

## Inducción de resistencia en plantas de sésamo (*Sesamum indicum* L.) a la mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *sesami*)

### Induction of resistance to the bacterial spot (*Xanthomonas campestris* pv. *sesami*) in sesame (*Sesamum indicum* L.) plants

Francisco Tomás Álvarez Morinigo<sup>1</sup> y Cristhian Grabowski Ocampos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Protección Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción (FCA-UNA). San Lorenzo, Paraguay.

\*Autor para correspondencia (cgrabowski@agr.una.py).

Recibido: 26/06/2013; Aceptado: 29/10/2013.

#### RESUMEN

La inducción de resistencia es la activación de mecanismos latentes que pasan a expresarse después de la exposición de las plantas a productos o sustancias adecuados (elicitors). Para determinar el potencial efecto inductor del extracto de Ka'a he'e, un producto comercial con mezcla de oligoelementos y extractos vegetales, el Acibenzolar-s- metil (ASM) y el Fosetyl-AI, contra la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* pv. *sesami* (Xcs), fueron evaluados el crecimiento *in vitro* de la bacteria y la intensidad de la enfermedad en plantas de sésamo. Para las pruebas *in vitro* se emplearon Antibiograma y Dilución seriada, utilizando el diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial de 5x4 y cuatro repeticiones, donde el factor principal fueron los productos y el secundario las concentraciones crecientes y las diluciones. Para determinar la intensidad de la mancha bacteriana se escanearon las hojas de las plantas y se cuantificó la severidad con el programa informático Assess 2.0; el diseño experimental fue completamente al azar con seis tratamientos, los cuatro productos, un testigo químico (oxicloruro de cobre + mancozeb) y un testigo absoluto (solo agua). El extracto de Ka'a he'e y el ASM son considerados inductores de resistencia por no ejercer acción antimicrobiana directa sobre Xcs y reducir la intensidad de la mancha bacteriana en plantas de sésamo. El Fosetyl-AI y el producto a base de mezcla de oligoelementos y extractos vegetales no son considerados como inductores de resistencia por ejercer acción antimicrobiana *in vitro* y no reducir significativamente la intensidad de la mancha bacteriana.

**Palabras clave:** Inducción de resistencia, Mancha bacteriana, *Xanthomonas campestris* pv. *sesami*.

#### ABSTRACT

Induction of resistance is the activation of latent mechanisms that are expressed after exposure of plants to suitable products or substances (elicitors). To determine the potential inductor effect of the Ka'a he'e extract, a commercial product with a mixture of trace elements and plant extracts, Acibenzolar-s-methyl (ASM) and Fosetyl-AI, against the bacterial spot caused by *Xanthomonas campestris* pv. *sesami* (Xcs), there were evaluated *in vitro* bacteria growth and the intensity of disease in sesame plants. For *in vitro* tests there were used antibiogram and serial dilution, using a completely randomized design with 5x4 factorial arrangement and four replications, main factor being the products and secondary factors the concentrations and dilutions. To determine the intensity of bacterial spot, plant leaves were scanned and severity was quantified with the Assess 2.0 software, the experimental design was completely randomized with six treatments, the four products, a chemical control (copper oxychloride + mancozeb) and an absolute control (water only). The Ka'a he'e extract and ASM are considered resistance inducers because they not exert direct antimicrobial action on Xcs and reduce the intensity of bacterial spot in sesame plants. The Fosetyl-AI and the product with a mix of trace elements and plant extracts are not considered resistance inducers because they have antimicrobial activity *in vitro* and do not significantly reduce the severity of bacterial spot.

**Key words:** Induction of resistance, bacterial spot, *Xanthomonas campestris* pv. *sesami*.

## INTRODUCCIÓN

El sésamo (*Sesamum indicum* L.) fue introducido al Paraguay a fines de la década del 90 por iniciativa del sector privado y es uno de los principales cultivos de renta para pequeños productores (ISA 2008). En el año 2007 el país se convirtió en el sexto mayor exportador mundial.

La planta es susceptible a la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* pv. *sesami* que puede presentarse en cualquier estado fenológico, los síntomas se observan inicialmente como pequeñas manchas que se desarrollan en el margen de las hojas y en infecciones severas pueden extenderse a otros órganos, trasladándose sistémicamente, matando la planta y pudiendo causar pérdida total de la producción (Wulff y Pascholati 1997). El principal control indicado hasta hace poco tiempo fue el tratamiento químico con antibióticos, pero en años recientes han surgido como un problema de consecuencias impredecibles para la salud pública, los mecanismos defensivos desarrollados por las bacterias, con lo que evaden la acción de estos productos, confiriéndoles una condición de resistencia (Gérvás 2000; Fernández et. al 2003). Augstburger et al. (2000) mencionan otras técnicas de control como la utilización de variedades resistentes, que no siempre están disponibles y el tratamiento de semillas a través de la termoterapia, técnica que ya no es recomendable debido a que no es eficiente y puede dañar la semilla gravemente si se excede con el calor.

El uso sin gerenciamiento técnico de productos fitosanitarios para el control de las plagas y enfermedades genera problemas ambientales y sobre todo deja residuos que contaminan los productos cosechados lo que conlleva al rechazo en los mercados de países compradores como el Japón (SENAVE 2010).

Las plantas en la naturaleza producen compuestos que proveen una condición de resistencia contra el ataque de patógenos (Agrios 2005). Estos mecanismos pueden ser activados por moléculas o elicitores bióticos o abióticos (Vallad y Goodman 2004), que involucran la participación de un gran número de pequeñas moléculas exógenas, denominadas inductores, capaces de activar los mecanismos de defensa. A partir de este descubrimiento se llevó a la experimentación varias sustancias capaces, surgiendo de esta manera la "inducción de resistencia en plantas a patógenos" como una alternativa para el manejo de enfermedades, siendo considerada una manera inteligente de controlar enfermedades de plantas (Grabowski 2012; Romeiro 2007; Riveros 2001).

Los inductores son moléculas de bajo peso molecular, que no cuentan con actividad antimicrobiana y que muestran acción de protección local inducida y sistémica, actuando sobre el vegetal impidiendo o retrasando la

entrada del patógeno y limitando su actividad en el tejido u órgano (Riveros et al. 2004). Según Kessmann et al. (1994) el criterio para determinar que un compuesto o sustancia sea un inductor involucra que no posea actividad antimicrobiana, pero que induzca a la planta a procesos bioquímicos que le confiera resistencia a enfermedades como activador biológico. Así, Abreu (2006) y Lucas et al. (2012), observaron que extractos de Citronella (*Cymbopogon nardus*) y Eucalipto (*Corymbia citriodora*) no inhibían el desarrollo *in vitro* de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, sin embargo asperjados sobre plantas de tomate provocaban una reducción de más del 50% en la intensidad de la mancha bacteriana al igual que Pereira et al. (2011) quienes observaron un nulo efecto *in vitro* de extractos de Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y Clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) sobre el crecimiento del micelio de *Cercospora coffeicola*, pero constatando la reducción significativa en la severidad de la enfermedad.

El objetivo general de este trabajo fue evaluar el grado de inducción de resistencia en plantas de sésamo por el extracto de Ka'a he'e (*Stevia rebaudiana* Bertoni), producto con mezcla de oligoelementos a base de Cu, Mn, Zn y extractos vegetales<sup>1</sup>, el producto Acibenzolar-s-metil y el producto Fosetyl-Al (Aluminium tris-o-etil-fosfonato) a la mancha bacteriana, verificando el efecto *in vitro* de los productos o moléculas utilizadas sobre *Xanthomonas campestris* pv. *sesami* y teniendo como premisa la reducción de la intensidad de la enfermedad en las plantas tratadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio e invernadero de la División de Fitopatología del Departamento de Protección Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción, ubicado en la ciudad de San Lorenzo, Paraguay. En el periodo comprendido entre los meses de marzo del 2012 a enero del 2013. Los materiales utilizados fueron: semillas de sésamo de la variedad Escoba Blanca, extracto de Ka'a he'e (*Stevia rebaudiana* Bertoni), los productos con mezcla de oligoelementos a base de Cu, Mn, Zn y extractos vegetales, el producto Acibenzolar-s-metil, el producto Fosetyl-Al (Aluminium tris-o-etil-fosfonato) y los fungicidas Oxiclورو de Cobre y Mancozeb.

### Aislamiento y preservación de la bacteria

Muestras de hojas de plantas enfermas fueron colectadas en parcelas del Departamento de San Pedro, norte de la

<sup>1</sup> Producto comercial registrado como Brotolom Total

región oriental del Paraguay. El aislamiento se realizó en medio de cultivo 523 de Kado y Heskett (1970).

El procedimiento de aislamiento bajo campana en condiciones asépticas consistió en cortar las hojas infectadas en pequeños pedazos angulares en la transición del tejido sano y enfermo, que fueron desinfectados en alcohol al 50% e hipoclorito de sodio al 2%. Posteriormente se realizó el triple lavado, con agua destilada y esterilizada. La muestra al final del proceso se colocó en una placa de Petri macerándola en agua estéril para liberar las células bacterianas y con ayuda de un ansa estéril fue sembrada en placas de Petri con medio de cultivo 523 mediante la técnica del rayado (Lelliott y Stead 1987). Obtenida la colonia bacteriana pura fue preservada en heladera a una temperatura de  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ .

#### Caracterización e identificación de la bacteria

Posterior al aislamiento de la bacteria se realizaron las siguientes pruebas para caracterizarla e identificarla. Las bioquímicas como: crecimiento en medio de cultivo, pigmentación, reacción de Gram y prueba del Hidróxido de Potasio al 3% (Lafi y Linardelli 2011; Schaad 2001). Las biológicas mediante la reacción de hipersensibilidad en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) infiltradas, y la ejecución de los postulados de Koch en plantas de sésamo inoculadas con la bacteria (Carrillo et al. 2001; Lelliott y Stead 1987).

#### Experimento 1: Insensibilidad *in vitro* de la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *sesami* (Xcs) a los potenciales inductores de resistencia

Para determinar la insensibilidad de la bacteria fueron desarrollados dos pruebas *in vitro*. a) Método de Antibiograma adaptado de Brock y Madigan (1993) para lo cual la bacteria fue cultivada en tubos de ensayo con medio líquido e incubada a  $28^\circ\text{C}$  por 48 h de donde fue retirada una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  e incorporada en un erlenmeyer con medio de cultivo 523 de Kado y Heskett (1970) fundente para cargar las placas de Petri y, una vez solidificado fue depositado un disco de papel estéril embebido con las concentraciones crecientes de cada producto. b) Método de Dilución en placas para conteo de células bacterianas viables adaptado de Romeiro (2001), donde se realizaron diluciones seriadas en solución salina (factor 1:10) de la suspensión bacteriana original, para transferir y distribuir con el ansa de Drigalsky 100  $\mu\text{l}$  de cada dilución en placas con medio de cultivo, al cual fue incorporado la concentración media de 0,2% de cada producto. Fueron incubadas a  $28^\circ\text{C}$  y evaluadas a las 48 h para determinar el número más probable de las unidades formadoras de colonia (ufc).

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con arreglo factorial de  $5 \times 4$ , con cuatro repeticiones, donde el factor principal son los productos (extracto de Ka'a he'e, el producto con mezcla de oligoelementos a

base de Cu, Mn, Zn y extractos vegetales, el producto Acibenzolar-s- metil, el producto Fosetyl-AI y el antibiótico oxitetraciclina) y el factor secundario para el método de antibiograma son las concentraciones crecientes (0%, 0,14%, 0,28%, 0,36% y 0,50%) de cada producto y para el método dilución las últimas cuatro seriadas ( $10^{-1}$  -  $10^{-4}$ ).

La variable en el método de antibiograma fue el diámetro del halo de inhibición de la bacteria en cada concentración de los productos, evaluadas a las 72 h a partir de la incubación, utilizando un escalímetro digital para la medición. Para el método de dilución fue el número de colonias formadas sobre el medio de cultivo con cada producto, cuantificadas a partir de las 48 h de incubación.

#### Experimento 2: Intensidad de la mancha bacteriana en plantas de sésamo en condiciones de invernadero

Para determinar la intensidad de la enfermedad fueron tratadas plantas de sésamo de la variedad Escoba Blanca con los potenciales inductores de resistencia e inoculados con la bacteria patógena. Las semillas fueron sembradas en macetas plásticas con 700  $\text{cm}^3$  de capacidad que contenían sustrato esterilizado por método físico, compuesto de 50% de arena gorda, 25% estiércol vacuno y 25% de arena lavada. Para el tratamiento fueron utilizadas la dosis comercial de cada potencial inductor, aplicado por atomización, a los quince días después de la emergencia de las plantas, cuando poseían cinco hojas verdaderas y a los cinco días posteriores a la primera aplicación, para después inocularlas con el patógeno a los cinco días después de la última aplicación de los tratamientos.

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, con seis tratamientos, incluyendo un testigo absoluto y testigo químico, con tres repeticiones, totalizando dieciocho unidades experimentales, las cuales estaban representadas por cuatro macetas plásticas. En la **Tabla 1** se detallan los productos que fueron utilizados como tratamiento.

La preparación de la suspensión bacteriana fue realizada a partir de cultivo puro de *Xanthomonas campestris* pv. *sesami* con 48 h de incubación y crecimiento en placas de Petri, al cual fue agregado agua mineral esterilizada para la aplicación foliar en plantas de sésamo, utilizando una proporción de 12 placas de Petri para 400 ml de agua estéril. Esta relación permite la obtención de aproximadamente  $10^7$  ufc/cc, verificada por dilución seriada, para el cálculo del número más probable de células viables (Romeiro 2001).

Las plantas de sésamo fueron acondicionadas en cámara húmeda por 24 h antes y posterior a la inoculación. Al finalizar este periodo fueron dispuestas en el invernadero hasta su evaluación.

**Tabla 1.** Descripción de productos y dosis empleados como tratamientos para la evaluación de la intensidad de mancha bacteriana en plantas de sésamo, en condiciones de invernadero. San Lorenzo, Paraguay. 2013.

Tratamientos	Productos	Dosis	Referencia
1	Fosetyl – Al	3g/l	Kessmann et. al (1994)
2	Testigo	–	–
3	Oxicloruro de Cobre + Mancozeb	3g/l + 2g/l	Carrillo et. al (2001)
4	Mezcla de oligoelementos y extractos vegetales (MOEV)	2,5 cc/l	*
5	Acibenzolar – s – metil	1g/l	Kessmann et al. (1994)
6	Extracto de Ka'a he'e	50 cc/l	*

\* Extractos naturales y productos de nueva generación con potencial de inducir resistencia en plantas

La variable cuantificada fue el porcentaje de incidencia y la severidad de la mancha bacteriana en plantas de sésamo tratadas con los potenciales inductores e inoculadas con la bacteria. Se realizó el conteo de las hojas con síntomas, en cada tratamiento, al noveno día después de la inoculación y fueron escaneadas para determinar la severidad, utilizando el programa informático Assess 2.0 (Lamari 2008). Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza. Las medias fueron comparadas entre sí mediante al test de Tukey al 5% de probabilidad de error.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas de sésamo inoculadas desarrollaron síntomas típicos de manchas angulares acuosas en las hojas (**Figura 1A**), que coalescen y aumentan de tamaño dejando el tejido quebradizo. Asimismo, la bacteria cultivada en medio YDCA (Extracto de levadura-Dextrosa-Carbonato de calcio y Agar) e incubada a 28°C durante 48 h, desarrolló colonias amarillas, mucosas y brillantes, típicas de *Xanthomonas* (**Figura 1B**) que coinciden con los descriptos por Wulff y Pascholati (1997) y Schaad (2001).

Posterior a la aplicación de la técnica tinción de Gram a la bacteria de 48 h de crecimiento, se observaron al microscopio con objetivo de inmersión (100x) masas de

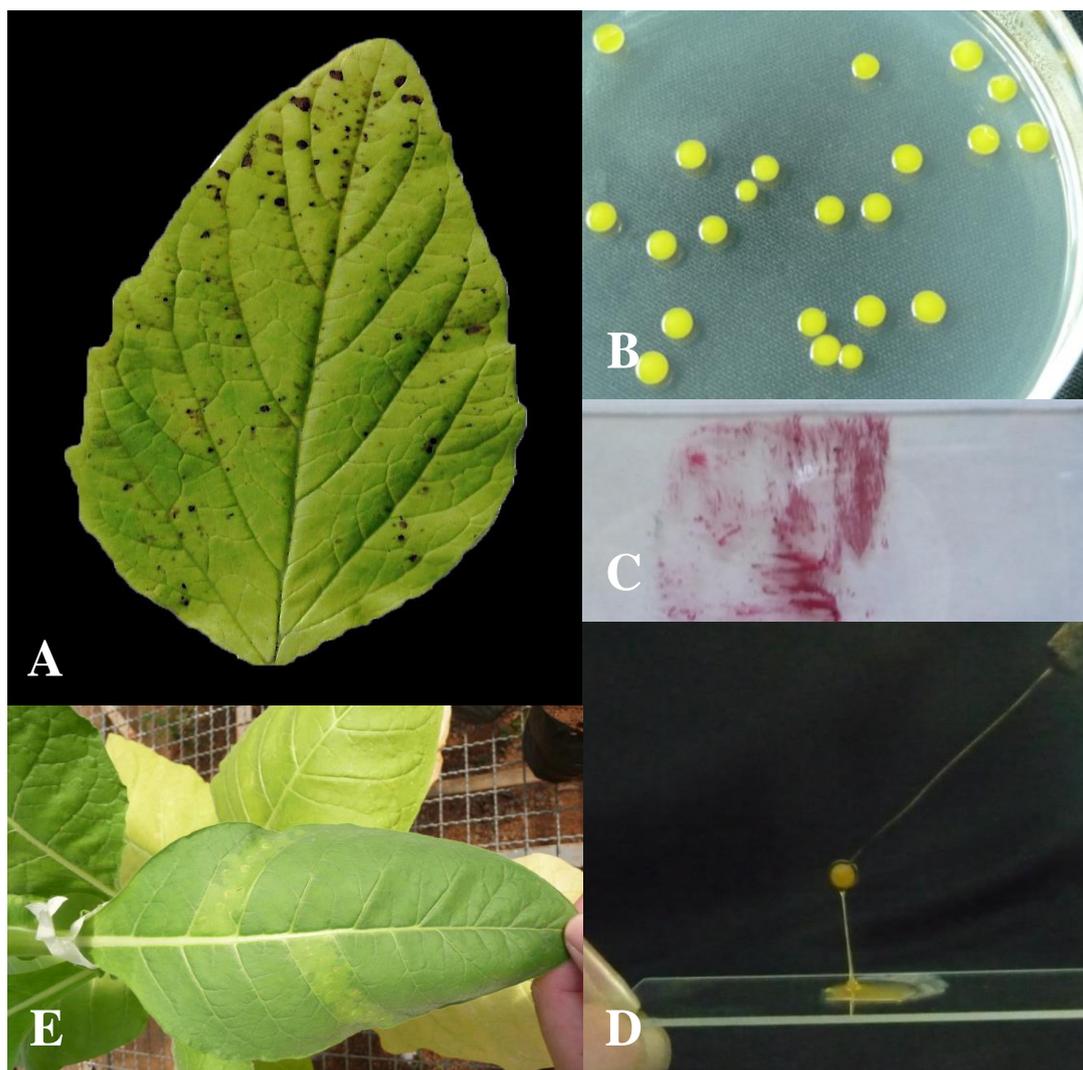
bacilos de coloración rosa (**Figura 1C**) y la reconfirmación al adicionar el hidróxido de potasio (KOH) al 3% a las colonias bacterianas, donde se constató la formación de una suspensión sumamente viscosa, que al levantarla con el ansa formó un hilo de aspecto mucilaginoso (**Figura 1D**). Estas características ocurren en bacterias Gram negativas como las del género *Xanthomonas* (Botero et al. 2008). La reacción de hipersensibilidad en plantas de tabaco fue positiva (**Figura 1E**), reconfirmando la patogenicidad de la bacteria. Esta caracterización diluida que la colonia bacteriana estudiada pertenece a *Xanthomonas campestris* pv. *sesami* de acuerdo a lo descrito por Fardoos (2009).

En el Experimento 1 de Insensibilidad *in vitro* de la bacteria Xcs a los potenciales inductores de resistencia, por el método de Antibiograma, no fueron observadas diferencias significativas entre el efecto de los tratamientos en la formación o presencia del halo de inhibición, con excepción del tratamiento con antibiótico (**Tabla 2**). Los resultados obtenidos en las diferentes concentraciones de Acibenzolar-s-metil (ASM), no presentaron diferencias con el testigo, coincidiendo con los datos publicados por Sbalcheiro (2010), quien no observó efectos inhibitorios del ASM aplicado en discos sobre la superficie del crecimiento de la bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* en medio de cultivo.

**Tabla 2.** Diámetro del halo de inhibición de *Xanthomonas campestris* pv. *sesami* debido al efecto de los potenciales inductores de resistencia en las diferentes concentraciones. FCA – UNA, San Lorenzo, Paraguay. 2013.

Productos	Concentración					Producto Individual
	0%	0,14%	0,28%	0,36%	0,50%	
	----- cm -----					
Acibenzolar – s – metil	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 A
MOEV	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 A
Fosetyl – Al	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 A
Extracto de Ka'a He'e	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 A
Oxitetraciclina	0,0 Aa	2,3 Bb	3,3 Bc	3,5 Bd	4,6 Bd	2,8 B
Concentración Individual	0,0 a	3,7 b	5,5 c	5,8 d	7,6 e	

Medias seguidas por la misma letra minúscula en las filas y mayúsculas en las columnas no difieren entre sí por el Test de Tukey al 5% de probabilidad de error.



**Figura 1.** Síntomas típicos de la mancha bacteriana en sésamo y caracterización de la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *sesami*. (A) Lesiones típicas de mancha bacteriana. (B) Colonias amarillas de Xcs en medio de cultivo. (C) Tinción de Gram (-). (D) Prueba de KOH positivo. (E) Reacción de hipersensibilidad en tabaco positivo. FCA-UNA, San Lorenzo, Paraguay. 2013.

Según Friedrich et al. (1996), en la mayoría de los casos estudiados con ASM, no fue observada una actividad antimicrobiana directa sobre el patógeno, caracterizando el producto químico como un producto de baja toxicidad para bacterias. Los inductores de resistencia de origen químico generalmente no ejercen una actividad antimicrobiana y pueden ser una alternativa para el control de la bacteriosis en los cultivos (Sbalcheiro 2010).

De igual manera los datos obtenidos de las diferentes concentraciones del Extracto de Ka'a he'e no difieren con el testigo, confirmando que este extracto no ejerce un efecto directo sobre la bacteria, fortaleciendo lo propuesto por Görlach et al. (1996), quienes afirman que para que un compuesto sea considerado como inductor de resistencia en plantas, no debe ejercer una acción directa

sobre el patógeno. El Extracto de Ka'a he'e no ejerció inhibición contra Xcs en este estudio, lo cual según Romeiro (2007) conferiría una característica inicial como inductor de resistencia o de no presentar acción bacteriostática, cualidad que debe confirmarse con la reducción de la intensidad de la enfermedad.

En el caso de Fosetyl-Al, no se observó efecto directo sobre Xcs. Este resultado afirma que el producto, al igual que los anteriores no inhibe el desarrollo de la bacteria para esta prueba, dato que no coincide con lo publicado por Chiriac y Ulea (2012) donde razas aisladas de *Erwinia amylovora* presentaron una reducción significativa en su crecimiento en placas de Petri debido a la toxicidad causada por Fosetyl - Al.

El producto a base de Mezcla de oligoelementos y extractos vegetales (MOEV) tampoco inhibió el crecimiento de la bacteria, siendo semejante al testigo en esta prueba, lo cual coincide con las publicaciones hechas por Stefanova et al. (2005), quienes demostraron la insensibilidad de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* a extractos naturales sintéticos a base de *Bixa orellana*. Asimismo, Lucas et al. (2012) observaron que extractos naturales no tuvieron efecto inhibitorio *in vitro* sobre cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en ninguna concentración. Sin embargo Orias (2008), constató que concentraciones crecientes del extracto natural sintético Kilol LDF 100 producido a base de semillas de cítricos inhibía el crecimiento *in vitro* del mismo patógeno.

En el método de dilución en placas fue observado diferencias significativas entre el efecto de los tratamientos con respecto a la cantidad de unidades formadoras de colonia a las 48 horas (Tabla 3).

**Tabla 3.** Efecto de los potenciales inductores de resistencia sobre el número de colonias de *Xanthomonas campestris* pv. *sesami*. FCA – UNA, San Lorenzo, Paraguay. 2013.

Productos	Unidades Formadoras de Colonia (ufc) – 10 <sup>4</sup>	
Extracto de Ka'a He'e	2421	a*
Testigo	2372	a
Acibenzolar – s – metil	2030	a
Fosetyl – Al	0,00	b
Mezcla de oligoelementos y extractos vegetales (MOEV)	0,00	b
Oxitetraciclina	0,00	b

C.V. (%): 33,7

\*Test de Tukey: las medias con letras diferentes en las columnas, indican diferencia significativa al 5% de probabilidad de error.

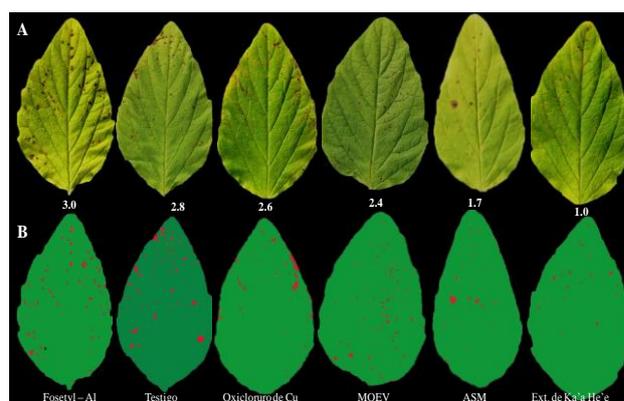
Se constató la mayor cantidad de unidades formadoras de colonia en las placas que contenían extracto de Ka'a he'e, totalizando unas 2421 (ufc), que no presenta diferencias significativas con el testigo (2372 ufc). Esto demuestra que el producto no ocasiona inhibición sobre el crecimiento de la bacteria, fortaleciendo lo argumentado por Vitti (2009), de que un producto considerado como inductor de resistencia no debe actuar de manera directa sobre el patógeno, sino debe tener la capacidad de producir una señal química que desencadenará una respuesta de resistencia contra el patógeno cuando este ataca. Resultados similares fueron observados en el tratamiento con Acibenzolar-s-metil (ASM) sin diferencia significativa con el testigo. Estos resultados corroboran lo observado por Silva et al. (2007), demostrando que el producto químico no promueve una inhibición significativa del crecimiento de la bacteria *Ralstonia solanacearum* en condiciones *in vitro*.

Por otra parte, los tratamientos con Fosetyl–Al y MOEV inhibieron totalmente el desarrollo de la bacteria en todas las diluciones, similares al antibiótico y diferentes estadísticamente al testigo. Coincidiendo con lo expresado por Chase (1993) y Molina (2001), donde el Fosetyl – Al y el extracto natural Kilol LDF 100 inhibieron el crecimiento *in vitro* de la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachia* y aislados del género *Pseudomonas*, respectivamente.

Contrastando los resultados obtenidos por el método de antibiograma y dilución seriada de la bacteria Xcs, se destaca la falta de consistencia en el efecto de los tratamientos con Fosetyl – Al y MOEV. Coincidiendo con lo observado por Carson et al. (2006) y Piper et al. (2001) quienes mencionan que los productos presentan una heterogénea difusión sobre el medio de cultivo.

El extracto de Ka'a he'e y el Acibenzolar-s-metil no presentaron efecto inhibitorio en el crecimiento de la bacteria en ninguna prueba *in vitro* realizada en este experimento, sin embargo el Fosetyl – Al y el MOEV no afectaron el desarrollo del patógeno en el antibiograma, pero sí lo hicieron en la prueba de dilución seriada, por lo tanto se considera que a una concentración de 0,2%, ambos productos tienen un efecto directo sobre *Xanthomonas campestris* pv. *sesami* en condiciones *in vitro*.

Para el Experimento 2, de cuantificación de la intensidad de la mancha bacteriana en plantas de sésamo en condiciones *in vivo*, fueron obtenidos resultados que indican diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) entre el efecto de los tratamientos utilizados (Tabla 4). Así mismo, la severidad máxima constatada fue de 3% en las condiciones y periodo experimental (Figura 2).



**Figura 2.** Severidad de la mancha bacteriana en plantas de sésamo tratadas con los potenciales inductores de resistencia e inoculados con *Xanthomonas campestris* pv. *sesami*. (A) Hojas inoculadas y escaneadas. (B) Hojas con severidad determinada con el programa Assess 2.0 ©. FCA-UNA, San Lorenzo, Paraguay. 2013.

**Tabla 4.** Intensidad de la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* pv. *sesami* en plantas de sésamo tratadas con los potenciales inductores de resistencia. FCA–UNA, San Lorenzo, Paraguay. 2013.

Productos	Severidad (%)		Incidencia (%)
Fosetyl – Al	3,0	a	24,9 ab
Testigo	2,8	a	26,1 a
Oxicloruro de cobre + Mancozeb	2,6	a	25,1 ab
Mezcla de oligoelementos y extractos vegetales (MOEV)	2,4	ab	19,9 . bc
Acibenzolar – s – metil	1,7	bc	17,0 .. c
Extracto de Ka'a He'e	1,0	c	9,8 ... d
<b>C.V. (%)</b>	29,0		18,8

\*Test de Tukey: las medias con letras diferentes en las columnas, indican diferencia significativa al 5% de probabilidad de error.

El tratamiento con Fosetyl – Al presenta una severidad de 3,0% y una incidencia de 24,9%, comparado con el testigo de quien no se diferenciaron estadísticamente. Con lo expuesto se afirma que el Fosetyl–Al no presenta características de un inductor de resistencia, debido a que presentó inhibición del crecimiento de la bacteria en condiciones *in vitro* y no redujo la intensidad de la enfermedad en condiciones *in vivo*. Esto coincide con Brown et al. (2004), quienes demostraron que no hubo reducción de la severidad del mildío de la lechuga (*Bremia lactucae*) tratadas con Fosetyl – Al en comparación con el testigo. También, en investigaciones realizadas por Vegh et al. (1985) fue demostrado que inhibe el crecimiento del patógeno *Phytophthora cinnamomi* en condiciones *in vitro*, y aplicado de forma preventiva a plantas ornamentales del género *Chamaecyparis* no reducía la intensidad de la enfermedad.

El tratamiento con el producto a base de Mezcla de oligoelementos y extractos vegetales (MOEV) presenta una severidad de 2,4% y una incidencia de 19,9%, datos que no se diferencian estadísticamente con el testigo. Con esto se constata que el producto tuvo un doble efecto, antimicrobiano debido a que inhibió el desarrollo *in vitro* de la bacteria en la dilución seriada y efecto inductor, teniendo en cuenta que no afectó el desarrollo del patógeno en el método de papel de filtro y redujo la intensidad de la mancha bacteriana, sin embargo, no se descarta que la ausencia del halo de inhibición se pudo deber a la nula difusión del producto sobre el medio de cultivo sólido (Carson et al. 2006) por lo cual se puede suponer que el MOEV no se comportó como un inductor de resistencia.

Estos resultados difieren a los divulgados por Lucas et al.

(2012), que demostraron la reducción significativa de la intensidad de la mancha bacteriana en plantas de tomate, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, utilizando extractos naturales como inductores de resistencia en condiciones *in vivo*.

El Acibenzolar-s-metil (ASM) redujo la severidad y la incidencia de la enfermedad, presentando diferencias significativas en comparación al testigo para ambas variables con valores de 1,7% a 17,0% contra 2,8% a 26,1%, respectivamente. Por lo tanto, se puede afirmar que el ASM se comporta como un inductor de resistencia, debido a que cumple con los requerimientos expresados por Kessmann (1994), donde el producto no actúa como un antimicrobiano en condiciones *in vitro*, pero aplicado sobre la planta reduce la intensidad de la enfermedad. Asimismo, se reafirma lo publicado por Gent y Schwartz (2005) donde plantas de cebolla tratadas con ASM presentaron una reducción significativa de la intensidad de la mancha foliar causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*.

Plantas tratadas con extracto de Ka'a he'e presentaron severidad de 1,0% e incidencia de 9,8%, comparados con 2,8% de severidad y 26,1% de incidencia en el testigo, reduciendo de manera significativa la intensidad de la enfermedad, debido a esto se puede caracterizar al extracto de Ka'a he'e como un producto sin efecto directo sobre *Xanthomonas campestris* pv. *sesami*, pero con la capacidad de reducir la intensidad de la enfermedad causada por la bacteria en condiciones *in vivo*, lo cual afirma que actúa como un eficiente inductor de resistencia.

Otros autores como Abreu (2006) y Lucas et al. (2012), observaron que extractos de Citronella (*Cymbopogon nardus*) y Eucalipto citriodora (*Corymbia citriodora*) no inhibían el desarrollo *in vitro* de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, sin embargo asperjados sobre plantas de tomate producen una reducción de más del 50% en la intensidad de la mancha bacteriana. Con esto, la inducción de resistencia es una alternativa importante para patosistemas sensibles al uso de productos fitosanitarios como la producción de sésamo en Paraguay.

## CONCLUSIONES

El Extracto de Ka'a he'e y el Acibenzolar-s-metil (ASM) son considerados como inductores de resistencia por no ejercer acción antimicrobiana directa sobre *Xanthomonas campestris* pv. *sesami* y reducir la intensidad de la mancha bacteriana en plantas de sésamo.

El Fosetyl - Al y el producto a base de Mezcla de oligoelementos y extractos vegetales (MOEV) no son considerados como inductores de resistencia por ejercer

acción antimicrobiana *in vitro* sobre *Xanthomonas campestris* pv. *sesami*, y no reducir significativamente la intensidad de la macha bacteriana en plantas de sésamo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, CLM. 2006. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com óleos essenciais. Tesis Qco. Botucatu, BR. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 71 p.
- Agrios, GN. 2005. Plant Pathology. 5 Ed. San Diego - USA. Academic Press. 948 p.
- Augstburger, F; Berger, J; Censkowsky, U; Heid, P; Milz, J; Streit C. 2000. Agricultura Orgánica en el Trópico y Subtrópico: Ajonjolí (Sésamo). 1 ed. Alemania. Asociación Naturland. p 1-25.
- Brock, T; Madigan, M. 1993. Microbiología. 6 ed. México, MX, Prentice Hall Hispanoamericana. 956 p.
- Brown, S; Koike, ST; Ochoa, OE; Laemmlen, F; Michelmores, RW. 2004. Insensitivity to the fungicide fosetyl-aluminum in California isolates of the lettuce downy mildew pathogen, *Bremia lactucae*. Plant Disease. 88: 502-508.
- Carrillo Fasio, JA; Garcia Estrada, RS; Allende Molar, R; Márquez Zequera, I; Ocampo, SM; Espinoza, GG. 2001. Sensibilidad a cobre de cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye, en Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 19 (1): 72-77.
- Carson, CF; Hammer, A; Riley, TV. 2006. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. Clinical Microbiology Reviews 19: 50-62.
- Chase AR. 1993. Efficacy of fosetyl-AI for control of some bacterial diseases on ornamentals. Plant disease 77 (8): 771-776.
- Chiriac, IP; Ulea, E. 2012. *In vitro* susceptibility of *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. strain isolated from pear to several plant extracts and different pesticides. Cercetări Agronomice în Moldova 45 (1): 65-71.
- Fardoos, S. 2009. Virulence analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *sesami* and *Pseudomonas syringae* pv. *sesami* the causal organisms of sesame (*Sesamum indicum*) Bacterial Blight. PhD thesis. Rawalpindi, Pakistan, University of Arid Agriculture. 194 p.
- Fernández Riverón, F; López Hernández, J; Ponce Martínez, LM; Machado Betarte, C. 2003. Resistencia bacteriana. Revista Cubana Medica Militar 32 (1): 44-48
- Friedrich, L; Lawton, K; Ruess, W; Masner, P; Specher, N; Gut-Rella, M; Meier, B; Dincher, S; Staub, T; Uknes, S. 1996. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. The Plant Journal 10: 61-70.
- Gent, DH; Schwartz, HF. 2005. Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with a plant activator, biological control agents, and copper bactericides. Plant Disease. 89:631-639.
- Gérvás, J. 2000. La resistencia a los antibióticos, un problema de salud pública. Atención Primaria 25 (8): 589-596
- Görlach, J; Volrath, S; Knauf-Beite, G; Hengy, G; Beckhove, U; Kogel, KH; Oostendorp, M; Staub, T; Ward, E; Kessmann, H; Ryals, J. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. The Plant Cell. 8: 629-643.
- Grabowski, C. 2012. Inducción de resistencia. El lado oculto del control biológico de enfermedades en plantas. In: II Congreso Nacional de Ciencias Agrarias. Seminario de Energías Renovables, 2012. Trabajos presentados. p 96 – 98.
- ISA (Informe Sector Agropecuario). 2008. Sésamo 2007/2008 (en línea). Asunción, PY. Consultado 28 ago 2012. Disponible en <http://www.mag.gov.py/dgp/isa%20sesamo.pdf>
- Kado, CI, Heskett, MG. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology 60: 969-979.
- Kessmann, H; Staub, T; Hofmann, C; Maetzke, T; Herzog, J; Ward, E; Uknes, S; Ryals, J. 1994. Induction of Systemic Acquired Disease Resistance in Plants by Chemicals. Annual Review of Phytopathology 3: 439-459.
- Lafi, JG; Linardelli, CE. 2011. Detección de *Xanthomonas cucurbitae* (Bryan) Vauterin et al. afectando frutos de zapallo coreano en Mendoza y San Juan, Argentina. Revista Facultad de Ciencias Agrarias de Uncuyo 43 (2): 245-253.
- Lamari, L. 2008. Assess 2.0: Image analysis software for plant disease quantification. St. Paul, MN: APS Press. Cd Room.

- Lelliott, RA; Stead, DE. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. *Methods in Plant Pathology*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, Reino Unido. 216 p.
- Lucas, GC; Alves, E; Pereira, RB; Zacaroni, AB; Perina, FJ; Souza, RM. 2012. Indian clove essential oil in the control of tomato bacterial spot. *Journal of Plant Pathology* 94: 45-51.
- Molina, N. 2001. Uso de extractos botánicos en control de plagas y enfermedades. *Manejo Integrado de Plagas* 59: 76 - 77.
- Orias Hidalgo, LM. 2008. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales y sus fracciones sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. Tesis. Guácimo, CR. Universidad EARTH. 43 p.
- Pereira, RB; Lucas, GC; Perina, FJ; Resende, MLV; Alves E. 2011. Potential of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants. *Ciência e Agrotecnologia* 35: 115-123.
- Piper, P; Calderon, CO; Hatzixanthis, K; Mollapour, M. 2001. Weak acid adaptation: the stress response that confers resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology* 147: 2635-2642.
- Riveros, AS. 2001. Moléculas activadoras de la inducción de resistencia, incorporadas en programas de agricultura sostenible. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 61: 4-11.
- Riveros, AS; Rosales, FE; Pocasangre, LE. 2004. Manejo alternativo de *Mycosphaerella fijiensis* a través de la inducción de resistencia y uso de bioproductos. XVI Reunión internacional acorbat: 47-52.
- Romeiro, R. 2001. Métodos em Bacteriologia de Plantas. Editora UFV, Viçosa, Minas Gerais - Brasil.
- Romeiro, R. 2007. Controle Biológico de Doenças de Plantas - Fundamentos. Editora UFV, Viçosa.
- Sbalcheiro, CC. 2010. Uso de *Bacillus* sp. e Acibenzolar-S-metil como indutores de resistência ao cretamento bacteriano em soja (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*). Tesis de Doctorado. Passo Fundo. Brasil. Universidade De Passo Fundo. 178 p.
- Schaad, NW. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria (3th). American Phytopathological Society, Minnesota. 394 p.
- SENAVE (Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas). 2010. Resolución 16. Reglamento técnico para la determinación de la calidad e inocuidad del sésamo o ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) con fines de certificación para exportación. Asunción PY. 5 p.
- Silva, RF; Pascholati, SF; Bedendo, IP. 2007. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. *Fitopatologia Brasileira* 32: 189-196.
- Stefanova Nalimova, M; Rizo Peña,SG; Coronado Izquierdo, MF. 2005. Efecto *in vitro* de extractos de plantas sobre especies bacterianas del género *Xanthomonas*. *Fitosanidad* 9 (3): 49 - 51.
- Vallad GE, Goodman RM. 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crops Science* 44:1920–1934.
- Vegh, I; Leroux, P; Le Berre, A; Lanen, C. 1985. Detection on *Chamaecypari lawsoniana* 'Ellwoodii' of a strain of *Phytophthora cinnamomi* resistant to fosetyl-AI. *Revista Hortícola*. 262:19-21.
- Vitti, A. J. 2009. Indução de resistência pelo Bion em diversas culturas de interesse econômico. Congresso Paulista de Fitopatologia 32 (4): 1-5.
- Wulff, NA; Pascholati, SF. 1997. Manual de fitopatologia: Doenças do gergelim. In Kimati, H; Amorim, L; Rezende, JAM; Bergamin Filho, A; Camargo, LEA. 4 ed. Brasil. Agronômica Ceres. p 379-384.