L. Journal and food Protection. 58: 1147-1149.

Deans, S.G; Noble, R.; Hiltunen, R.; Wuryani, W. and Pénzes, L. 1995. Antimicrobial and antioxidant properties of *Syzygium aromaticum* (L): impact upon bacteria, fungi and fatty acid levels in agein mice. Flavour and Fragance Journal. 10: 323-328.

De Feo, V.; Ricciardi, A.; Biscardi, D.; Senatore, F.1998. Chemical composition and antimicrobial sreening of the essential oil of *Minthostachys verticillata* (Griseb). Epl. (*Lamiaceae*). Journal Essential oil Research. 10: 61-65.

Delaquis, P.; Stanich, K.; Girard, B.; Mazza, G. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. International Journal of Food Microbiology. 74: 101-109.

Demo, M. y Oliva, M.M. 2008. Antimicrobial activity of medicinal plants from south america. Botanical Medicine in Clinical Practice. Edited by Professors Ronald Ross Watson and Victor R. Preedy. Reino Unido.

Demo, M.; Oliva, M.M.; Lopez, M.; Zunino, P.; Zygadlo, J. 2005. Antimicrobial activity of essential oils obtained from aromatic plants of Argentina. Pharmaceutical Biology. 43: 129-134.

De Pooter, H.L.; Aboutabl, E.A.; El-Shabrawy, O.A. 1995. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of leaf, steam and rhizome of *Alpinia speciosa* (J.C. Wendl) K. Schum. Grown in Egypt. Flavour and Fragrance Journal. 10: 63-67.

Derakhshana, S.; Sattari, M.; Bigdeli, M. 2008. Effect of subinhibitory concentrations of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seed essential oil and alcoholic extract on the morphology, capsule expression and urease activity of *Klebsiella pneumonia.* International Journal of Antimicrobial Agents. 32: 432-436.

Didry, N.; Dubreuil, L. and Pinkas, M. 1993. Activité antibactérienne du thymol, du carvacrol et de l'aldéhyde cinnamique seuls ou associés. Pharmazie. 48: 301-304.

Di Pasqua, R.; Betts, G.; Hoskins, N.; Edwards, M.; Ercolini, D.; Mauriello, G. 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. Agriculturas and Food Chemistry. 55: 4863-4870.

Distéfano, S.; Lenzi, L.; Gadbán, L. 2016. Inf. fitopatológ regional–Sudeste Cba–INTA M. Juárez.

Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M. G.; Gonzalez, L.; Tablada, M. y Robledo, C. W. 2012. InfoStat versión 2012., in Grupo InfoStat, F., Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Domingo, D.; López-Brea, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. Revista Española de Quimioterapia.16(4): 385-393.

El Abed, S.; Houari, A.; Latrache, H.; Remmal, A.; IbnsoudaKoraichi, S. 2011. *In vitro* activity of four common essential oil components against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa.* Research Journal of Microbiology. 6(4): 394-401.

El-Sakhawy, F.; Tantawy, M.; Ross, A. and El-Sohly, A. 1997. Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Murraya exótica* L. Flavour and Fragrance Journal.13: 59-62.

Faria, J.M.S.; Barbosa, P.; Bennett, R.N.; Mota, M.; Figueiredo, A.C. 2013. Bioactivity against *Bursaphelenchus xylophilus*: Nematotoxics from essential oils, essential oils fractions and decoction waters. Phytochemistry. 94: 220-228.

Fehr, W.; Caviness, C.; Burmood, D. 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. Crop Science. 11: 929-93.

Fernandez Valiela, M.V. 1975. Introducción a la fitopatología. 3. Colección científica del INTA.

Ferranteand Scortichini. 2008. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* as causal agent of bacterial canker of yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis Planchon*) in central Italy. Journal Phytopathology. 157: 768-770.

Fett W.; Jones, S. 1981. Role of bacterial immobilization in race-specific resistance of soybean to *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. Phytopathology. 72: 488-492.

Finelgol, S.; Baron, E.; Braily, S. 1992. Diagnóstico microbiológico, aislamiento e identificación de microorganismos patógenos. Ed Médica Panamericana Bs. As., 36: 514-533.

Fogliano, V.; Gallo, M.; Vinale, F.; Ritieni, A.; Randazzo, G.; Greco; Lops, M. R.; Graniti, A. 1999. Immunological detection of syringopeptins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans.* Physiological and Molecular Plant Pathology. 55: 255-261.

Formento, A. N. 2015. Informes fitopatológicos del cultivo de soja. INTA.

Formento, N.; Schutt, L. 2014. Estado sanitario del cultivo de soja. INTA- EEA. Paraná.

Formento, N.; Scandiani, M.; Ivancovich, A., Sillón, M. 2008. Enfermedades de Fin de Ciclo y Roya de la Soja: descripción y reconocimiento. INTA.

Formento, N.; Velazquez, R.; Figoni, G., Velazquez, J.C.; Mainez, H. 2016. Cultivo de soja. Boletín Fitopatológico N° 38. INTA.

Friedman, M. 2014. Chemistry and multibeneficial bioactivities of carvacrol (4-Isopropyl2-methylphenol), a component of essential oils produced by aromatic plants and spices. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 62: 7652-7670.

Fyfe, L.; Armstrong, F.; Stewart, J. 1998. Inhibition of *Listeria monocitogenes* and *Salmonella enteritidis* by combinations of plant oils derivatives of benzoic acid. The development of synergistic antimicrobial combinations. International Journal of Antimicrobial Agents. 9(3):195-199.

Gallucci, M.N.; Carezzano, M.E.; Oliva, M.M.; Demo, M.S.; Pizzolitto, R.P.; Zunino, M.P.; Zygadlo, J.A. and Dambolena, J.S. 2014. *In vitro* activity of natural phenolic compounds against fluconazole-resistant *Candida* species: a quantitative structure–activity relationship analysis. Journal of Applied Microbiology. ISSN 1364-5072.

Garrity, G.M.; Bell, J.A.; Lilburn, T. 2005. Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2: The probacteria, Part B. (2nd Ed.). Ed. Don J. Brenner, Noel R. Krieg and James T. Staley.

Geske, G.D.; O'Neill, J.C.; Miller, D.M.; Mattmann, M.E.; Blackwell, H.E. 2007. Modulation of bacterial quorum sensing with synthetic ligands: systematic evaluation of n-acylated homoserine lactones in multiple species and new insights into their mechanisms of action. Journal of the American Chemical Societies. 129 (44): 13613-13625.

Ghasemi Pirbalouti, A.; Rahimmalek, M.; Malekpoor, F.; Karimi, A. 2011. Variation in antibacterial activity, thymol and carvacrol contents of wild populations of *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Celak. Plant OMICS. Vol. 4: 209-214.

Giuliano, M. 2013. Efecto de aceites esenciales sobre la produccion de biofilm de cepas fitopatógenas de soja. Tesis de grado. UNRC.

Glasstone, S.; Sesonske, S. 2005. Ingeniería de reactores nucleares. Capítulo 8: Combustibles nucleares. pp. 503-556. España. Reverté.

Golmohammadi, M.; Cubero, J.; Peñalver, J.; Quesada, J.M.; López, M.M. and Llop, P. 2007. Diagnosis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causal agent of citrus canker, in commercial fruits by isolation. Journal of Applied Microbiology. 03: 2309-2315.

Guarda, A.; Rubilar, J.F.; Mitlz, J.; Galotto, M.J. 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. International Journal of Food Microbiology. 146: 144-150.

Gunther, E. 1948. The Essential Oils.1:1-342. D. Van Nostrand Co. London.

Hauben, L.; Vauterin, L.; Swings, J.; Moore, E. 1997. Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. International Journal of Systematic Bacteriology. 47 (2): 328-335

Helander, I.; Alakomi, H.; Kala, K.; Sandholm, T.; Pol, I.; Smid, E.; Gorris, L.; vonWright, A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. Journal Agriculture Chemistry.46(9): 3590-3595.

Hettwer, U.; Jaeckel, F.; Boch, J.; Meyer, M.; Rudolph, K.; Ulltich, M. 1998. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of levansucrase genes from the plant pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *P. syringae* pv. *phaseolicola.* Applied and environmental microbiology. 64 (9): 3180-3187.

Hirasa, K.; Takemasa, M. 1998. Spice Science and Technology. Ed:Marcel Dekker, Inc. Susceptibility testing of *Candida albicans* and *Aspergillus* species by a simple microtiter menadione-augmented 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide assay. Journal of Clinical Microbiology. 33 (3): 661-667.

Hossain, M.A.; AL-Raqmi, K.A.S.; AL-Mijizy, Z.H.; Weli, A.M.; Al-Riyami, Q. 2013. Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 3(9): 705-710.

http://agro.fauba.info/node/164

http://comercioyjusticia.info/blog/economia/estiman-produccion-argentina-de-soja-para-la-campana-201617-en-57-millones-de-toneladas

https://en.wikipedia.org/wiki/Origanum

https://es.wikipedia.org/wiki/Thymus

http://inta.gob.ar/documentos/informe-sanitario-de-la-campana-de-soja- 2012-13.

http://inta.gob.ar/documentos/rendimiento-y-calidad-de-la-soja-de-la-zona-nucleo-sojera-campana-2014-15

http://mundoagrocba.com.ar/atencion-a-las-enfermedades-de-fin-de-ciclo-de-la-soja

http://prairiecalifornian.com/soybean-growth-stages

http://www.ambito.com/832504-avanza-la-cosecha-de-soja-en-la-argentina

http://www.brnich.com.ar/agro/enfermedades

http://www.infoagro.com/herbaceos/industriales/soja.htm

http://www.ncbi.nlm.nih.gov

http://www.produccion.com.ar/ver_nota.php?edicion=Sep_Oct2013&numero=204&id=1338

Hudaib, M.; Speroni, E.; Di Pietra, A. 2002. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 29: 691-700.

Hwang, M.; Morgan, R.; Sarkar, S.; Wang, P.; Guttman, D. 2005. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. Applied and environmental microbiology. 71 (9): 5182-5191.

Iaco, J.; Barreno, E.; Brugues, M.; Costa, M.; Devesa, J.; Fernández, F. 1998. Botánica. 2: 522-523.

Imai, H.; Osawa, K.; Yasuda, H.; Hamashima, H.; Arai, T. and Sasatsu, M. 2001. Inhibition by essential oils of peppermint and spearmint of the growth of pathogenic bacteria. Microbios. 106(1):31-39.

Isman, M.B. 2004. Plant essential oils as green pesticides for pest and disease management. Agricultural Applications in Green Chemistry, Chapter 4: 41-51.

Isman, M.B.; Machial, C.M. 2006. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. Rai and Carpinella (eds.), Naturally Occuring Bioactive Compounds. 29-44.

Ji, P.; Momol, M.T.; Olson, S.M.; Pradhanang, P.M.; and Jones, J.B. 2005. Evaluation of thymol as biofumigant for control of bacterial wilt of tomato under field conditions. Plant Diseases. 89: 497-500.

Kalia, V.C. 2013. Quorum sensing inhibitors: An overview. Biotechnology Advances 31: 224-245.

Kantolic, A. P. 2004. Ciclo ontogénico, dinámica del desarrollo y generación del rendimiento y la calidad de soja. En: Producción de Granos. Bases funcionales para su manejo. 2da edición. Ed: A. Pascale, Buenos Aires. 167-195.

Kerr, J.R. 1999. Bacterial inhibition of fungal growth and pathogenicity. Microbial Ecology in Health and Disease. 11: 129-142.

Khan,M.S.A.; Zahin, M.; Hasan, S.; Husain, F.M.; Ahmad, I. 2009. Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil. Letters in Applied Microbiology. 49: 354-360.

Kim, J.; Park, B.; Yoo, C.; Jeon, E.; Oh, J.; Hwang, I. 2003. Characterization of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Hrp pathogenicity island. Journal of Bacteriology. 185 (10): 3155-3166.

Kim, Y.G.; Lee, J.H.; Kim, S.I.; Baek, K.H.; Lee, J. 2015. Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. International Journal of Food Microbiology. 195: 30-39.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution.16: 111-120.

Klein, G.; Rüben, C.; Upmann, M. 2013. Antimicrobial activity of essential oil components against potential food spoilage microorganisms. Current Microbiology. 67: 200-208.

Kozics, K.; Klusova, V.; Srancˇikova, A.; Muc aji, P.; Slamen ova, D.; Hunakova, L.U.; Kusznierewicz, B., Horvathova, E. 2013. Effects of *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris* on oxidant-induced DNA damage and antioxidant status in HepG2 cells. Food Chemistry, 141: 2198-2206.

Kotan, R.; Dadasoglu, F.; Kordali, S.; Cakır, A.; Dikbas, N.; Cakmakc, R. 2007. Antibacterial activity of essential oils extracted from some medicinal plants, carvacrol and thymol on *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye causes bacterial spot disease on pepper and tomato. Journal of Agricultural Technology. 3(2): 299-306.

Kotan, R.; Cakir, A.; Ozer, H.; Kordali, S.; Cakmakci, R.; Dadasoglud, F.; Dikbas, N.; Aydin, T.; Kazaz, C. 2014. Antibacterial effects of *Origanum onites* against phytopathogenic bacteria: Possible use of the extracts from protection of disease caused by some phytopathogenic bacteria. Scientia Horticulturae. 172: 210-220.

Lambert, R.; Skandamis, P.; Coote, P.; Nychas, G. 2001. A study of the minimun inhibitory concentracion and mode of accion of *Oregano* Essential Oil, thymol and carvacrol. Journal of applied Microbiology. 91: 453-462.

Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, en 'Nucleic acid techniques in bacterial systematics', E. Stackebrant y M. Goodfellow, editores, JohnWiley & Sons, New York. 115-175.

Laue, H.; Schenk, A.; Li, H.; Lambertsen, L.; Neu, T.; Molin, S.; Ullrich, M. 2006.Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae.* Microbiology. 152: 2909-2918.

Lelliott, R.A.; Billing, E.; Hayward, A.C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. Journal of Applied Bacteriology. 29: 47-489.

Licina, B.Z.; Stefanovic, O.D.; Vasic, S.M.; Radojevic, I.D.; Dekic, M.S.; Comic, L.R. 2013. Dep Biological activities of the extracts from wild growing *Origanum vulgare* L. Food Control. 33: 498-504.

Lisbalchin, M.; Hart, S. and Roth, G. 1997. The spasmolitic activity of essential oils of scented Pelargonium. Phytoterapy research. 11(8):583-584.

Lo Cantore, P.; Iacobellis, N.; De Marco, N.; Capasso, F.; Senatore, F. 2004. Antibacterial activity of *Coriandrum sativum L.* and *Foeniculum vulgare Miller Var. vulgare* (Miller) essential oils. Journal Agricultural Food Chemistry. 52(26): 7862-7866.

López, R.; Asensio, C.; Gilbertson, R. 2006. Phenotypic and genetic diversity in strains of common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *phaseoli var. fuscans*) in a secondary center of diversity of the common bean host suggests multiple introduction events. Phytopathology. 96: 1204-1213.

Lydon, J.; Patterson, C.D. 2001. Detection of tabtoxin-producing strains of *Pseudomonas syringae* by PCR. Letters in Applied Microbiology. 32: 166-170.

Madigan, M.T.; Martinko, J.; Bender, K.S.; Buckley, D.H.; Stahl, D.A. 2015. Biology of microorganisms 14th Edición.

Malamud, F. 2011. Bases moleculares del desarrollo de "biofilms" en *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* y su rol en el proceso infectivo. Tesis doctoral en Química biológica. Universidad de Buenos Aires.

Mann, C.M. and Markham, J. L. 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. Journey Applied Microbiology. 84: 538-544.

Mansfield, J.; Genin, S.; Magori, S.; Citovsky, V., Sriariyanum, M.; Ronald, P.; Dow, M.; Verdier, V.; Beer, S.V.; Machado, M.A.; Toth, I.; Salmond, G.; Foster, G.D. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. Molecular plant pathology. 13(6): 614-629.

March, G.J.; Oddino, C.M.; Marinelli, A.D. 2010. Manejo de enfermedades de los cultivos según parámetros epidemiológicos. Ed. UNRC.

Martins, N.; Barros, L.; Santos-Buelga, C.; Henriques, M.; Silva, S.; Ferreira, I. 2014. Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. Food Chemistry. 158: 73-80.

Masak, J.; Cejkova, A.; Schreiberova, O.; Rezanka, T. 2014. *Pseudomonas* biofilms: possibilities of their control. Federation of European Microbiological Societies. 89: 1-14.

Mathur, T.; Singhal, S.; Khan, S.; Upadhyay, D.J.; Fatma, T.; Rattan, A. 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods. Indian Journal of Medical Microbiology. 24 (1): 25-9.

Mc Faddin, J. F. 1980. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana. S. A. Bs. As. 1-284.

Ministerio de Agricultura, Ganadería y pesca. 2009 (MINAGRI) http://www.minagri.gob.ar/site/desarrollo_rural/producciones_regionales/01_origen_vegetal/04_hierbas_arom%C3%A1ticas_y_especies/_cadenas/cond_esp_aromaticas_especias_07_09.htm67.68.

Miron, T.L.; Plaza, M.; Bahrim, G.; Ibáñez, E.; Herrero, M. 2011. Chemical composition of bioactive pressurized extracts of *Romanian* aromatic plants. Journal of Chromatography. 1218: 4918-4927.

Mongelli, E.; Desmarchielier, C.; Coussia, J.; Ciccia, G. 1995. Actividad antimicrobiana e interacción con el ADN de las plantas medicinales de la amazonia Peruana. Revista Argentina de Microbiología. 27: 199-203.

Morris, C.; Kinkel, L.; Xiao, K.; Prior, P.; Sand, D. 2007. Surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. Infection, Genetics and Evolution 7: 84-92.

Morris, C.E.; Monier, J.M. 2003. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. Annual Review Phytopatholy. 41: 429-53.

Muñoz, F. 1993. Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado. Reimpresión PrimeraG Edición 1987. Ediciones Mundi-Prensa, España.

Murillo, J.; Rodriguez-Palenzuela, P. 2000. Biología molecular de las interacciones entre plantas y bacterias fitopatógenas. Patología Vegetal. 565-566, 577-579.

Nabavi, S.F.; Di Lorenzo, A.; Izadi, M.; Sobarzo-Sánchez, E.; Daglia, M.; Nabavi, S.M. 2015. Antibacterial effects of cinnamon: from farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries. Nutrients, 7: 7729-7748.

Nakamura, C.; Nakamura, T.; Bando, E.; Melo, A.; García Cortéz, D.; Díaz Filho, B. 1999. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* (L.) essential oil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Río de Janeiro. 94(5): 675-678.

Niu, C.; Gilbert, E.S. 2004.Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure.Applied Environmental Microbiology. 70: 6951-6956.

Nostro, A.S. 2007. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Journal of Medical Microbiology. 56: 519-523.

Nuñez, C.; Cantero, J.J. 2000."Las Plantas medicinales del sur de la Provincia de Córdoba". Ed. Fund. UNRC.

Ojeda, M.; Corini, R.; Cosiansi, J.; Zapata, R.; Zygadlo J. 2001. Evaluation of variability in natural populations of peperina (*Minthostachys mollis* (kunth) griseb.), an aromatic species from Argentina. Plant Genetic Resources Newletter. 126: 27-30.

Oliva, M.; Carezzano, E.; Gallucci, N.; Casero, C.; Demo, M. 2011. Antimicotic effect of the essential oil of *Aloysia triphylla* against Candida species obtained from human pathologies. Natural Products Comunications. 6 (7): 1039-1043.

Oliva, M.M.; Carezzano, M.E.; Giuliano, M.; Daghero, J.; Zygadlo, J.; Bogino, P.; Giordano, W.; Demo, M. 2015. Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on phytopathogenic strains isolated from soybean. Plant Biology.

Onrubia, M.; Moyano, E.; Bonfill, M.; Cusidó, R.M.; Goossens, A.; Palazón, J. 2013. Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in Taxus media cell cultures than methyl jasmonate. Journal of Plant Physiology. 170(2): 211-9.

Ortuño, M. 2006. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Capítulo 8- sección 8.7: Extractos de plantas. La alternativa a los aceites esenciales. España. Aiyana. pp. 223-231.

O'Toole, G.A.; Kolter, R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Molecular Microbiology. 28: 449-461.

Paret, M. L., Cabos, R., Kratky, B. A., and Alvarez, A. M. 2010. Effect of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* race 4 and bacterial wilt of edible ginger. Plant Disease. 94: 521-527.

Pierozan, M.; Pauletti, G.; Rota, L.; Santos, A.; Lerin, L.; Di Luccio, M.; Mossi, A.; Atti-Serafini, L.; Cansian, R.; Oliveira, J. 2009. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of salvia L. species. Food Science and Technology. Campinas. 29 (4): 764-770.

Polat, R.; Satıl, F. 2012. An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir-Turkey). Journal of Ethnopharmacology. 139: 626-641.

Pratt, L.; Kolter, R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Molecular Microbiology. 30(2): 285-293.

Preston, G.M. 2000. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: the right pathogen, of the right plant, at the right time. Molecular Plant Pathology.1(5): 263-27.

Primo, V.; Rovera, M.; Zanon, S.; Oliva, M.; Demo, M.; Daghero, J.; Sabini, L. 2001. Determinación de la actividad antibacteriana y antiviral del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* (griseb). Revista Argentina de microbiología. 33: 113-117.

Primo-Yúfera, E. 1995. Química orgánica básica y aplicada. De la molécula a la industria. Ed. Reverté. Capítulo 32: 851-872.

Qi, M.; Wang, D.; Bradley, C.A.; Zhao, Y. 2011. Genome sequence analyses of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and subtractive hybridization-based comparative genomics with nine *Pseudomonads*. Plos One. 6: 16451.

Raaman, N. 2006. Phytochemical techniques. Chapter 4: Methods of extraction; pp. 9-19. Nueva Dheli, India. New India Publishing Agency.

Rajendhran, J. and Gunasekaran, P. 2011. Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. ScienceDirect Microbiological Research 166: 99-110.

Raut, J.S.; Karuppayil, S. M. 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. Industrial Crops and Products, 62: 250-264.

Rigano,L. A.; Siciliano, F.; Enrique, R.; Sendín, L.; Filippone, P.; Torres, P. S.; Qüesta, J. Maxwell Dow, J.; Castagnaro, A. P.; Vojnov, A. A.; Marano, M. R. 2007. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Molecular Plant-Microbe Interactions. 20 (10): 1222-1230.

Rodicio, M.; Mendoza, M. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología. Universidad de Oviedo. España. 11: 81-86.

Romero, A.M.; Kousik, C.S.; Ritchie, D.F. 2002. Temperature sensitivity of the hypersensitive response of bell pepper to *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. Phytopathology. 92: 197-203.

Rota, M.; Herrera, A.; Martínez, R.; Sotomayor, J.; Jordán, M. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. Food Control. 19: 681-687.

Radulović, N.; Mišić, M.; Aleksić, J.; Doković, D.; Palić, R.; Stojanović, G. 2007. Antimicrobial synergism and antagonism of salicylaldehyde in *Filipendula vulgaris* essential oil. Fitoterapia. 78: 565-570.

Rudrappa, T.; Bais, H.P. 2008. Curcumin, a known phenolic from *Curcuma longa*, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56 (6): 1955-1962.

Ruffinatto, A. 2007. Importancia del metabolismo de colina en la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* S5. Tesis de grado. UNRC.

Sánchez L., Ariza Y., Castañeda E., Martinez E. 2010. Identifcación microbiológica de marchitez vascular en col china (*Brassica campestris L. var pekinensis*) en Cogua, Colombia. Nova-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. 8: 163-170.

Sawada, H.; Takeuchi, T.; Matsuda, I. 1997. Comparative analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae and* pv. *phaseolica* based on phaseolotoxin-rsistant ornithine carbamoyltransferasa gene (argK) and 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. Applied and Environmental Microbiology. 282-288.

Scandiani, M.M.; Luque, A.G. 2009. *Suplemento Especial* N° 2:1-148.

Schaad, N.W. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2° edition. The American Phytopathological Society.

Schaad, N. W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2° edition. The American phytopathological society.

Schenk, A.; Berger, M.; Keith, L.; Bender, C.; Muskhelishvili, G. 2006. The algT Gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and new insights into the transcriptional organization of the algT-muc gene cluster. Journal of bacteriology. 188 (23): 8013-8021.

Schillaci, D.; Napoli, E.M.; Cusimano, M.G.; Vitale, M.; Ruberto, G. 2013. *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* essential oil prevented biofilm formation and showed antibacterial activity against planktonic and sessile bacterial cells. Journal of Food Protection. 76(10): 1747-1752.

Scott, W.; Aldrich, S. 1975. Producciónmoderna de la soja. Hemisferio Sur. 13-14, 18-20.

Servicio Antimicrobianos-INEI – ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". 2001.

Sikkema, J.; de Bont, J. A. M. and Poolman, Bert. 1995. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiological Review. 59(2): 201-221.

Sinclair, J.B. 1989. Compendium of soybean diseases. *3rd ed.* American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas, 2015.

Sokmen, A.; Gulluce, M.; Akpulat, H.A.; Daferera, D.; Tepe, B.; Polissiou, M.; Sokmen, M.; Sahin, F. 2004. The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. Food Control, 15: 627-634.

Sokovic, M.; Marin, P.; Brkić, D.L.D.; Van Griensven, L. 2007. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. Food. Global Science Books. 1-7.

Song, J.H.; Kim, S.K.; Chang, K.W.; Han, S.K.; Yi, H.K.; Jeon, J.G. 2006. *In vitro* inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* on bacterial viability and virulence factors of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Archives of Oral Biology. 51: 1131-1140.

Sorensen, K.N.; Kim, K.H.; Takemoto, J.Y. 1998. PCR detection of cyclic lipodepsinonapeptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. Applied and Environmental Microbiology. 226-230.

Sotelo, J.P. 2015. Utilización de aceites esenciales obtenidos de *Origanum vulgare y Thymus vulgaris* como control del tizón bacteriano en soja. Tesis de grado para optar el título de Microbióloga. UNRC.

Soylu, S.; Soylu, E.M.; Bozkurt, A.; Kaya, A.D. 2003. Antibacterial activities of essential oils from oregano, thyme, rosemary and lavender plants against *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola,* the causal agent of halo blight of bean. Ovidius University Annals of Medical Science-Pharmacy. 40 (I): 2-40.

Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D.G.; Costerton, J.W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. Annual Review Microbiology. 56: 187-209.

Svoboda, K.P.; Hampson, J.B. 1999. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.

Takeuchi, K.; Taguchi, F.; Inagaki, Y.; Toyoda, K.; Shiraishi, T.; Ichinose, K. 2003.Flagellin glycosylation island in *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and its role in host specificity. Journal of Bacteriology. 185 (2): 6658-6665.

Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution. 24: 1596-1599.

Tarkowski, P.; Vereecke, D. 2014. Threats and opportunities of plant pathogenic bacteria. Biotechnology Advances. 32: 215-229.

Tiziana Baratta, M.; Damien Dorman, H.; Stanley G. Deans.; Figuereido, C.; Barroso, J. and Ruberto, J. 1998. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. Flavour and Fragance Journal. 13: 235-244.

Thompson, J.; Gibson, T.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. 1997. The CLUSTAL-X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research. 25: 4876-4882.

Turina, A.; Nolan, M.; Zygadlo, J.; Perillo, M. 2006. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. Biophysical Chemistry. 122: 101-113.

Ude, S.; Arnold, D.L.; Moon, C.D.; Timms-Wilson, T.; Spiers, A.J. 2006. Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. Environ Microbiol. 8: 1997-2011.

Ullrich, M.; Bereswill, S.; Volksch, B.; Fritsche, W.; Geider, K. 1993. Molecular characterization of field isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* differing in coronatine production. Journal of General Microbiology. 139: 1927-1937.

Ultee, A.; Gorris, L.; Smid, E. 1998. Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Journal of Applied Microbiology. 85(2): 211-218.

Veldhuizen, E.; Tjeerdsma-Van Bokhoven, J.; Zweijtzer, C.; Burt, C.; Haagsman, H. 2006. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54: 1874-1879.

Van der Wolf, J.M.; Michta, A.; Van der Zouwen, P.S.; De Boer, W.J.; Davelaar, E.; Stevens, L.H. 2012. Seed and leaf treatments with natural compounds to induce resistance against *Peronospora parasitica* in *Brassica oleracea*. Crop Protection. 35: 78-84.

Vasinauskiene, M.; Radusiene, J.; Zitikaite, I.; Surviliene, E. 2006. Antibacterial activities of essential oils from aromatic and medicinal plants against growth of phytopathogenic bacteria. Agronomy Research. 4: 437-440.

von Bodman, S.B., Dietz Bauer, W., Coplin, D.L. 2003. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. Annual Review of Phytopathology. 41: 455-82.

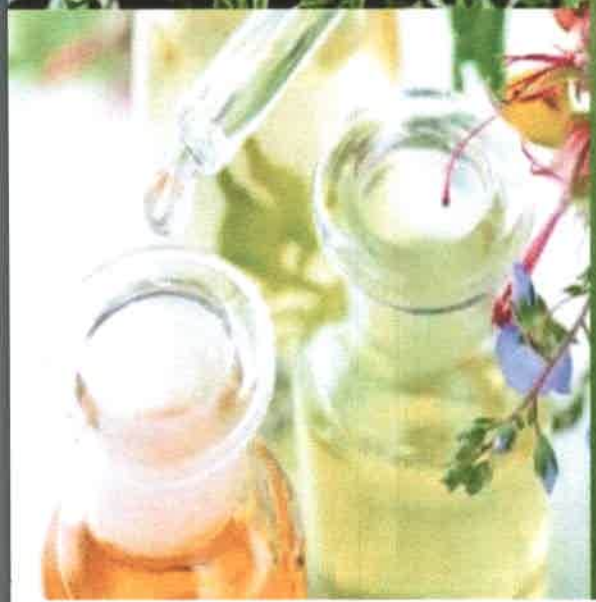
Wrather, J.; Anderson, T.; Arsyad, D.; Tan, Y.; Ploper, L.; Porta-Puglia, A.; Ram, H.; Yorinori, J. 2001. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean producing countries in 1998. Canadian Journal of Plant Pathology. 23(2): 115-121.

Ybran-Lancelli-2016-inta_informe_estadistico_del_mercado_de_soja.

Young, J. 2010. Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Pseudomonas* pathogens of stone fruits and nuts: classical and molecular phytobacteriology. Training course handbook. Journal of Plant Pathology. 92: S1.5-S1.14.

Young, J.; Lee, J. S.; Oh, J.; Choi, J.W.; Baik, H.S. 2008. Functional analysis of the role of fur in the virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 11528: fur controls expression of genes involved in quorum-sensing. Biochemical and Biophysical Research Communications. 366: 281-287.

Zygadlo, J.A.; Juliani, H.R. 2000. Bioactivity of essential oil components. Current Topics in Phytochemistry. 3: 203-214.



ANEXO

I. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS BACTERIANAS

1. Soluciones

- **Solución fisiológica**

ClNa	0,9 gr
Agua destilada	100 mL

- **Solución de resazurina al 0.01%**

Sal de Resazurina Sódica	0.01 gr
Agua destilada c.s.p.	100 mL

Se colocó 0.01 gr. de la sal de resazurina sódica en 100 mL de agua destilada estéril en un frasco de vidrio con tapa esterilizado. La solución de resazurina se disolvió por agitación y se conservó en heladera, en oscuridad.

- **Solución de Cristal Violeta al 1%**

Cristal violeta	1 gr.
Agua destilada c.s.p.	100 mL.

- **Solución balanceada de fosfatos (PBS)**

ClNa	8 gr.
ClK	0.2 gr.
PO4HNa2 + 2H2O	1.44 gr.
H2O bidestilada c.s.p.	1000 mL.

La solución se fraccionó en frascos de 200 mL. aproximadamente, se esterilizó a ¾ de atmósfera durante 30 minutos y se conservó hasta su uso a 4°C.

2. Medios de cultivo

2.a. Medios de cultivo para el aislamiento

- **Caldo Tripticasa- Soya**

Tripteina	17 gr
Peptona de soya	3 gr
Cloruro de sodio	5 gr
Fosfato dipotásico	2,5 gr
Glucosa	2,5 gr
Agua destilada c.s.p	1000 mL

- **Agar Tripticasa-Soya (ATS)**

Caldo Tripticasa Soya	1000 mL
Agar	17 gr

- **Extracto de levadura, dextrosa, CO_3Ca (YDCA)**

Extracto de levadura	10 gr
Dextrosa (glucosa)	20 gr
Carbonato de calcio	20 gr
Agua destilada c.s.p.	1000 mL
Agar	15 gr

Se preparó una solución concentrada (10X) de carbonato de calcio y se esterilizó en autoclave. Luego se agregó al medio de cultivo estéril, previamente fundido a la concentración adecuada.

- **Medio King B (KB):**

Tripteína soya	10 gr
Peptona de carne	10 gr
Fosfato dipotásico	1,5 gr
Agua destilada C.S.P.	1000 mL
Agar	10 gr
Glicerina	10 mL

- **Agar Cetrimide**

Peptona de gelatina	20 gr
SO4K2	10 gr
Cl_2Mg	1,4 gr
Cetrimide	0,3 gr
Agar-agar	13,6 gr
Agua destilada c.s.p.	1000 mL
pH 7,2	

2.b. Medios de cultivos para identificación fenotípica

- **Agar movilidad**

Caldo Tripticasa-Soya	1000 mL
Agar-agar	7,5 gr

- **Medio de nitrato de potasio**

Extracto de carne	3 gr
Peptona	5 gr
KNO^3	1 gr
Agua destilada	1000 mL
pH 7	

- **Medio de Citrato de Simmons**

Agar	20 gr
Cloruro de sodio	5 gr
Sulfato de magnesio	0,2 gr
Fosfato dihidrógeno de amonio	1 gr
Fosfato dipotásico	1 gr
Citrato de sodio	2 gr
Azul de bromotimol	0,08 gr
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

- **Agar triple de azúcar hierro (TSI)**

Peptona	20 gr
Cloruro de sodio	5 gr
Lactosa	10 gr
Sacarosa	10 gr
Glucosa	1 gr
Sulfato de hierro (II) y amonio	0,2 gr

Tiosulfato de sodio	0,2 gr
Rojo fenol	0,025 gr
Agar	13 gr
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

pH 7,3

- **Medio para Indol**

Peptona de carne	10 gr
ClNa	5 gr
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

pH 7,0

- **Medio de Clark y Lubs (caldo RM/VP)**

Polipeptona o peptona bufferada	7 gr
KH_2PO_4	5 gr
Glucosa	5 gr
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

pH 6,9

- **Medio para test oxidación-fermentación de la glucosa (O/F)**

Peptona	2 gr
ClNa	5 gr
PO4H2K	0,3 gr
Glucosa	0,1 gr

Agar	3 gr
Azul de bromotimol 1%	3 mL
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

pH 7,1

- **Caldo Medio mínimo + glucosa (0.1%) (CMM)**

Fosfato de potasio	1.5 gr
Fosfato de sodio	0.85gr
Sulfato de magnesio	0.1gr
Cloruro de amonio	2gr
Cloruro de calcio	0.01gr
Sulfato de hierro (III)	0.005gr
Glucosa	0.1%

Variante 1: Medio mínimo + glucosa (0.1%) + glutamina (0.0125%)

Variante 2: medio mínimo + glucosa (0.1%) + arginina (8.71%)

- **Agar Medio mínimo + glucosa (0.1%) (AMM)**

CMM	1000mL.
Agar-agar	17gr

- **Agar Medio para siringomicina SRM**:

$MgSO_4$ $7H_2O$	0.8mL (2.46 g/10 mL)
KH_2PO_4 (0.5 mol/L)	3.6 mL (0.68 g/10 mL)
K_2HPO_4 (0.5 mol/L)	6.4 mL (0.87 g/10 mL)

$FeCl_3$	100 µL
L-histidina	4 g
Sacarosa	10 g
Agar	20 g

(pH: 7)

3. Pruebas Bioquímicas

3.a- Prueba de catalasa (CAT)

Procedimiento: a partir de las colonias aisladas, se tomó una ansada y se emulsionó en un portaobjeto conteniendo una gota de agua oxigenada (30%).

Fundamento: se estudia la hidrólisis del peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) por la catalasa, dando lugar a agua y oxígeno. (Prats. 2008) La producción de burbujas indicó la presencia de la enzima catalasa por lo que la prueba fue considerada positiva. (Branson. 1974)

3.b-Oxidación-Fermentación de la glucosa (OF)

Procedimiento: para cada microorganismo se sembraron 2 tubos de medio de cultivo y se colocó una capa de parafina líquida estéril en uno de ellos. Luego se incubó a 28-30°C durante 24-48 h.

Fundamento: esta prueba permite diferenciar microorganismos que fermentan la glucosa de otros que no la fermentan. El ácido resultante produce un cambio de pH en el medio, visualizado por un cambio de color del indicador de pH azul de bromotimol.

Resultados:

-Fermentación: formación de ácido en ambos tubos abierto y cerrado. Viraje a amarillo en ambos tubos.

-Oxidación: formación de ácido en el tubo abierto solamente. Viraje a amarillo en ese tubo.

-Si no hay acidez en ninguno de los tubos, indica que el microorganismo investigado no utiliza la glucosa de ninguna manera.

3.c-Diferenciación de pigmentos en cultivos de *Pseudomonas* (King B)

Procedimiento: El medio King B se inoculó con una ansada de un cultivo de 24 h y se incubó a 28-30°C durante 24-48 h.

Interpretación: el medio King B propicia la mayor producción de pioverdina (amarillo). Se observa mejor con luz UV.

3.d-Reducción de nitratos (NO_3)

Procedimiento: a partir de un cultivo puro en CTS o CKB, se sembró el mismo en medio de nitrato de potasio. Al cabo de 24 h, a 28°C se le adicionó reactivo de nitrato (dimetil alfanaftilamina y ácido sulfanílico) a los tubos con crecimiento.

Reacción positiva: color rojo.

Reacción negativa: sin cambio de color.

Si no hay cambio de color se agrega polvo de zinc.

Fundamento: algunos microorganismos en condiciones de anaerobiosis tienen la propiedad de reducir los nitratos a nitritos o a nitrógeno libre por medio de la enzima nitrato reductasa, donde el nitrato sirve como aceptor final de electrones. La reducción de nitratos a nitritos está indicada por la aparición de color cuando los nitritos reaccionan con el reactivo formando un compuesto diazoico p-sulfobenceno-azo-alfa-naftilamina. Si no hay cambio de color debe agregarse polvo de zinc, ya que si los nitratos del medio no han sido reducidos, el zinc los reduce químicamente a nitrito y aparece el color rojo, con lo que se verifica la reacción negativa. Si se mantiene el medio incoloro los nitratos han pasado a nitrógeno libre por acción de la nitrito reductasa presente en los microorganismos, por lo que la prueba es considerada positiva. (Mc Faddin. 1980)

3.e-Prueba para indol (I)

Procedimiento: se inoculó el microorganismo en un caldo que contenía triptófano y se incubó durante 24 h a 28°C. El indol se detectó al añadir una solución alcohólica de p-dimetil-amino-benzaldehído (reactivo de Kovacs). Se agitó suavemente el tubo y se

observó el desarrollo de un anillo color rosa en la interface entre el caldo y el reactivo alcohólico, que sube a la superficie.

Reacción positiva: reactivo color rojo cereza.

Reacción negativa: el reactivo permanece amarillo.

Fundamento: los microorganismos que producen la enzima triptofanasa son capaces de degradar el triptófano a ácido pirúvico, amoníaco e indol. Este último se detecta por su combinación con el aldehído indicador que forma una coloración roja de la fase alcohólica. (Finegold and Baron. 1989)

3.f-Prueba de rojo de metilo (RM) (fermentación ácida mixta)

Procedimiento: a partir de un cultivo bacteriano se sembró un inóculo en el medio de Clark y Lubs; se incubó durante 24 h a 28°C y luego se agregaron unas gotas de rojo de metilo.

Reacción positiva: viraje al rojo.

Reacción negativa: viraje al amarillo.

Fundamento: la fermentación ácida mixta forma etanol y ácido láctico, acético, fórmico y succínico, que producen en el medio una elevada acidez (pH 4,5). Esta acidez se detecta añadiendo un indicador de pH (rojo de metilo), que vira a rojo a un pH 4,5 o menor. (García Martos. et al. 1997)

3.g-Prueba de Voges Proskauer (VP) (fermentación butilenglicólica)

Procedimiento: a partir de un cultivo bacteriano se sembró un inóculo en el medio de Clark y Lubs, se incubó durante 24 h a 30°C. Se tomó 1 mL de cultivo y se adicionó 0,6 mL de alfa naftol al 5% (p/v) (intensificador de color) disuelto en etanol absoluto, se mezcló y se adicionó 0,2 mL de solución acuosa de KOH al 40% (oxidante). Se incubó en posición inclinada a 30°C. Se examinó después de 15 a 60 minutos. (Smibert and Krieg. 1981)

Reacción positiva: color rojo.

Reacción negativa: incoloro.

Fundamento: esta prueba detecta la producción de acetoína a partir del ácido pirúvico en la degradación de la glucosa. La acetoína es oxidada a diacetilo, que a su vez se

combina con determinados compuestos de las peptonas virando el color del reactivo a rojo en cinco minutos. (Prats. 2008)

3.h- Prueba de citrato (CIT)

Procedimiento: el microorganismo se inoculó en la superficie de un tubo con agar inclinado de citrato de Simmons, en presencia de oxígeno. El medio se incubó a 28°C durante 24 h. El desarrollo de los microorganismos en la superficie del pico de flauta (zona inclinada), con viraje del color verde a azul o azul turquesa, indicó que el organismo alcalinizó el medio por producción de acetato u otra sal alcalina carboxilada a partir del citrato.

Reacción positiva: viraje de verde a azul.

Reacción negativa: el reactivo permanece amarillo. (Finegold and Baron. 1989)

Fundamento: es un medio sintético que lleva como única fuente de carbono el citrato sódico y azul de bromotimol como indicador. Las bacterias capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono y energía crecerán alcalinizando el medio por la utilización del citrato y la producción de cloruro de amonio. (Prats. 2008)

3.i- Movilidad (MOV)

Procedimiento: el microorganismo se inoculó en ATS o AKB semi-sólido punzando con ansa recta, hasta una profundidad de 2 cm. Luego de 18-24 h de incubación a 28°C, la movilidad se hizo evidente como un crecimiento difuso que se extendió desde la línea de incubación, mientras que las inmóviles desarrollaron sólo en la picadura. (Finegold and Baron. 1989)

3.j-Reacciones en agar triple azúcar hierro (TSI)

Procedimiento: se tomó con ansa recta una pequeña alícuota de una colonia pura y se inoculó en el medio perforando la parte inferior de la columna de agar hasta el fondo del tubo y marcando una estría sobre la superficie del agar inclinado. Se incubó a 28°C durante 24h.

Fundamento: el medio TSI, puede emplearse para la identificación inicial de los bacilos Gram negativo, en especial de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Este medio detecta la capacidad de producir gas por la fermentación de azúcares (se visualiza usualmente como burbujas o fractura de la columna de medio), la producción de sulfuro de hidrógeno gaseoso (formación de un precipitado negro que contiene hierro) y la capacidad para fermentar lactosa y sacarosa.

Contiene una cantidad limitante de glucosa y una concentración diez veces mayor de lactosa. Los fermentadores de glucosa comienzan metabolizando este azúcar. Una vez ha reducido toda la glucosa disponible a piruvato, comenzará a metabolizarlo formando productos finales ácidos, lo que hace virar al indicador de pH rojo fenol a amarillo. Si el microorganismo no fermenta la glucosa, no se producirán cambios de color. En algunos casos se alcalinizará, lo que se puede visualizar por un color rojo más intenso que el del medio original, demostrando que el organismo no es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae*.

Después de haber agotado la glucosa, los microorganismos utilizan la lactosa o sacarosa que se encuentran diez veces más concentradas formando productos finales ácidos. Luego de 18-24 h de incubación todo el medio TSI permanecerá de color amarillo (ácido sobre ácido (ac/ac) y el organismo se identifica como un fermentador de lactosa. Si no es capaz de usar la lactosa, utiliza las proteínas y aminoácidos del medio como fuentes nutritivas observándose en la superficie de la zona inclinada donde el oxígeno es abundante. Los productos de degradación de la peptona (como el amoníaco) son alcalinos y provocan el viraje del indicador rojo fenol a su color rojo original (alc/alc). (Finegold and Baron. 1989)

4. Tablas de producción de biofilm (DO 570nm)

Tabla 1: Producción de biofilm por cepas aisladas de soja

		DO 570nm			
CEPAS	**ESPECIE**	**Exp. 1**	**Exp. 2**	**Promedio**	**Desvío Estandar**
A5	*Pseudomonas* sp.	2,126	1,1742	1,6501	0,67302423
C13	*Pseudomonas* sp.	1,7178	1,0802	1,399	0,45085128
EM1	*Pseudomonas* sp.	2,083	1,4176	1,7503	0,47050885
LS3	*Pseudomonas* sp.	1,5518	1,3502	1,451	0,14255273
Q	*Pseudomonas* sp.	2,1445	1,002	1,57325	0,8078695
VT2	*Pseudomonas* sp.	2,0078	1,164	1,5859	0,5966567
Xa	*X. axonopodis*	1,846	1,2	1,523	0,45679098

I. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PRODUCTOS NATURALES DE *THYMUS VULGARIS* Y *ORIGANUM VULGARE*

1. Cromatografía de aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*

Tabla 2: Cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (GC-MS) del AE de tomillo.

TIEMPO RETENCION	COMPUESTOS	%
10,4	alpha thujene	1,7
10,69	alpha pinene	1,6
11,34	alpha fenchene	0,8
12,35	beta pinene	1,1
12,68	myrcene	1,8
12,96	3-octanol	tr
13,37	alpha phellandrene	tr
13,46	3-carene	tr

13,75	alpha terpinene	1,7
14,08	p-cymene	31,5
14,37	1,8-cineole	2,4
15,3	gamma terpinene	11,3
15,74	terpinolene	1,5
16,43	para-cymenene	tr
16,72	linalool	3,5
16,87	sabinene hydrate cis	tr
18,54	camphor	tr
19,38	borneol	1
19,64	4-terpineol	1,2
19,82	p-cymen-8-ol	tr
20,14	alpha terpineol	tr
21,4	thymol methyl ether	1,7
21,9	geraniol	tr
22,55	geramial	tr
22,76	thymol	1
23,13	carvacrol	29,5
25,67	isobornyl acetate	tr
25,78	alpha copaene	tr
26,04	beta bourbonene	tr
27,16	longifolene	3,6
28,5	alpha cadinene	1,1
29,17	gamma muurolene	tr
29,61	gamma cadinene	tr
29,7	delta cadinene	tr
29,85	calamenene 1S, cis	tr
31,57	oxide caryophyllene	1,3
		99,3

Tabla 3: Cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (GC-MS) del AE de orégano

TIEMPO RETENCION	COMPUESTOS	%
10,35	alpha thujene	0,6

10,66	alpha pinene	tr
11,28	alpha fenchene	tr
12,12	sabinene	1,8
12,32	octanone 3	tr
12,5	trans-2-octen-1-ol	tr
12,65	myrcene	1,2
13,75	alpha terpinene	2,4
14,06	p-cymene	11,5
14,2	limonene	tr
14,28	beta phellandrene	tr
14,38	cis ocimene	3,9
14,77	trans ocimene	0,6
15,27	gamma terpinene	22,7
15,75	terpinolene	2,1
16,86	sabinene hydrate cis	19,7
17,71	sabinene hydrate trans	tr
19,4	borneol	0,6
19,67	4-terpineol	5,1
20,11	alpha terpineol	1,8
21,41	thymol methyl ether	1,5
23,07	thymol	1,5
23,33	carvacrol	19,7
27,12	beta caryophyllene	2,7
		99,4

2. Actividad antimicrobiana de Extractos vegetales

Tabla 4: Técnica de disco con productos naturales de tmillo y Orégano
(halos de inhibición en cm)

Aislamientos Bacterianos		EA		EH		EC		EP	
		O	T	O	T	O	T	O	T
VT2	*Pseudomonas* sp.	-	-	-	-	-	-	-	-
C13	*Pseudomonas* sp.	-	-	-	-	-	-	-	-
LS3	*Pseudomonas* sp.	-	-	-	-	-	-	-	-
EM1	*Pseudomonas* sp.	-	-	-	-	-	-	-	-
Q	*Pseudomonas* sp.	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudomonas syringae									
Ps 5	*P. syringae* pv. *atropurpurea**	-	1,05	-	-	-	-	-	-
6605	*P. syringae* pv. *tabaci**	-	0.9	-	-	-	-	-	NR
DC3000	*P. syringae* pv. *tomato**	1,05	1,05	-	-	-	-	-	-
P 61	*P. syringae* pv. *syringae**	-	-	-	-	-	-	-	-
B076	*P. savastanoi* pv. *glycinea**	-	-	-	-	-	-	-	-

Ref.: EAO: Extracto Alcohólico de Orégano, **EHO:** Extracto Hexánico de Orégano, **ECO:** Extracto Clorofórmico de Orégano, **EPO:** Extracto Propanólico de Orégano, **AEO:** Aceite Esencial de Orégano, ***:** cepas de referencia.

3. Actividad antimicrobiana de AE

Tabla 5: CIM y ½ CIM de AE *T. vulgaris* y *O. vulgare*

Aislamientos bacterianos	*T. vulgaris* (mg/mL)		*O. vulgare* (mg/mL)	
	CIM	1/2CIM	CIM	1/2CIM
Pseudomonas sp. A5	11,5	5.75	46.3	23.15
Pseudomonas sp. C13	11,5	5.75	5.8	2.9
Pseudomonas sp. EM1	11,5	5.75	11.6	5.8
Pseudomonas sp. LS3	11,5	5.75	46.3	23.15
Pseudomonas sp. Q	11,5	5.75	23.15	11.6
Pseudomonas sp. VT2	NI	NI	23.15	11.6
P. syringae pv. *atropurpurea* Ps5	5.7	2.85	11.6	5.8
P. syringae pv. *syringae* P61	11,5	5.75	23.15	11.6

Ref.: NI: No Inhibe

4.Análisis estadístico de decocción de *T. vulgaris* sobre la producción de biofilm

4.a) *Pseudomonas* sp. A5:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
A 5	27	0,97	0,96	6,64

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

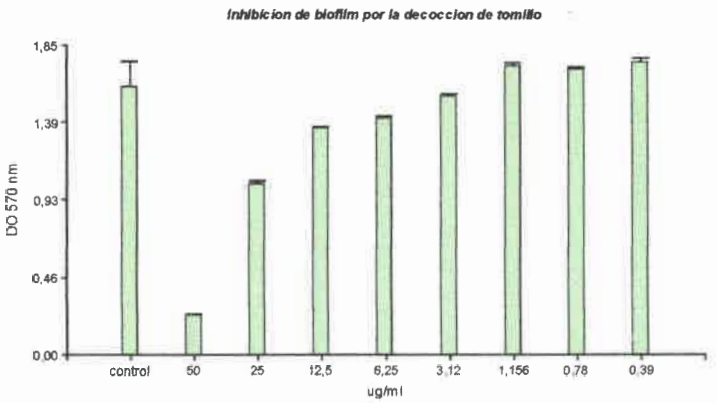
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		5,65	8	0,71	84,80	<0,0001
Decoccion		5,65	8	0,71	84,80	<0,0001
Error	0,15	18	0,01			
Total	5,80	26				

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,15652

Error: 0,0083 gl: 18

Decoccion		Medias	n	E.E.					
50	0,24	3	0,05	A					
25	1,02	3	0,05		B				
12,5	1,36	3	0,05			C			
6,25	1,42	3	0,05			C	D		
3,12	1,54	3	0,05				D	E	
control	1,60	3	0,05					E	F
0,78	1,70	3	0,05						F
1,156	1,73	3	0,05						F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



4.b) *Pseudomonas* sp. C13:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
C 13	27	0,97	0,96	40,58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		6,29	8	0,79	78,27	<0,0001
Decoccion		6,29	8	0,79	78,27	<0,0001
Error	0,18	18	0,01		
Total	6,47	26			

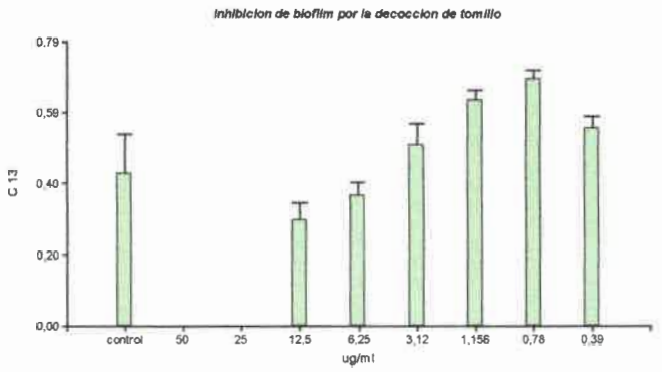
Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,17195

Error: 0,0100 gl: 18

Decoccion	Medias	n	E.E.		
50	-0,78	3	0,06	A	
25	-0,46	3	0,06		B

12,5	0,29	3	0,06		C			
6,25	0,37	3	0,06		C	D		
control	0,42	3	0,06		C	D	E	
3,12	0,50	3	0,06			D	E	F
0,39	0,55	3	0,06				E	F
1,156	0,63	3	0,06					F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



4.c) *Pseudomonas* sp. EM1:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
EM 1	27	0,82	0,75	24,87

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		2,77	8	0,35	10,51	<0,0001
Decoccion		2,77	8	0,35	10,51	<0,0001
Error	0,59	18	0,03		
Total	3,37	26			

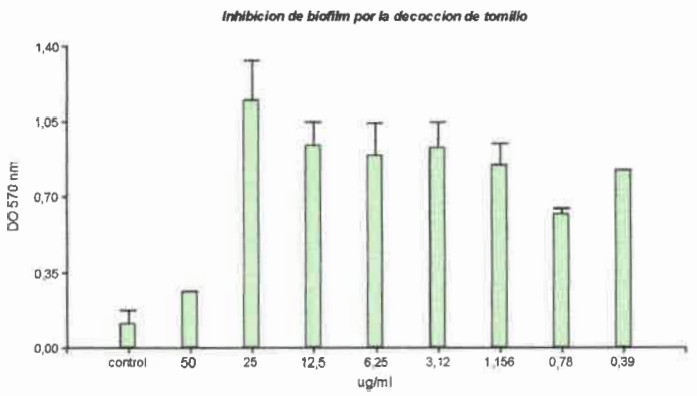
Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,31164

Error: 0,0330 gl: 18

Decoccion	Medias	n	E.E.		
control	0,11	3	0,10	A	
50	0,26	3	0,10	A	
0,78	0,62	3	0,10		B

0,39	0,82	3	0,10	B	C	
1,156	0,85	3	0,10	B	C	D
6,25	0,89	3	0,10	B	C	D
3,12	0,93	3	0,10	B	C	D
12,5	0,94	3	0,10		C	D
25	1,15	3	0,10			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



4.d) *Pseudomonas* sp. LS3:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
LS 3	27	0,85	0,79	13,13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		5,24	8	0,65	13,18	<0,0001
Decoccion		5,24	8	0,65	13,18	<0,0001
Error	0,89	18	0,05			
Total	6,13	26				

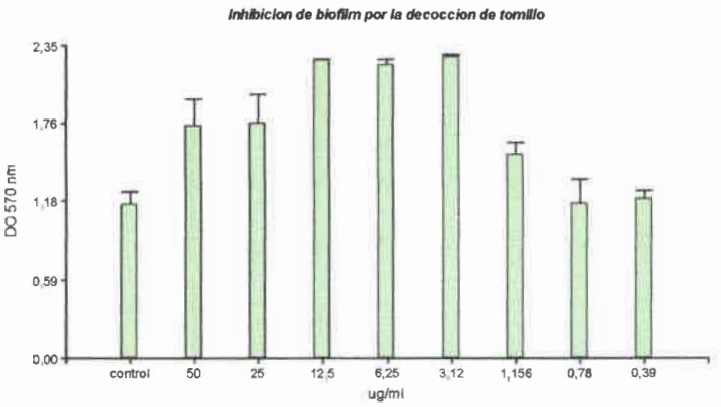
Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,38245

Error: 0.0497 gl: 18

Decoccion	Medias	n	E.E.	
control	1,15	3	0,13	A
0,78	1,17	3	0,13	A
0,39	1,20	3	0,13	A

1,156	1,53	3	0,13	A	B	
50	1,75	3	0,13		B	
25	1,76	3	0,13		B	
6,25	2,21	3	0,13			C
12,5	2,24	3	0,13			C
3,12	2,27	3	0,13			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



4.e) *Pseudomonas* sp. Q:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Q	27	0,30	0,00	177,40

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		2,01	8	0,25	0,97	0,4895
Decoccion		2,01	8	0,25	0,97	0,4895
Error	4,66	18	0,26		
Total	6,67	26			

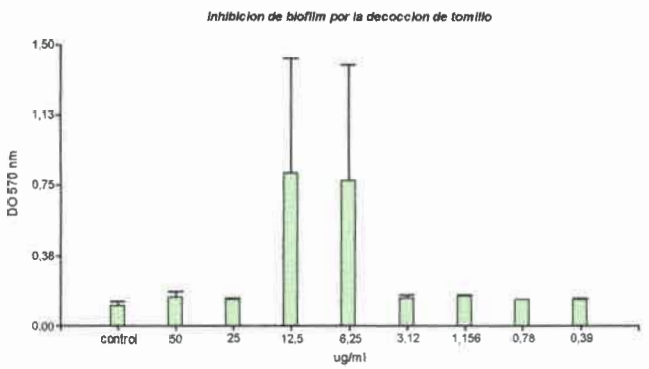
Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,87302

Error: 0,2590 gl: 18

Decoccion	Medias	n	E.E.	
control	0,11	3	0,29	A
0,78	0,14	3	0,29	A

25	0,14	3	0,29	A
0,39	0,14	3	0,29	A
3,12	0,15	3	0,29	A
50	0,15	3	0,29	A
1,156	0,16	3	0,29	A
6,25	0,78	3	0,29	A
12,5	0,81	3	0,29	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



4.f) *Pseudomonas* sp. VT2:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
VT 2	27	0,61	0,43	4,77

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0,33	8	0,04	3,49	0,0131
Decoccion		0,33	8	0,04	3,49	0,0131
Error	0,21	18	0,01		
Total	0,54	26			

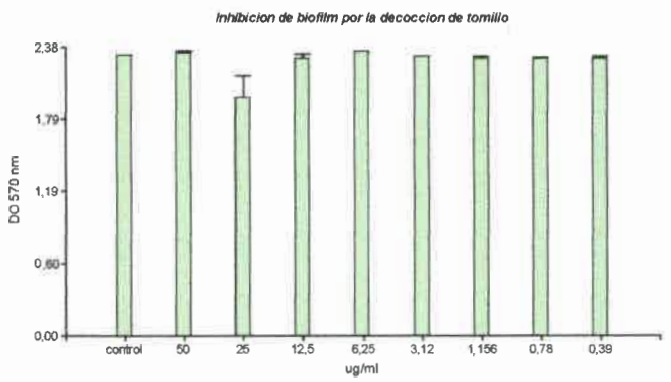
Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,18609

Error: 0.0118 gl: 18

Decoccion	Medias	n	E.E.		
25	1,96	3	0,06	A	
12,5	2,29	3	0,06		B

0,39	2,30	3	0,06	B
1,156	2,30	3	0,06	B
0,78	2,30	3	0,06	B
3,12	2,31	3	0,06	B
control	2,32	3	0,06	B
50	2,34	3	0,06	B
6,25	2,34	3	0,06	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



4.g) *P. syringae* pv. *atropurpurea* Ps5:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
PS 5	27	0,69	0,55	46,27

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		4,31	8	0,54	4,92	0,0024
Decoccion		4,31	8	0,54	4,92	0,0024
Error	1,97	18	0,11		
Total	6,27	26			

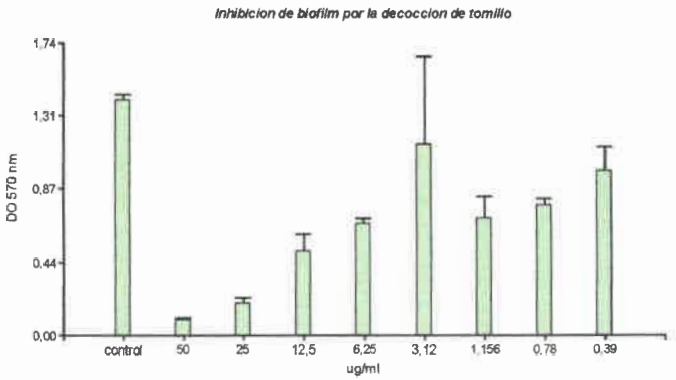
Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,56739

Error: 0,1094 gl: 18

Decoccion	Medias	n	E.E.		
50	0,09	3	0,19	A	
25	0,19	3	0,19	A	B

12,5	0,50	3	0,19	A	B	C		
6,25	0,66	3	0,19		B	C	D	
1,156	0,70	3	0,19		B	C	D	
0,78	0,78	3	0,19			C	D	
0,39	0,98	3	0,19			C	D	E
3,12	1,14	3	0,19				D	E
control	1,40	3	0,19					E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



4.h) *P. syringae* pv. *syringae* P61:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
P 61	27	0,51	0,29	39,57

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0,80	8	0,10	2,31	0,0670
Decoccion		0,80	8	0,10	2,31	0,0670
Error	0,78	18	0,04		
Total	1,57	26			

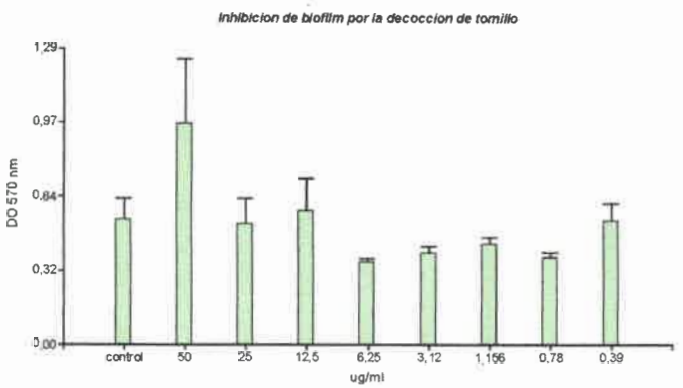
Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,35629

Error: 0,0431 gl: 18

Decoccion	Medias	n	E.E.	
6,25	0,36	3	0,12	A
0,78	0,38	3	0,12	A
3,12	0,40	3	0,12	A
1,156	0,44	3	0,12	A

25	0,52	3	0,12	A
0,39	0,54	3	0,12	A
control	0,54	3	0,12	A
12,5	0,58	3	0,12	A
50	0,96	3	0,12	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



4.i) *P. syringae* pv. *tomato* DC3000:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
DC 3000	27	0,88	0,83	37,66

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		7,14	8	0,89	16,70	<0,0001
Decoccion		7,14	8	0,89	16,70	<0,0001
Error	0,96	18	0,05			
Total	8,10	26				

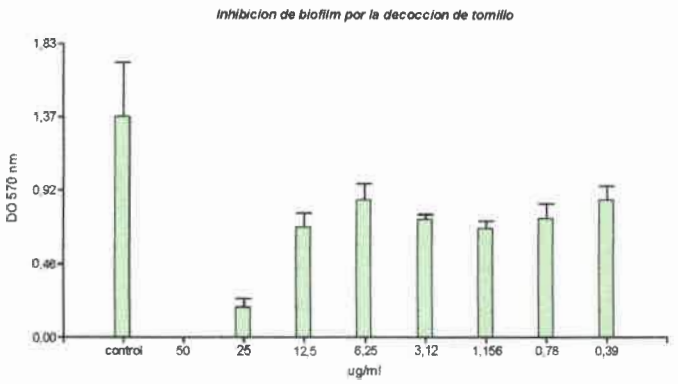
Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,39652

Error: 0.0534 gl: 18

Decoccion	Medias	n	E.E.			
50	-0,59	3	0,13	A		
25	0,18	3	0,13		B	
1,156	0,67	3	0,13			C
12,5	0,69	3	0,13			C

3,12	0,74	3	0,13	C
0,78	0,74	3	0,13	C
0,39	0,86	3	0,13	C
6,25	0,86	3	0,13	C
control	1,37	3	0,13	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



5. Análisis estadístico de decocción de orégano sobre la producción de biofilm

5.a) *Pseudomonas* sp. A5:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
A 5	26	0,85	0,77	14,67

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		1,83	8	0,23	11,76	<0,0001
Decoccion		1,83	8	0,23	11,76	<0,0001
Error	0,33	17	0,02			
Total	2,16	25				

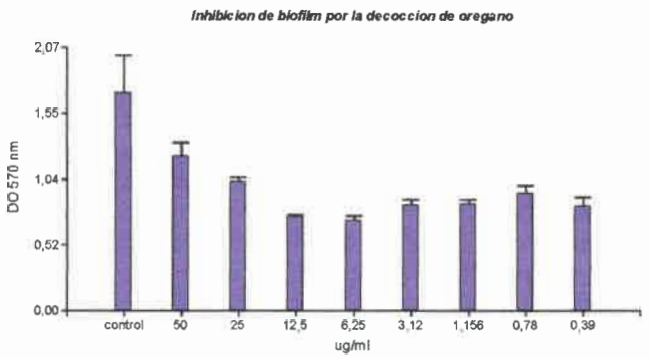
Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,24683

Error: 0,0194 gl: 17

Decoccion	Medias	n	E.E.	
6,25	0,71	3	0,08	A
12,5	0,74	3	0,08	A

0,39	0,82	3	0,08	A	B		
3,12	0,83	3	0,08	A	B		
1,156	0,84	3	0,08	A	B		
0,78	0,92	3	0,08	A	B		
25	1,01	3	0,08		B	C	
50	1,21	3	0,08			C	
control	1,72	2	0,10				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



5.b) Pseudomonas sp. C13:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
C 13	26	0,67	0,52	26,15

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		5,36	8	0,67	4,38	0,0050
Decoccion		5,36	8	0,67	4,38	0,0050
Error	2,60	17	0,15		
Total	7,96	25			

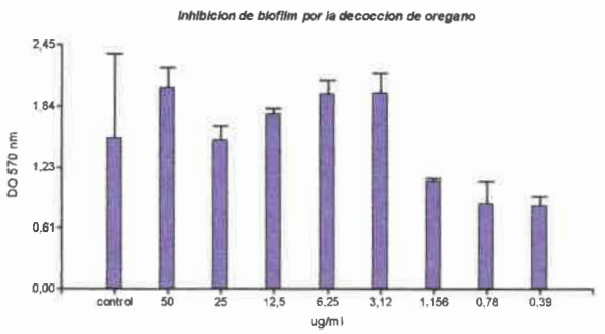
Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,69187

Error: 0,1528 gl: 17

Decoccion	Medias	n	E.E.	
0,39	0,84	3	0,23	A
0,78	0,85	3	0,23	A
1,156	1,08	3	0,23	A

25	1,49	3	0,23	A	B
control	1,51	2	0,28	A	B
12,5	1,76	3	0,23		B
6,25	1,95	3	0,23		B
3,12	1,96	3	0,23		B
50	2,02	3	0,23		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



5.c) Pseudomonas sp. *EM1:*

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
EM 1	26	0,73	0,60	19,42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		2,56	8	0,32	5,61	0,0014
Decoccion		2,56	8	0,32	5,61	0,0014
Error	0,97	17	0,06		
Total	3,53	25			

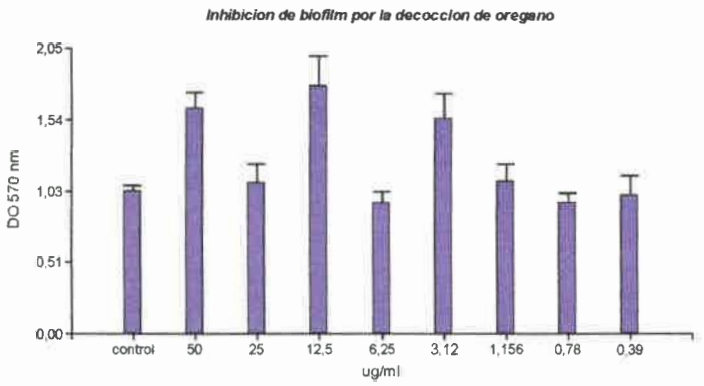
Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,42296

Error: 0,0571 gl: 17

Decoccion	Medias	n	E.E.	
6,25	0,94	3	0,14	A
0,78	0,94	3	0,14	A
0,39	0,99	3	0,14	A

control	1,02	2	0,17	A	
25	1,09	3	0,14	A	
1,156	1,09	3	0,14	A	
3,12	1,54	3	0,14		B
50	1,62	3	0,14		B
12,5	1,78	3	0,14		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



5.d) *Pseudomonas* sp. LS3:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
LS 3	26	0,78	0,67	11,45

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		3,49	8	0,44	7,37	0,0003
Decoccion		3,49	8	0,44	7,37	0,0003
Error	1,01	17	0,06		
Total	4,49	25			

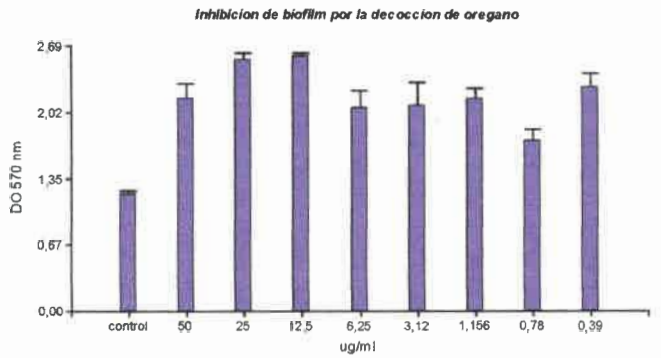
Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,43047

Error: 0,0592 gl: 17

Decoccion	Medias	n	E.E.			
control	1,19	2	0,17	A		
0,78	1,73	3	0,14		B	
6,25	2,06	3	0,14		B	C
3,12	2,09	3	0,14		B	C
50	2,16	3	0,14			C D

1,156	2,16	3	0,14		C	D	
0,39	2,27	3	0,14		C	D	E
25	2,55	3	0,14			D	E
12,5	2,58	3	0,14				E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



5.e) *Pseudomonas* sp. Q:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Q	26	0,84	0,76	34,63

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		7,01	8	0,88	11,02	<0,0001
Decoccion		7,01	8	0,88	11,02	<0,0001
Error	1,35	17	0,08		
Total	8,36	25			

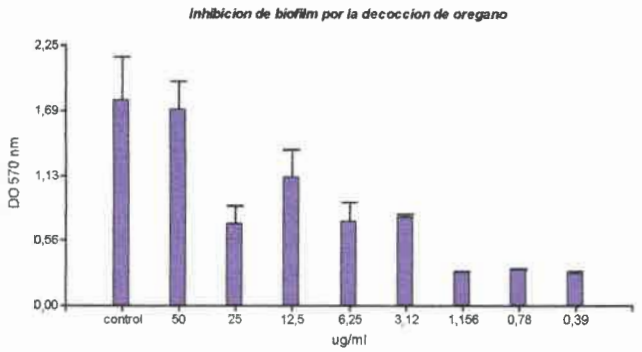
Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,49921

Error: 0,0796 gl: 17

Decoccion	Medias	n	E.E.			
0,39	0,28	3	0,16	A		
1,156	0,28	3	0,16	A	B	
0,78	0,31	3	0,16	A	B	
25	0,71	3	0,16	A	B	C
6,25	0,72	3	0,16	A	B	C
3,12	0,77	3	0,16		B	C

12,5	1,11	3	0,16	C	
50	1,70	3	0,16		D
control	1,78	2	0,20		D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



5.f) *Pseudomonas* sp. VT2:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
VT 2	26	0,43	0,16	35,74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		2,16	8	0,27	1,60	0,1963
Decoccion		2,16	8	0,27	1,60	0,1963
Error	2,86	17	0,17		
Total	5,03	25			

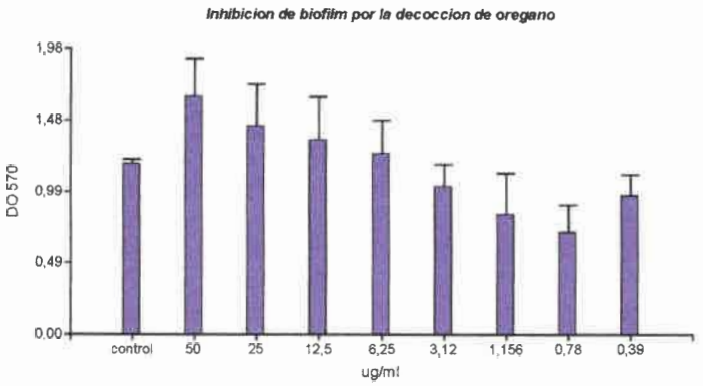
Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,72645

Error: 0,1685 gl: 17

Decoccion	Medias	n	E.E.			
0,78	0,71	3	0,24	A		
1,156	0,83	3	0,24	A	B	
0,39	0,96	3	0,24	A	B	C
3,12	1,02	3	0,24	A	B	C
control	1,18	2	0,29	A	B	C
6,25	1,24	3	0,24	A	B	C
12,5	1,34	3	0,24	A	B	C

25	1,43	3	0,24	B	C
50	1,64	3	0,24		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



5.g) *P. syringae* pv. *atropurpurea Ps5:*

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
PS 5	26	0,75	0,63	28,88

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		9,91	8	1,24	6,41	0,0007
Decoccion		9,91	8	1,24	6,41	0,0007
Error	3,29	17	0,19		
Total	13,19	25			

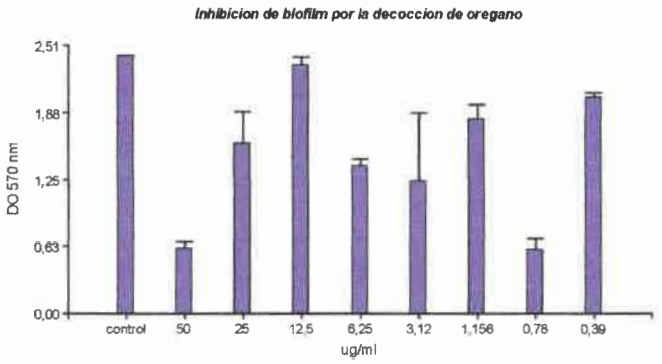
Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,77804

Error: 0,1933 gl: 17

Decoccion	Medias	n	E.E.			
0,78	0,60	3	0,25	A		
50	0,61	3	0,25	A		
3,12	1,24	3	0,25	A	B	
6,25	1,38	3	0,25		B	C
25	1,59	3	0,25		B	C	D
1,156	1,82	3	0,25		B	C	D
0,39	2,02	3	0,25			C	D

12,5	2,33	3	0,25	D
control	2,41	2	0,31	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



5.h) *P. syringae* pv. *syringae* P61:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
P 61	26	0,86	0,80	18,28

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		2,89	8	0,36	13,53	<0,0001
Decoccion		2,89	8	0,36	13,53	<0,0001
Error	0,45	17	0,03		
Total	3,34	25			

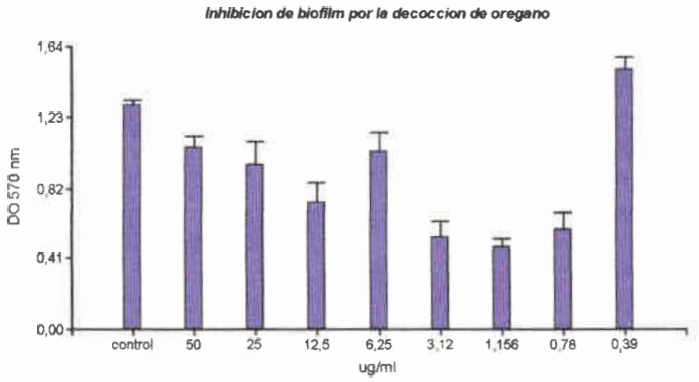
Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,28921

Error: 0,0267 gl: 17

Decoccion	Medias	n	E.E.					
1,156	0,48	3	0,09	A				
3,12	0,54	3	0,09	A				
0,78	0,58	3	0,09	A				
12,5	0,74	3	0,09	A	B			
25	0,96	3	0,09		B	C		
6,25	1,04	3	0,09			C	D	
50	1,05	3	0,09			C	D	
control	1,30	2	0,12				D	E

0,39	1,51	3	0,09	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



5.i) P. syringae pv. *tomato* DC3000:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
DC 3000	26	0,53	0,31	22,74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		2,05	8	0,26	2,41	0,0607
Decoccion		2,05	8	0,26	2,41	0,0607
Error	1,81	17	0,11		
Total	3,86	25			

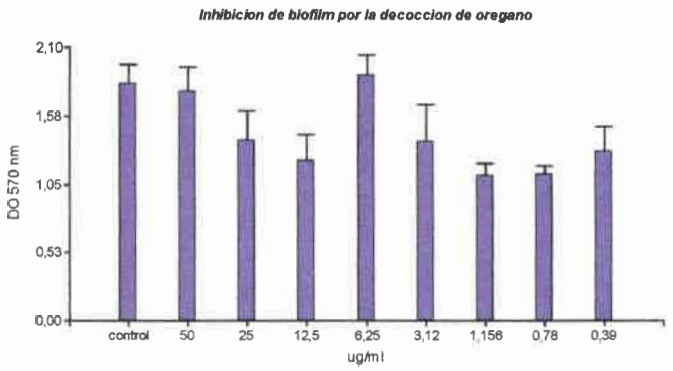
Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,57764

Error: 0,1065 gl: 17

Decoccion	Medias	n	E.E.			
1,156	1,12	3	0,19	A		
0,78	1,13	3	0,19	A		
12,5	1,23	3	0,19	A	B	
0,39	1,31	3	0,19	A	B	
3,12	1,38	3	0,19	A	B	C
25	1,39	3	0,19	A	B	C
50	1,77	3	0,19		B	C
control	1,83	2	0,23		B	C

6,25	1,89	3	0,19	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



6. Inhibición de la producción de biofilm por AE de *T. vulgaris* a las 48 h

6.a) *Pseudomonas* sp. A5:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
A5	8	0,95	0,93	22,33

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0,27	2	0,14	49,68	0,0005
Columna1		0,27	2	0,14	49,68	0,0005
Error	0,01	5	2,7E-03		
Total	0,28	7			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,11844

Error: 0.0027 gl: 5

Columna1	Medias	n	E.E.		
CIM	0,00	3	0,03	A	
1/2 CIM		0,34	3	0,03	B
Control	0,42	2	0,04		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

6.b) *Pseudomonas* sp. C13:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
C13	8	0,74	0,64	63,92

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,17	2	0,08	7,21	0,0336
Columna1	0,17	2	0,08	7,21	0,0336
Error	0,06	5	0,01		
Total	0,23	7			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,24507

Error: 0,0117 gl: 5

Columna1	Medias	n	E.E.		
CIM	0,00	3	0,06	A	
1/2 CIM	0,21	3	0,06	A	B
Control	0,37	2	0,08		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

6.c) *Pseudomonas* sp. EM1:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
EM 1	8	0,96	0,94	38,18

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,87	2	0,43	57,51	0,0004
Columna1	0,87	2	0,43	57,51	0,0004
Error	0,04	5	0,01		
Total	0,91	7			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,19690

Error: 0,0075 gl: 5

Columnal		Medias	n	E.E.	
CIM	0,00	3	0,05	A	
1/2 CIM		0,08	3	0,05	A
Control	0,80	2	0,06		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

6.d) *Pseudomonas* sp. LS3:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
LS 3	8	0,82	0,75	47,96

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0,11	2	0,05	11,66	0,0131
Columnal		0,11	2	0,05	11,66	0,0131
Error	0,02	5	4,7E-03		
Total	0,13	7			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,15536

Error: 0,0047 gl: 5

Columnal		Medias	n	E.E.	
CIM	0,00	3	0,04	A	
1/2 CIM		0,19	3	0,04	B
Control	0,29	2	0,05		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

6.e) *Pseudomonas* sp. Q:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Q	8	0,66	0,53	156,67

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0,22	2	0,11	4,89	0,0666

Columnal	0,22	2	0,11	4,89	0,0666
Error	0,11	5	0,02		
Total	0,33	7			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,34053

Error: 0,0226 gl: 5

Columnal	Medias	n	E.E.	
1/2 CIM	0,00	3	0,09	A
CIM	0,00	3	0,09	A
Control	0,38	2	0,11	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

6.f) *P. syringae* pv. *syringae* P61:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
P61	8	0,91	0,87	54,13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,03	2	0,02	23,85	0,0028
Columnal	0,03	2	0,02	23,85	0,0028
Error	3,6E-03	5	7,1E-04		
Total	0,04	7			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,06043

Error: 0,0007 gl: 5

Columnal	Medias	n	E.E.	
CIM	0,00	3	0,02	A
1/2 CIM	0,02	3	0,02	A
Control	0,16	2	0,02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

6.g) *P. syringae* pv. *tomato* DC3000:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV

DC 3000	8	0,94	0,92	53,22

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,06	2	0,03	42,36	0,0007
Columna1	0,06	2	0,03	42,36	0,0007
Error	3,3E-03	5	6,6E-04		
Total	0,06	7			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,05807

Error: 0,0007 gl: 5

Columna1	Medias	n	E.E.	
1/2 CIM	0,00	3	0,01	A
CIM	0,00	3	0,01	A
Control	0,19	2	0,02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

7. Inhibición de la producción de biofilm por AE de *O. vulgare* a las 48 h

7.a) *Pseudomonas* sp. A5:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
A5	8	0,94	0,91	56,75

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,09	2	0,04	37,26	0,0010
Columna1	0,09	2	0,04	37,26	0,0010
Error	0,01	5	1,1E-03		
Total	0,09	7			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,07671

Error: 0,0011 gl: 5

Columna1	Medias	n	E.E.	
1/2 CIM	0,00	3	0,02	A
CIM	0,00	3	0,02	A

Control	0,24	2	0,02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

7.b) *Pseudomonas* sp. C13:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
C13	7	0,59	0,38	63,04

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0,03	2	0,01	2,85	0,1703
Columna1		0,03	2	0,01	2,85	0,1703
Error	0,02	4	4,8E-03		
Total	0,05	6			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,18198

Error: 0,0048 gl: 4

Columna1	Medias	n	E.E.	
CIM	0,06	3	0,04	A
Control	0,09	2	0,05	A
1/2 CIM	0,21	2	0,05	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

7.c) *Pseudomonas* sp. EM1:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
EM1	8	0,64	0,50	71,14

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0,13	2	0,07	4,52	0,0757
Columna1		0,13	2	0,07	4,52	0,0757
Error	0,07	5	0,01		
Total	0,20	7			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,27254

Error: 0,0145 gl: 5

Columna1		Medias	n	E.E.	
1/2 CIM		0,06	3	0,07	A
CIM	0,13	3	0,07	A	B
Control	0,39	2	0,09		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

7.d) *Pseudomonas* sp. LS3:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
LS3	8	0,98	0,97	32,89

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0,25	2	0,13	110,93	0,0001
Columna1		0,25	2	0,13	110,93	0,0001
Error	0,01	5	1,1E-03		
Total	0,26	7			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,07671

Error: 0,0011 gl: 5

Columna1		Medias	n	E.E.	
1/2 CIM		0,00	3	0,02	A
CIM	0,00	3	0,02	A	
Control	0,41	2	0,02		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

7.e) *Pseudomonas* sp. Q:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Q	6	0,57	0,29	161,46

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0,06	2	0,03	2,01	0,2797

Columna1	0,06	2	0,03	2,01	0,2797
Error	0,05	3	0,02		
Total	0,11	5			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,40337

Error: 0,0161 gl: 3

Columna1	Medias	n	E.E.	
1/2 CIM	0,00	2	0,09	A
CIM	0,01	2	0,09	A
Control	0,23	2	0,09	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

7.f) *P. syringae* pv. *syringae* P61:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
P 61	8	0,39	0,14	124,38

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,01	2	4,4E-03	1,57	0,2948
Columna1	0,01	2	4,4E-03	1,57	0,2948
Error	0,01	5	2,8E-03		
Total	0,02	7			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,12019

Error: 0,0028 gl: 5

Columna1	Medias	n	E.E.	
CIM	0,00	3	0,03	A
1/2 CIM	0,06	3	0,03	A
Control	0,07	2	0,04	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

7.g) *P. syringae* pv. *tomato* DC3000:

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV

DC 3000	7	0,75	0,62	67,01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0,22	2	0,11	5,96	0,0631
Columnal		0,22	2	0,11	5,96	0,0631
Error	0,07	4	0,02		
Total	0,29	6			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,35407

Error: 0,0183 gl: 4

Columnal		Medias	n	E.E.		
CIM	0,00	3	0,08	A		
1/2 CIM		0,32	2	0,10	A	B
Control	0,39	2	0,10		B	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

8. Inhibición de la producción de biofilm por AE de *T. vulgaris* a las 24 h

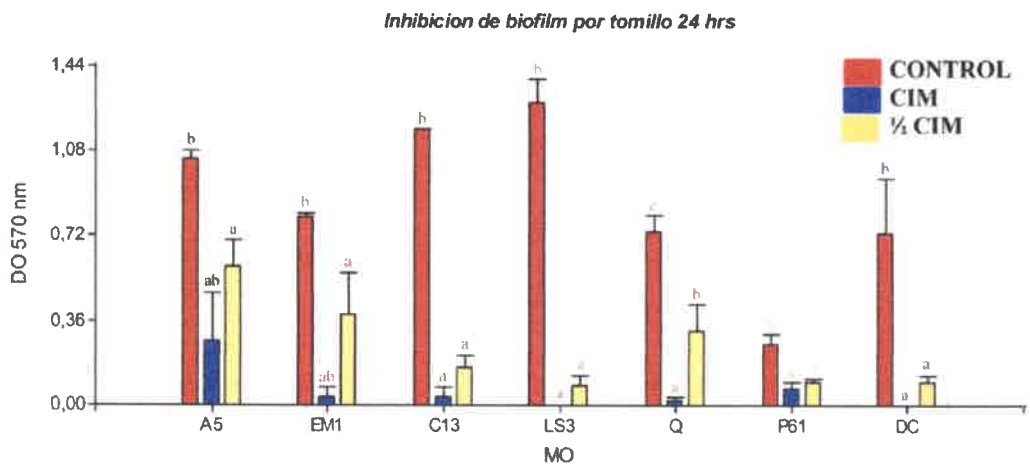


Figura 1: Efecto de CIM y ½ CIM de AE de *Thymus vulgaris* sobre la formación de biofilm en cepas fitopatógenas (24 h) (Giuliano. 2013)

9. Inhibición de la producción de biofilm por AE de *O. vulgare* a las 24 h

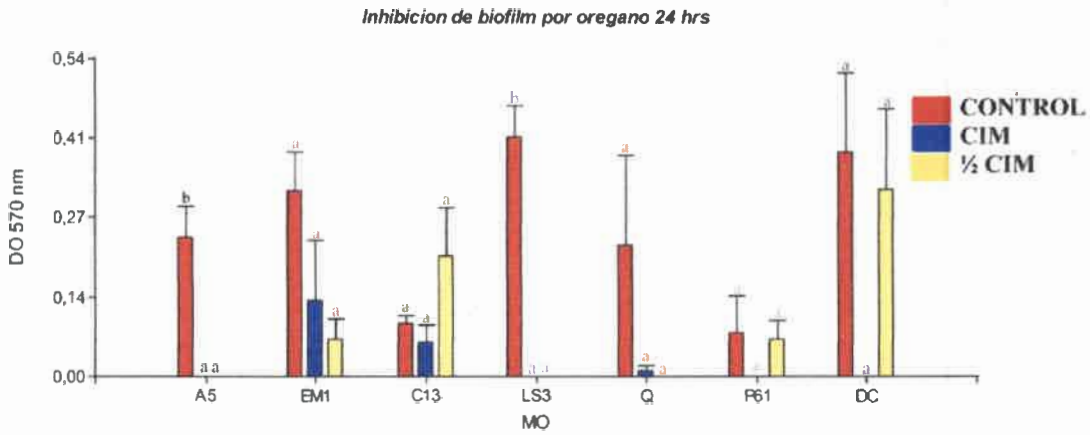


Figura 2: Efecto de CIM y ½ CIM de AE de *Origamun vulgare* sobre la formación de biofilm en cepas fitopatógenas (24 h)

10. Inhibicón de siringomicina por AE de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*

Tabla 6: Inhibición de la producción de siringomicina por AE de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*.

Pseudomonas	Inhibición de Siringomicina	
	T. vulgaris (mg/mL.)	*O. vulgare* (mg/mL.)
Pseudomonas sp. C13	11,49	0,045
Pseudomonas sp. *EM1*	0,0055	0,045
Pseudomonas sp. *LS3*	NI	0,045
Pseudomonas sp. *Q*	0,021	0,09
P. syringae pv. *tomato* DC3000	0,011	0,003
P. syringae pv. *tabaci* 6605	0,089	0,09
P. *syringae* pv. *syringae* B728a	0,17	0,022
P. savastanoi pv. *glycinea* B076	0,089	0,11

III-BIOACTIVIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE *THYMUS VULGARIS* SOBRE PLANTAS DE SOJA INFECTADAS CON *PSEUDOMONAS* SP.

Tablas construídas a partir de datos recogidos en las experiencias de incidencia y severidad.

	Control B076	**1/64 B076**	**1/128 B076**	**1/256 B076**
	Severidad	Severidad	Severidad	Severidad
2.a	1,10	1,45	1,59	0,94
2.b	1,49	1,74	3,57	0,00
3.a	5,32	3,22	0,87	0,66
3.b	5,15	1,08	1,16	2,44
4.a	1,16	1,95	0,66	0,58
4.b	1,43	0,87	1,52	2,84
5.a	1,31	2,91	2,09	1,02
5.b	0,15	1,65	0,66	0,44
Promedio	2,14	1,86	1,51	1,11

Control	1	1,10
Control	1	1,49
Control	1	5,32
Control	1	5,15
Control	1	1,16
Control	1	1,43
Control	1	1,31
Control	1	0,15
1/64	2	1,45
1/64	2	1,74
1/64	2	3,22
1/64	2	1,08
1/64	2	1,95
1/64	2	0,87
1/64	2	2,91
1/64	2	1,65
1/128	3	1,59
1/128	3	3,57
1/128	3	0,87
1/128	3	1,16
1/128	3	0,66
1/128	3	1,52
1/128	3	2,09

1/128	3	0,66
1/256	4	0,94
1/256	4	0,00
1/256	4	0,66
1/256	4	2,44
1/256	4	0,58
1/256	4	2,84
1/256	4	1,02
1/256	4	0,44

INCIDENCIA

	Control B076	**1/64 AET**	**1/128 AET**	**1/256 AET**
2	55,56	100,00	100,00	25,00
3	100,00	75,00	66,67	75,00
4	58,33	66,67	66,67	41,67
5	55,56	83,33	75,00	55,56

SEVERIDAD

	Control B076	**1/64 B076**	**1/128 B076**	**1/256 B076**
2	1,29	1,59	2,58	0,47
3	5,24	2,15	1,02	1,55
4	1,29	1,41	1,09	1,71
5	0,73	2,28	1,37	0,73

	INCIDENCIA	SEVERIDAD
1 Control	55,56	1,29
1 Control	100,00	5,24
1 Control	58,33	1,29
1 Control	55,56	0,73
2 1/64	100,00	1,59
2 1/64	75,00	2,15
2 1/64	66,67	1,41
2 1/64	83,33	2,28
3 1/128	100,00	2,58
3 1/128	66,67	1,02
3 1/128	66,67	1,09

3 1/128	75,00	1,37
4 1/256	25,00	0,47
4 1/256	75,00	1,55
4 1/256	41,67	1,71
4 1/256	55,56	0,73

Plantas de soja infectadas con *Pseudomonas* sp. Q , tratadas con AET a diferentes oncentraciones

	Incidencia	Severidad
Control Q		
1.a	100,00	3,92
1.b	100,00	4,09
2.a	100,00	3,57
2.b	100,00	3,07
3.a	100,00	3,84
3.b	100,00	3,22
4.a	100,00	1,45
4.b	66,67	2,49
5.a	100,00	3,07
5.b	100,00	1,74
1/64 Q		
1.a	66,67	0,97
1.b	100,00	1,59
2.a	100,00	1,59
2.b	100,00	2,61
3.a	22,22	0,48
3.b	66,67	1,16
4.a	100,00	1,74
4.b	83,33	2,36
5.a	66,67	1,16
5.b	66,67	5,62

1/128 Q

1.a	-	-
1.b	16,67	0,22
2.a	66,67	1,16
2.b	66,67	0,87
3.a	83,33	1,87
3.b	83,33	1,23
4.a	100,00	3,67
4.b	66,67	1,02
5.a	100,00	1,59
5.b	100,00	2,09

1/256 Q

1.a	50,00	0,66
1.b	66,67	0,87
2.a	100,00	2,23
2.b	100,00	2,93
3.a	100,00	3,07
3.b	66,67	1,72
4.a	-	-
4.b	66,67	1,25
5.a	100,00	2,43
5.b	66,67	4,25

	Control Q		1/64 AET		1/128 AET		1/256 AET	
	Incidencia	**Severidad**	**Incidencia**	**Severidad**	**Incidencia**	**Severidad**	**Incidencia**	**Severidad**
1.a	100,00	3,92	66,67	0,97	-	-	50,00	0,66
1.b	100,00	4,09	100,00	1,59	16,67	0,22	66,67	0,87
2.a	100,00	3,57	100,00	1,59	66,67	1,16	100,00	2,23
2.b	100,00	3,07	100,00	2,61	66,67	0,87	100,00	2,93
3.a	100,00	3,84	22,22	0,48	83,33	1,87	100,00	3,07
3.b	100,00	3,22	66,67	1,16	83,33	1,23	66,67	1,72
4.a	100,00	1,45	100,00	1,74	100,00	3,67	-	-
4.b	66,67	2,49	83,33	2,36	66,67	1,02	66,67	1,25
5.a	100,00	3,07	66,67	1,16	100,00	1,59	100,00	2,43
5.b	100,00	1,74	66,67	5,62	100,00	2,09	66,67	4,25
	96,67	3,05	77,22	1,93	68,33	1,37	71,67	1,94

	Control Q Incidencia	1/64 AET Incidencia	1/128 AET Incidencia	1/256 AET Incidencia
1.a	100,00	66,67	-	50,00
1.b	100,00	100,00	16,67	66,67
2.a	100,00	100,00	66,67	100,00
2.b	100,00	100,00	66,67	100,00
3.a	100,00	22,22	83,33	100,00
3.b	100,00	66,67	83,33	66,67
4.a	100,00	100,00	100,00	-
4.b	66,67	83,33	66,67	66,67
5.a	100,00	66,67	100,00	100,00
5.b	100,00	66,67	100,00	66,67
	96,67	77,22	68,33	71,67

	Incidencia
1 Control	100,00
1 Control	100,00
1 Control	100,00
1 Control	100,00
1 Control	100,00
1 Control	100,00
1 Control	100,00
1 Control	66,67
1 Control	100,00
1 Control	100,00
2 1/64	66,67
2 1/64	100,00
2 1/64	100,00
2 1/64	100,00
2 1/64	22,22
2 1/64	66,67
2 1/64	100,00
2 1/64	83,33
2 1/64	66,67
2 1/64	66,67
3 1/128	-
3 1/128	16,67
3 1/128	66,67
3 1/128	66,67
3 1/128	83,33
3 1/128	83,33
3 1/128	100,00
3 1/128	66,67
3 1/128	100,00
3 1/128	100,00
4 1/256	50,00
4 1/256	66,67
4 1/256	100,00
4 1/256	100,00
4 1/256	100,00
4 1/256	66,67
4 1/256	-
4 1/256	66,67
4 1/256	100,00
4 1/256	66,67

	Control Q Severidad	1/64 AET Severidad	1/128 AET Severidad	1/256 AET Severidad
1.a	3,92	0,97	-	0,66
1.b	4,09	1,59	0,22	0,87
2.a	3,57	1,59	1,16	2,23
2.b	3,07	2,61	0,87	2,93
3.a	3,84	0,48	1,87	3,07
3.b	3,22	1,16	1,23	1,72
4.a	1,45	1,74	3,67	-
4.b	2,49	2,36	1,02	1,25
5.a	3,07	1,16	1,59	2,43
5.b	1,74	5,62	2,09	4,25
	3,05	1,93	1,37	1,94

	Severidad
1 Control	3,92
1 Control	4,09
1 Control	3,57
1 Control	3,07
1 Control	3,84
1 Control	3,22
1 Control	1,45
1 Control	2,49
1 Control	3,07
1 Control	1,74
2 1/64	0,97
2 1/64	1,59
2 1/64	1,59
2 1/64	2,61
2 1/64	0,48
2 1/64	1,16
2 1/64	1,74
2 1/64	2,36
2 1/64	1,16
2 1/64	5,62
3 1/128	-
3 1/128	0,22
3 1/128	1,16
3 1/128	0,87
3 1/128	1,87
3 1/128	1,23
3 1/128	3,67
3 1/128	1,02
3 1/128	1,59
3 1/128	2,09
4 1/256	0,66
4 1/256	0,87
4 1/256	2,23
4 1/256	2,93
4 1/256	3,07
4 1/256	1,72
4 1/256	-
4 1/256	1,25
4 1/256	2,43
4 1/256	4,25

PUBLICACIONES

plant biology

Plant Biology ISSN 1435-8603

RESEARCH PAPER

Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on phytopathogenic strains isolated from soybean

M. de las M. Oliva[1], M. E. Carezzano[1], M. Giuliano[1], J. Daghero[2], J. Zygadlo[3], P. Bogino[4], W. Giordano[4] & M. Demo[1]

1 Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Fco-Qcas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Rio Cuarto, Argentina

2 Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Rio Cuarto, Rio Cuarto, Argentina

3 Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBiV-CONICET) & Cátedra de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

4 Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Fco-Qcas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Rio Cuarto, Argentina

Keywords
Antimicrobial activity; bacterial common blight; essential oil; *Pseudomonas syringae*.

Correspondence
M. de las M. Oliva, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Fco-Qcas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36, Km 601, CP: 5800, Rio Cuarto, Argentina.
E-mail: moliva@exa.unrc.edu.ar

Editor
H. Papen

Received: 8 September 2014; Accepted: 22 October 2014

doi:10.1111/plb.12282

ABSTRACT

The aim of this work was to study the antimicrobial activity of essential oils obtained from *Thymus vulgaris* (thyme) and *Origanum vulgare* (oregano) on phytopathogenic *Pseudomonas* species isolated from soybean. Strains with characteristics of *P. syringae* were isolated from leaves of soybean plants with blight symptoms. Ten of these could be identified in Group Ia of LOPAT as *P. syringae*. Six of these were confirmed as *P. syringae* using 16S *rRNA*, indicating the presence of these phytopathogenic bacteria in east and central Argentina. All the phytopathogenic bacteria were re-isolated and identified from the infected plants. MIC values for thyme were 11.5 and 5.7 mg·ml^{-1} on *P. syringae* strains, while oregano showed variability in the inhibitory activity. Both essential oils inhibited all *P. syringae* strains, with better inhibitory activity than the antibiotic streptomycin. The oils were not bactericidal for all pseudomonads. Both oils contained high carvacrol (29.5% and 19.7%, respectively) and low thymol (1.5%). Natural products obtained from aromatic plants represent potential sources of molecules with biological activity that could be used as new alternatives for the treatment of phytopathogenic bacteria infections.

INTRODUCTION

In recent years, soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) has become the most important crop in Argentina and most of the production enters the international market. The United State Department of Agriculture (USDA) has estimated record crops (more than 55 millions·t) for this country, because of good environmental conditions and suitable technologies. Over 90% of soybeans from Argentina are produced in the northern Pampean subregion (provinces of Córdoba, Santa Fe, Buenos Aires and La Pampa); the rest are produced in the northwestern and northeastern regions. However, since the early 1990s, diseases have gradually become a major problem for soybean production in many areas of Argentina (Wrather *et al.* 2001; http://www.fao.org/agronoticias/agro-noticias). These diseases are caused either by filamentous fungi or bacteria and success of diseases on soybean plants depends on their age, area, climate and management of agricultural practices. Worldwide, soybean diseases cause losses of 10–15%, while Argentine losses are estimated at 8–10% (http://inta.gob.ar/documentos/informe-sanitario-de-la-campana-de-soja-2012-13).

Many of the causal agents of plant bacterial diseases belong to the *Pseudomonas syringae* group. *P. syringae* pv. *glycinea*, is a member of this group and is responsible for common bacterial blight of soybean. This bacterium produces light brown or brown water-soaked lesions on leaves, which increase in size and finally cause tearing of leaves (Scandiani & Luque 2009). This disease was present in Cordoba province, with incidence of 100% and severity of 20% for the 2012/2013 season (http://inta.gob.ar/documentos/informe-sanitario-de-la-campana-de-soja-2012-13).

Pseudomonas syringae has worldwide economic importance because it has a wide host range and causes disease in over 180 plant species, consisting of necroses on leaves, stems, fruits and other aerial plant parts (Morris *et al.* 2007). It was classified by Lelliott *et al.* (1966) in Group I of LOPAT and is subdivided into approximately 50 pathovars, based largely on the original host of isolation and pathogenicity, rather than biochemical or physiological criteria (Krzymowska *et al.* 2007). This bacterium has an epiphytic phase where it can establish large populations on aerial surfaces of plant species without necessarily causing disease. In its pathogenic phase it survives thanks to photosynthate from host plants, and virulence factors such as syringomycin and related toxins, to which a wide range of prokaryote and eukaryote cells are sensitive (Morris *et al.* 2007).

The control of bacterial diseases of crops has been and is nowadays a considerable problem due to the limited availability of antimicrobial substances without side effects. The antibiotic streptomycin and copper compounds are frequently applied for treatment of bacterial diseases but these are toxic to organisms and the environment. Moreover, pathogens can become drug resistant, or can undergo possible horizontal genetic transfer to become animal and human pathogens. Furthermore, these substances are often prohibited in agricultural practice in many countries of Europe and the USA (Lo Cantore *et al.* 2004; Kotan *et al.* 2013). A consequence of the above facts is the failure of disease control.

In recent years, the biological properties of plant extracts, *e.g.*, essential oils, have been evaluated, and many studies have pointed out the possibility of using them for the control of microorganisms that are pathogenic to animals and plants, as well as causing food spoilage (Cowan 1999). The requirement for a reduction in the use of pesticides in agriculture prompts a need to develop alternative active compounds. Research on growth inhibition of phytopathogenic bacteria using plant extracts has intensified, and the results strongly suggest the potential of essential oils to control plant bacterial diseases (Lo Cantore *et al.* 2004; Paret *et al.* 2010; Kotan *et al.* 2013). Studies of the effects of *Coriandrum sativum* and *Foeniculum vulgare* essential oils on plant phytopathogenic bacteria have already shown growth inhibition activity for several microorganisms, with high bactericidal activity of *C. sativum* oil. Coriander oil inhibited the growth of *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium* and important plant pathogenic bacteria in Gram-negative genera such as *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Xanthomonas* and *Agrobacterium*, and Gram-positive genera such as *Clavibacter*, *Curtobacterium* and *Rhodococcus* (Lo Cantore *et al.* 2004).

Essential oils are volatile compounds with a strong odour and are synthesised by aromatic plants as secondary metabolites. They are mixtures of complex compounds based on a 5-carbon isoprene structure (terpenes), occurring as diterpenes, triterpenes, tetraterpenes (C20, C30 and C40), hemiterpenes (C5) and sesquiterpenes (C15). Most of the antimicrobial activity in essential oils is dependent on the diversity and quantity of such constituents, and could be attributed to oxygenated terpenoids as well as alcoholic and phenolic terpenes (Burt 2004; Koroch *et al.* 2007; Oliva de las *et al.* 2010).

Among these aromatic plant species, *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* occupy a special position because their essential oils and extracts showed very significant antimicrobial activity against various species of bacteria, especially Gram-negative bacteria and fungi (Viuda-Martos *et al.* 2011; Coy Barrera & Acosta 2013). In the search of new alternatives for the treatment of phytopathogenic bacterial diseases, the aim of this work was to study the antimicrobial activity of essential oils obtained from *T. vulgaris* (thyme) and *O. vulgare* (oregano) on phytopathogenic *Pseudomonas* species isolated from soybean plants.

MATERIAL AND METHODS

Isolation of phytopathogenic strains

Leaves of soybean with characteristic bacterial blight symptoms were collected from fields located in different regions of Argentina. For the bacterial isolation, leaves were disinfected first with ethanol (70%) and then with sodium hypochlorite (1%). Fragments of vegetal tissues were aseptically removed into sterile dishes and sterile distilled water was poured over them. Subsequently, bacteria were isolated by streaking liquid from these dishes onto tryptone soy (TS), cetrimide (CA) and King B (KB) agar plates. The plates were incubated at 28 °C for 24–72 h. For long-term storage, isolated bacteria were maintained in glycerol at −70 °C (Ferrante & Scortichini 2009).

Phenotype characterisation of strains

Conventional biochemical tests were performed on pure cultures of isolated strains: Gram reaction, catalase production, metabolism of glucose (Hugh-Leifson medium), hydrolysis of aesculin, gelatine hydrolysis and fluorescence on King B medium, nitrate reduction, indole, methyl red (MR) and Voges-Proskauer (VP), and motility in semi-solid medium. For putative phytopathogenic bacteria, the following procedures were performed: levan production (L), presence of oxidase (O), soft rot activity on potato slices (P), presence of arginine dehydrolase (A) and hypersensitivity reaction in tobacco leaves (T) (LOPAT tests) (Ferrante & Scortichini 2009).

Reference strains were used: *P. syringae* pv *tomato* DC 3000, *P. syringae* pv *artropurpurea* (Ps5), *P. syringae* pv *syringae* (P61). These strains were provided by Laboratory 15 of the Molecular Biology Department of the National University of Río Cuarto.

Analysis of 16S *rRNA* gene of phytopathogenic strains

Nucleotide sequence of the 16S *rRNA* gene was analysed for 13 bacterial strains isolated from soybean. The 16S *rRNA* gene amplification was carried out using P0 (5′-GAGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3′) and P6 (5′-CTACGGCTACCTTGTTACG A-3′) primers (Lane 1991). PCR conditions, purification of amplicons and sequencing were done by the MACRO GEN Service Center (Seoul, Korea). Identities among these sequences were determined using the BLAST search program (National Center for Biotechnology Information; Altschul *et al.* 1997). The nucleotide sequences of the 16S *rRNA* gene of soybean strains were deposited in GenBank under accession numbers KJ569364, KJ569366, KJ569367, KJ569368, KJ569369, KJ569370, KJ569371, KJ569372, KJ569373, KJ569374, KJ569375, KJ569376 and KJ569377.

A phylogenetic analysis was conducted using MEGA version 4 (Tamura *et al.* 2007). Multiple alignments of 16S *rRNA* sequences were performed using the Clustal X2.0 algorithm (Thompson *et al.* 1997). Alignments were used to build a phylogenetic tree based on neighbour-joining (NJ) algorithms using the Kimura 2-parameter model (Kimura 1980).

Pathogenicity test

Pathogenicity was assessed after spraying soybean leaves of growing plants with a bacterial suspension (10^8 CFU·ml^{-1}; five replicates). Silweet (0.01%) was used as emulsifier. Inoculum was prepared by growing bacterial strains on KB broth for 48 h at 28 °C. A negative control of sterile broth was included in each experiment. Plants were maintained in a controlled growth chamber (25 °C, 12-h photoperiod, 80% relative

humidity). Disease progression was monitored phenotypically, and visible reactions were recorded 7–14 days after inoculation (Samson *et al.* 1998).

Plant material and essential oils

Plant material of *O. vulgare* (L) cv 'chileno' and *T. vulgare* (L) was obtained from the farm Establecimiento Agroproductivo Los Molles, located in San Luis (Argentina). The essential oils were extracted from dried leaves (100 g) of the plants, hydrodistilled in a Clevenger-like apparatus. Anhydrous sodium sulphate was added to the oils for desiccation and they were then stored in a freezer until GC-MS analysis (De Feo *et al.* 1998).

Gas chromatography (GC)

The essential oil composition was analysed with a Perkin Elmer Clarus 500 gas chromatograph (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) equipped with a fused silica column (60 m × 0.25 mm) coated with DB-5. The temperature of the column was programmed from 60 to 240 °C at 4 °C·min^{-1}. The injector and detector temperatures were 270 °C. The gas carrier was helium, at a flow rate of 1 ml·min^{-1}. Peak areas were measured by electronic integration. The relative amounts of the individual components were based on the peak areas obtained, without FID response factor correction. Programmed temperature retention index of the compounds were determined relative to *n*-alkanes. GC analysis was performed using a column Supelcowax-10 with the same conditions as described above (Zunino *et al.* 1998).

Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

The GC-MS analyses were performed on a Perkin Elmer Clarus 600 with a 60 m × 0.25 mm capillary column coated with DB-5. The temperature of the column and the injector were the same than those from GC. The carrier gas was helium at a flow rate of 0.9 ml·min^{-1}. Mass spectra were recorded at 70 eV. The oil components were identified by comparison of their retention index, of mass spectra with those of authentic samples, by peak enrichment, with published data and with the mass spectra library of the National Institute of Standards and Technology (NIST 3.0), and our mass spectra library, which contains reference mass spectra and retention index of volatile compounds. GC-MS analysis was performed using a column Supelcowax 10 with the same conditions as describe above (Adams 1989).

Microdilution assay

The antimicrobial activity of the essential oils on *Pseudomonas* was determined using the broth microdilution method described in Mann & Markham (1998), with some modifications.

Culture methods

Tubes containing KB broth were prepared at pH 7, and inoculated with the isolated phytopathogenic bacteria and reference strains. These were incubated overnight at 28 °C and optical densities measured at 620 nm in a spectrometer. Cell densities were estimated from standard curves and confirmed by the viable plate count on KB agar.

Inoculum densities

The microorganism cell concentration necessary to cause reduction of resazurin was determined for each of the tested microorganisms. For this, serial ten-fold dilutions of the overnight culture were prepared in KB broth. Aliquots (170 µl) of the inocula were dispensed into a microtitre containing 20 µl dimethyl sulphoxide (DMSO; 1:8) and 10 µl resazurin solution (0.01% w/v). The microtitre was incubated for 24 h at 28 °C. The appropriate dilution was that unable to reduce resazurin (blue), *i.e.*, 1 log cycle lower than the cell density required to reduce resazurin (usually 10^5–10^6 CFU·ml^{-1}). The plate count method was made to this dilution. Resazurin is a redox indicator that is blue in its oxidised form and pink in its reduced form.

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of T. vulgaris and O. vulgare essential oils

Serial twofold dilutions of each essential oil were prepared in DMSO (1:8) by vortexing it at room temperature. A sterile 96-well microtitre tray was set up with the dilution of bacteria as follows: column 1–10, 170 µl inoculum + 20 µl essential oil dilution; column 11, 170 µl inoculum + 20 µl diluent DMSO (1:8; positive control = pink); column 12, assay medium (KB broth) + 20 µl diluent (negative control = blue). Well contents were thoroughly mixed using a micropipette. Two trays were prepared for each strain and incubated at 28 °C for 24 h. After incubation, 10 µl resazurin solution were added to all wells. After a second incubation of 4 h at 28 °C, wells were assessed visually for colour change, with the highest dilution remaining blue indicating the MIC (Mann & Markham 1998).

Determination of minimum bactericidal concentration (MBC) of *T. vulgaris* and *O. vulgare* essential oils

The MBC was determined as follows: 100 µl of the dilution from the MIC and the previous dilutions were inoculated in KB agar and incubated at 28 °C for 24 h. The MBC was considered as the largest dilution without cellular growth (Bailey & Scott 1973).

RESULTS

Phenotype characterisation

The isolation of bacteria was made from symptomatic leaves using different culture media (KB, CA, TS agar), where KB agar proved to be the most appropriate for the isolation of *Pseudomonas*. In KB agar, fluorescent and non-fluorescent white, round, mucoid colonies were observed. A total of 83 Gram-negative, rod-shaped, catalase-positive cell isolates were recovered. Sixteen of them were chosen for further biochemical characterisation on the basis of the oxidative metabolism of glucose (Table 1). All strains were negative for nitrate reduction, indole (tryptophanase), gelatine, Voges-Proskauer (acetoin) and methyl red (acids), with the exception of EM21 for this last test. Most strains were alkaline in TSI; only one strain (M1E2) was alkaline/acid in this test. Thus, EM21 and M1E2 did not belong to *Pseudomonas*. Motility in soft agar was variable, as well as citrate, aesculin and the production of green pigmentation in KB agar.

Table 1. Biochemical and nutritional tests showed by the isolates obtained from soybean fields.

strain	Cet (Pig)	KB (Pig)	Cat	OF	NO_3	TSI	M	C	I	RM	VP	A	G
A5	+(g)	+ (g)	+	O	–	Al	+	+	–	–	–	–	–
A6	ND	+ (g)	+	O	–	Al	+	+	–	–	–	+	–
A7	–	+ (g)	+	O	–	Al	–	+	–	–	–	–	–
C11LS	ND	+ (g)	+	O	–	Al	–	–	–	–	–	–	–
C12LS	–	+ (g)	+	O	–	Al	+	+	–	–	–	ND	ND
C13LS	–	+ (g)	+	O	–	Al	+	–	–	–	–	–	–
C47	–	+ (g)	+	O	–	Al	–	–	–	–	–	+	–
EM1	–	+	+	O	–	Al	+	+	–	–	–	+	–
EM16	+(g)	+ (g)	+	O	–	Al	–	+	–	–	–	–	–
EM16b	ND	+	+	O	–	Al	–	+	–	–	–	ND	ND
EM21	–	+	+	O	–	Al	–	–	–	+	–	–	–
LS3	–	+ (g)	+	O	+	Al	–	+	–	–	–	+	–
M1E2	–	+ (g)	+	O	–	Al/Ac	+	–	–	–	–	ND	ND
M2E7	+	+	+	O	+	Al	+	–	–	–	–	–	–
Q	–	+	+	O	–	Al	–	+	–	–	–	–	–
VT2	–	+ (g)	+	O	–	Al	+	+	–	–	–	–	–

Cet = cetrimide agar; KB = King's B agar; Cat = catalasa; OF = glucose metabolism; NO_3 = nitrate reductase; TSI = three-sugar ion; M = movement; C = citrate; I = indole; RM = methyl red; VP = Voges Proskauer; A = aesculin; G = gelatine; (+) = positive; (–) = negative/no growth; O = oxidative metabolism; Al = alkaline; Al/Ac = alcaline/ácid; PIG = pigments; (g) = green; ND = not done.

The LOPAT test results, following Lelliott *et al.* (1966), are shown in Table 2. Ten of the isolates belonged to Group Ia: levan-positive, oxidase-negative, potato soft rot-negative, arginine dehydrolase-negative, tobacco hypersensitive-positive. Four strains were oxidase positive, so were located in Group III or IV. Based on these results, strains A5, C11LS, C13LS, C47, EM1, EM21, LS3, M2E7, Q and VT2 could provisionally be identified as *P. syringae* (Scortichini & Loreti 2007). These strains were isolated from Córdoba, San Luis and Santa Fe (Table 3).

Analyses of 16S *rRNA* gene of strains isolated from soybean

The 14 strains phenotypically characterised as *Pseudomonas* were analysed based on comparisons of the 16S *rRNA* sequences of these strains with those of accessions in the GenBank database (Table 3). Eleven strains showed identity with the *Pseudomonas* genus. Of these, six strains (A5, C13LS, EM1, LS3, Q, VT2) showed identity with *P. syringae* pv *glycinea*, *P. syringae* pv *tabaci* and *P. syringae* pv *syringae*, while A6, A7, EM16 and C12LS showed identity with *P. putida*. Of the remaining strains, two were significantly aligned with *Acinetobacter schindleri* and one strain with *Achromobacter xylosoxidans*. As seen in Table 3, one strain (C11LS) could not be identified. Nucleotide sequences of the nearly full-length 16S *rRNA* gene (average ~1,400 bp) from our isolated strains were deposited in the GenBank database and compared to available sequences of known strains.

Table 2. LOPAT test of the isolates obtained from soybean fields.

strains	LEV	O	PP	ARG	HT
A5	+	–	–	–	+
A6	+	+	–	+	–
A7	+	+	–	+	+
C11LS	+	–	–	NR	NR
C12LS	+	+	–	+	+
C13LS	+	–	–	–	+
C47	+	–	–	–	–
EM1	+	–	–	–	+
EM16	+	+	+	+	+
EM21	+	–	+	–	+
LS3	+	–	–	–	+
M2E7	+	–	–	–	NR
Q	+	–	–	–	+
VT2	+	–	–	–	+

Lev = levan; O = oxidase; PP = rot of potato; ARG = arginine; HT = hypersensitivity reaction on tobacco leaves; (+) = positive, (–) = negative.

In order to analyse the evolutionary distance and phylogenetic relationships among the isolated strains, a phylogenetic tree was built. Cluster analysis performed with 16S *rRNA* gene sequences and the NJ algorithm showed that the isolates were similar to some phytopathogenic pseudomonads. The phylogenetic tree showed three branches in which the strains were distributed: *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Achromobacter*. The *Pseudomonas* group was the most representative and was subdivided in two groups: *P. syringae* and *P. putida*. The strains A5, C13LS, EM1, LS3, Q and VT2 were grouped with *P. syringae*, while A6, A7, C12LS and EM16 were related to *P. putida*. The remaining strains were grouped with *Acinetobacter* spp. and *Achromobacter* spp. (Fig. 1).

Pathogenicity test

The pathogenicity test was carried on with all the isolated strains identified as *P. syringae* and *P. putida* A7. *P. syringae pv tomato DC 3000* and *P. syringae pv atropurpurea Ps5* were used as reference strains. Typical symptoms of bacterial blight, chlorotic or water-soaked lesions on soybean plant leaves were reproduced by all *P. syringae* strains 7–10 days post-inoculation. All the phytopathogenic bacteria were re-isolated from the infected plants and identified biochemically. No pathogenic characteristics were observed with the isolated strain *P. putida* A7, *P. syringae* pv *tomato* DC 3000 or *P. syringae* pv *atropurpurea* Ps5, which were used as negative controls. Plants treated with sterile water remained symptom-free (Fig. 2).

Plant Biology © 2014 German Botanical Society and The Royal Botanical Society of the Netherlands

Table 3. Bacterial species isolated from soybean leaves, based on maximum similarity of 16S *rRNA* sequences.

strain	accession no.	origin of sample	source	sequences with significant alignment (99% identity)
A5	KJ569376	Alcira Gigena (A)	this work	*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (AB001443.1)
C13LS	KJ569375	Los Cisnes (LS)	this work	
EM1	KJ569377	Alejandro Roca (EM)	this work	
LS3	KJ569373	Los Cisnes (LS)	this work	
Q	KJ569372	Quines (Q)	this work	
VT2	KJ569374	Venado Tuerto (VT)	this work	
A6	KJ569369	Alcira Gigena (A)	this work	*Pseudomonas putida DE5* (JQ435693.1)
EM16	KJ569370	Alejandro Roca (EM)	this work	
A7	KJ569368	Alcira Gigena (A)	this work	*Pseudomonas putidaW619* (CP000949)
C12LS	KJ569371	Los Cisnes (LS)	this work	
C47EM	KJ569367	Los Cisnes (LS)	this work	*Acinetobacter schindleri H56* (KC 934833.1)
EM21	KJ569366	Alejandro Roca (EM)	this work	
M2E7	KJ569364	Paso del Durazno (M)	this work	*Achromobacter xylosoxidans SR50-12* (KF 279368.1)

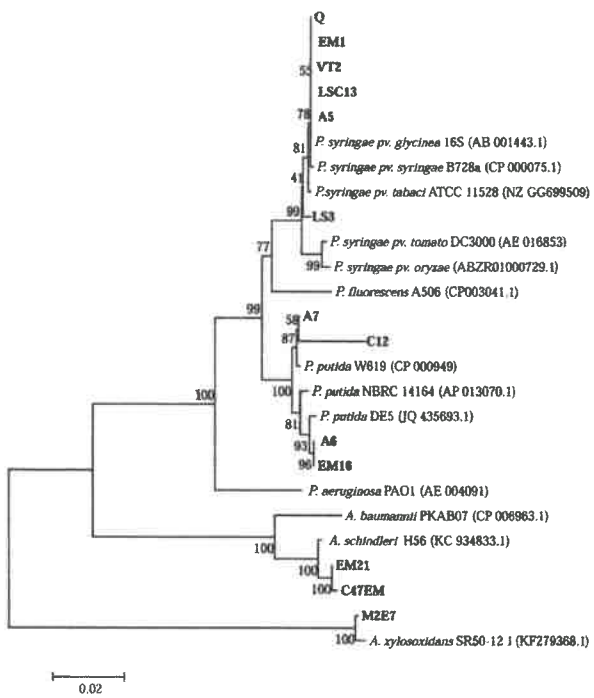


Fig. 1. Phylogenetic tree of strains isolated from *Glycine max* leaves and representative members, based on aligned *16S rRNA* gene sequences. Multiple alignments and neighbour-joining methods were used to construct the trees using MEGA 4.0.2 software. Strains isolated from soybean are indicated in bold. Bootstrap values, expressed as a percentage of 1000 replications, are given at the nodes. Sequence accession numbers are listed in parentheses. Scale bar: 1 nt substitutions per 200 nt.

Antimicrobial activity of essential oils

The antimicrobial activity of the essential oils of *T. vulgaris* and *O. vulgare* was investigated on the isolated *P. syringae* strains, *P. syringae* pv *tomato* DC 3000 and *P. syringae* pv *syringae* P61. The microdilution assay results are presented in Table 4. The essential oil of thyme had MIC values of 11.5 $mg \cdot ml^{-1}$ on five of the *P. syringae* strains isolated and on *P. syringae* pv *tomato* DC 3000. The MIC value obtained for *P. syringae* pv *syringae* P61 was 5.7 $mg \cdot ml^{-1}$ and strain VT2 was not inhibited by this oil. The essential oil of oregano showed inhibitory activity against all the tested strains, including reference strains, with more variability in the MIC values. Streptomycin (0.5 $mg \cdot ml^{-1}$) did not inhibit *Pseudomonas* strains. Thyme and oregano oil were not bactericidal for any of the pseudomonads.

The essential oils of oregano and thyme were analysed by means of GC-MS. In thyme oil 36 compounds were identified, and in oregano oil 24 compounds were identified, representing 99.3% and 99.7%, respectively. Both oils presented high percentages of carvacrol (29.5% and 19.7%, respectively) and low percentages of thymol (1.5%). These terpenes are described as characteristic components of these oils (Viuda-Martos *et al.* 2011). The essential oil of thyme and oregano contained p-cimene and γ terpinene as the main components, while oregano oil also had *cis*-sabinene hydrate among its main terpenes (Table 5).

DISCUSSION

Soybean diseases have gradually become a major problem for production in many areas of Argentina, particularly since the early 1990s. Several new diseases appeared in the 1993–1994 season, and some of these caused major losses in 1998 (Wrather *et al.* 2001). Recently, new bacterial diseases have appeared in soybean cultivars that were not previously known in Argentina and there has been an increase in established diseases (http://agro.fauba.info/node/164). In this country, damage caused by these diseases led to losses of 18,400 t in 1998 (Wrather *et al.* 2001). At least six different bacteria are known to affect soybean cultivars, including *P. syringae* (Scandiani & Luque 2009). This species is recognised as a plant pathogen of worldwide economic importance, responsible for common bacterial blight. It can establish large populations on aerial surfaces of a wide range of plant species, causing necroses on leaves, stems, fruits and other aerial parts (Morris *et al.* 2007). Few data on this bacterium in soybean cultivars are known for Argentina. In this work, strains with characteristics of *P. syringae* were isolated from leaves of soybean plants with blight symptoms. Ten of these isolates were identified biochemically in Group Ia of LOPAT as *P. syringae* because they shared the following characteristics: positive for levan production, negative for oxidase, potato rot and arginine dihydrolase, and positive for hypersensitivity in tobacco. The *Pseudomonas* species in Group I are described as leaf-spotting pathogens.

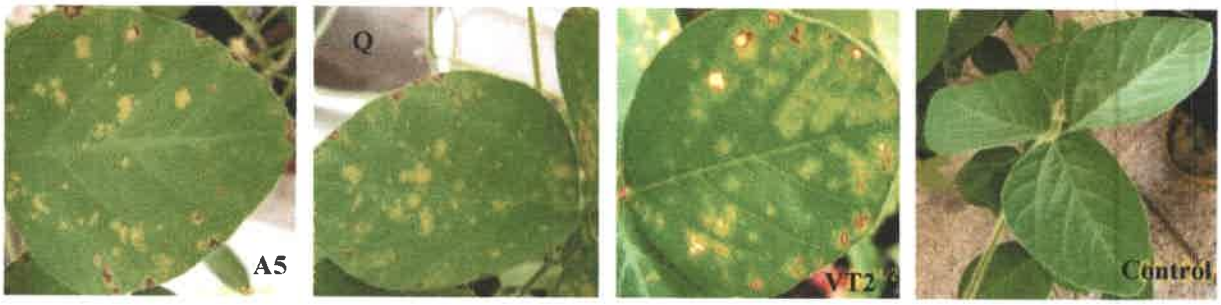


Fig. 2. Soybean plants infected with the strains A5, Q and VT2: typical blight lesions were observed on the leaves surface. Negative control: no lesions were observed on leaves surface.

Table 4. MIC ($mg \cdot ml^{-1}$) of essential oils of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* on *P. syringae* strains isolated from soybean.

strain	*T. vulgaris* (0.022–91.98 $mg \cdot ml^{-1}$)	*O. vulgare* (0.022–92.52 $mg \cdot ml^{-1}$)
A5	11.5	46.3
EM1	11.5	11.6
LS3	11.5	46.3
LSC13	11.5	5.8
VT2	NI	23.1
Q	11.5	23.1
P61	5.7	11.6
DC 3000	11.5	23.1

NI = no inhibition.

The *Pseudomonas* spp. of Groups II and III cause large necrotic lesions on leaves and stems, and are more invasive than those of Group I (Lelliott *et al.* 1966). From the identified strains, six were confirmed as *P. syringae* using 16S *rRNA*, with identities of 99% with *P. syringae* pv *glycinea, P. syringae* pv *tabaci* and *P. syringae* pv *syringae*. This species is a fluorescent pseudomonad clustering within rRNA similarity Group I of the genus *Pseudomonas* (Brenner *et al.* 2005). The steps followed in this work to isolate and identify phytopathogenic pseudomonads re-affirm the need to combine biochemical and molecular methods to obtain the definitive identity of a microorganism. Rodicio & Mendoza (2004) suggested that the identification of a microorganism should use different methodologies based on phenotypic and genotypic criteria. It is known that *P. syringae* strains exhibit high host specificity, and that this allows *P. syringae* species to be subdivided into more than 50 pathovars. A genetic analysis of total DNA-DNA homology and ribotyping indicated the existence of nine genomo-species within *P. syringae* species. As a consequence, many species in these groups have been re-classified, and *P. syringae* re-named as *P. savastanoi*, with pvs. *savastanoi, glycinea, tabaci* and *phaseolicola*. This implies that the genetic diversity of *P. syringae* species is due to adaptation of individual pathovars to their respective host plant environment (Young 2010; Qi *et al.* 2011).

The pathogenicity of the six strains identified as *P. syringae* was confirmed after inoculating them onto healthy soybean plants and observing the characteristic spots on the leaf surfaces. These bacteria were re-isolated from the spots and re-identified as *P. syringae*. Disease symptoms were not observed in plants inoculated with *P. syringae* pv *tomato* DC 3000 and *P. syringae* pv *atropurpurea* Ps5. The natural hosts of these last strains are tomato and oats, respectively. These data confirm that the isolated strains from soybean cause blight disease mainly in the host from which they were isolated. Moreover, they indicate the presence of phytopathogenic strains *P. syringae* in the east and central regions of Argentina (provinces of Córdoba, San Luis and Santa Fe), which are the main production regions of soybean.

Bacterial blight, caused by *P. syringae* pv *glycinea*, is one of the most prevalent soybean diseases. It is worldwide in distribution and more severe in cooler production regions (Prom & Venette 1997). The control of these bacterial diseases remains difficult due to the limited availability of antimicrobial substances. Antibiotic and copper compounds are the only chemical products suggested, but their use is hampered by limited efficacy in the field, and their potential negative effects either in the environment or on human and animal health (Lo Cantore *et al.* 2004). The availability of new and environmental compatible compounds with antibacterial activity would be very useful for control of soybean diseases. Natural products obtained from aromatic plants represent potential sources of molecules with biological activity.

Essential oils have been widely studied for their antimicrobial ability to control bacterial and fungal growth. Several studies of their effects on clinically dangerous microorganisms, as well as on microorganisms responsible for food spoilage or contamination have been published (Oliva *et al.* 2011; Bi *et al.* 2012). However, research on the use of essential oils to inhibit plant pathogenic bacteria is very limited. In this work, we document the inhibitory effects of *O. vulgare* and *T. vulgaris* essential oils on phytopathogenic *P. syringae* from soybean. Both oils were effective against all *P. syringae* strains, with better inhibitory activity than the antibiotic streptomycin (data not shown), which is the existing treatment for plant bacteriosis. The antimicrobial activity against phytopathogenic bacteria of essential oils and natural products from *T. vulgaris, O. vulgare, Oreganum onites* and other Labiatae (Kokoskova *et al.* 2011; Kotan *et al.* 2014) is documented. Essential oils and extracts obtained from *C. sativum, F. vulgare* var. *vulgare, Satureja hortensis, Cymbopogon* and *Eucalyptus* have been evaluated against phytopathogenic bacteria, with promising results (Lo Cantore *et al.* 2004; Paret *et al.* 2010; Kotan *et al.* 2013). Moreover, such results support the fact that natural products obtained from plants are effective inhibitors of phytopathogenic bacteria and could be useful against bacterial blight and other plant pathogens.

The mode of action of plant essential oils indicates that the microbial toxicity is associated with cell membrane damage.

Table 5. Components identified in the essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* (%) using GC-MS.

compound	*T. vulgaris*	*O. vulgare*
α thujene	1.7	0.6
α pinene	1.6	Tr
α fenchene	0.8	Tr
β pinene	1.1	–
Sabinene	–	1.8
Octanone 3	–	Tr
trans-2-octen-1-ol	–	Tr
Myrcene	1.8	1.2
3-octanol	Tr	–
α phellandrene	Tr	–
3-carene	Tr	–
α terpinene	1.7	2.4
p-cymene	31.5	11.5
1,8-cineole	2.4	–
Limonene	–	Tr
β phellandrene	–	Tr
cis ocimene	–	3.9
trans ocimene	–	0.6
γ terpinene	11.3	22.7
Terpinolene	1.5	2.1
Para-cymenene	Tr	–
Linalool	3.5	–
cis sabinene hydrate	Tr	19.7
trans sabinene hydrate	–	Tr
Camphor	Tr	–
Borneol	1	0.6
4-terpineol	1.2	5.1
p-cymen-8-ol	Tr	–
α terpineol	Tr	1.8
Thymol methyl ether	1.7	1.5
Geraniol	Tr	–
Geranial	Tr	
Thymol	1	1.5
Carvacrol	29.5	19.7
Isobornyl acetate	Tr	–
α copaene	Tr	–
β bourbonene	Tr	–
Longifolene	3.6	–
α cadinene	1.1	–
γ muurolene	Tr	–
γ cadinene	Tr	–
δ cadinene	Tr	–
cis calamenene 1S	Tr	–
Oxide caryophyllene	1.3	–
β caryophyllene	–	2.7
	99.3	99.7

Tr = trace.

Their chemical constituents are characteristically hydrophobic and accumulate in the lipid-rich environments of cell membranes, causing structural and functional damage (Lambert *et al.* 2001). Gram-negative organisms are less susceptible to the action of antibacterial compounds, since they possess an outer membrane surrounding the cell wall that restricts diffusion of hydrophobic compounds through its lipopolysaccharide layer. Usually, the antibacterial activity of essential oils is attributed to major terpene components present in the oil. However, in some cases, whole essential oils have higher antibacterial activity than a combination of their major isolated components, indicating that minor components are critical to the activity, probably by producing a synergistic effect (Burt 2004). In essential oil of thyme and oregano, one of the main components is carvacrol (29.5% and 19.7%, respectively), which is structurally very similar to thymol, having the hydroxyl group at different locations on the phenolic ring. Both compounds contain a cyclohexane with a bound hydroxyl group and a system of delocalised electrons that possess strong antimicrobial activity. The hydroxyl group bound to a benzene ring is important and responsible for the antimicrobial activity, through the presence of an α–β double bond (Lambert *et al.* 2001; Viuda-Martos *et al.* 2011; Kotan *et al.* 2014). In this work, the presence of carvacrol in oregano and thyme essential oils was markedly higher than thymol, despite the fact that the latter is usually the main component of thyme oil (Rota *et al.* 2008; Viuda-Martos *et al.* 2011). Other studies report differences in the chemical compositions of thyme and other essential oils, which are attributed to factors such as plant age, plant part, development stage, growing place, harvesting period and principal chemotype, since they all influence plant biosynthetic pathways and consequently the relative proportion of the main characteristic compounds (Oliva *et al.* 2010; Viuda-Martos *et al.* 2011). The genus *Thymus* has numerous species and varieties, with six chemotypes: geraniol, linalool, γ-terpineol, carvacrol, thymol and trans-thujan-4-ol/terpinen-4-ol (Rota *et al.* 2008). In this work, the presence of carvacrol (29.5%) was markedly higher than thymol (1%) despite the fact that the latter is usually the main component of thyme oil. Consequently, the chemotype used in this research seems to be carvacrol, and its high presence could be responsible for the antimicrobial activity. The mode of action of carvacrol and thymol appear to make the cell membrane permeable. Both terpenes are able to disintegrate the outer membrane of Gram-negative bacteria, releasing lipopolysaccharides and increasing the permeability of the cytoplasmic membrane (Lambert *et al.* 2001; Veldhuizen *et al.* 2006). The chromatography of thyme oil showed that p-cymene was the main terpene (31.5%); it is a biosynthetic precursor of thymol and carvacrol that lacks the bound hydroxyl group. Antimicrobial activity of this terpene against microorganisms has been described previously, although it was not an effective antibacterial when used alone. The combination of p-cymene with carvacrol showed synergism against *B. cereus in vitro*, where the hydrophobic characteristics of p-cymene allowed it to be incorporated more easily into the lipid bilayer and facilitated transport of carvacrol across the cytoplasmic membrane (Veldhuizen *et al.* 2006).

The results presented here are promising because essential oils could be used for control of diseases caused by bacteria responsible for reduced crop yield. *P. syringae* is a Gram-negative bacterium, which is important because of its ability to infect susceptible hosts. This bacterium displays higher intrinsic resistance to antibiotics and biocides than Gram-positive bacteria. The availability of new active principles such as essential oils or their components in disease control practice is of great interest. Further studies are necessary to evaluate the toxicity of the above substances toward seeds and/or plants and to obtain the appropriate formulations useful for crop protection.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was carried out thanks to grants from SECyT-UNRC and CONICET. Maria de las Mercedes Oliva, Maria Evangelina Carezzano, Pablo Bogino, Julio Zygadlo and Walter Giordano are Career Members of CONICET. Milena Giuliano, Jorge Daghero and Mirta Demo are professors at UNRC. We thank Ing. Roberto Genovese from Establecimiento Agroproductivo Los Molles for supplying *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris*.

REFERENCES

Adams R.P. (1989) *Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy*. Academic Press, New York, NY, USA.

Altschul S., Madden T., Schäffer A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search. *Nucleic Acids Research*, **25**, 3389–3402.

Bailey W.R., Scott E.G. (1973) *Diagnóstico Microbiológico. Aislamiento e identificación de microorganismos patógenos*, Cap 36. Ed. Médica Panamericana. Bs. As.

Bi Y., Jiang H., Hausbeck M.K., Hao J.J. (2012) Inhibitory effects of essential oils for controlling *Phytophthora capsici*. *Plant Disease*, **96**, 797–803.

Brenner D., Krieg N., Staley J. (2005) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edition. Vol. II: La proteobacterizra. Part B: The gamaproteobacteria. Springer, Berlin, Germany.

Burt S. (2004) Essential oils: antibacterial properties and potential applications in food: a review. *International Journal of Food Microbiology*, **94**, 223–253.

Cowan M.M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *American Society for Microbiology*, **12**, 564–565.

Coy Barrera C.C.A., Acosta G.E. (2013) Antibacterial activity and chemical composition of essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*), thyme (*Thymus vulgaris*) and turmeric (*Curcuma longa*) from Colombia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, **18**, 237–246.

De Feo V., Ricciardi A., Biscardi D., Senatore F. (1998) Chemical composition and antimicrobial screening of the essential oil of *Minthostachys verticillata* (Griseb). Epl. (*Lamiaceae*). *Journal of Essential Oil Research*, **10**, 61–65.

Ferrante P., Scortichini M. (2009) Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* as causal agent of bacterial canker of yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planchon) in Central Italy. *Journal of Phytopathology*, **157**, 768–770.

Kimura M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**, 111–120.

Kokoskova B., Pouvova D., Pavela R. (2011) Effectiveness of plant essential oils against *Erwinia amylovora*, *Pseudomona syringae pv. syringae* and associated saprophytic bacteria on/in host plants. *Journal of Plant Pathology*, **93**, 133–139.

Koroch A., Juliani H.R., Zygadlo J.A. (2007) Bioactivity of essential oils and their components. In: Berger R. G. (Ed.), *Flavours and fragrances chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer, Berlin, Germany, pp 87–115.

Kotan R., Dadasoglu F., Karagoz K., Cakir A., Ozer H., Kordali S., Cakmakci R., Dikbas N. (2013) Antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Satureja hortensis* against plant pathogenic bacteria and their potential use as seed disinfectants. *Scientia Horticulturae*, **153**, 34–41.

Kotan R., Cakir A., Ozer H., Kordali S., Cakmakci R., Dadasoglu F., Dikbas N., Aydin T., Kazaz C. (2014) Antibacterial effects of *Oreganum onites* against phytopathogenic bacteria: possible use of the extracts from protection of disease caused by some phytopathogenic bacteria. *Scientia Horticulturae*, **172**, 210–220.

Krzymowska M., Konopka-Postupolska D., Sobczak M., Macioszek V., Ellis B., Hennig J. (2007) Infection of tobacco with different *Pseudomonas syringae* pathovars leads to distinct morphotypes of programmed cell death. *The Plant Journal*, **50**, 253–264.

Lambert R., Skandamis P., Coote P., Nychas G. (2001) A study of the Minimum Inhibitory Concentration and mode of action of *Oregano* Essential Oil, Thymol and Carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, **91**, 453–462.

Lelliott R.A., Billing E., Hayward A.C. (1966) A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology*, **29**, 47–489.

Lo Cantore P., Iacobellis N., De Marco N., Capasso F., Senatore F. (2004) Antibacterial activity of *Coriandrum sativum L.* and *Foeniculum vulgare* Miller var. *vulgare* (Miller) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 7862–7866.

Mann C.M., Markham J.L. (1998) A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, **84**, 538–544.

Morris C., Kinkel L., Xiao K., Prior P., Sand D. (2007) Surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Infection, Genetics and Evolution*, **7**, 84–92.

Oliva de las M., Beltramino E., Gallucci N., Casero C., Zygadlo J., Demo M. (2010) Antimicrobial activity of essential oils of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton from different regions of Argentina. *Boletin Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales*, **9**, 29–37.

Oliva M., Carezzano E., Gallucci N., Casero C., Demo M. (2011) Antimycotic effect of the essential oil of *Aloysia triphylla* against *Candida* species obtained from human pathologies. *Natural Product Communications*, **6**, 1039–1043.

Paret M.L., Cabos R., Kratky B.A., Alvarez A.M. (2010) Effect of plant essential oils on *ralstonia solanacearum* race 4 and bacterial wilt of edible ginger. *Plant Disease*, **94**, 521–527.

Prom L.K., Venette J.R. (1997) Races of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* on commercial soybean in eastern North Dakota. *Plant Disease*, **81**, 541–544.

Qi M., Wang D., Bradley C.A., Zhao Y. (2011) Genome sequence analyses of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and subtractive hybridization-based comparative genomics with nine pseudomonads. *PLoS ONE*, **6**, 16451.

Rodicio M., Mendoza M. (2004) Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Universidad de Oviedo, Spain. **11**, 81–86.

Rota M.C., Herrera A., Martnez R.M., Sotomayor J.A., Jordan M.J. (2008) Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, **19**, 681–687.

Samson R., Shafik H., Benjama A., Gardan L. (1998) Description of the Bacterium Causing Blight of Leek as *Pseudomonas syringae* pv. *porri* (pv. nov.). *Phytopathology*, **88**, 844–850.

Scandiani M.M., Luque G.L. (2009) Identificación de patógenos en semillas de soja. In: *Análisis de semillas* Suppl. 2. Argentina. ISSN: 1852–5024.

Scortichini M., Loreti S. (2007) Occurrence of an Endophytic, Potentially Pathogenic Strain of *Pseudomonas syringae* in Symptomless Wild Trees of *Corylus avellana* L. *Journal of Plant Pathology*, **89**, 431–434.

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596–1599.

Thompson J., Gibson T., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D. (1997) The CLUSTAL_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **25**, 4876–4882.

Veldhuizen T.J.A., Tjeerdsma-van Bokhoven J.L.M., Zweijtzer C., Burt S.A., Haagsman H.P. (2006) Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 1874–1879.

Viuda-Martos M., Mohamady M.A., Fernández-López J., Abd El Razik K.A., Omer E.A., Pérez-Alvarez J.A., Sendra E. (2011) *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of essentials oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control*, **22**, 1715–1722.

Wrather J., Anderson T., Arsyad D., Tan Y., Ploper L., Porta-Puglia A., Ram H., Yorinori J. (2001) Soybean disease loss estimates for the top ten soybean producing countries in 1998. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **23**, 115–121.

Young J. (2010) *Taxonomy of Pseudomonas syringae. Pseudomonas pathogens of stone fruits and nuts: classical and molecular phytobacteriology*. Training course handbook, European Cooperation in Science & Technology, Belgarde, Serbia.

Zunino M.P., Newton M.N., Maestri D.M., Zygadlo J.A. (1998) Essential oils of three *Baccharis* species. *Planta Medica*, **64**, 86–87.

----- Mensaje reenviado de heinz.rennenberg@ctp.uni-freiburg.de -----
Fecha: Wed, 22 Oct 2014 04:35:25 -0400 (EDT)
De: heinz.rennenberg@ctp.uni-freiburg.de
Asunto: Plant Biology - Decision on Manuscript ID PlaBio-2014-09-0394-RPR1
Para: moliva@exa.unrc.edu.ar, mechioliva@gmail.com.ar

22-Oct-2014

Dear Dr. Oliva,

I am pleased to accept your manuscript entitled ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OILS OF THYMUS VULGARIS AND ORIGANUM VULGARE ON PHYTOPATOGENIC STRAINS ISOLATED FROM SOYBEAN in its current form for publication in Plant Biology. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the end of this letter.

You will receive an email shortly asking you to login into Wiley's Author Services, where you will be able to complete the license agreement or copyright transfer agreement on behalf of all authors on the paper via the Wiley Author Licensing Service (WALS).

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive.

If you do not select the OnlineOpen option, you will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Plant Biology, we look forward to your continued contributions to the journal.

Sincerely,

Prof. Heinz Rennenberg
Editor in Chief, Plant Biology
heinz.rennenberg@ctp.uni-freiburg.de

Manuscript submitted to editorial office

plant biology

Inhibitory effect of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* essential oils on virulence factors of phytopatogenic *Pseudomonas syringae* strains

Journal:	*Plant Biology*
Manuscript ID	PlaBio-2016-07-0256-RP.R1
Manuscript Type:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	06-Jan-2017
Complete List of Authors:	Carezzano, María; Universidad Nacional de Rio Cuarto Sotelo, Jesica; Universidad Nacional de Rio Cuarto Primo, Emiliano; Universidad Nacional de Rio Cuarto Reinoso, Elina; Universidad Nacional de Rio Cuarto Paletti Rovey, María; Universidad Nacional de Rio Cuarto Demo, Mirta; Universidad Nacional de Río Cuarto, Microbiología e Inmunología Giordano, Walter Oliva, Maria de las Mercedes; Universidad Nacional de Rìo Cuarto
Keyword:	Phytopatogenic strains, phytotoxins, biofilm, essential oils, inhibition

SCHOLARONE™
Manuscripts

Inhibitory effect of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* essential oils on virulence factors of phytopatogenic *Pseudomonas syringae* strains

M. E. Carezzano[1], J.P. Sotelo[1], E. Primo[2], E. B. Reinoso[1], M. F. Paletti Rovey[1], M. S. Demo[1], W. F. Giordano[2], M. de las M. Oliva[1]

1 Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Fco-Qcas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto.

2 Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Fco-Qcas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina.

Corresponding author: María de las Mercedes Oliva.

Email: moliva@exa.unrc.edu.ar

Address: Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta 36, Km 601. Río Cuarto. Argentina.

Phone number: 0054-0358-4676434

Fax number: 0054-0358-4676231

Running tittle: **Inhibition of *P. syringae* virulence factors by essential oils**

Key words: Phytopatogenic strains, phytotoxins, biofilm, essential oils, inhibition

Abstract

Pseudomonas syringae is a phytopathogenic bacterium that causes lesions in the leaves during the colonization process. The damage is associated to the production of many virulence factors such as biofilm and phytotoxins. The essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* have demonstrated the ability to inhibit *P. syringae*. The aim of this study was to investigate the effects of *T. vulgaris* and *O. vulgare* essential oils on the production of virulence factors of phytopatogenic *P. syringae* strains, including anti-biofilm and anti-toxins activities. The broth microdilution method was performed for the determination of MIC and biofilm inhibition assays. Coronatine, syringomycin and tabtoxin was pheno- and genotipically evaluated. Both oils showed good inhibitory activity with MIC values ranging from 1.43 to 11.5 mg/mL for thyme and 5.8 to 11.6 mg/mL for oregano. The biofilm formation, the production of coronatine, syringomycin and tabtoxin were inhibited by thyme and oregano essential oils in the majority of the strains. The results presented here are promising, demonstrating the bactericidal activity and the reduction of the virulence factor production by thymus and oregano oils, providing some insight into how they exert their antibacterial activity. These natural products could be considered in the future for the control of bacteriosis caused by *P. syringae*.

Introduction

Pseudomonas syringae is a gram negative plant-pathogenic rod responsible of a variety of plant diseases in many crops species, including apples, beets, beans, cabbage, cucumbers, oats, olives, peas, tobacco, tomato, rice and flowers. This species is divided into pathovars, related to the host from which were isolated, producing several symptoms like spots, specks, and blights (Bender *et al.* 1999; Hwang *et al.* 2005). *P. syringae* lives as an ephyhite on leaf surface until conditions favors it switch to a pathogenic life style. It enters into the plant through natural openings such as stomata and lenticels, or via wound sites, where it reproduces itself until it reaches a cellular concentration that triggers disease lesions (Tarkowski & Vereecke 2013). The lesions produced in the colonization process of the host are associated with many virulence factors regulated by quorum sensing (QS) mechanisms (Matas *et al.* 2012). These virulence factors are biofilm, extracellular polysaccharides, phytotoxins, cell wall-degrading enzymes, and phytohormones (Arrebola *et al.* 2011).

In natural ecosystems, microorganisms grow preferentially in communities, attached to surfaces forming complex structures known as biofilms that help in the survival of bacteria on host tissue. Biofilms are described as aggregations of cells adsorbed to biotic or abiotic surfaces, constituted mainly by extracellular polysaccharides along with proteins, lipids, and nucleic acids. Cells inside biofilm are more resistant to environmental stresses, host defense mechanisms, and antimicrobial compounds. The growth of cells in close proximity, as in biofilms, allows signal molecules to triggers changes in the gene expression (von Bodman *et al.* 2003; Rigano *et al.* 2007; Bogino *et al.* 2013). Phytotoxins are virulence factors because they are produced during pathogenesis in plants, leading to chlorosis and

necrosis of leaves. They are not considered necessary for the disease development, but the presence of them increases the pathogen virulence and severity in plants as they are involved in the systemic movement of bacteria, the lesion size and the reproduction in the host (Bender *et al.* 1999; Ichinose *et al.* 2013). These phytotoxins exert their effect mainly in the plasma membranes of plant cells with different consequences: a) coronatine, induces the opening of the stomata favoring the income of bacteria; b) syringomycin and syringopeptin, provoke pore formation allowing loss of several nutrients lost resulting in plant tissue necrosis; c) tabtoxin and phaseolotoxin chlorosis and necrosis by the inhibition of the amino acids synthesis (Arrebola *et al.* 2011; Tarkowski & Vereecke 2013). The diseases caused by these phytopatogenic bacteria are increasing worldwide mostly because of the existence of contaminated seeds, equipment, machinery, people, water and international commerce that serve as a transport agent for these pathogens helping in the dissemination. The only therapy for the control of these bacteriosis are antibiotics and copper compounds, which represent a considerable problem because they can be toxic when they are wrongly used, generating undesirable effects for human, animals and the environment. The misuse of the antibiotic compounds could develop resistance in strains of *P. syringae*. Unfortunately, there are not compounds available for bacterial plant disease control in extensive practices such as soybean. In the last years, biological properties of medicinal plant extracts have been studied extensively and many reports have focused on the possibility of using them to avoid the dispersion of phytopathogens (Lo Cantore *et al.* 2004; Vasinauskiene *et al.* 2006). In this way, the essential oils and their terpenes are being considered for the treatment of bacterial infections due to their antimicrobial properties, safety, the wide acceptance by consumers and their potential use in different areas as cosmetic, pharmaceutical and food industries (Ben El Hadj Ali *et al.*

2013). Essential oils are volatile compounds with a strong odor, synthesized by aromatic plants as secondary metabolites. The biological activities described for them are dependent on the diversity and quantity of the constituents which include oxygenated terpenoids as well as alcoholic and phenolic terpenes (Burt 2004; Koroch *et al.* 2007; Oliva *et al.* 2010). *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* are plant aromatic species that produce essential oils and extracts that have been reported to exert significant antimicrobial activity [redacted] *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Salmonella typhymutium, Lysteria innocua, Serratia marcescens* and *Pseudomonas fluorescens* (Viuda-Martos *et al.* 2011; Coy Barrera & Acosta 2013). Previous studies have demonstrated the ability of these essential oils to inhibit the growth of phytopatogenic *P. syringae* strains (Oliva *et al.* 2015). These results have prompted the continuation of the studies on the mechanism by which these essential oils affect these bacteria. Nowadays, investigations on the control of phytopatogenic strains are focused on the inhibition of the production of molecules related to virulence, such as phytotoxins and biofilm (Geske *et al.* 2007). So the aim of this study was to investigate the effects of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* essential oils on the production of virulence factors of phytopatogenic *P. syringae* strains, including anti-biofilm and anti-toxins activities.

Materials and methods

Essential oils

Essential oils of *Thymus vulgaris* (L) (thyme) and *Origanum vulgare* (L) cv 'chileno' (oregano) were provided by "Establecimiento Agroproductivo Los Molles", located in San Luis (Argentina). The essential oils were obtained by hydrodistillation in a Clevenger-like apparatus from dried leaves (100 g) of each plant. They were stored at -20 °C with anhydrous sodium sulphate (Aumeeruddy-Elalfi *et al.* 2016). The identification and quantification of the components of thyme and oregano essential oils were previously analyzed using gas chromatography_mass spectrometry (GC-MS). In thyme oil, 36 compounds were identified while in oregano oil, 24. The main components found in high percentages in both oils were: carvacrol, p-cimene and c-terpinene and, in low percentages: thymol. Oregano oil also presented cis-sabinene hydrate among its main terpenes (Oliva *et al.* 2015).

Microorganisms

The bacterial species used in this work were: *Pseudomonas syringae* C13LS (KJ569375), *Pseudomonas syringae* EM1 (KJ569377), *Pseudomonas syringae* LS3 (KJ569373), *Pseudomonas syringae* Q (KJ569372), *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC 3000, *Pseudomonas syringae* pv *syringae* B728a, *P. savastanoi pv glycinea* B076, *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* 6605 and *Pseudomonas syringae* pv *atropurpurea* (Ps5) (Table 2).

Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC)

The antimicrobial activity of thyme and oregano essential oils was determined using the broth microdilution method described in Mann & Markham (1998), with some modifications on *Pseudomonas syringae* pv *syringae* B728a, *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* B076, *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* 6605 *and Pseudomonas syringae* pv *atropurpurea* (Ps5) strains. For *P. syringae* C13LS, *P. syringae* EM1, *P. syringae* LS3, *P. syringae* Q, *P. syringae* pv *tomato* DC 3000, the MIC values obtained previously by Oliva *et al.* 2015 were considered for these studies too.

Overnight culture: Tubes containing King's B broth (KBB) were inoculated with the phytopathogenic bacteria and incubated at 28 °C, overnight. Cell densities were measured at 620 nm in a spectrophotometer. .

Firstly, the appropriate cell density to perform the MIC assays was determined for each strain using resazurin. This is a redox indicator that is blue in its oxidized form and pink in its reduced form, producing a color change when the surrounding medium is reduced as a result of dissolved oxygen and acid production (Mann & Markham. 1998). For this assay, serial ten-fold dilutions of the overnight culture were prepared in KBB and 170 µl of each dilution were dispensed into a microtitre plate containing 20 µl of a dilution of dimethylsulphoxide (DMSO) and water (1:8) and 10 µl of resazurin solution (0.01% w/v). The microtitre plate was incubated for 24h at 28 °C. and the appropriate dilution unable to reduce resazurin (blue) was chosen for the antimicrobial assay, i.e., 1 log cycle lower than the cell density required to reduce resazurin (usually 10^5–10^6 CFU/mL). The viable plate count method on KB agar (KBA) was made to this dilution as a control to determine the CFU/mL.

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC): Serial two fold dilutions of each essential oil were prepared in DMSO (1:8) by vortexing it at room temperature. A sterile 96-well microtitre tray was prepared with the dilution of bacteria as follows: column

1–10, 170 µl inocula + 20 µl essential oil dilution; column 11, 170 µl inocula + 20 µl diluent DMSO (1:8; positive control = pink); column 12, assay medium (KBB + 20 µl diluent; negative control = blue). Two trays were prepared for each strain and incubated at 28 °C for 24h. After incubation, 10 µl of resazurin solution were added to all wells and incubated again for 4h at 28 °C. Wells were assessed visually for color change, with the highest dilution remaining blue indicating the MIC (Mann & Markham 1998).

Determination of the minimum bactericidal concentration (MBC)

The bactericidal activity was performed adding 100 µl of an overnight culture of each strain to tubes containing Minimun Media (MM) with different dilutions of each essential oil. These tubes were incubated at 28 °C 24h in a shaker (120 rpm) and a spot (20 µl) was placed onto a plate with KBA. They were incubated for 5 days at room temperature; then MBC was determined, considering bactericidal activity when less than 0.01% of growth was observed.

Inhibition of biofilm formation assay

For biofilm formation overnight *P. syringae* cultures in KBB were added to microtitres wells filled with fresh KKB and incubated at 28 °C for different times: 8, 24, 36 and 48h. After each time, cultures were discarded and microtitres were washed with distilled water twice and filled with crystal violet (1%) 30 min. They were thoroughly washed with distilled water and a visual qualitative detection was made. Then each stained well was solubilized with ethanol for the quantification of biofilm, measuring the absorbance at 570 nm in a spectrophotometer (O'Toole *et al.* 1998; Niu & Gilbert 2004).

The microplates where was previously determined the MIC were used to test the effect of essential oils on the biofilm formation. Therefore, the cultures contained in the microplate were discarded and the empty wells were washed with distilled water twice. All of them were filled and stained with 1% of crystal violet for 30 min. The dye was removed and many washes were performed with distilled water. The effect of essential oils on biofilm production was visualized and quantified by solubilization with 95% ethanol. The absorbance of the microplate was measured in a spectrophotometer at 570 nm (O'Toole *et al.* 1998).

Phenotipic assays for phytotoxins production

Coronatine: the production of this phytotoxin was determined by the semiquantitative potato disk bioassay. Fifty microliters of overnight *P. syringae* cultures were added to eppendorfs containing 1 mL of MM and incubated in a shaker (120 rpm) at 20 °C for 4 days. These bacterial suspensions were centrifuged at 3000 rpm for 10 min at room temperature, and 20 µl of the bacterial supernatants were spotted onto the potato tuber disk. The presence of coronatine was characterized by a hypertrophic response on the potato disks (Hwang *et al.* 2005).

Syringomycin: P. syringae strains were incubated for 24h at 28 °C. Twenty microliters of these suspensions were spotted onto potato dextrose agar, followed by incubation for 5 days at 30 °C. Subsequently, the plates were exposed to chloroform vapors for 15 minutes and sprayed with a suspension of *Geotrichum citri aurantii* spores. They were left for 24h at room temperature and a positive production of the toxin was considered when the development of a zone of inhibition surrounding the *P. syringae* colonies was observed (Hwang *et al.* 2005).

199 *Tabtoxin*: *P. syringae* strains were grown in KBB for 120h at 28 °C and then centrifuged at
200 3000 rpm during10 min. Supernatants were divided in two fractions, adding 5 µL/mL of
201 glutamine. Plates containing MM were overlaid with MM soft agar (7.5%, w/v) with an
202 overnight culture of *Escherichia coli*. Wells were made to these plates and filled with both
203 fractions of the supernatants; they were incubated at room temperature for 2 days and then
204 observed for tabtoxin detection. A positive production was considered when zones of
205 growth inhibition of *E. coli* were observed in wells with supernatants without glutamine but
206 were not observed with glutamine (Barta *et al.* 1992; Lydon & Patterson 2001).
207
208 **Genotypic assays of phytotoxins production**
209 PCR amplification for the detection of genes related to phytotoxins in *P. syringae* strains
210 was performed using specific oligonucleotide primers from published sequences. All the
211 oligonucleotides were synthesized by Biodynamics. The PCR was standardized for the
212 detection of each virulence-associated gene following the methodologies described in
213 bibliography with some modifications. The primers sequences and programs used are
214 shown in Table 2. The reaction mixture (50 µL) for gene amplification was made
215 containing 20 ng of template DNA, 1 mM oligonucleotide primers, 0.4 mM of each of the
216 four dNTPs, 1.50 U Taq polymerase and 1.5 mM $MgCl_2$. The temperature of annealing
217 varied from 57 to 60 °C. and reactions were carried out in a thermal cycler. Each phytotoxin
218 gene was tested at least twice, including a positive and a negative control in each run. PCR
219 products were resolved on 1.2% agarose gel at 90V for 1h. Gels were stained with 1 mL
220 SYBR Safe DNA gel stain per 50 mL of melted agarose and photographed under UV light
221 with MiniBisPRO gel documentation. Genes of each isolate were tested twice (Table 1).
222

223

224 **Table 1: PCR primers, annealing temperatures and expected PCR products for**
225 **phytotoxins of *P. syringae* strains.**

226

227 **Inhibition of the production of phytotoxin**

228 The inhibition of phytotoxins by both essential oils was phenotipycally assayed, performing
229 the same methodologies described previously for each toxin with the addition of sub-
230 inhibitory concentrations of essential oils at the initial inocula.

231

232 Statistical analysis: It was performed using the Infostat/Professional statistical analysis
233 Program, using ANOVA and LSD-Fischer test. Significative differences in biofilm assays
234 were calculated for each strain (Di Rienzo *et al.* 2016).

235

Results

Antimicrobial activity of *T. vulgaris* and *O. vulgare* essential oils

The inhibitory effect (MIC) of the essential oils of *T. vulgaris* and *O. vulgare* was investigated on *P. syringae* pv *syringae* B728a, *P. savastanoi* pv *glycinea* B076, *P. syringae* pv *tabaci* 6605 and *P. syringae* pv *atropurpurea* Ps5. Both oils showed good inhibitory activity on all *P. syringae* strains, with MIC values ranging from 1.43 to 11.5 mg/mL for thyme and 5.8 to 11.6 mg/mL for oregano (Table 2).

The ability to cause the cell death of thyme and oregano oils was tested on all *P. syringae* strains. The bactericidal activity for thyme was between 0.022 to 5.7 mg/mL and for oregano the MBC was in the range of 0.012 to 0.36 mg/mL. Oregano oil demonstrated more effectiveness than thyme, as smaller concentrations were needed to perform the bactericidal activity (Table 2).

Table 2: Inhibitory and bactericidal activity of *T. vulgaris* and *O. vulgare* essential oils on *P. syringae* strains (mg/mL)

Inhibition of biofilm formation by essential oils

The ability to form biofilm by the *P. syringae* strains and the behavior of its production were analyzed at different times: 8, 24, 36, 48 h. The formation of biofilm was steadier at 24h, without variations in OD values (data not shown). So, the experiences of biofilm inhibition were performed at this time (Graphic 1).

Thyme and oregano essential oils were assayed for anti-biofilm activity against *P. syringae* strains at inhibitory and sub-inhibitory concentrations. The results obtained showed that biofilm formation was inhibited by thyme and oregano essential oils in all the strains. The biofilm inhibition was more effective at higher concentrations, both with thymus as well as with oregano oil, observing an increase in the polysaccharide formation as the concentration of the oils was smaller. Thyme oil reduced biofilm formation until the smallest concentration [redacted] (0.022 mg/mL) (Graphic 1).

Graphic 1: Effect of thyme and oregano essential oils on biofilm formation of phytophatogenic *P. syringae* strains.

DO: optical density; **AET**: Thymus essential oil; **AEO**: Oregano essential oil; **(a)**: *P. syringae* C13LS; **(b)**: *P. syringae* LS3; **(c):** *P. savastanoi* pv *glycinea* B076; **(d):** *P. syringae* pv *tomato* DC3000; **(e):** *P. syringae* pv *atropurpurea* Ps5; **(f and g):** *P. syringae* pv *tabaci* 6605 and *P. syringae* Q.

-Phytotoxin production

Phytotoxins are involved in the colonization process of the host, so the determination of the ability of *P. syringae* to produce them would help in the understanding of the pathogenicity process. The phenotypic and genotypic production of phytotoxins by *P. syringae* strains was analyzed.

The presence of coronatine was phenotypically observed by a hypertrophyc effect in the potato disk. *P. syringae* C13LS, *P. syringae* EM1, *P. syringae* LS3, *P. syringae* Q, *P. syringae* pv *tomato* DC3000 and *P. savastanoi* pv *glycinea* B076 were able to produce this toxin (Table 3).

283 Syringomycin production was phenotypically observed in all *P. syringae* strains with the
284 exception of *P. syringae* pv *atropurpurea* Ps5. This phytotoxin was observed by an
285 inhibition halo of *G. citri aurantii* (Table 3).
286 In *P. syringae* C13LS, *P. syringae* EM1, *P. syringae* LS3, *P. syringae* Q, *P. syringae* pv
287 *atropurpurea* Ps5 and *P. syringae* pv *tabaci* 6605 was phenotipically observed the tabtoxin
288 production as an inhibition zone of *E. coli* (Table 3).
289
290 **Table 3: Phenotypic and genotypic evidence of the production of phytotoxins by**
291 ***Pseudomonas syringae* strains.**
292
293 For the detection of coronatine genes, primers 1 and 2 were used to detect the presence of
294 *cfl*, amplifying a fragment of 650 bp. In this study, the presence of *cfl*, a gen involved in the
295 synthesis of this toxin, was detected in *P. syringae* C13LS, *P. syringae* LS3, *P. syringae* Q,
296 *P. syringae* pv *tomato* DC 3000, *P. syringae* pv *glycinea* B076 and *P. syringae* pv
297 *atropurpurea* Ps5, while it was not observed in *P. syringae* EM1 (Figure 1. a) (Table 3).
298 For the genotypic detection of syringomycin genes, two primers were used: *syr*B and *syr*D
299 (Sorensen *et al.* 1998). *P. syringae* pv syringae B728a was the only strain in which the
300 amplification of both fragments was observed, coinciding with the phenotypic results of the
301 production of the toxin (Figure 1. b). These genes were not detected in the others strain that
302 were phenotypically observed as positive producers (Table 3).
303 The genotypic detection of *tblaA*, involved in tabtoxin synthesis, was performed on all that
304 *P. syringae* strains that were phenotypically observed as positive producers. A fragment of
305 830 bp similar to *tbl*A product was detected in *P. syringae* pv *atropurpurea* Ps5; in the
306 other strains the amplification of this fragment was not present (Table 3, Figure 1. c).

Figure 1: a: Typical amplicons of *cfl* gene, encoding coronatine, with sizes of 650 pb (lanes: 1, 2, 3, 4, 5 and 6). b: the *syr*B and *syr*D genes for syringomycin with sizes of 700 bp (lane 1), 446 bp (lane 2); c: the genes encoding *tbl*A gene segments for tabtoxin with sizes of 829 bp (lane 1); lane M 100 bp molecular weight marker (Gibco).

Inhibition of the production of phytotoxins by essential oils

The effect on the production of phytotoxins at sub-bactericidal concentrations of thyme and oregano oils, was tested on the phytopatogenic pseudomonas strains. Both oils were able to inhibit the production of coronatine, syringomycin and tabtoxin in these *P. syringae* strains. Coronatine inhibition assay was performed on strains that demonstrated pheno- and genotypic production of this toxin: *P. syringae* LS3, *P. syringae* Q, *P. syringae* pv *tomato* DC 3000 and *P. savastanoi* pv *glycinea* BO76. The coronatine production was inhibited by both oils at concentrations of 0.71 mg/mL for thyme and 0.09 mg/mL for oregano in *P. syringae* Q, while in *P. syringae* LS3 was inhibited by oregano oil at 0.045 mg/mL.

The effect of essential oils on syringomycin was tested on those strains of *P. syringae* in which the phenotype production was observed (Table 3). Oregano essential oil inhibited the production of this phytotoxin in all the strains (100%) from concentrations of 0.003 mg/mL to 0.11 mg/mL, while thyme oil was effective to inhibit syringomycin production on 87.5% of the strains at concentration ranges of 0.006 mg/mL to 11.49 mg/mL.

The effect of both essential oils on tabtoxin production was performed on *P. syringae* pv *atropurpurea* Ps5, which was the only strain pheno- and genotypically positive for the toxin production. The inhibitory activity of thyme was observed at 2.85 mg/mL and of oregano at 0.006 mg/mL. (Table 3).

Discussion

The control of *P. syringae,* a bacteria associated to severe plant diseases, remains difficult due to the limited availability of antimicrobial substances. Natural products obtained from aromatic plants represent potential sources of molecules with biological activity. Studies made with vegetal extracts of *Allium sativum* and *Ficus carica* proved to be effective as biocontrol *P. syringae* pv *tomato*, *Xanthomonas versicatoria* and *Clavivacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato plants (Ballestra *et al.* 2009). Essential oils have been widely studied for their antimicrobial ability to control bacterial and fungal growth of animal and foods (Koroch et al. 2007; Voon *et al.* 2012). This has propelled a new stream of researches in the use of plant products for the control of microorganisms responsible of plant diseases. A significant antibacterial activity on many phytopathogenic bacterial species was shown by *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller var. *vulgare* (Miller) essential oils, proposing them as useful natural bactericides (Lo Cantore *et al.* 2004). The essential oils obtained from members of Lamiaceae family that included *Origanum onites* L., (oregano) and *Thymbra spicata* L. var. *spicata* (thyme) were tested *in vitro* against *Pseudomonas savastanoi* pv *phaseolicola* (*Psp*), the causal agent of halo blight of bean, showing inhibition activity of the growth of this pathogen (Soylu *et al.* 2003).

Our research group has previously reported the inhibitory effects of *T. vulgaris* and *O. vulgare* essential oils on phytopathogenic *P. syringae* isolated from soybean fields (Oliva *et al.* 2015). In this work, the antimicrobial activity of both oils on *P. syringae* strains and the anti-biofilm and anti-phytotoxins effect is reported. Both oils showed good inhibitory activity on all *P. syringae* strains (MIC ranges: 1.43 to 11.5 mg/mL.) and effective

355 bactericidal activity (MBC ranges: 0.012 to 5.7 mg/mL). The MIC obtained of thyme and
356 oregano essential oils was made using a microdilution method and KBB as growth
357 medium, while the MBC was performed with a macrodilution method in MM and
358 incubated in a rotary shaker. In this last method, active concentrations that produced a cidal
359 effect were smaller compared with MIC concentrations, what could be explained by the fact
360 that the incubation with movement allowed a better contact between essential oils and cells,
361 enhancing the antimicrobial activity. Several techniques for studying antimicrobial activity
362 are proposed in the bibliography, which present differences in the sensitivity due to
363 that the methods employed are based on diverse principles. They are carried out in liquid or
364 in solid media, with the advantage that in the liquid method can be determined whether an
365 extract is able to kill cells (cidal effect) or to inhibit cells (static effect) at a particular
366 concentration. Another factor to consider is the growth medium composition which could
367 greatly affect the antibacterial activity of a compound (Cos *et al.* 2006). The results
368 obtained in this work are promising for a possible use of both essential oils as bactericides
369 for the control of phytopatogenic bacteria.
370 **Biofilm:** Biofilms are three-dimensional aggregates of bacterial cells employed as a
371 strategy for the colonization of different environments that could function as a protecting
372 mechanism from stressful conditions, such as killing by antimicrobial agents (Morris &
373 Monier 2003). Biofilms are organized structures that consist of exopolysaccharides,
374 proteins, teichoic acids, and extracellular DNA, with channels that allow nutrients
375 circulation, where differentiated cells could be recognized (Beoletto *et al.* 2016).
376 surfaces are described as an optimum environment in which phytopathogenic bacteria could
377 form these structures and developed serious damages to them. They are very difficult to
378 eradicate because biofilm prevents the income of antimicrobial substances (Brakman &

379 Coenye 2015). Essential oils could be substances that interfere in the formation of
380 microbial biofilms, constituting an innovative anti-biofilm alternative for the control of
381 pathogenic bacteria (Beoletto *et al.* 2016).
382 *Pseudomonas* genus has been a model for biofilm studies thanks to its ability to form it on
383 biotic and abiotic substances (Kumar *et al.* 2013). In this work the biofilm production by all
384 phytopathogenic *P. syringae* strains was observed. The [redacted] of biofilm formation
385 followed a sigmoid model showing a first step in which the biofilm detection was poor;
386 then was observed the maximum production and lastly, the formation decreased till reach
387 initial values and began the process again. This behavior varied in time for each strain with
388 a maximum production of biofilm at 8h for some strains and 36h for others, detecting a
389 uniform amount of this polysaccharide at 24h for all strains. Thus, the effect of thyme and
390 oregano essential oils on biofilm formation was tested at this time in which the production
391 was similar in all the strains. The present study demonstrates the anti-biofilm efficacy of
392 thyme and oregano essential oils [redacted] all strains at sub-inhibitory and inhibitory
393 concentrations. Furthermore, the biofilm production of some *P. syringae* strains was totally
394 inhibited when MIC concentrations were used. There are many research works that report
395 the anti-biofilm activity of essential oils on bacteria, but few of them are on phytopatogenic
396 ones. A study made on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* demonstrated
397 the biofilm inhibition by oregano essential oil (Schillaci *et al.*2013). Other researchers
398 demonstrated the anti-biofilm activity of sub-inhibitory concentrations of oregano,
399 carvacrol and thymol on *S. aureus* and *S. epidermidis* (Nostro 2007). The inhibition of the
400 polysaccharide production of *Pseudomonas sp.* and *E. coli* by terpenes as eugenol and
401 citronellol was reported (Niu & Gilbert 2004). A study made with cinnamon bark oil and its
402 main terpene, cinnamaldehyde, showed the ability to reduce biofilm formation in *P.*

403 *aeruginosa* and enterohemorragic *E. coli* O157:H7 (EHEC) (Kim *et al.* 2015). Hence, this
404 is the first report in which the biofilm inhibition of phytopathogenic *P. syringae* by
405 essential oils has been demonstrated.
406
407 **Phytotoxins Produced by *P. syringae***
408 Phytopathogenic pseudomonads synthesized molecules that significantly enhance pathogen
409 virulence, like phytotoxins, that are not encoded by *hrp* cluster (hypersensitive response
410 and pathogenicity) (Bender. 1999). These phytotoxins can restrict and/or promote especific
411 pathogen-host interactions. The toxins most recognized in *P. syringae* are four: coronatine,
412 phaseolotoxin, syringomycin, and tabtoxin and contribute to chlorosis or necrosis (Hwang
413 *et al.* 2005). In this work the production of phytotoxins by *P. syringae* strains was
414 phenotypically and genotypically analyzed with specific detection methods and the
415 inhibitory effect on the production of coronatine, syringomycin and tabtoxin at sub-
416 inhibitory concentrations of thyme and oregano essential oils was demonstrated.
417 **Coronatine**: it is a phytotoxin [redacted] structure that mimics methyl jasmonate, a growth
418 regulator and signaling molecule synthesized by plants. This phytotoxin helps in the
419 virulence of *P. syringae* stimulating an exaggerated cell growth response resulting in a
420 bacterial gall formation or in black spots on the leaves that induce chlorotic haloes
421 (Chodwhury *et al.* 2013). The production of coronatine has been documented in *P. syringae*
422 pv *atropurpurea*, *P. savastanoi* pv *glycinea*, *P. syringae* pv *morsprunorum*, *P. syringae* pv
423 *macuolicola* and *P. syringae* pv *tomato*. [redacted] production has been associated with the
424 induction of many genes commonly localized in plasmids (Hwang *et al.* 2005; Arrebola *et*
425 *al.* 2011). The structure of coronatine consists of the polyketide coronafacic acid (CFA) and
426 the coronamic acid (CMA) linked by an amide bond (Bender *et al.* 1999). The enzyme

427 responsible for amide bond formation between coronafacic acid and coronamic acid is
428 codified by *cfl* gen. (Bereswill *et al.* 1994; Braun *et al.* 2009). In the present study, the
429 phenotypic production of coronatine was observed in *P. syringae* strains isolated from soy,
430 in *P. syringae* pv *tomato* DC3000 and in *P. savastanoi* pv *glycinea* BO76, in concordance
431 with was previously reported by other authors (Hwang *et al.* 2005; Braun *et al.* 2009;
432 Arrebola *et al.* 2011). In addition, the genotypic detection of *cfl* gen was assayed using
433 Primers 1 and 2, that specifically amplified a portion of *cfl*, demonstrating presence in *P.*
434 *syringae* C13LS, *P. syringae* LS3, *P. syringae* Q, *P. syringae* pv *tomato* DC3000, *P.*
435 *savastanoi* pv *glycinea* BO76 and *P. syringae* pv *atropurpurea* Ps5. The absence of this
436 in some of the *P. syringae* strains could be attributed to the fact that this cluster could
437 be located in plasmids, which could be lost by successive strains passages.
438 In the current work, one of the main objectives was the evaluation of essential oils effects
439 on the phytotoxins production. The inhibition of coronatine production by thyme and
440 oregano essential oils at sub-bactericidal concentrations was demonstrated on *P. syringae*
441 LS3 and *P. syringae* Q, both of them pheno- and genotypically positive for the toxin
442 production.
443 **Syringomycin:** The small cyclic lipodepsinonapeptide syringomycin causes electrolyte
444 leakage via pores formed in the host plasma membrane increasing cellular K+ efflux and
445 transient Ca2+ fluxes. It has the ability to inhibit spectrum of fungi by lipid
446 dependent membrane interaction (Hwang *et al.* 2005; Bensaci *et al.* 2011). In this work, the
447 presence of this toxin was phenotipically observed in all *P. syringae* strains by the
448 inhibition of *Geotrichum citri aurantii;* only *P. syringae* pv *atropurpurea* Ps5 was unable
449 to produce it. Despite the fact that in these strains the production of the toxin was observed
450 , the genotypic detection of *syrB* and *syrD*, was positive only in *P. syringae* pv

451 *syrinage* B728a. Genetic regulation of this toxin is quite complex; the syringomycin (*syr*)
452 gene cluster comprises six ORFs that are supposed to encode proteins involved in the
453 synthesis, secretion, and regulation of syringomycin (Sorensen *et al.* 1998). The
454 syringomycin production was described by several authors only in *P. syringae* pv *syringae*
455 (Bull *et al.* 1998; Fogliano *et al.* 1999). In this research, genes *syrB* and *syrD* from this
456 cluster were analyzed, detecting both genes only in one strain *P. syringae* pv *syringae*
457 B728a, coinciding with was previously reported. However, the majority of the
458 phytopatogenic strains isolated from soybean, beans and tomato were phenotipically
459 observed to produce this toxin. [redacted] to determine the presence of other genes
460 belonging to this cluster more studies using related primers should be tested.
461 The good inhibitory effect of thyme and oregano essential oils on this toxin production was
462 demonstrated on all strains that were phenotipically positive, with complete effectiveness of
463 oregano oil (100% of the strains) and 90% of thyme oil.
464 **Tabtoxin:** *P. syringae* pv *tabaci,* pv *coronafaciens*, and pv *garcae* has been described as
465 tabtoxin producers by other researchers. This is a toxin responsible of the chlorosis in the
466 host plant cell producing the cleavage of the peptide bond (Hwang *et al.* 2005; Young *et al.*
467 2008). Tabtoxin is a β-lactam that inhibits glutamine synthesis and is composed by
468 tabtoxinine-b-lactam (TbL) linked to threonine. The genes necessary for tabtoxin synthesis
469 in *P. syringae* are clustered in a 31-kb region that contains the *tabA, tabB* and *tblA* genes.
470 The gen *tabA* synthesizes a precursor of tabtoxin, while *tabB* codifies for an acetyl
471 transferase and *tblA* encodes for a histidine protein kinase that functions as an
472 environmental sensors (Bender *et al.* 1999). The production of tabtoxin by *P. syringae*
473 strains was presented in this research, observing phenotypic production in most of the
474 strains and genotypic detection of *tblA* only in *P. syringae* pv *atropurpurea* Ps5. These

475 results were in coincidence with Lydonn & Patterson (2001), who obtained strains that
476 were phenotipically positive to the tabtoxin production but not to the detection of these
477 genes.
478 The essential oils inhibition assay was performed on *P. syringae* pv *atropurpurea* Ps5, as it
479 was pheno- and genotipycally positive for tabtoxin production. Thyme and oregano
480 essential oils inhibited the production of tabtoxin at sublethal doses, remarking the
481 effectiveness of oregano essential oils, which was more effective at lower concentrations.
482 Many studies describe the inhibition activity of natural products obtained from medicinal
483 plants on *P. aeruginosa* virulence factors (QSI: Quorum Sensing Inhibitors). All the
484 extracts tested from six south Florida medicinal plants, belonging to different botanical
485 families were found to exert anti-QS activities against *P. aeruginosa* PAO1, including a
486 decrease in biofilm formation (Adonizio *et al.* 2008). Other research work with *P.*
487 *aeruginosa* showed that cinnamon bark oil and its main terpenic component,
488 cinnamaldehyde markedly reduced biofilm formation (Kim *et al.* 2015). Similar results
489 were obtained with curcumin that attenuated *P. aeruginosa* PAO1 biofilm formation as
490 well as down-regulated the production of extracellular virulence factors and AHLs
491 (Rudrappa & Bais 2008).
492 The plant kingdom has been a source of medicines since ancient times, deriving in many
493 searches for ethnobotanical agents that can be used to treat infections. In the last years
494 studies about the inhibition of virulence factors and QS systems by medicinal plants
495 extracts have been increasing. This is the first report that describes the ability of thyme and
496 oregano essential oils to inhibit biofilm and phytotoxins produced by *P. syringae* strains.
497 The results presented in the current work are promising because they showed antibacterial
498 activity and, at sub lethal doses, the reduction of virulence factors production by *P.*

499 *syringae* strains, providing some insight into how they can be used in the future to treat
500 phytopatogenic infections and using a natural alternative. The knowledge of the
501 antimicrobial activity of thyme and oregano essential oils gives new opportunities to test
502 natural substances for the control of phytopathogenic bacteria responsible of severe
503 diseases that cause economic losses in different crops. What is more, these natural
504 compounds would help to reduce the usage of the chemical pesticides, which are
505 environmentally harmful. Studies of the effectiveness of these oils in the greenhouse and in
506 open fields should be carried out in the future, in order to evaluate the effects of these
507 natural substances to control *Pseudomonas* infections on susceptible hosts.
508
509 ACKNOWLEDGEMENTS
510
511 The present work was carried out thanks to grants from SECyT-UNRC and CONICET.
512 María Evangelina Carezzano, Jesica Paola Sotelo, Emiliano Primo, María Fernanda Paletti
513 Rovey are fellows of CONICET. Elina Beatríz Reinoso, Walter Fabián Giordano and María
514 de las Mercedes Oliva are Career Members of CONICET and Mirta Demo is a professor at
515 UNRC. We thank Ing. Roberto Genovese from Establecimiento Agroproductivo Los
516 Molles for supplying *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris*.
517

518 Bibliografia

519 Adonizio A., Kong K.-F., Mathee K. (2008) Inhibition of quorum sensing-controlled
520 virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by south florida plant extracts.
521 *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 198-203.

522 Arrebola E., Cazorla F.M., Perez-García A., Vicente, A. (2011) Chemical and metabolic
523 aspects of antimetabolite toxins produced by *Pseudomonas syringae* pathovars. *Toxins*, *3*,
524 1089-1110.

525 Aumeeruddy-Elalfi Z., Gurib-Fakim A., Mahomoodally M.F. (2016) Antimicrobial and
526 antibiotic potentiating activity of essential oils from tropical medicinal herbs and spices.
527 Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches. Ed. Elsevier Inc,
528 London: 271-289.

529 Balestra G.M., Heydari A., Ceccarelli D., Ovidi E., Quattrucci A. (2009) Antibacterial
530 effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. *Crop*
531 *Protection*, 28, 807-811.

532 Barta T.M., Kinscherf T.G., Willis D.K. (1992) Regulation of Tabtoxin Production by the
533 lemA Gene in *Pseudomonas syringae*. *Journal of bacteriology*, 3021-3029.

534 Ben El Hadj Ali I., Guetat A., Boussaid M. (2013) A combined approach using allozymes
535 and volatiles for the characterization of *Tunisian Thymbra capitata* (L.) Cav. (Lamiaceae)
536 *Industrial Crops and Products*, 43, 477-483.

537 Bender C., Malvick D., Conway K., George S., Pratt P. (1999) Characterization of
538 pXV1OA, a copper resistance plasmid in *Xanthomonas campestris* pv.*vesicatoria*. *Applied*
539 *and environmental microbiology*, 56 (1), 170-175.

Bensaci M.F., Gurnev P.A., Bezrukov S.M., Takemoto J.Y. (2011) Fungicidal activities and mechanisms of action of *Pseudomonas syringae* pv *syringae* lipodepsipeptide syringopeptins 22A and 25A. *Frontiers in microbiology*, 216 (2), 1-7.

Beoletto V.G., Oliva M.M., Marioli J.M., Carezzano M.E., Demo M.S. (2016) Antimicrobial natural products against bacterial biofilms. Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches. Ed. Elsevier Inc, London: 290-307.

Bereswill S., Bugert P., Volksch B., Ullrich M., Bender C.L., Geider K. (1994) Identification and relatedness of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analysis and sequence determination of the amplification products. *Applied and environmental microbiology*, 2924-2930.

Bogino P.C., Oliva M.de las M., Sorroche F.G., Giordano W. (2013) The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *Int. J. Mol. Sci*, 14, 15838-15859.

Brackman G., Coenye T. (2015) Quorum Sensing Inhibitors as Anti-Biofilm Agents. *Current Pharmaceutical Design, 21*, 5-11.

Braun Y., Smirnova A.V., Weingart H., Schenk A., Ullrich M.S. (2009) Coronatine gene expression in vitro and in planta, and protein accumulation during temperature downshift in *Pseudomonas syringae. Sensors, 9*, 4272-4285.

Bull C.T., Wadsworth M.L., Sorensen K.N., Takemoto J.Y., Austin R.K., Smilanick J.L. (1998) Syringomycin E produced by biological control agents controls green mold on lemons. *Biological control*, 12, 89-95.

Burt S. (2004) Essential oils: antibacterial properties and potential aplications in food:-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.

563 Chowdhury C., Jagannadham M.V. (2013) Virulence factors are released in association
564 with outer membrane vesicles of *Pseudomonas syringae* pv *tomato* T1 during normal
565 growth. *Biochimica et Biophysica Acta,* 1834, 231-239.
566 Cos P., Vlietinck A.J., VandenBerghe D., Maes L. (2006) Anti-infective potential of natural
567 products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of*
568 *Ethnopharmacology*, 106, 290-302.
569 Coy Barrera C.C.A., Acosta G.E. (2013) Antibacterial activity and chemical composition of
570 essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*), thyme (*Thymus vulgaris*) and turmeric
571 (*Curcuma longa*) from Colombia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales,* 18(2), 237-246.
572 De Feo V., Ricciardi A., Biscardi D., Senatore, F. (1998) Chemical composition and
573 antimicrobial sreening of the essential oil of *Minthostachys verticillata* (Griseb). Epl.
574 (*Lamiaceae*). *J Essential oil Res,* 10, 61-65.
575 Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W.
576 InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
577 URL http://www.infostat.com.ar
578 Fogliano V., Gallo M., Vinale F., Ritieni A., Randazzo G., Greco Lops, M. R., Graniti A.
579 (1999) Immunological detection of syringopeptins produced by *Pseudomonas syringae* pv.
580 *lachrymans. Physiological and Molecular Plant Pathology, 55, 255-261.*
581 Geske G.D., O'Neill J.C., Miller D.M., Mattmann M.E., Blackwell H.E. (2007) Modulation
582 of bacterial quorum sensing with synthetic ligands: systematic evaluation of n-acylated
583 homoserine lactones in multiple species and new insights into their mechanisms of action.,
584 *J. Am. Chem. Soc,* 129 (44), 13613-13625.

585 Hwang M., Morgan R., Sarkar S., Wang P., Guttman D. (2005) Phylogenetic
586 characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae. Applied*
587 *and environmental microbiology*, 71 (9), 5182-5191.
588 Ichinose Y., Taguchi F., Mukaihara T. (2013) Pathogenicity and virulence factors of
589 *Pseudomonas syringae. J Gen Plant Pathol*, 79, 285-296.
590 Kim Y.G., Lee J.H., Kim S-I., Baek K.H., Lee J. (2015) *Cinnamon bark* oil and its
591 components inhibit biofilm formation and toxin production International. *Journal of food*
592 *microbiology*, 195, 30-39.
593 Koroch A.R., Juliani H.R., Zygadlo J.A. (2007) Bioactivity of essential oils and their
594 components. *Flavours and Fragrances*, 5, 87-115.
595 Kumar L., Chhibber S., Harjai K. (2013) Zingerone inhibit biofilm formation and improve
596 antibiofilm efficacy of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Fitoterapia*,
597 90, 73-78.
598 Lo Cantore P., Iacobellis N., De Marco N., Capasso F., Senatore F. (2004) Antibacterial
599 activity of *Coriandrum sativum L.* and *Foeniculum vulgare Miller Var. vulgare* (Miller)
600 essential oils. *Journal. Agricultural. Food Chemistry*, 52, 7862-7866.
601 Lydon J., Patterson C.D. (2001) Detection of tabtoxin-producing strains of *Pseudomonas*
602 *syringae* by PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 32, 166-170.
603 Mann C.M., Markham J.L. (1998) A new method for determining the minimum inhibitory
604 concentration of essential oils. *Journey Applied Microbiology*, 84, 538-544.
605 Matas I.M., Lambertsen L., Rodríguez-Moreno L., Ramos C. (2012) Identification of novel
606 virulence genes and metabolic pathways required for full fitness of *Pseudomonas*
607 *savastanoi* pv *savastanoi* in olive (Oleaeuropaea) knots. *New Phytologist*, 196, 1182–1196.

608 Morris C.E., Monier J.M. (2003) The ecological significance of biofilm formation by plant-
609 associated bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 41, 429-53.
610 Niu C., Gilbert E.S. (2004) Colorimetric method for identifying plant essential oil
611 components that affect biofilm formation and structure. *Appl Environ Microbiol*, 70, 6951-
612 6956.
613 Nostro A.S. (2007) Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and
614 *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*, 56, 519-523.
615 Oliva M., Carezzano E., Gallucci N., Casero C., Demo M. (2010) Antimicotic effect of the
616 essential oil of *Aloysia triphylla* against *Candida* species obtained from human pathologies.
617 *Natural Product Communications*, 5, 1-3.
618 Oliva M.M., Carezzano M.E., Giuliano M., Daghero J., Zygadlo J., Bogino P., Giordano
619 W., Demo M. (2015) Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* and
620 *Origanum vulgare* on phytopathogenic strains isolated from soybean. *Plant biology*, 1-8.
621 O'Toole G.A., Kolter R. (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens*
622 WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol*
623 *Microbiol*, 28, 449-461.
624 Rigano L.A., Siciliano F., Enrique R., Sendín L., Filippone P., Torres P.S., Qüesta J.,
625 Maxwell Dow J., Castagnaro A.P., Vojnov A.A., Marano M.R. (2007) Biofilm formation,
626 epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Molecular*
627 *Plant-Microbe Interactions*, 20 (10), 1222–1230.
628 Rudrappa T., Bais H.P. (2008) Curcumin, a known phenolic from curcuma longa,
629 attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal
630 pathogenicity models. *J. Agric. Food Chem*, 56 (6), 1955-1962.

631 Sawada H., Takeuchi T., Matsuda I. (1997) Comparative analysis of *Pseudomonas syringae*
632 *pv. actinidiae* and *pv. phaseolica* based on phaseolotoxin-rsistant ornithine
633 carbamoyltransferasa gene (argK) and 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. *Applied*
634 *and environmental microbiology,* 282-288.
635 Schaad N.W., Jones J.B., Chun W. (2001) Laboratory guide for identification of plant
636 pathogenic bacteria. 2° edition. Editorial: *The American phytopathological society.* Press,
637 St. Paul, MN. USA.
638 Schillaci D., Napoli E.M., Cusimano M.G., Vitale M. Ruberto G. (2013) *Origanum vulgare*
639 subsp. *hirtum* essential oil prevented biofilm formation and showed antibacterial activity
640 against planktonic and sessile bacterial cells. *Journal of food protection,* 76(10), 1747-
641 1752.
642 Sorensen K.N., Kim K.H., Takemoto J.Y. (1998) PCR detection of cyclic
643 lipodepsinonapeptide-producing *Pseudomonas syringae pv. syringae* and similarity of
644 strains. *Applied and environmental microbiology*, 226-230.
645 Soylu S., Soylu E.M., Bozkurt A., Kaya A.D. (2003) Antibacterial activities of essential
646 oils from oregano, thyme, rosemary and lavender plants against *Pseudomonas savastanoi*
647 pv *phaseolicola,* the causal agent of halo blight of bean. *Ovidius University annals of*
648 *medical science-Pharmacy,*1, 40-44.
649 Tarkowski P., Vereecke D. (2013) Threats and opportunities of plant pathogenic bacteria.
650 *Biotechnology Advances,* 32, 215-229.
651 Vasinauskiene M., Radusiene J., Zitikaite I., Surviliene E. (2006) Antibacterial activities of
652 essential oils from aromatic and medicinal plants against growth of phytopathogenic
653 bacteria. *Agronomy Research,* 4, 437-440.

654 Viuda-Martos M., Mohamady M.A., Fernández-López J., AbdElRazik K.A., Omer E.A.,
655 Pérez-Alvarez J.A., Sendra E. (2011) In vitro antioxidant and antibacterial activities of
656 essentials oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control*, 22, 1715-1722.
657 von Bodman S.B., Dietz Bauer W., Coplin D.L. (2003) Quorum sensing in plant-
658 pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol*, 41, 455–482.
659 Voon H.C., Bhat R., Rusul G. (2012) Flower Extracts and Their Essential Oils as Potential
660 Antimicrobial Agents for Food Uses and Pharmaceutical Applications. *Comprehensive*
661 *Reviewsin Food Science and Food Safety*, 11, 1-22.
662 Young J., Lee J.S., Oh J., Choi J.W., Baik H.S. (2008) Functional analysis of the role of fur
663 in the virulence of *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* 11528: fur controls expression of
664 genes involved in quorum-sensing. *Biochemical and biophysical research communications*,
665 366, 281-287.
666

667 **Table and figure legends**

668 **Table 1: PCR primers, annealing temperatures and expected PCR products for**
669 **phytotoxins of *P. syringae* strains.**

670

671 **Table 2: Inhibitory and bactericidal activity of *T. vulgaris* and *O. vulgare* essential oils**
672 **on *P. syringae* strains (mg/mL).**

673

674 **Table 3: Phenotypic and genotypic evidence of the production of phytotoxins by**
675 ***Pseudomonas syringae* strains.**

676

677 **Figure 1: a: Typical amplicons of *cfl* gene, encoding coronatine, with sizes of 650 pb**
678 **(lanes: 1, 2, 3, 4, 5 and 6). b: the *syr*B and *syr*D genes for syringomycin with sizes of**
679 **700 bp (lane 1), 446 bp (lane 2); c: the genes encoding *tbl*A gene segments for tabtoxin**
680 **with sizes of 829 bp (lane 1); lane M 100 bp molecular weight marker (Gibco).**

681

682 **Graphic 1: Effect of thyme and oregano essential oils on biofilm formation of**
683 **phytophatogenic *P. syringae* strains.**
684 **DO: optical density; AET: Thymus essential oil; AEO: Oregano essential oil; (a): *P.***
685 ***syringae* C13LS; (b): *P. syringae* LS3; (c): *P. savastanoi* pv *glycinea* B076; (d): *P.***
686 ***syringae* pv *tomato* DC3000; (e): *P. syringae* pv *atropurpurea* Ps5; (f and g): *P. syringae***
687 **pv *tabaci* 6605 and *P. syringae* Q.**

Table 1: PCR primers, annealing temperatures and expected PCR products for phytotoxins of *P. syringae* strains.

Target gene	Phytotoxin	Primer sequence (5′–3′)	Annealing temperatura (°C)	Product size (bp)	References
cfl	Coronatine	GGCGCTCCCTCGCACTT	58	650	Schaad *et*
		GGTATTGGCGGGGGTGC			*al.* 2001
*syr*B	Syringomycin	CTTTCCGTGGTCTTGATGAGG	60	752	Sorensen *et*
		TCGATTTTGCCGTGATGAGTC			*al.* 1998;
					Schaad *et*
					al. 2001
*syr*D	Syringomycin	AAACCAAGCAAGAGAAGAAGG	60	446	Sorensen *et*
		GGCAATACCGAACAGGAACAC			*al.* 1998
*tbl*A	Tabtoxin	CTGGTCACTGCGCTAGGC	57	829	Lydon &
		CTGGTCACTGCGCTAGGC			Patterson
					2001

Table 2: Minimum inhibitory (MIC) and bactericidal activity (MBC) of *T. vulgaris* and *O. vulgare* essential oils on *P. syringae* strains (mg/ml)

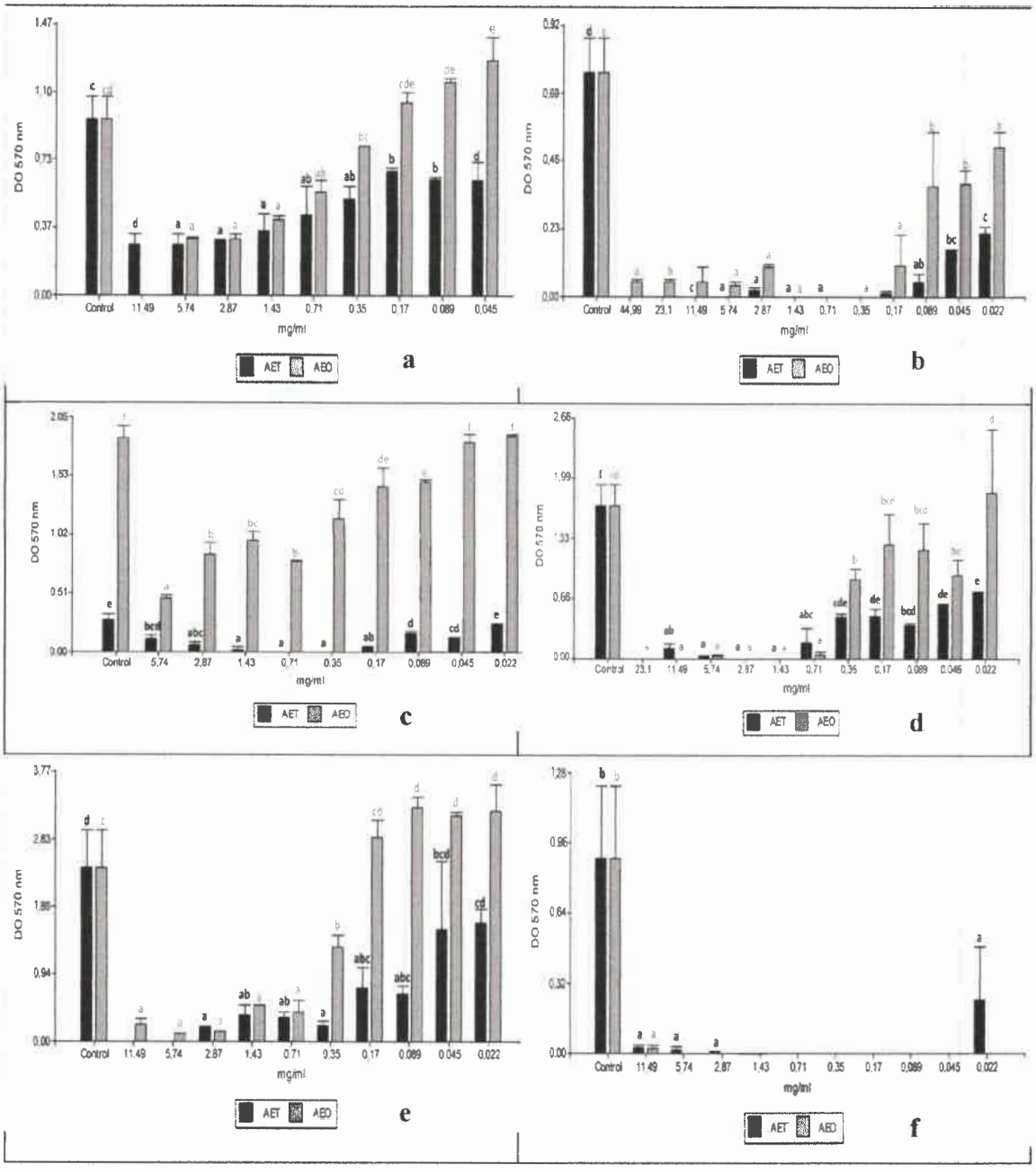
***Pseudomonas* strains**	**Source**	***Thymus vulgaris*** **(0.022-45.99mg/mL)**		***Origanum vulgare*** **(0.022-6.26mg/mL)**	
		MIC	**MBC**	**MIC**	**MBC**
***P. syringae* C13LS**[a]	soybean	11.5*	5.7	5.8*	0.022
***P. syringae* EM1**[a]	soybean	11.5*	0.71	11.6*	0.09
***P. syringae* LS3**[a]	soybean	11.5*	0.17	46.3*	0.36
***P. syringae* Q**[a]	soybean	11.5*	0.71	23.1*	0.022
***P. syringae* pv *tomato* DC3000**[b]	tomato	11.5*	0.022	23.1*	0.045
***P. syringae* pv *syringae* B728a**[c]	bean	1.4	0.022	5.8	0.045
***P. savastanoi* pv *glycinea* B076**[d]	soybean	5.8	0.17	5.8	0.022
***P. syringae* pv *tabaci* 6605**[e]	tobacco	11.5	0.089	11.6	0.18
***P. syringae* pv *atropurpurea* Ps5**[f]	oats	2.9	-	11.6	0.012

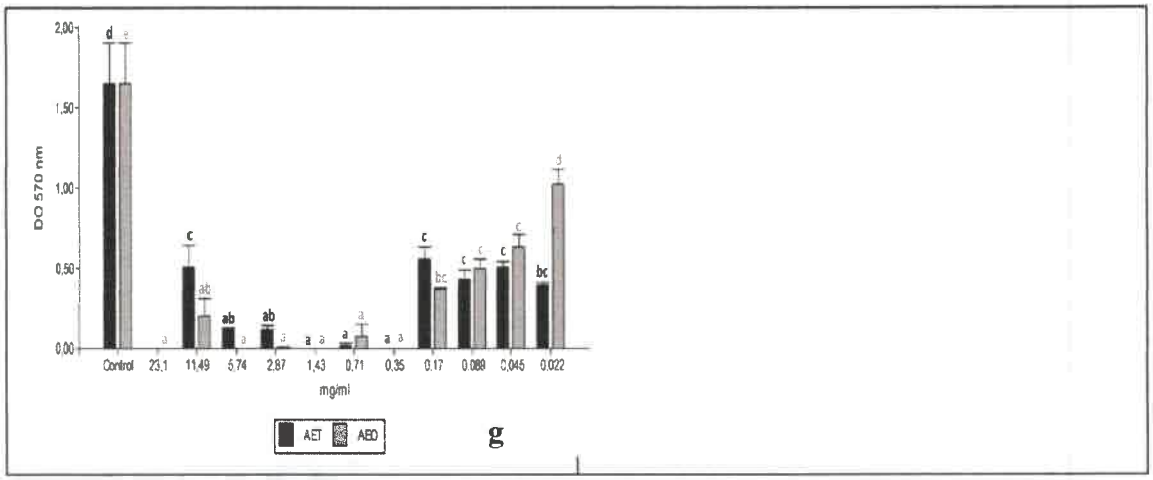
Ref.: MIC: Minimun inhibitory concentration; MBC: Minimun bactericidal concentration; mg/mL: concentration of essential oil; (-): Not done; * [a]: From Oliva et al. 2015; [b]: provided by A. Collmer; [c]: provided by S. Lindow; [d]: provided by Y. Zhao; [e]: provided by D. Studholmer; [f]: provided by L. Gallarato

Table 3: Phenotypic and genotypic production of phytotoxins in *Pseudomonas syringae*

Strains \ Toxins	Coronatine		Syringomycin		Tabtoxin	
	P	G	P	G	P	G
***P. syringae* C13LS**	+	+	+	-	+	-
***P. syringae* EM1**	+	-	+	-	+	-
***P. syringae* LS3**	+	+	+	-	+	-
***P. syringae* Q**	+	+	+	-	+	-
***P. syringae* pv *tomato* DC3000**	+	+	+	-	-	ND
***P. syringae* pv *syringae* 728a**	-	ND	+	+	-	-
***P. savastanoi* pv *glycinea* B076**	+	+	+	-	-	ND
***P. syringae* pv *tabaci* 6605**	-	ND	+	ND	+	-
***P. syringae* pv *atropurpurea* Ps5**	-	+	-	-	+	+

Ref.: P: Phenotipic; G: Genotipic; ND: not done


DO 570 nm
mg/ml
Control
11.49
5.74
2.87
1.43
0.71
0.35
0.17
0.089
0,045
AET
AEO
a
Control
44,99
23,1
11.49
5.74
2.87
1.43
0,71
0,35
0,17
0,089
0.045
0.022
b
5,74
c
23.1
d
e
f


DO 570 nm
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
Control
23,1
11,49
5,74
2,87
1,43
0,71
0,35
0,17
0,089
0,045
0,022
mg/ml
AET
AED

g

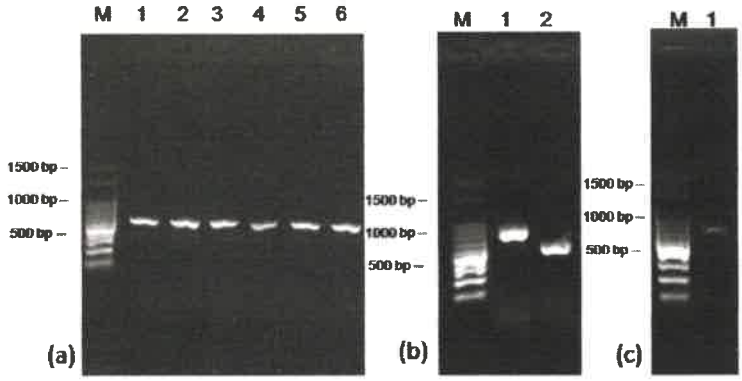


Figure 1: a: Typical amplicons of *cfl* gene, encoding coronatine, with sizes of 650 pb (lanes: 1, 2, 3, 4, 5 and 6). b: the *syrB* and *syrD* genes for syringomycin with sizes of 700 bp (lane 1), 446 bp (lane 2); c: the genes encoding *tblA* gene segments for tabtoxin with sizes of 829 bp (lane 1); lane M 100 bp molecular weight marker (Gibco).

254x190mm (96 x 96 DPI)

Dear Dr. Oliva,

Manuscript ID PlaBio-2016-07-0256-RP entitled Inhibitory effect of Thymus vulgaris and Origanum vulgare essential oils on virulence factors of phytopatogenic Pseudomonas syringae strains which you submitted to Plant Biology, has been reviewed. The comments of the reviewers are included at the end of this letter.

The reviewers have recommended publication, but also suggest some minor revisions to your manuscript. Therefore, I invite you to respond to the reviewers' comments and revise your manuscript.

To revise your manuscript, log into https://mc.manuscriptcentral.com/plabio and enter your Author Center, where you will find your manuscript title listed under "Manuscripts with Decisions." Under "Actions," click on "Create a Revision." Your manuscript number has been appended to denote a revision.

You will be unable to make your revisions on the originally submitted version of the manuscript. Instead, revise your manuscript using a word processing program and save it on your computer. Please also highlight the changes to your manuscript within the document by using the track changes mode in MS Word or by using bold or colored text.

Once the revised manuscript is prepared, you can upload it and submit it through your Author Center.

When submitting your revised manuscript, you are requested to respond to the comments made by the reviewers in the space provided. You can use this space to document any changes you make to the original manuscript. In order to expedite the processing of the revised manuscript, please be as specific as possible in your response to the reviewers.

IMPORTANT: Your original files are available to you when you upload your revised manuscript. Please delete any redundant files before completing the submission.

Because we are trying to facilitate timely publication of manuscripts submitted to Plant Biology, your revised manuscript should be uploaded as soon as possible, but within 4 weeks at the latest. If this is not possible for you, we will handle your paper as a new submission.

Once again, thank you for submitting your manuscript to Plant Biology and I look forward to receiving your revision.

Sincerely,
Dr. J. T. M. Elzenga
Editor in Chief, Plant Biology
j.t.m.elzenga@rug.nl

Editor's Comments to Author:

Dear Dr. Oliva,

your manuscript "Inhibitory effect of Thymus vulgaris and Origanum vulgare essential oils on virulence factors of phytopatogenic Pseudomonas syringae strains", which you kindly submitted to Plant Biology has been reviewed by two competent colleagues and their comments are enclosed. As you can see from the reviews attached the reviewers found your manuscript suitable for publication in Plant Biology, but had expressed some concerns that require your attention. Thus, your manuscript needs minor revisions that will be checked upon resubmission.

After submission of a properly revised version I will suggest the Editors-in-Chief to accept the manuscript.

Yours sincerely, Dr. E. Flemetakis

Reviewer: 1

Make one section: results and discussion
1-Line 25: replace was by were

2-Lines 29 to 32: Sentence too, long. I would suggest to re-write it

3-Lines 43-44. Check the use of English of this sentence, the idea it is not clear.

4-Line 106. Reference need to be updated.

5-Line 107. What is the meaning of "mean of CG-MS"? I suggest to explain the method. The method is not explained because it was not made for this study. It was previously made by our research group and published in Oliva et al. 2015. We considered that it was not necessary

to explain it.

6-Line 134. DMSO (1:8)? w/w? with water?
Yes. It means 1 part of DMSO in 7 parts of water, v/v.

7- Lines 169-171. How is the presence of biofilm related with this technique?
The presence of biofilm is detected by the dye cristal violet because it adheres to the polysachariddes. It can be quantified using a colorimetric method, related to the quantity of biofilm produced.

8-Line 217. Insert reference for statistical analysis and software.

9-Line 218. The test name is LSD-Fisher.

10-Line 241-242. Check sentence meaning.

11-Lines 301-307. I suggest to delete this information. I was mentioned in the introduction section.

12-Line 328. Insert bibliography.

13. Lines 356 to 358. It is not clear if it is a sigmoid model, does it has to asymptotes? Or reach an initial value?

14. Line 362. Replace of by for.

Reviewer: 2

The manuscript by Carezzano et al. describes the effects of essential oils by Thymus vulgaris and Origanum vulgare on biofilm formation and the production of the phytotoxins coronatine, syringomycin and tabtoxin produced by several plant pathogenic Pseudomonas syringae strains. The authors performed a series of experiments to demonstrate the bactericidal activity of thyme and origanum essential oils and showed for the first time that biofilm formation and phytotoxin production was inhibited by these crude extracts in all or some of the tested phytopathogenic Pseudomonas strains. In general, the experimentation is well organized and conducted and the obtained results are quite interesting but some additions and modifications are necessary. The inhibition of the biofilm formation should be measured in % reduction of bacterial cell numbers and not of absorbance units. Additionally, the effects of essential oils on Pseudomonas phytotoxins should be depicted in more details with pictures of the different assays. The manuscript

though is not very well-written and presented and requires a thorough revision and several corrections in the text that need to be considered before it can be accepted for publication. There are a lot of grammatical and syntax errors throughout the manuscript that makes the clarity of the text very unsatisfactory.

Points that need to be considered by the authors:

Abstract

1. Lines 29-32. Rewrite the sentence.

2. Line 34. Replace "treat" by "control"

3. Line 35. Add the word "strategy" after "alternative"

Introduction

4. Line 40. Replace "representative" with "typical"

5. Line 42. Add "the" before "reason"

6. Line 44. Replace "leaves" with "leaf" and add "to" before "switch"

7. Line 48. Replace "to" by "with"

8. Line 62. Delete the first "the" before "severity"

9. Lines 66-67. Correct the sentence to "syringomycin and syringopeptin provoke pore formation allowing loss of several nutrients resulting in plant tissue necrosis"

10. Line 68. Replace "produce" with "lead to" and delete "," after phaseolotoxin

11. Line 70. Replace "this" with "these"

12. Lines 71-72. This sentence does not make sense and needs rewriting: "... because of the use of contaminated seeds helped by the transport of the pathogens in the equipment, people, water and international commerce".

13. Line 73. The copper compounds are not used for therapy of bacterial diseases but they only have preventive role. Besides copper compounds do not have toxic and undesirable effects for human, animals and the environment. They are widely used in biological or organic agriculture.

We based on Lo Cantore et al. (2004), who exposed that copper compounds and antibiotic are not environmentaly friendly. But, we know that nowadays copper compounds are used to prevent bacteriosis, especially in citrics. Our aim is to present a new natural alternative to control or prevent the proliferation of phytophatogenic bacteria.

14. Line 75. Modify the sentence to "Furthermore, the misuse of the antibiotic compounds has developed the..."

15. Lines 76-77. There are several commercial biocontrol or other compounds that can be used for the management of bacterial diseases.

16. Line 78. Add the word "extensively" after "have been studied..."

17. Line 80. Replace "the" with "several"

18. Line 88. Replace "species which" with "...plant species with.." and add "that" after "extracts"

19. Line 89. Mention the latin names of the microorganisms that essential oils have been reported to have significant antimicrobial activity.

20. Lines 89-91. Modify the sentence to "Previous studies have demonstrated the ability of these essential oils to inhibit the growth of phytopatogenic P. syringae strains".

Materials and Methods
21. Lines 125-126. Modify the sentence to: ... P. syringae pv tomato DC 3000, MIC values obtained previously by Oliva 126 et al. 2015 were considered for these studies too".

22. Line 127. Replace "King" with "King's".

23. Line 132. Explain the role of "resazurin" in these experiments. What does the redox status indicate regarding the viability of the cells. Add the sentence from lines 138-139 in line 132.

24. Line 132. Add the word "assay" after "For this..."

25. Line 133. Add the word "dilution" after "inoculum"

26. Lines 134 and 135. Add the word "plate" after " microtitre"

27. Line 139. The sentence "The plate count method was made to this dilution as a control" needs rewriting because the meaning is not clear.

28. Line 153. Add the word "tubes" after "These", delete "," and replace the word "during" with "for".

29. Line 155. Modify the sentence to "... the MBC was determined when less than 0.01% of growth was observed".

30. Line 159. Delete the ","

31. Line 161. Replace "during" with "for" and add "then" after "They were.."

32. Line 162. Add the word "further" before "solubilized"

33. Line 163. Add a space between "570" and "nm"

34. Line 165. Modify the sentence to "... the microplates where the MIC was previously determined..."

35. Line 166 and 216. Replace "inoculums" with "inocula"

36. Line 174. Add the words "of this phytotoxin" after "the production"
37. Line 176. Replace "incubating" with "and incubated"

38. Line 179. The expression "hypertrophic response" is not understood This is a localized over growth of potato cells that can be observed with a lens.

39. Lines 182 and 188. Replace "during" with "for"

40. Line 184. Transfer the expression "a positive production of the toxin" before "was considered" and delete "it"

41. Line 197. Add the expression "genes related to" before "phytotoxins"

42. Line 202. Replace "genes" with "gene"

43. Line 213. Replace "phytotoxins production" with "production of phytotoxins"

44. Line 217-219. Replace the text to: "Statistical analysis: It was performed by the Infostat/Professional statistical analysis program using ANOVA and Fischer test. Significant differences in biofilm assays were calculated for each strain".

Results

45. Lines 227 and 231. Explain what is "mg/ml" indicate i.e. mg of essential oil etc. It refers to essential oil concentration which is calculated from the density value of each essential oil. For Thymus the density value is: 919,8 mg/ml and for oregano 925,2 mg/ml.

46. Line 228. Add "(Table 2)" at the end of the sentence.

47. Line 230. Replace "methods" with "method" and "showing" with "that demonstrated". Delete "with"

48. Lines 231-233. Rewrite sentence.

49. Lines 237-249. The absorbance numbers that are presented in Graphic 1 should be converted to bacterial cell numbers and the inhibition of the biofilm formation should be measured in % reduction of bacterial cell numbers. The biofilm is a structure constituted by polysaccharides, proteins, genetic material, etc. produced by some bacteria and that contain cells inside it. This film can be seen at the lab using dyes and detecting it by visual and spectrometric methods. The quantification of cells outside and inside the biofilm requires specific methodologies that were not performed in this study.

50. Lines 241-242. Rewrite sentence.

51. Table 2 is confusing. Do the authors show data of antimicrobial activity or inhibition of biofilm formation in this Table? Antimicrobial activity and inhibition of biofilm formation data have to be separated. Table 2 doesn´t make reference to biofilm.

52. Line 247. Replace the word "probed" with "tested" and add a space after 0.022

53. Lines 253-260. Explain why you performed these experiments in a sentence at the beginning of the paragraph. Are these bioassays enough to prove the ability of these bacteria to produce phytotoxins. Maybe a chemical analysis was necessary for all the bacteria strains?

54. Line 258. Replace "produced" with "observed"

55. Line 267. Rewrite sentence "was not observed the genotypic production"

56. Line 270. Rewrite sentence

57. Line 273. Replace "gen" with "genes"

58. Lines 281-295. This paragraph and Table 3 does not present the results of the inhibition on the production of phytotoxins. You need to show pictures of the effects of essential oils on bacteria phytotoxins: 1) the coronatine assays on potato tuber disks 2) the syringomycin assays with the inhibition of the fungus Geotrichum citri and 3) the tabtoxin assays with the zone of inhibition to *E. coli*. Photos are showed at the end of this document. They were not considered for the manuscript to not extend it too much. (8 free pages).

59. Line 285. Replace "made" with "performed"

60. Line 287. Add "that" before "demonstrated"

61. Lines 288-289. Rewrite sentence and correct "syringomicin" to "syringomycin" throughout the manuscript.

62. Lines 289-290. Replace "oil" with "oils" and "the totality of the" with "all".

63. Lines 293-295. Rewrite sentence.

Discussion
The Discussion part is too lengthy and verbose (8 pages of Discussion corresponding to about 3 pages of Results) and has to be reduced.

64. Lines 304. Add "by" before "their potential"

65. Line 308. Replace "biocontrolling" with "in biocontrol"

66. Line 332. Add the word "the fact" after "due to"

67. Lines 333-335. Modify sentence to: "...that in the liquid method an extract can be determined whether it has acidal or static action at a particular concentration".

68. Line 337-338. The major problems of the application of essential oils is that 1) they will be expensive to be produced and applied in commercial greenhouses or open fields and 2) the emerging odors might interfere with the organoleptic characteristics of the plant products (i.e. apple with oregano smell)

The application of essential oils could be done using very small concentrations of them, considering that bactericidal activity was reach between 0,012 to 5,7 mg/ml. In addition, these essential oils were able to inhibit the production of virulence factors, like phytotoxins and biofilm at lower concentrations than the bactericidal ones. These would help to use minor quantities of essential oils avoiding the proliferation of the disease in soybean plants.
The application of essential oils on soybean plants would not modify the flavor of soybean because they are protected by the pod. Besides the plants would be treated in the first stages of growth trying to avoid major consequences as losses in the yields.

69. Line 339. Modify sentence to "Biofilms are cell aggregations..."

70. Line 343. Replace "in" with "of"

71. Lines 339-352. Do not provide so many details here.

72. Line 355. Replace "dinamyc" with "dynamic"

73. Lines 377-378. The toxins are not effectors and are not secreted by the type III secretion system.

74. Line 381. Add the word "the tested" before "P. syringae"

75. Line 382. Replace "phenotypic" with "phenotypically"

76. Line 384. Add "was demonstrated" after "oils"

77. Line 385. Replace "which" to "with a"

78. Line 391. Replace "it" with "its"

79. Lines 395-401. Do not provide so many details here.

80. Lines 401-403. Rewrite sentence

81. Line 403. Replace "pathovar" with "pathovars"

82. Line 406. Replace "the" with "its"

83. Line 408. Replace "gen" with "gene"

84. Line 414-416. Rewrite sentence

85. Line 419. Add spaces in "andtransientCa2+" and in "abroad"

86. Line 421. Replace "produced" with "verified to be synthesized"

87. Line 423. Modify sentence to "...the production of the toxin was observed in vitro..."

88. Line 425. Add "of" before "six ORFs"

89. Lines 425-435. Do not provide so many details here.

90. Lines 436-438. Rewrite sentence

91. Line 440. Modify text to "...thyme oil in 90% of the strains remarking..."

92. Line 448. Rewrite sentence

93. Line 460. Replace "works" with "studies"

94. Line 475. Replace "on the" with "of"

95. Lines 481-483. Modify the sentence to "Studies of the effectiveness of these oils in the greenhouse and in open fields should be carried out in the future, in order to evaluate the effects of these natural substances to manage Pseudomonas infections on susceptible hosts".

96. Line 490. Replace "fellowship" with "fellow"

Table and Figure legends, Tables, Figures

97. Line 634. Modify title of Table 1 to "... PCR products for genes related to ..."

98. Table 1. Add an extra column that will refer to the related phytotoxin of each set of primers. Correct the word "temperatura" to

"temperature"

99. Line 637. Modify title of Table 2 to "Minimum inhibitory (MIC) and bactericidal activity (MIB)..."

100. Table 2. Explain under the table what is MIC, MIB and what the concentration mg/ml is referring to. Replace "Microorganisms" with "Pseudomonas strains" and put the names of the people that provided these strains as a footnote of the table of in Acknowledgements of the paper and not as a column of the Table.

101. Line 640. Replace the word "production" with "evidence".

102. Lines 643-646. Rewrite Figure 1 legend because of syntax errors. What are the numbers 1 to 6 referring to?

103. Lines 648. Replace "oil" with "oils" and add "biofilm formation" before P. syringae.

104. Line 650. Delete the text "References of graphic"

105. Graphic 1. Diagrams of Graphic 1 are too small and difficult to see the text. Maybe modify the Graphic to show 2 diagrams in a row instead of 3. Explain what is DO, AET and AEO, mg/ml.

1-Syringomycin

Figure 1: Inhibition of syringomycin by thymus essential oil in *P. syringae* pv *tabaci* 6605 **(c)** and *P. syringae* pv *syringae* B728a **(d)**; Production of syringomycin by *P. syringae* pv *tabaci* 6605 **(a)** and *P. syringae* pv *syringae* B728a **(b)**.

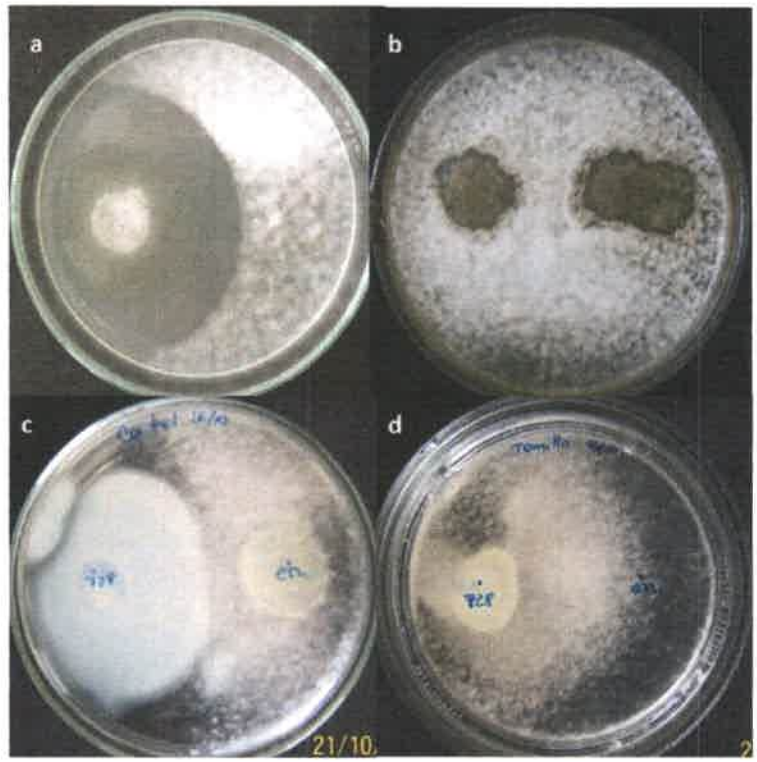
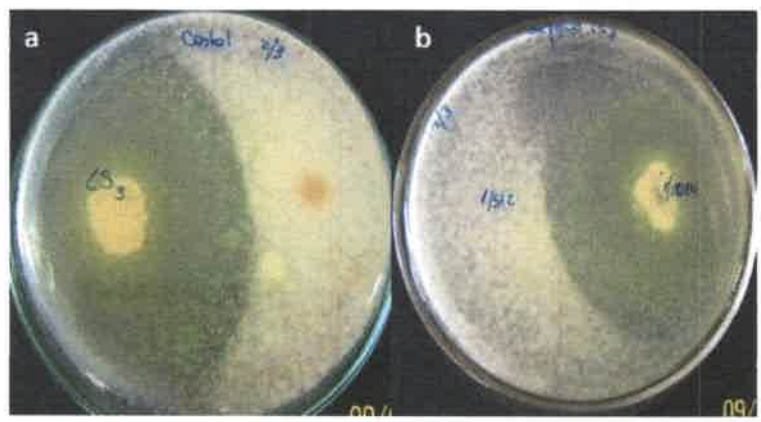


Figure 2: Inhibition of syringomycin by oregano essential oil in *P. syringae* LS3 **(b)**. Production of syringomycin by *P. syringae* LS3 **(a)**.

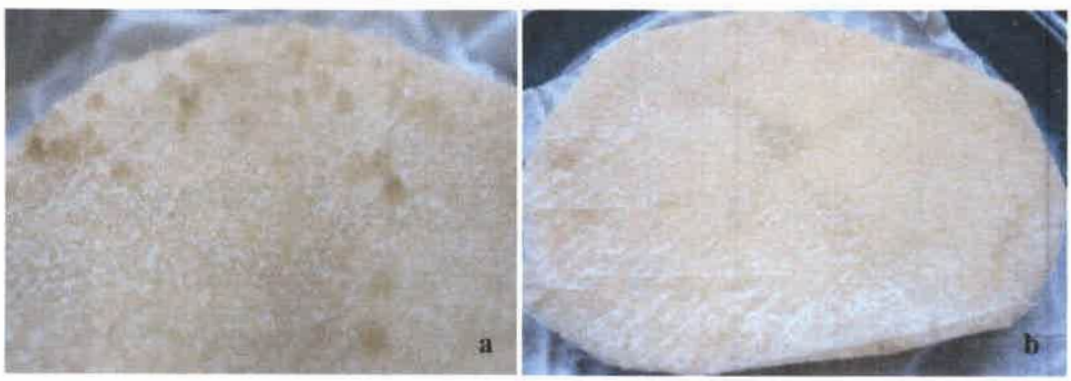


Tabtoxin

Figure 3: Inhibition of tabtoxin by oregano essential oil (0.006 mg/mL) in *P. syringae* pv *atropurpurea* Ps5. **(b)**. Production of tabtoxin by *P. syringae* pv *atropurpurea* Ps5 **(a)**

Coronatine

Figure 4: a: Coronatine production by *P. syringae* LS3; **b:** Inhibition of coronatine production by oregano essential oil in the *P. syringae* LS3.



76166