



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO



BIOCONTROL DEL CÁNCER BACTERIANO EN JITOMATE
MEDIANTE UN TÉ AERÓBICO DE COMPOSTA

Por:

Ing. Agrop. Víctor Adrián Hernández Aranda

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Agropecuarias

Soledad de Graciano Sánchez, S. L. P.

Agosto 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO



BIOCONTROL DEL CÁNCER BACTERIANO EN JITOMATE
MEDIANTE UN TÉ AERÓBICO DE COMPOSTA

PRESENTA:

Ing. Agrop. Víctor Adrián Hernández Aranda

Tesis presentada como requisito para la obtención del título de
Maestro en Ciencias Agropecuarias

Director:

Dr. Ramón Jarquín Gálvez

Asesores:

Dr. José Pablo Lara Ávila

Dr. Martín Escoto Rodríguez



Biocontrol del Cáncer Bacteriano en Jitomate Mediante un Té Aeróbico de Composta por Víctor Adrián Hernández Aranda se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

El trabajo titulado “**Biocontrol del Cáncer Bacteriano en Jitomate Mediante un Té Aeróbico de Composta**” fue realizado por el Ing. Agrop. **Víctor Adrián Hernández Aranda** como requisito parcial para obtener el grado de **Maestro en Ciencias Agropecuarias**, fue revisado y aprobado por el suscrito comité de Tesis.

Dr. Ramón Jarquin Gálvez
Director

Dr. José Pablo Lara Ávila
Asesor

Dr. Martín Escoto Rodríguez
Asesor

Ejido Palma de la Cruz, Municipio de Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P. a los 21 días del mes de julio de 2021.

DEDICATORIA

A MI ESPOSA E HIJOS

IRENE, PAULO ANDRÉS (Zurdo) Y ADRIANO SEBASTIÁN (Fitipai).

Por su amor incondicional y empuje. ¡Lo logramos!

A MIS PADRES

VÍCTOR Y CRISTINA

A ustedes quienes siempre me han apoyado incondicionalmente. La perseverancia y constancia lo aprendí de ustedes. Mirar atrás solo para agarrar impulso. Gracias por tanto amor.

HERMANOS

GABRIEL, CARLOS Y CRISTINA.

Muchas gracias por todo el apoyo que me han brindado durante este período de estudios y en especial a mi familia en este tiempo de pandemia. Tengo tanto por devolverles.

A MIS FAMILIARES

**ABUELITA AMADA, TÍOS AMPARITO, GLENDA, BOLIVAR, ÍTALO;
PRIMOS JUSSEPH y ERIKA.**

A MIS COMPADRES y AMIGOS

**FERNANDO CEDEÑO y ALEXANDRA PORTALANZA; CARLOS ARIAS
e ISMAEL VALDERRAMA (Pana te deseo una pronta recuperación).**

HOMENAJE PÓSTUMO

DRA. SILVIA ORELLANA MANZANO

Que dio su vida ayudando a los pacientes que sufrieron esta catastrófica enfermedad que aqueja al mundo COVID 19 (SARS-COV-2).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y a la Facultad de Agronomía y Veterinaria por abrirme las puertas y darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca asignada para realizar mis estudios de posgrado en el Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias (PNPC 000972) con el número de apoyo 761874.

A la Fundación Privada Ecuatoriana, su presidente Ing. Shayler Nieto Barciona y al directorio, por haber creído en mí y apoyarme en un momento clave al inicio de mis estudios de posgrado.

A la Red Vlr Ecuador, por su colaboración con fondos para la adquisición de insumos de laboratorio para el análisis final del proyecto de investigación.

A mi asesor principal y amigo, Dr. Ramón Jarquin Gálvez, por ser una persona justa, transparente y por haber creído en mí a lo largo de este arduo camino.

Al Dr. José Pablo Lara Ávila, por su paciencia, enseñanzas y confianza al permitirme trabajar en el laboratorio.

Al Dr. Martín Escoto Rodríguez, por todo el apoyo que me brindó en todo este proceso y esos largos ratos de conversación muy interesantes sobre el acontecer científico.

A la Dra. María de la Luz Guerrero, por su ayuda desinteresada y guía desde el inicio hasta la culminación de la maestría.

A la Dra. María Fernanda Quintero C. por su apoyo y creer en mí. Gracias, por tanto.

A la Dra. Fabiola Villegas Rodríguez y al Dr. Héctor Aarón Lee Rangel por la confianza al haberme permitido realizar parte de la investigación en sus respectivos laboratorios.

A mis excompañeros y colegas del Centro de Biotecnología (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral, de quienes siempre aprendí mucho, valoré su trabajo y me abrieron las puertas para realizar los últimos análisis de mi investigación: Dra. Daynet Sosa del Castillo, Dr. Juan Manuel Cevallos Cevallos, Dra. Patricia Isabel Manzano Santana, MSc. Iván Andrés Choez Guaranda y a la Econ. Lilia Suárez.

A la plantilla de profesores de las diferentes materias que recibí en el posgrado, Dr. Heriberto Méndez, Dra. Catarina Loredó, Dr. Gilberto Ballesteros, Dr. Ángel Rojas, Dr. Gregorio Álvarez, Dr. Juan Carlos Rodríguez, Dra. Gisela Aguilar.

A la Dra. Alejandra Hernández y al Dr. José Luis Woo, por haberme levantado los ánimos en una época que más necesité escuchar las palabras precisas en el momento correcto.

A los administrativos y trabajadores de la FAV-UASLP por todos los buenos ratos vividos y por su gentil colaboración: Cande Alonso, Osiel Noyola, Patty Flores, Miguel Herrera, Pedro Pérez, Pedro García, Dora Escalante, Francisco Martínez, José Sandoval, Antonia Torres, Ramón Galindo, Javier Lara, Mónico Alonso, José Luis Perales, José Luis López, Juan Carlos Blanco, Eduardo Ornelas, Regino López, Josué Méndez, Gricelda Alvarado, Alfredo Rodríguez y a Doña Ofelia.

A los buenos amigos que conocí en San Luis Potosí: Luis Pérez, Alejandra González, Gabriela González, Juan Carlos Díaz, Kent Ruiz, Israel Cruz Jiménez, Sra. Teresa Hernández (Doña Tere), Rujaine Martínez, Rocío del Sol, Mayra Aguilar, Gerardo Castro, Sherman Morales, Cristopher Palomo, Daniel Ascencio, Aracely Mena, Oscar Ortiz, Miguel Pachicano y Brenda Rangel.

¡Gracias Totales!

Y principalmente a DIOS, por haberme puesto en el camino este reto que asumí con mucha responsabilidad.

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Investigación Interacción Planta-Microorganismo (LIPM) de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y el Laboratorio de Bioproductos del Centro de Biotecnología de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL, Ecuador), bajo la asesoría del Dr. Ramón Jarquin Gálvez y Co-asesorías de los Doctores: José Pablo Lara Ávila y Martín Escoto Rodríguez y colaboración del Dr. Juan Manuel Cevallos Cevallos, Dra. Patricia Isabel Manzano Santana y el MSc. Iván Andrés Chóez Guaranda de la Escuela Superior Politécnica del Litoral. Este proyecto fue financiado por el fondo FAI-UASLP-2019-2020 y por el fondo de Investigación Científica Básica CONACYT-SEP proyecto 236066.

CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
CONTENIDO.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
RESUMEN.....	xi
SUMMARY	xii
INTRODUCCIÓN	1
Pregunta de Investigación.....	3
Hipótesis	3
Objetivos.....	3
<i>Objetivo general</i>	3
<i>Objetivos específicos</i>	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Cultivo de Jitomate en México	4
Interacción Planta-Microorganismo	5
Interacción Planta-Patógeno	6
Cáncer Bacteriano	7
Compostas y Té Aerobios de Composta	9
Biocontrol del Cáncer Bacteriano	12
Metabolómica de la Interacción Planta-Patógeno.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
Ubicación del Experimento	15
Diseño Experimental	15
Producción de la Composta Madura	15
Producción y Caracterización del Té Aerobio de Composta.....	18
Preparación del Material Vegetal.....	19
Aislamiento, Identificación e Inoculación de Cmm en Jitomate	19
Evaluación de Parámetros Agronómicos del Cultivo	22
Extracción de ADN de Plantas Infectadas.....	23

Obtención de Fluido Apoplástico y Muestras de Tejidos de Jitomate	24
Extracción e Identificación de Metabolitos Secundarios	26
Análisis de Datos.....	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
Caracterización de la Composta y del Té Aerobio de Composta	28
Datos Climatológicos durante el Proceso de Elaboración y Temperatura de la Composta Madura	29
Prueba de Germinación de Arvenses de la Composta Madura.....	30
Identificación de Cepas Aisladas de Cmm	32
Parámetros de Crecimiento de Plantas de Jitomate Infectadas con Cmm y Tratadas con el TAC	33
Índice de Severidad de la Enfermedad (ISE).....	37
Determinación del Contenido de Clorofila y Polifenoles en Hojas de Jitomate.....	37
Conductividad Hidráulica.....	39
Confirmación de la Infección.....	40
Cinéticas de Crecimiento de <i>C. michiganensis</i> en el Fluido Apoplástico	41
Identificación de Metabolitos Secundarios en Fluido Apoplástico de <i>S. lycopersicum</i>	42
CONCLUSIONES	49
LITERATURA CITADA.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Sintomatología de Cmm en plantas de jitomate. A. Necrosis marginal en hojas. B. Atrofiamiento de tallos y marchitamiento de la planta. C. Lesiones en el fruto conocidas como ojo de pájaro.....	8
2	Patrones de temperatura y crecimiento microbiano en pilas de compost (Antil <i>et al.</i> , 2014).....	10
3	Elaboración de la composta en forma de pila. A. Colocación por capas de todos los materiales que conforman la composta. B. Composta terminada y cubierta con plástico negro para evitar su enfriamiento.....	17
4	Prueba de germinación de arvenses. A. Envases con composta. B. Envases con suelo del predio como control negativo.....	18
5	Elaboración del té aerobio de composta (TAC). A. Preparación y Medición de los materiales que componen el TAC. B. TAC luego de 24 h de suministrar aireación forzada.....	18
6	Microplaca de 96 pozos utilizada para el análisis de cinéticas de crecimiento de la bacteria fitopatógena en medios de cultivos líquido LB y Xmm.....	25
7	Climograma y registro de temperatura de la composta a los 5, 10, 15, 22, 29, 36 y 43 días.....	30
8	Microorganismos aislados del TAC utilizando diluciones seriadas de hasta 1×10^6 en A. Medio BK, B. Medio PDA, C. Medio LB, D. Medio Nutritivo y Análisis biosintético en medio E. CAS y F. Burk.....	31
9	Identificación micro y macroscópica del agente causal. A. Observación microscópica a partir de la tinción de Gram. B. Siembra de bacteria aislada de muestras de tejidos de jitomate en medio de cultivo CMM ¹	32
10	Amplificación de un gragmento de 219 pb del gen <i>tomA</i> específico de Cmm sobre 4 muestras de ADN de bacterias extraídas de tejidos de plantas infectadas.....	33
11	Altura y diámetro basal analizados durante 30 días luego de la infección. Se utilizaron las medias de cada tratamiento. Letras diferentes sobre las barras indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos de plantas que fueron infectadas con Cmm vs tratamientos de plantas tratadas con el té.....	34
12	Desarrollo del área de la cuarta hoja compuesta durante 30 dpi. Letras diferentes sobre las barras indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos de plantas que fueron infectadas con <i>C. michiganensis</i> vs tratamientos con plantas sanas.....	36
13	Desarrollo de la enfermedad en hoja compuesta de planta de jitomate. Tratamiento TAC + Cmm. A. Ocho días después de la infección. B. 15 días luego de la infección.....	36

14	Índice de Severidad de la enfermedad (ISE). Asteriscos sobre las barras indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) a partir de los 18 dpi entre tratamientos de plantas infectadas con Cmm y tratadas con el TAC.....	37
15	Determinación de A. Clorofila, B. Flavonoides, C. Antocianinas y D. Índice de equilibrio de Nitrógeno (NBI). Letras diferentes sobre las barras indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos de plantas infectadas con <i>C. michiganensis</i> vs tratamientos de plantas sanas.....	38
16	Análisis de conductividad hidráulica en los diferentes tratamientos. Letras diferentes sobre las barras indican que existen diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos de plantas que fueron infectadas con <i>C. michiganensis</i> vs el tratamiento tratado con el té en época de semillero.....	40
17	Amplificación del fragmento de 221 pb del gen 25S rRNA específico del jitomate de muestras extraídas de plantas infectadas y tratadas con el TAC.....	40
18	Detección de los espectros de masas de compuestos obtenidos en la primera réplica del tratamiento 1 (TACSem + Cmm), utilizando el programa MZMine.....	43
19	Análisis de componentes principales. Gráfico de puntos del perfil de metabolitos entre el T0 (Testigo) vs T3 (TAC + Cmm) a los 16 dpi.....	45
20	Gráfico de cargas del perfil de metabolitos de fluido apoplástico (FA) entre el T0 vs el T3, a los 16 dpi.....	45
21	Análisis de componentes principales. Gráfico de puntos del perfil de metabolitos entre el T0 (Testigo) vs T5 (Jit + Cmm) a los 16 dpi.....	46
22	Gráfico de cargas del perfil de metabolitos de fluido apoplástico (FA) entre el T0 vs el T5 a los 16 dpi.....	46
23	Análisis de componentes principales. Gráfico de puntos del perfil de metabolitos entre el T5 (Jit + Cmm) vs T3 (TAC + Cmm) a los 16 dpi....	47
24	Gráfico de cargas del perfil de metabolitos de fluido apoplástico (FA) entre el T5 vs el T3 a los 16 dpi.....	47

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Parámetros fisicoquímicos y concentración de macro y micronutrientes de la composta y del Té Aerobio de Composta (TAC).....	29
2 Microorganismos procedentes del TAC sembrados en diversos medios de cultivo y análisis biosintético en medios CAS y Burk.....	32
3 Identificación de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> con la secuencia de un fragmento del ADNr 16S.....	33
4 Promedio del número de flores obtenidos en cada tratamiento a los 15 días luego del trasplante. Letras diferentes indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.....	35
5 Parámetros de crecimiento de Cmm en XMM complementados con fluido apoplástico de jitomate de los diferentes tratamientos.....	42
6 Expresión diferencial de metabolitos entre los tratamientos vs el control ($p < 0.05$), del primer muestreo de fluido apoplástico realizado a los 16 dpi.....	44

RESUMEN

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) es la segunda hortaliza más importante del mundo y entre sus limitantes de producción se encuentran algunas bacterias fitopatógenas entre ellas el actinomiceto *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), considerada una enfermedad de gran importancia económica. Existen alternativas biológicas que inhiben su desarrollo a partir de la aplicación de Tés Aeróbicos de Composta (TAC). El TAC contribuye al crecimiento y desarrollo del jitomate y la estimula a defenderse ante la infección por Cmm. El objetivo de este estudio fue evaluar el perfil metabolómico en plantas de *S. lycopersicum* infectadas con Cmm y tratadas con un TAC en condiciones semicontroladas. Se determinó 1) las características fisicoquímicas y microbiológicas; 2) El efecto agronómico del TAC en plantas de jitomate infectadas Cmm y 3) El perfil metabolómico de plantas de *S. lycopersicum* infectadas con Cmm y tratadas con el TAC. El TAC, mejoró el desarrollo vegetativo de plantas de jitomate infectadas con Cmm. El aporte de N, y bacterias fijadoras de N presentes en el TAC, se reflejó en el contenido de clorofila e Índice de Equilibrio de Nitrógeno (NBI). Existió influencia en el número de flores y área foliar de la cuarta hoja compuesta en plantas infectadas y tratadas con el TAC, mostrando menor desarrollo de la enfermedad. Los resultados obtenidos del Índice de Severidad de la Enfermedad, Conductividad Hidráulica y Cinéticas de Crecimiento de Cmm en fluidos apoplásticos de jitomate, muestran que el TAC reduce la severidad de la infección permitiendo un flujo de agua relativamente normal en el xilema y existe una menor afinidad de la bacteria en plantas tratadas con el té respectivamente. La reducción en la patogenicidad en plantas de jitomate tratadas con el TAC podría estar asociado a la expresión de metabolitos secundarios como el 4-Aminobutyric acid que puede producir efectos de resistencia a enfermedades. El estudio del significado biológico de la expresión de los metabolitos secundarios de la interacción Planta-Patógeno-TAC, podría brindar información sobre las rutas metabólicas de dicha interacción que influye en el mecanismo de defensa vegetal.

Palabras clave: *Clavibacter michiganensis*, microorganismos, metabolómica

SUMMARY

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is the second most important vegetable in the world and among its production limitations there are some phytopathogenic bacteria, including the actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), considered of great economic importance disease. There are biological alternatives that inhibit its development through the application of Aerated Compost Teas (ACT). The ACT contributes to the growth and development of the tomato plants and stimulates to defend themselves against Cmm infection. The objective of this study was to evaluate the metabolomic profile in *S. lycopersicum* plants infected with Cmm and treated with an ACT under semi-controlled conditions. It was determined 1) the physicochemical and microbiological characteristics; 2) The agronomic effects of the ACT in tomato plants infected with Cmm, and 3) The metabolomic profile of *S. lycopersicum* plants infected with Cmm and treated with ACT. The ACT improved the vegetative development of tomato plants infected with Cmm. The contribution of N, and N-fixing bacteria present in the ACT, was reflected in the content of chlorophyll and Nitrogen Balance Index (NBI). There was an influence on the number of flowers and foliar area of the fourth compound leaf in infected plants treated with the ACT, showing lower disease development. The results obtained from the Disease Severity Index, Hydraulic Conductivity and Growth Kinetics of Cmm in apoplastic tomato fluids, showed that the ACT reduces the severity of the infection allowing a relatively normal water flow in the xylem and there is a lower affinity of the bacteria in plants treated with the tea, respectively. The pathogenicity reduction in tomato plants treated with ACT could be associated with the expression of secondary metabolites such as 4-Aminobutyric acid that can produce disease resistance effects. The biological significance study of the expressed secondary metabolites of the Plant-Pathogen-ACT interaction could provide information on the metabolic pathways in said interaction that influences the plant defense mechanism.

Keywords: *Clavibacter michiganensis*, microorganisms, metabolomics

INTRODUCCIÓN

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) es una planta herbácea que pertenece a la familia de las Solanáceas; su nombre proviene del Náhuatl xitomatl y aunque es originaria de Sudamérica, su domesticación se llevó a cabo en México (Harris *et al.*, 2019; Peralta y Spooner, 2005). Se considera la segunda hortaliza más importante del mundo, por sus características que la convierten en uno de los vegetales más utilizados en la gastronomía mundial (SIAP, 2017).

El cultivo de jitomate en México satisface el 100% del consumo interno mexicano. Su producción en el año 2016 fue de 3.35 Mt, lo que representa el 3.46% del PIB agrícola Nacional, de los cuales 1.61 Mt fueron exportados principalmente a Estados Unidos, uno de sus principales clientes; se estima que para el año 2030 aumente la producción para exportación en 5.50 Mt. (SAGARPA, 2017).

San Luis Potosí ocupa el segundo lugar en la producción de jitomate en México. La zona media genera una mayor producción de cultivos hortícolas debido a que posee un poco más de 1800 hectáreas en condiciones de invernadero y el 80% la dedican al cultivo de jitomate. Los municipios de Rioverde y Ciudad Fernández son los principales productores con alrededor de 306 mil toneladas, de las cuales se exportan aproximadamente 45 mil toneladas, lo que representa un ingreso de 1,500 millones de pesos por año (SADER, 2019).

Existen limitantes en la producción de jitomate, debido a enfermedades causadas principalmente por la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), agente causal del cáncer

bacteriano del jitomate (Borboa-Flores *et al.*, 2009). Esta enfermedad se considera severa y de gran importancia económica, ya que puede comprometer las exportaciones a sus principales mercados (Estados Unidos y Canadá) y con ello los ingresos monetarios.

C. michiganensis se reportó por primera vez en un invernadero de jitomate en el estado de Michigan en 1909 (Smith, 1910); actualmente se encuentra en la mayoría de las regiones productoras de jitomate en Estados Unidos. En México, se detectó e identificó el

cáncer bacteriano en el estado de Sinaloa y a partir de ahí, se extendió a los estados de Jalisco, San Luis Potosí, Baja California y Baja California Sur (Holguín, *et al.*, 2007).

El patógeno se transmite por semillas, restos de plantas infectadas o herramientas contaminadas (Sen *et al.*, 2015). Cmm penetra en el tejido vegetal a través de los estomas, hidátodos, raíces y tejidos dañados, incluidos los tricomas lesionados (Jones *et al.*, 2014; Carlton *et al.*, 1998). Una vez establecida la infección, Cmm invade los vasos del xilema moviéndose sistémicamente por toda la planta (Wallis, 1977). Los síntomas incluyen marchitez y clorosis (Fatmi *et al.*, 2017), primero en un lado de la planta y luego en toda la planta. También se puede observar cáncer en el tallo y necrosis vascular. En los frutos, los síntomas se presentan como pequeñas manchas marrones rodeadas de halos de color blanco cremoso, denominado comúnmente como ojo de pájaro (Latorre, 2004). Por otra parte, no se han encontrado variedades de jitomate comerciales resistentes.

Existen algunos compuestos químicos para el control de Cmm, sin embargo, tienen eficacia variable (de León *et al.*, 2008). Además, los componentes activos de dichos compuestos podrían ser perjudiciales tanto como para el trabajador como para el medio ambiente como lo sugiere Boulard *et al.*, (2011).

Diversos estudios han demostrado que los téis aerobios de composta (TAC), como alternativas de manejo no químico, pueden suprimir los fitopatógenos y las enfermedades de las plantas (Martínez-Yáñez, 2018). El efecto del control biológico del TAC está asociado a la microbiota benéfica que contiene, especialmente cuando se obtiene de una composta madura. A pesar de su potencial, el té de composta se ha considerado inadecuado como agente de control biológico en los sistemas de cultivo convencionales (Scheuerell y Mahaffee, 2013), pero es importante para los productores certificados como orgánicos (D.O.F., 2020; Litterick y Wood, 2009).

Se ha reportado que los téis de composta, con los microorganismos que contienen, participan directa e indirectamente en la generación de metabolitos secundarios que ayudan a suprimir enfermedades en las plantas y en la promoción de crecimiento vegetal (Naidu *et al.*, 2013). En este contexto las plataformas de metabolómica se pueden usar para identificar el papel de los metabolitos en la supresión de enfermedades y el análisis

de expresión génica, así como la respuesta de defensa a partir de la aplicación de dichos téis (Martin, 2014).

La finalidad de la presente investigación fue la de definir el potencial nutricional del Té Aerobio de Composta (TAC) y evaluar el perfil metabolómico en plantas de jitomate (*S. lycopersicum*) tratadas con el TAC, para el biocontrol de la bacteria fitopatógena *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en condiciones semicontroladas y validar su uso como herramienta tecnológica en la producción de dicho cultivo.

Pregunta de Investigación

¿Cuál es el efecto del Té Aerobio de Composta en el metabolismo vegetal que incide en la disminución de la enfermedad en la planta?

Hipótesis

El Té Aerobio de Composta contribuye al crecimiento y desarrollo de las plantas y las estimula a defenderse ante la infección por *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar el perfil metabolómico en plantas de *S. lycopersicum* infectadas con *C. michiganensis* y tratadas con un té aerobio de composta en condiciones semicontroladas.

Objetivos específicos

- Determinar las características fisicoquímicas y biológicas de un té aerobio de composta (TAC).
- Evaluar el efecto agronómico del TAC en plantas de jitomate infectadas con el patógeno bacteriano (*C. michiganensis*).
- Analizar el perfil metabolómico en plantas de jitomate infectadas con *C. michiganensis* y tratadas con un té aerobio de composta.

REVISIÓN DE LITERATURA

Cultivo de Jitomate en México

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) se lo ha asociado a México a lo largo de la historia. Aunque esta hortaliza es originaria de Sudamérica, fue domesticada en Mesoamérica antes de su llegada a Europa. Tiene un gran valor económico y es una de las hortalizas considerada de importancia gastronómica por ser el componente principal de una gran variedad de platillos (Saavedra *et al.*, 2017). Actualmente esta hortaliza, incluida en la canasta básica de México, posee un papel nutricional importante en la dieta de la población (Lares *et al.*, 2018).

A pesar de que no contiene un alto valor nutricional, si solo se consideran las proteínas, lípidos y azúcares, el tomate cuenta con una fuente importante de antioxidantes por el contenido de licopeno, nutriente esencial para la salud humana. El licopeno se lo considera como fuente protectora contra el cáncer y las enfermedades cardiovasculares. Asimismo, el tomate contiene vitamina A (β -caroteno), ácido ascórbico (vitamina C) y minerales como el potasio (Rao y Agarwal, 2000).

Actualmente, México es el principal proveedor de jitomate de Estados Unidos y Canadá, con una participación en el mercado internacional del 22.11% del valor de exportaciones mundiales y aunque satisface la demanda nacional, el jitomate mexicano cubrió el 90.67% y 65.31% de importaciones de ambos países respectivamente (SAGARPA, 2017).

San Luis Potosí, ocupa el segundo lugar en producción de jitomate a nivel nacional, con una superficie sembrada de 2.643 ha de las cuales, 1800 ha se encuentran en condiciones de invernadero; este estado produce aproximadamente 306 mil toneladas y generando ingresos anuales de MNX \$ 3.370 millones de pesos (Zaragoza, 2019).

Por lo tanto, el jitomate cumple un papel extremadamente importante en la producción y el comercio de hortalizas agrícolas. Por ser uno de los vegetales más cultivados en el mundo, el jitomate se ve afectado por diversas enfermedades (virus, hongos, bacterias) y plagas en su proceso de crecimiento. El cultivo se puede ver afectado por el entorno local, las variedades y manejo, por lo tanto, las plagas y enfermedades del jitomate son distintas en diferentes regiones cultivadas (Liu y Wand, 2020).

Interacción Planta-Microorganismo

Los microorganismos asociados a las plantas cumplen funciones importantes para la salud de estas. La comunicación entre plantas hospedadas y microorganismos puede ocurrir a través de la secreción de factores de señalización en forma de proteínas, metabolitos y/o compuestos orgánicos volátiles. Diversos factores abióticos y bióticos pueden influir en el desarrollo y establecimiento de relaciones entre plantas-microorganismos y en el efecto fisiológico neto sobre el crecimiento de la planta hospedante (Sukumar *et al.*, 2013).

Los microorganismos asociados a las plantas se clasifican en tres grupos: beneficiosos (mutualistas), nocivos (patógenos) y neutros (comensalistas). Se ha descrito que en los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Serratia*, *Azotobacter*, entre otros, existen especies habitantes de la rizosfera que promueven el crecimiento y desarrollo de las plantas tanto en condiciones normales como de estrés, por lo que se les denomina Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal. Sin embargo, la mayoría de los Promotores del Crecimiento de las Plantas y las micorrizas arbusculares son incapaces de tolerar sequías, salinidad y estrés por metales pesados. En general, los microbios benéficos asociados a las plantas mejoran la eficiencia de su crecimiento y desarrollo en condiciones de estrés abiótico y biótico (Kumar y Verma, 2018).

Por otro lado, diversos mecanismos están implicados en la supresión de patógenos de las plantas, que a menudo están conectados indirectamente con el crecimiento de las plantas (Berg, 2009). Las bacterias asociadas a las plantas pueden reducir la actividad de los microorganismos patógenos no solo a través de antagonismos microbianos, sino también activando la planta para que se defienda mejor, un fenómeno denominado "resistencia sistémica inducida" (Van Loon, 2007).

Se ha demostrado que numerosos microorganismos asociados a plantas secretan compuestos químicos que suprimen directamente el crecimiento de antagonistas microbianos. Los eucariotas filamentosos son bien conocidos por producir una multitud de metabolitos secundarios de bajo peso molecular que tienen actividades antifúngicas contra microbios no relacionados filogenéticamente (Hassani *et al.*, 2018).

Las bacterias también producen diferentes metabolitos, incluidos antibióticos y enzimas, que exhiben una actividad de amplio espectro contra patógenos fitogenéticos de plantas filogenéticamente no relacionados. Además, las bacterias de diferentes compartimentos vegetales muestran diferentes niveles de sensibilidad a la actividad antagonista, lo que indica que las interacciones antagonistas podrían desempeñar un papel importante en la distribución de la estructura de la microbiota vegetal (Maida *et al.*, 2016).

Interacción Planta-Patógeno

La mayoría de las plantas son resistentes a un gran número de patógenos vegetales. Las plantas tienen la capacidad de distinguir a los intrusos de la microbiota benéfica. En este contexto, los fitopatógenos pueden ser discriminados por las células vegetales a través de una gran variedad de receptores intracelulares y de la membrana plasmática que reconocen las moléculas liberadas por los microorganismos, en un proceso llamado Sistema Inmunológico Innato. A pesar de que las plantas poseen la capacidad de prevenir infecciones por patógenos, en algunos casos, la planta hospedera percibe moléculas de señalización simbióticas procedentes de fitopatógenos, desencadenando cascadas de señalización que favorecen el proceso de infeccioso (Tóth y Stacey, 2015).

Sin embargo, algunas moléculas de señalización implicadas en el reconocimiento de microorganismos pueden inducir respuestas que normalmente están asociadas con la inmunidad innata de las plantas, entre ellas la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (ISR) (Pauly *et al.*, 2006). Al igual que los patógenos bacterianos, los microorganismos asociados a plantas tienen la capacidad de regular selectivamente la respuesta inmune innata y facilitar la colonización (Liang *et al.*, 2013).

En el contexto de las interacciones planta-patógeno, uno de los mecanismos de resistencia, se basan en interacciones específicas entre los alelos del gen de avirulencia (Avr) del patógeno y los alelos del locus de resistencia (R) en el hospedero. Cuando los productos de los genes R y Avr correspondientes están presentes tanto en el hospedero como en el patógeno, el resultado es la resistencia a las enfermedades, contextualizada como interacción incompatible. Si el gen R es inactivo o ausente, se produce una enfermedad, contextualizada como interacción compatible (Flor, 1971). La inmunidad innata mediada por R específica se superpone a una o más vías de defensa basal. Las

defensas basales inhiben la propagación de patógenos después de una infección exitosa y la aparición de la enfermedad. La superposición genética entre las respuestas de resistencia específicas y basales sugiere que una función de la señalización mediada por R es activar más rápida y eficazmente los mecanismos de defensa que comparten ambas vías (Dangl y Jones, 2011).

Para comprender mejor esta interacción, los análisis ómicos podrían proporcionar información valiosa en sistemas controlados, entre las plantas hospederas y microorganismos simbióticos (De Souza *et al.*, 2016).

Cáncer Bacteriano

El género *Clavibacter* pertenece al grupo de actinobacterias, definidas como bacterias Gram positivas y comprende una sola especie con cinco subespecies establecidas, todas estas consideradas fitopatógenas, que difieren significativamente en cada hospedero (Hiery *et al.*, 2015). El cáncer bacteriano causado por la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), es la subespecie mejor investigada y una de las enfermedades más destructivas del jitomate. Cmm, causa marchitez en las hojas y cáncer en el sistema vascular del jitomate (*Solanum lycopersicum*) (Strider, 1969). Se ha reportado dicha enfermedad a nivel mundial tanto a campo abierto como en invernaderos, causando pérdidas sustanciales en dicho cultivo (Chang *et al.*, 1992).

Cmm puede desarrollarse a 20 – 30 °C y sobrevivir a 50 °C, crece de manera óptima a 25 °C; puede crecer en medios artificiales, pero se necesitan de 3 a 7 días para que las colonias sean visibles en placas de agar selectivas. El pH óptimo para el crecimiento de esta bacteria oscila entre 7 y 8, sin embargo, crece en el xilema de la planta con un pH de 5 (Eichenlaub *et al.*, 2007). Una vez que las plantas están infectadas los síntomas iniciales de necrosis en las hojas marginales (Figura 1A) se agrandan y provocan el marchitamiento de todas las hojas, mientras que el cáncer se desarrolla en el tallo, y las plantas enteras pueden atrofiarse y marchitarse severamente (Figura 1B) provocando su muerte (Sen *et al.*, 2015). En el fruto se producen lesiones redondeadas de entre 3 a 6 mm de color oscuro conocidas como ojos de pájaro (Figura 1C) (Medina-Mora *et al.*, 2001). El inóculo de Cmm puede originarse en suelos infectados, por semillas que le permiten sobrevivir el invierno por hasta 2 años, proporcionando una fuente de inóculo durante la temporada de

crecimiento (Gleason *et al.*, 1993), se puede transmitir además a las plántulas emergentes (Biggerstaff *et al.*, 1999), en los trasplantes, restos de tomate en el suelo, herramientas y equipos operativos. La bacteria puede ingresar a las plantas a través de heridas y aberturas naturales como estomas e hidátodos; posteriormente se mueven hacia el xilema y se multiplican rápidamente (Sharabani *et al.*, 2013). Las prácticas agrícolas como atar, podar, cortar, rociar y cosechar pueden causar un alto nivel de infección secundaria que se propaga a las plantas sanas cercanas a través de los dedos y las herramientas de los trabajadores (Gleason *et al.*, 1993). Las poblaciones de Cmm se desarrollan en invernaderos húmedos y pueden propagarse a plantas no infectadas mediante riego por aspersión (Hausbeck *et al.*, 2000).



Figura 1. Sintomatología de Cmm en plantas de jitomate. **A.** Necrosis marginal en hojas. **B.** Atrofiamiento de tallos y marchitamiento de la planta. **C.** Lesiones en el fruto conocidas como ojo de pájaro.

El conocimiento sobre los factores de virulencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* y las interacciones huésped-patógeno a nivel molecular son bastante limitados. Se han estudiado en detalle tres genes de Cmm y sus respectivos productos. Por un lado, el gen *pat-1*, que codifica una serina proteasa (Dreier *et al.*, 1997); el gen *celA*, que codifica una β -1,4-endoglucanasa (Jahr *et al.*, 2000) y finalmente el gen *tomA*, que codifica una tomatinasa que degrada la tomatina, una saponina antimicrobiana (Kaup *et al.*, 2005). Los genes *pat-1* y *celA* se encuentran en dos plásmidos naturales, que son cruciales para la virulencia y el desarrollo de síntomas. Además de *pat-1* y *celA*, tres serinas proteasas putativas más (*ppaJ*, *phpA* y *phpB*), que también pueden desempeñar un papel importante en la patogenicidad, están codificadas en estos plásmidos denominados

pCM1 y pCM2. El gen *tomA* está codificado cromosómicamente y ubicado dentro de la región *chp/tomA*, una isla de patogenicidad putativa (Gartemann *et al.*, 2008), que comprenden también los genes que codifican las serinas proteasas *chpC*, *chpG*, *ppaA* y *ppaC*, otros factores de virulencia putativos de Cmm (Stork *et al.*, 2008). La pérdida de esta isla de patogenicidad, así como la pérdida de pCM1 y pCM2, dan como resultado una patogenicidad reducida y el desarrollo de síntomas en el jitomate (Eichenlaub y Gartemann, 2011).

A pesar de la gravedad de esta enfermedad, no se ha encontrado ningún método de control completamente efectivo. Al no existir material vegetal resistente a Cmm disponibles comercialmente, el control actual se basa principalmente en el uso de semillas y trasplantes certificados libre de patógenos, buena higiene, desinfección de todas las herramientas y rotaciones de cultivos (Xu *et al.*, 2015).

Cmm posee una alta diversidad genética que contrasta fuertemente con la erosión genética de los cultivares de jitomate comerciales, conocida como síndrome de domesticación. En este contexto Cmm es un patógeno vegetal que se ha adaptado a los cultivares comerciales de jitomate, mientras que este último no posee la capacidad de responder eficazmente a la infección de dicho patógeno, lo cual explicaría la ausencia de cultivares resistentes (Martínez-Castro *et al.*, 2018).

Compostas y Tés Aerobios de Composta

El desarrollo de tecnologías de fertilización y control de enfermedades en la agricultura orgánica ha dado paso a nuevos descubrimientos. Mejorar y mantener la calidad y la fertilidad del suelo a lo largo del tiempo ha sido un desafío para una agricultura moderna basada en el uso frecuente de insumos orgánicos al suelo y la necesidad de tratar y eliminar los desechos orgánicos ha hecho que la producción de composta y su aplicación agrícola sean una solución atractiva (De Corato, 2020a; Berek, 2017). El compostaje es un proceso donde la materia orgánica es humificada y mineralizada por microorganismos. El metabolismo microbiano es un proceso aeróbico que pasa por una fase Mesofílica I (0 - 45°C), luego pasa por una fase Termofílica (60 °C) en donde actúan las actinobacterias que catabolizan ceras y hemicelulosas, y ocurre la higienización de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. A los 55 °C se eliminan los quistes y huevos de helminto, esporas de

hongos fitopatógenos y semillas de malezas y, nuevamente una etapa Mesofílica II (40 - 45°C) (Figura 2). Finalmente existe un proceso de maduración a temperatura ambiente en donde existe condensación, polimerización de compuestos y generación de ácidos fúlvicos y húmicos (Antil *et al.*, 2014). La degradación de la materia orgánica es un proceso donde ocurren reacciones bioquímicas e intervienen organismos vivos, en un ambiente cálido y húmedo. Dentro del proceso de compostaje se elimina o reduce el riesgo de propagación de patógenos, parásitos y semillas de malezas asociados con la aplicación directa al suelo de compost inmaduro y conduce a un producto final estabilizado. Los microorganismos mesófilos y termófilos están involucrados en el compostaje y son importantes en el proceso de compostaje.

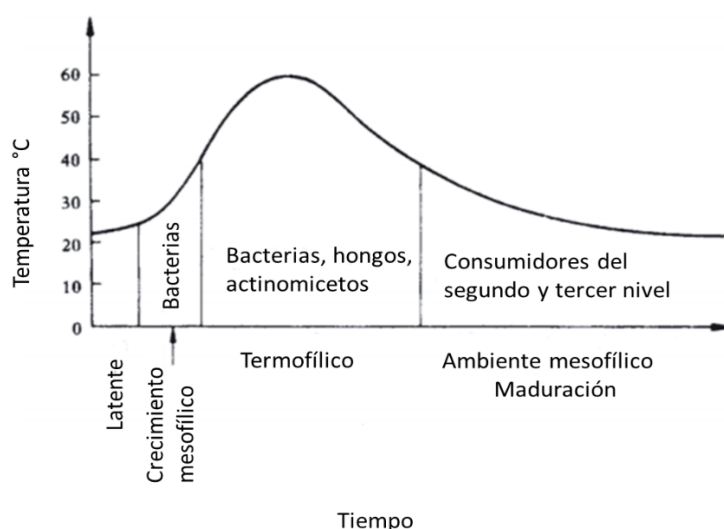


Figura 2. Patrones de temperatura y crecimiento microbiano en pilas de compost (Antil *et al.*, 2014).

El compostaje es una opción viable gracias a los beneficios sobre la calidad del suelo y la salud de las plantas a través del reúso de la biomasa subutilizada. La producción de compostas de alta calidad y sus derivados representan una posibilidad para explotar fuentes valiosas de moléculas orgánicas y microorganismos benéficos provenientes de desechos agrícolas y subproductos disponibles en sistemas agrícolas intensivos (De Corato, 2020b). El reciclaje de residuos de biomasa mediante el proceso de compostaje conlleva a garantizar el suministro de materia orgánica humificada al suelo, minerales y consorcios microbianos benéficos asociados al suelo y a las plantas, que necesitan

incrementar su estado nutricional, vigor vegetativo, salud y productividad (Scotti *et al.*, 2015).

Actualmente, las compostas están disponibles comercialmente como acondicionadores para mejorar la estructura física, la fertilidad biológica del suelo o como enmienda orgánica para mejorar la supresión natural contra patógenos de plantas transmitidos en el suelo (Zaccardelli *et al.*, 2010). La composta es una fuente de macro y micronutrientes que puede verse como una fuente rentable de nutrientes al reemplazar, al menos en parte, la necesidad de fertilizantes minerales (De Corato, 2020c). La calidad de la composta está determinada principalmente por su madurez (que se lo asocia con el potencial de crecimiento de las plantas o la fitotoxicidad) y estabilidad (que se relaciona con la actividad microbiana de la composta) (Cerdeira *et al.*, 2018). La supresión de enfermedades en plantas provenientes del suelo es atribuida a las compostas. Así mismo, su aplicación a largo plazo mejora la biodiversidad y disminuye la abundancia de patógenos vegetales en el suelo (De Corato, 2020b; D'Hose *et al.*, 2014). La capacidad de las compostas para suprimir las enfermedades de las plantas ha sido ampliamente estudiada por su eficacia y beneficios (Avilés *et al.*, 2011). Estudios preliminares han demostrado que el uso de compostas es eficaz en la supresión de hongos patógenos del suelo como *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Borrero *et al.*, 2006), la eliminación de nematodos causantes de enfermedades en diversos cultivos (Everts *et al.*, 2006) y a la supresión del cáncer bacteriano del jitomate (Yogev *et al.*, 2009).

Uno de los derivados de compostas maduras más importante, para mejorar la sostenibilidad de los sistemas de cultivos hortícolas, son los denominados té de composta. El té de composta es un subproducto de una composta madura, al diluirse su contenido en un medio líquido en presencia de oxígeno que funciona como fuente de nutrientes disueltos disponibles, para ser absorbidos ya sea a través de las raíces o las hojas y que, además, puede ser utilizado como bioplaguicida debido a las opciones limitadas para el control de enfermedades (Berek, 2017).

El té de composta se puede preparar a través de un proceso aerobio y se basa en la agitación u oxigenación forzada. El propósito principal de la agitación es disolver los nutrientes de la composta en el agua, además de proporcionar el oxígeno adecuado para

los microorganismos, especialmente bacterias, que también pueden suprimir el patógeno *Escherichia coli* (Ingham, 2005). Para aumentar su eficacia en la mejora de la salud y la vitalidad de las plantas, en el proceso de elaboración, a menudo se agrega o se enriquece con determinados sustratos para microorganismos y nutrientes para las plantas (Shrestha *et al.*, 2011). Se han reportado estudios sobre de la aplicación de Tés Aerobios de Composta (TAC) para la supresión de enfermedades foliares bacterianas producidas por *Pseudomonas syringae* pv. tomate (Pane *et al.*, 2007) y la mancha bacteriana por *X. vesicatoria* (Al-Dahmani *et al.*, 2003); además de varios estudios a partir del uso de TACs en campo abierto para controlar patógenos del cultivo de papa como *Helminthosporium solani*, *Alternaria solani*, *Fusarium spp.*, *Rhizoctonia solani* (Al-Mughrabi, 2006) y *Phytophthora infestans* (Al-Mughrabi, 2007; Al-Mughrabi *et al.*, 2008). Además, los TACs se han estudiado en diversos sistemas de cultivos hortícolas en los que los diferentes tipos de formulación parecían eficaces contra enfermedades transmitidas por el suelo como la raíz corchosa del tomate producidas por *Pyrenochaeta lycopersici* y la pudrición de raíces en pepino y el frijol por *Pythium ultimum* y *R. solani*, respectivamente (Pane *et al.*, 2012).

Biocontrol del Cáncer Bacteriano

Estudios centrados en el control químico de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* es escaso y ofrece resultados variables (Kleitman *et al.*, 2008); la propagación secundaria del patógeno en el campo solo puede reducirse tratando las plántulas con estreptomicina y compuestos de cobre (Werner *et al.*, 2002), sin embargo, estos compuestos podrían ser perjudiciales para el ser humano y el medio ambiente (de León *et al.*, 2008).

Se ha reportado que, para contrarrestar este fitopatógeno en dicho cultivo, existen alternativas biológicas que permiten inhibir su desarrollo. Raviv *et al.* (2010) demostraron que se puede suprimir Cmm en jitomate, en campo e invernadero, aplicando al suelo una composta madura, producida a base de residuos de jitomate infectado con Cmm, tomando como punto de ajuste de compostaje al menos 55 °C de temperatura para garantizar la erradicación completa de dicho patógeno, al aplicar dicho sustrato directamente al suelo después del final de la temporada de producción.

La utilización de microorganismos benéficos tales como las micorrizas (Duc y Posta, 2018) y *Bacillus subtilis* (Jung *et al.*, 2014; Raupach y Kloepper, 2000; Rojas, 2014), ha demostrado ser eficaz para el control de esta bacteria. Por otra parte, la aplicación foliar de extractos de composta suprime significativamente poblaciones de enfermedades bacterianas en jitomate (Al-Dahmani *et al.*, 2003). Estudios preliminares han demostrado que la estructura microbiana presente en un té aerobio de composta suprime parcialmente la sintomatología de plantas infectadas con Cmm Martínez-Yáñez (2018).

Metabolómica de la Interacción Planta-Patógeno

La metabolómica es un campo en crecimiento de la química analítica que se centra en la identificación de pequeños metabolitos. Inicialmente, utilizada en aplicaciones farmacéuticas, la metabolómica se ha convertido en una herramienta poderosa en la agricultura y la ciencia de los alimentos (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2009), y ha sido utilizado para caracterizar cambios metabólicos en plantas después de sufrir estrés biótico o abiótico (Pedras, y Zheng, 2010), al tiempo que se obtienen conocimientos sobre el estado fisiológico y bioquímico de las plantas en determinadas condiciones (Hong *et al.*, 2016). En general, los metabolitos están más relacionados con el fenotipo que con el genotipo, y se ha propuesto a la metabolómica como el vínculo entre genotipo y fenotipo (Harrison *et al.*, 2020). La cromatografía de gases junto con la espectrometría de masas (GC-MS) es la tecnología analítica más utilizada para el perfil de metabolitos (Abdelrahman *et al.*, 2018).

En un estudio realizado por Lowe-Power *et al.* (2018), utilizaron metabolómica no dirigida para comparar la composición química de la savia de plantas de jitomate sanas e infectadas con *Ralstonia solanacearum* que presentaban síntomas iniciales. A través del análisis de GC-MS reportaron que la putrescina, una poliamina, es la encargada de acelerar los síntomas de la marchitez bacteriana producido por dicho patógeno y se produce en el bloqueo de los vasos del xilema en plantas de jitomate aumentando su concentración. Este patógeno utiliza la galactosa, 3-hidroxibutirato (3HB), gluconato y glucosa como fuentes de carbono para sobrevivir en el xilema. Sus resultados demostraron que la putrescina es un metabolito de virulencia producido por dicho patógeno.

El conocimiento sobre los factores de virulencia de la subespecie *C. michiganensis* y las interacciones hospedero-patógeno a nivel metabolómico son limitados. Más allá de la aplicación de los TACs en condiciones de invernadero (Al-Dahmani *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2009) o de campo (Ghorbani, *et al.*, 2006) y observar su comportamiento, es importante estudiar al potencial que poseen las herramientas metabolómicas para caracterizar los mecanismos biológicos de resistencia en las plantas (Maridueña-Zavala *et al.*, 2017; Dixon y Walsh, 1998).

Tomando en cuenta lo anterior en el presente proyecto planteamos valorar el potencial sobre el efecto fisiológico y de biocontrol del cáncer bacteriano en jitomte (*S. lycopersicum*) mediante la aplicación de un té aerobio de composta (TAC) y evaluar el perfil metabolómico en plantas infectadas y tratadas con el TAC con la finalidad de conocer la expresión de metabolitos relacionados en la interacción planta-patógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del Experimento

Esta investigación se realizó en el Área Experimental de Agroecología (Latitud: N 22° 13' 39,80601" Longitud: W 100° 51' 26,61539") e Invernadero y Laboratorio de Investigación "Interacción Planta-Microorganismo" (Latitud N: 22°14'04.6" y Longitud: W 100°51'49.0") de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, localizado en el Ejido Palma de la Cruz, Km 14.5 carretera San Luis Potosí a Matehuala, municipio de Soledad de Graciano Sánchez, a una altura de 1850 metros sobre el nivel del mar.

Diseño Experimental

Los tratamientos se establecieron mediante un diseño de bloques completos al azar con cinco réplicas, en condiciones semicontroladas con el respectivo tratamiento de control y consistió en T1: aplicación del té aerobio de composta en etapa de semillero e infección con la bacteria patógena al presentar la tercera hoja verdadera ($TAC_{Sem} + Cmm$) y; T2: aplicación del té en etapa de semillero (TAC_{Sem}); T3: Aplicación del té después del trasplante e infección con la bacteria patógena al presentar la tercera hoja verdadera ($TAC + Cmm$); T4: Aplicación del té luego del trasplante (TAC); T5: Infección con la bacteria fitopatógena al presentar la tercera hoja verdadera ($Jit + Cmm$); T0: plantas sanas (testigo). Se utilizaron 30 plantas por tratamiento.

Producción de la Composta Madura

La composta se la elaboró según los lineamientos para la producción orgánica vigente en México (Jarquin *et al.*, 2013; D.O.F., 2020) y las recomendaciones de la FAO (Román *et al.*, 2013) mediante pilas aeróbicas (de 1 x 1 x 1 m) con volteos sistemáticos con relación C/N 30 – 40:1. Se utilizó como materiales: nopal, estiércol de ganado bovino seco y suelo del predio. El tiempo de producción de la composta fue de 47 días.

Para determinar el volumen de cada material se utilizó una fórmula matemática considerando que la relación ideal para preparar un buen abono sea la siguiente C/N 40:1.

$$x = \frac{(40 \times Nn) - Cn}{Cc - (40 \times Nc)}$$

X = Cantidad en peso del material rico en carbono, para cada parte de nitrógeno.

Nn = % de nitrógeno, en el material rico en N.

Cn = % de carbono, en el material rico en N.

Nc = % de nitrógeno, en el material rico en C.

Cc = % de carbono, en el material rico en C.

¹Nopal (*Opuntia ficus-indica*) C = 5.13; N = 0.05; Estiércol Bovino: C = 53.44; N = 1.67

$$Nopal = \frac{(40 \times 1.67\%) - 53.44\%}{5.13\% - (40 \times 0.05\%)} = \frac{13.36}{3.13} = 4.27$$

Se mezcló 4.27 partes en peso de Nopal por cada 1.67 partes en peso de estiércol bovino.

Se delimitó un espacio de 1 x 1 m para colocar el nopal y estiércol, ambos se extendieron de manera uniforme, adicionalmente se les fue añadió 5 paladas de suelo del predio, a fin de ir tapando los materiales, y finalmente se le salpicó agua por capa. Se colocaron 41 capas de los materiales anteriormente mencionados y para evitar la caída por gravedad de los materiales se levantó un terraplén con el mismo suelo que sirvió de apoyo hasta llegar a 64 cm de altura (Figura 3A). Cabe destacar que el lugar donde se elaboró la composta estaba junto a unos árboles de mora para mantener una temperatura adecuada. Finalmente, se cubrió con plástico de color negro para proteger la composta de la lluvia o cualquier factor abiótico externo y mantener las temperaturas requeridas en las fases mesofílicas y termofílicas (Figura 3B).

¹ Comunicación personal: tablas revisadas en clases del Dr. Ramón Jarquín G., profesor titular de la materia de Producción Agrícola Orgánica de la Maestría en Ciencias Agropecuarias en el año 2020, sobre composición promedio de materiales ricos en carbono y nitrógeno.



Figura 3. Elaboración de la composta en forma de pila. **A.** Colocación por capas de todos los materiales que conforman la composta. **B.** Composta terminada y cubierta con plástico negro para evitar su enfriamiento.

A partir del quinto y décimo día, luego de producida la composta, se midió la temperatura en horas de la mañana. Se utilizó un termómetro análogo tipo lanza para composta de 50 cm de longitud (TFA Dostmann, 19.2008, Alemania). Se utilizó un Hygro-Thermometro (Extech, 445702, China) y la aplicación MeteoRed V. 7.1.2 para registrar la temperatura y humedad del ambiente diaria. A los 15, 22, 29, 36 y 43 días se capturó la temperatura y posteriormente se midió un cuadrante de 1 x 1 m a un costado de la pila para realizar el respectivo volteo sistemático. Para este fin, se quitó el plástico y se retiró poco a poco el terraplén de la composta que se fue ubicando en el perímetro del nuevo cuadrante. Se trazaron 5 líneas en la parte superior de la composta con un ancho de 0.20 m y se procedió a dividir en 5 partes (cada capa) que fueron paleadas y ubicadas en el nuevo cuadrante realizando el volteo sistemático respectivo, utilizando así mismo la técnica del terraplén para evitar su desmoronamiento. Finalmente, se volvió a cubrir la composta con plástico negro.

Una vez lista la composta madura se procedió con su caracterización fisicoquímica tomando en consideración los siguientes parámetros: pH, conductividad eléctrica, humedad, materia orgánica, cenizas, carbono orgánico, relación C/N, contenido de macro y micronutrientes y prueba de germinación de arvenses para confirmar el nivel de saneamiento término de posibles plantas espontaneas (Figura 4).

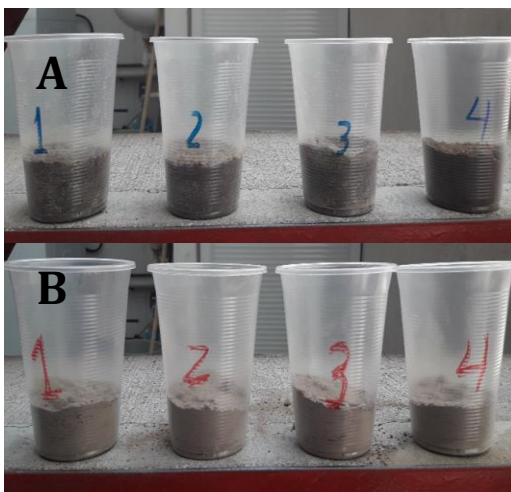


Figura 4. Prueba de germinación de arvenses. **A.** Envases con composta. **B.** Envases con suelo del predio como control negativo.

Producción y Caracterización del Té Aerobio de Composta

El té de composta se preparó en una proporción de 1:5 (composta:agua), colocando 2 kg de la composta producida preliminarmente, en una bolsa de tela porosa, 400 g de piloncillo diluido de manera previa, 400 mL de humus líquido, 400 mL de leche, 100 mL de agua de coco y 20 L de agua (de preferencia sin cloro) en un tanque plástico, equipado con un sistema de aireación forzada continua durante un lapso de 24 horas (Fig. 5 A y B) según el método modificado de Ingham, (2005).

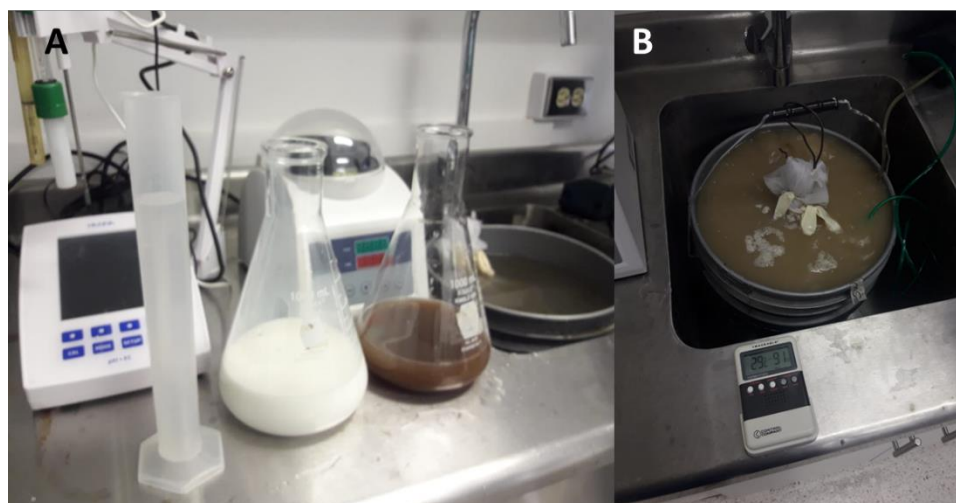


Figura 5. Elaboración del té aerobio de composta (TAC). **A.** Preparación y Medición de los materiales que componen el TAC. **B.** TAC luego de 24 h de suministrar aireación forzada.

Se determinaron los parámetros fisicoquímicos: pH y conductividad eléctrica (CE), con el equipo multiparamétrico (Hanna Instruments, HI 9813-6N, USA); materia orgánica del té de compost se determinó según metodología de Black *et al.*, (1965). Se determinaron los macro y micronutrientes mediante ICP-OES (Digestión con HNO₃). Para la identificación de microorganismos presentes en el TAC se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁶ y se colocó 50 µL de cada dilución en cajas Petri con medios de cultivo BK, LB, Nutritivo y PDA. Las cajas fueron incubadas a 28 °C por 48 h. Adicionalmente se realizó una evaluación biosintética utilizando los medios CAS y Burk llevados a incubación por 72 h a 28 °C, para la determinación de microorganismos productores de sideróforos y fijadores de nitrógeno respectivamente.

Preparación del Material Vegetal

Para el proceso de germinación, se colocaron semillas certificadas de jitomate (Kristen Seed, Saladett, México) en bandejas de germinación (1 por alveolo) utilizando turba (Premier, Sphagnum peat moss, Canadá) como sustrato previamente humedecido con agua. Se mantuvieron en las bandejas hasta que las plántulas desarrollaron dos hojas verdaderas, para luego ser trasplantadas en bolsas plásticas agrícolas individuales (de polietileno) con sustrato de peat moss (Kekkila, Sphagnum peat moss, Finlandia) perlita y vermiculita en una proporción de 6:2:2 según método de Kim y Kim, (2011).

Aislamiento, Identificación e Inoculación de Cmm en Jitomate

Se colectó material vegetal (hojas y tallos) provenientes de un cultivo de jitomate ubicado en el invernadero de acuaponía del Centro de Capacitación en Agricultura Protegida de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, que presentó síntomas de cáncer bacteriano. Dicho material fue llevado al laboratorio de interacción planta-microorganismo; fue limpiado con cloro al 10%, removiendo las impurezas de la superficie, enjuagado con agua destilada, cortado en pedazos pequeños y colocados en una caja Petri con medio de cultivo sólido Luria-Bertani (LB) (10 g/L peptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L de NaCl, 20 g/L de agar bacteriológico). Se lo llevó a incubación por 24 h a 28 °C. Se aisló una colonia bacteriana que presentó morfología mucoide, de color amarillo típico de Cmm, que fue sembrada en una caja Petri con medio de cultivo sólido Cmm¹ (10 g/L de Sacarosa, 1.2 g/L de Tris

Base, solución de 1 mL/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g/L de cloruro de litio, 2 g/L de extracto de levadura, 1 g/L de NH_4Cl , 4 g/L ácido casamino, ajustar pH 7.4, 15 g/L agar bacteriológico) y se incubó por 72 h a 28 °C.

Para identificar al agente causal se realizó la tinción de Gram y luego se observó en microscopio. Se procedió con la extracción de ADN de la bacteria con solventes orgánicos. Se preparó un cultivo con la colonia aislada en 3 mL de medio líquido LB que fue llevado a incubación a 28 °C durante 48 h. Se colocó 1 mL de la colonia en un tubo eppendorf. Las células se cosecharon por centrifugación a 8.000 rpm durante 2 minutos. Se resuspendió con 0.5 mL de agua destilada estéril. Se centrifugó nuevamente a 8.000 rpm durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla con 0.5 mL de amortiguador de lisis (Tris 50 mM, pH 8; EDTA 50 mM; SDS 3%). Se homogenizó la mezcla con una micropipeta. Se incubó a 65 °C durante 40 min. Se colocó 0.5 mL de Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Se mezcló por inversión y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min. Se separó la parte acuosa (superior) y se colocó en otro tubo. Se adicionó 0.1 mL de Acetato de Sodio 3M y se mezcló por inversión. Se adicionó 1 mL de etanol absoluto y se incubó a -20 °C durante 25 minutos. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos, se eliminó el etanol y la pastilla se lavó con etanol al 70%. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 min, se eliminó el etanol y se secó a temperatura ambiente durante 10 min. Finalmente, se resuspendió en 0.040 mL de agua inyectable y se almacenó a -20 °C. Se realizó una prueba de calidad utilizando un gel de agarosa teñido al 1% con bromuro de etidio (5 mg/mL agua destilada estéril).

Se realizó el diagnóstico molecular a partir de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de un fragmento de 219 pb del gen *tomA* (tomAF GAGCCAAGCCACTGATCTTC, tomAR CGTTCTCGTAGAGGCGGTAG) gen específico de Cmm. Se efectuó la amplificación en un termociclador de DNA (Labnet, TC-020-24, USA). Las condiciones de reacción fueron: desnaturalización inicial 95°C/5 min, 35 ciclos conformados por las etapas de desnaturalización 95 °C/30 s, alineamiento 55 °C/ 30 s, extensión 72 °C/45 s, y extensión final 72 °C/5 min. El producto de PCR se verificó a través de electroforesis con gel de agarosa al 2% a 90 V. El gel se visualizó con

bromuro de etidio (5 mg/mL) en el Sistema Documentador de Geles (ENDURO™ GDS, GDS-1302, USA).

Así mismo, se amplificó mediante la técnica PCR un fragmento de 1500 pb de la región genómica 16S rRNA (27F AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, 1492R TACGGYTACCTTGTTACGACTT). La reacción se la realizó en un volumen de 25 µL: 16.52 µL de agua inyectable, 2.5 µL de Buffer 10X + MgCl₂, 0.5 µL dNTPs 10µM, 0.34 µL primer 27F 1 µM, 0.34 µL primer 1492R 1 µM, 2.5 µL DMSO, 0.3 µL Taq polimerasa (5U/ µL) y 2.0 µL del ADN. Las condiciones de reacción para a amplificación fueron: desnaturalización inicial 94°C/5 min, 35 ciclos conformados por las etapas de desnaturalización 94 °C/45 s, alineamiento 50 °C/ 45 s, extensión 72 °C/90 s; y extensión final 72 °C/5 min. El producto de PCR se verificó a través de electroforesis con gel de agarosa al 1% al que se le agregó bromuro de etidio (5 mg/mL) para realizar la tinción; se colocó en un pozo del gel 2 µL del marcador molecular de ADN de 1 kb (Thermo Scientific, SM1163, USA); se utilizó el amortiguador TAE 1X (Tris base 40 mM, acetato de sodio 5 mM y EDTA 1mM, pH 8), a 90 v durante 30 min y se visualizó en el Sistema Documentador de Geles Enduro. Los fragmentos del tamaño esperado fueron purificados con kit comercial y secuenciados. La secuencia fue analizada con la herramienta de búsqueda básica de alineación local (Blastn) (Tambong, 2017).

Una vez que las plantas presentaron la tercera hoja verdadera se preparó el material para la infección. Se colocó 10 mL de medio de cultivo líquido LB en tubos falcon de 15 mL. Con un asa bacteriológica estéril se sembró, con dos pases, la bacteria proveniente de la caja petri previamente obtenida; el tubo fue sellado y llevado a incubación por 24 h a 28 °C. Posteriormente se centrifugó el tubo falcon durante 3 min a 3500 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió con agua destilada estéril. Se inoculó la bacteria en las plántulas de jitomate utilizando el método modificado de Eddin *et al.*, (2005). El líquido resuspendido fue utilizado para infectar una cuchilla (de afeitar) y provocar dos heridas pequeñas separadas 5 cm entre sí en el tallo del jitomate. Finalmente, con una micropipeta se añadió 50 µL del material líquido en cada herida, repitiendo este proceso dos veces más con tres días de separación.

Evaluación de Parámetros Agronómicos del Cultivo

Los parámetros agronómicos medidos a los 45 días después de la siembra fueron: altura de planta, diámetro del tallo, número de flores, y área foliar (Hidalgo *et al.*, 2009). Para la altura se midió su longitud desde la base hasta el ápice del tallo. Se utilizó un vernier digital para medir el diámetro a 2 cm de la base de la planta. Se hizo un conteo cada dos días del número de flores a partir de la primera floración. Para medir el área foliar se fotografió la cuarta hoja compuesta, debidamente identificada, de cada planta evaluada; se utilizó como fondo una hoja de papel de color blanco, que tenía inserto un pedazo de papel milimetrado, con el fin de capturar *in vivo* semanalmente el desarrollo de las hojas en cada tratamiento, posteriormente se analizó con el programa informático ImageJ (Drienovsky *et al.*, 2017).

Se midió el nivel de daños producido por la bacteria implementado por Sen *et al.*, (2013) cada 2 días, luego de presentarse los primeros síntomas en plantas infectadas. Los síntomas se registraron utilizando la siguiente escala: Sin síntomas, puntuación = 0; Marchitez de 1 hoja, puntuación = 1; Más de una hoja, pero < 50% de hojas marchitas, puntuación = 2; Entre el 50 y el 75% de las hojas están marchitas, puntuación = 3; Más del 75% pero < al 100% marchitas, puntuación = 4; y Planta marchita o muerte total, puntuación = 5. Luego de obtenido el nivel de daño se calculó el índice de severidad de la enfermedad (ISE), según lo propuesto por Bella *et al.*, (2012) aplicando la siguiente fórmula: $ISE = \frac{\sum(P*Q)}{(M*N)}$ donde, P = nivel de daño; Q = Número de plantas que muestran el nivel de daño P; M = Número total de plantas observadas; N = nivel máximo de daño.

Se determinó el contenido foliar de clorofila (Chl), flavonoides (Flav), antocianinas (Anth) e índice de equilibrio de nitrógeno (NBI) en la hoja más joven completamente expandida durante 7 semanas luego de la infección mediante la técnica no destructiva de hojas utilizando el equipo Dualex.ForceA (Cеровic *et al.*, 2012; Montenegro *et al.*, 2020) y finalmente se midió la conductividad hidráulica según el método de Sperry *et al.* (1988) modificada utilizando tres gradientes de presión de agua a 30, 60 y 90 cm de altura; para esta evaluación se utilizaron 5 plantas por tratamiento.

Extracción de ADN de Plantas Infectadas

Para la confirmación del agente causal en plantas infectadas se extrajo el ADN genómico a partir del protocolo sugerido por Lara-Ávila (2005), basado en CTAB 0.8% (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) y 1 % de n-Lauril Sarcosina. Se colocó en un tubo eppendorf 1 g de muestra de tejido de jitomate, para cada tratamiento. Se agregó 500 µL del buffer de extracción (0.14 M d-Sorbitol, 0.22 M Tris HCl pH 8, 0.022 M EDTA pH 8, 0.8 M NaCl, 0.8% CTAB, 1% n-Lauril Sarcosina). Se trituró, mezcló en vortex y llevó a incubación a 65 °C durante 30 minutos (agitándose cada 10 min). Se añadió 500 µL de Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló en vortex y se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min. Se separó la fase acuosa y se la colocó en un tubo eppendorf nuevo. Se repitió la fase de lavado con Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Luego se precipitó el ADN con un volumen igual de Isopropanol frío, se mezcló por inversión y se comprobó la formación de madeja de ADN. Se llevó el tubo a -20 °C durante 5 min, para favorecer la precipitación. Se centrifugó durante 10 min a 12 000 rpm y se eliminó el sobrenadante por decantación. Se lavó la pastilla con 200 µL de Etanol al 70%, invirtiendo el tubo varias veces con cuidado. Finalmente, se centrifugó por 5 min y se eliminó el etanol con pipeta. Se secó el tubo al ambiente durante 10 minutos, se resuspendió con 50 µL de agua inyectable y se lo almacenó a -20 °C. Posteriormente se procedió a la amplificación por PCR de los genes 25S y *tomA* específicos de jitomate y Cmm respectivamente, a fin de confirmar la presencia de este último en la planta. La reacción del PCR 25S (25SF GGCCATTTTGGTAAGCAGA, 25SR GATTCGGCAGGTGAGTTGTT) se realizó en un volumen de 25 µL: 16.52 µL de agua inyectable, 2.5 µL de Buffer 10X + MgCl₂, 0.5 µL dNTPs 10µM, 0.34 µL primer 25S F 1 µM, 0.34 µL primer 25S R 1 µM, 2.5 µL DMSO, 0.3 µL Taq polimerasa (5U/ µL) y 2.0 µL del ADN bajo las mismas condiciones de reacción para amplificación realizadas en el PCR *tomA*. El producto de PCR se verificó a través de electroforesis con gel de agarosa al 1% al que se le agregó bromuro de etidio (10 g/mL) para realizar la tinción; se colocó 2 µL del marcador molecular de ADN de 100 bp (ThermoScientific); se utilizó el amortiguador TAE 1X (Tris base 40 mM, acetato de sodio 5 mM y EDTA 1mM, pH 8), a 90 v durante 30 min y se visualizó en el Sistema Documentador de Enduro.

Obtención de Fluido Apoplástico y Muestras de Tejidos de Jitomate

Se obtuvieron muestras de líquido apoplástico a los 16 y 24 días después de la infección (dpi) a través de la técnica de infiltración-centrifugación, en hojas de plantas evaluadas, siguiendo el protocolo de O'Leary *et al.*, 2014. Se colectaron muestras de folíolos de la cuarta hoja compuesta de cada planta. Se enjuagaron con agua destilada estéril para eliminar residuos de la superficie y se secaron con papel. Posteriormente se colocaron las hojas en matraces Kitasato, debidamente identificadas por tratamiento y se les añadió 250 mL de agua destilada estéril. Posteriormente se sometieron a pulsaciones al vacío durante 40 min hasta que estuvieran completamente saturadas. Finalmente, las hojas fueron enrolladas con papel Parafilm y colocadas en tubos falcon de 50 mL por tratamiento y se las llevó a centrifugación durante 7 minutos a 3500 rpm. El líquido extraído de cada tratamiento fue colocado en tubos eppendorf de 1.5 mL y llevado a -80 °C..

Se colectó muestras de tejido a los 24 dpi de plantas infectadas y tratadas con el TAC que fueron pulverizadas con nitrógeno líquido según el método propuesto por Desbrosses *et al.* 2005 modificado. Las muestras fueron almacenadas en -80 °C durante 15 días. Se utilizó nitrógeno líquido para transportar las muestras en los tubos que posteriormente fueron congeladas en seco en un equipo liofilizador durante 24 horas. Estas muestras fueron utilizadas para la extracción e identificación de metabolitos secundarios expresados en todos los tratamientos.

Cinéticas de Crecimiento de *C. michiganensis* en el Fluido Apoplástico

Se realizó cinéticas de crecimiento de Cmm con muestras de fluido apoplástico liofilizado. Se preparó 10 mL de cultivo en medio líquido LB con Cmm y 10 mL en medio líquido que imita al fluido del xilema Xmm (1.168 g/L de NaCl, 2.02 g/L KNO₃, 1.233 g/L MgSO₄, 0.147 g/L CaCl₂, 22 mg/L KH₂PO₄, 56 mg/L K₂HPO₄, 1.5 µg/L FeSO₄, 2 g/L ácido casamino y 1 L de agua destilada estéril) con Cmm. La muestra se incubó durante 24 h a 28 °C. Se utilizó una placa de 96 pozos (12 x 8) (Figura 6) y se colocó 200 µL del cultivo en medio LB, con una densidad óptica inicial (D.O) de 0.1 en 5 pozos en la columna 1 y 200 µL de medio LB fresco (sin Cmm) en los 3 pozos restantes. Así mismo, se colocaron 200 µL del cultivo en Xmm, con D.O. 0.1 en cinco pozos en la columna 2 y 200 µL de medio Xmm fresco en 3 pozos. En la columna 3 se colocó en 5 pozos 180 µL

de cultivo de Xmm (D.O.: 0.1) + 20 μ L de fluido apoplástico del T1 resuspendido con 300 μ L de agua destilada, en los 3 pozos restantes se aplicó 180 μ L de medio Xmm fresco + 20 μ L del fluido apoplástico del T1. Lo mismo se realizó en las columnas 4 a la 8 colocando el fluido apoplástico de los T2, T3, T4, T5 y T6 respectivamente. Se utilizó el equipo Multiskan FC (Thermo Scientific, USA) y se estableció los siguientes parámetros: Bucle cinético 141 lecturas; Intervalo cinético: 3 minutos; Tiempo de agitación: pulsado; Velocidad de agitación: rápida; Encendido de agitación: 1 minuto; Apagado de agitación: 2 minutos; absorbancia: posición 3 y $\lambda = 620$ nm y modo de medida normal; tiempo total: 7 horas.

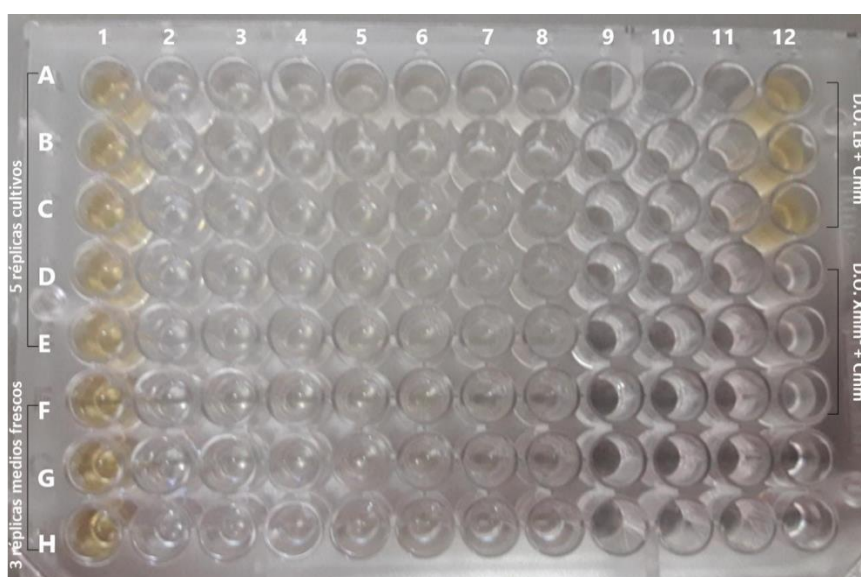


Figura 6. Microplaca de 96 pozos utilizada para el análisis de cinéticas de crecimiento de la bacteria fitopatogena en medios de cultivos líquido LB y Xmm.

Para el cálculo de las cinéticas de crecimiento, se utilizaron los datos del tiempo (t) vs absorbancia (abs). Los datos de cada cinética, con su respectiva réplica, fueron transformados con base al logaritmo natural Ln y se calculó el R^2 del sistema t vs $Ln(abs)$. Se procedió con el cálculo de regresión lineal $Y = mx + b$, una vez corroborado que $R^2 > 0.9$; El modelo lineal permitió realizar los cálculos de las tasas de crecimiento (μ) y del tiempo de duplicación (τ) de Cmm en cada medio de cultivo con fluido apoplástico y su respectivo control, aplicando la siguientes fórmulas: $Ln(N) = \mu\tau + Ln(No)$ y $\tau = \frac{Ln(2)}{\mu}$; donde: No : Densidad óptica inicial del cultivo; N : Densidad óptica final del cultivo;

μ : tasa de crecimiento; y τ : tiempo de duplicación. Finalmente, se procesaron los datos a través de un modelo lineal general y pruebas de comparación múltiple de Tukey al 95% para determinar diferencias significativas entre tratamientos.

Extracción e Identificación de Metabolitos Secundarios

Para la caracterización de metabolitos, tanto de muestras de fluido apoplástico como de tejidos liofilizados de jitomate, se trabajó en varios protocolos de extracción de compuestos y se consideró el método de Lisec *et al.*, (2006) modificado, con los que se obtuvo una mayor cantidad de metabolitos de buena calidad. Se pesaron 2 g de muestras de tejidos y fluido apoplástico, en tubos eppendorf de 1.5 mL para cada tratamiento con sus respectivas repeticiones. Para la inactivación enzimática se agregaron 1.4 mL de metanol al 100% y las muestras se llevaron a baño maría a 70 °C por 10 min. Cada 3 minutos se agitó en un vortex durante cinco segundos. Las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 13.000 rpm. Se transfirió 150 μ L del sobrenadante a tubos de vidrio. Se añadió 750 μ L de cloroformo y 1400 μ L de agua Tipo I. Se agitó en vortex durante 30 segundos hasta homogenizar la mezcla y se esperó a que se separe en 2 fases. Se agregó 300 μ L del sobrenadante en tubos de 1.5 mL. Se secó el extracto en un concentrador de vacío a 60 °C durante 90 minutos. Luego, se agregó 40 μ L de reactivo de metoxiaminación (Methoxyamine hydrochloride (Sigma, cat. no. 593-56-6)) y agitó en un mezclador de tubos eppendorf durante 2 h a 37 °C. Se añadió 70 μ L de reactivo MSTFA por 30 minutos a 37 °C. Se transfirieron alícuotas de 100 μ L a insertos colocados en viales de vidrio de 2 mL.

Las muestras se analizaron en un GC-MS (sistema GC 7890A y MSD XL inerte 5975C, Agilent Technologies), con una columna capilar DB-5MS (30 m $\times$ 0,25 mm) de fenil metilpolisiloxano (0,25 μ m de espesor de película) como fase estacionaria. La temperatura del inyector fue de 250 °C en modo Splitless, la temperatura inicial del horno se mantuvo a 70 °C durante 1 min, luego se incrementó hasta 252 °C con un gradiente de 5 °C/min, y se incrementó hasta 315 °C con un gradiente de 12 °C/m. La temperatura final se mantuvo durante 2.35 min. Se utilizó helio ultrapuro como gas portador a 1 mL/min. La temperatura de la interfaz GC-MS se estableció en 280 °C y la temperatura del detector fue de 230 °C.

Luego de la inyección de muestras, los datos fueron exportados en formato NetCDF / AIA (*.cdf) utilizando el software de análisis de datos ChemStation GC / MSD (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.). Se empleó el programa MzMine 2 (versión 2.53) (Pluskal, *et al.*, 2010) para la detección de los espectros de masas, la construcción cromatográfica, la deconvolución y alineación. Los compuestos se identificaron de forma tentativa al hacer coincidir los espectros de masas con la información disponible en la base de datos NIST 11, Wiley 9 (McLafferty, 2009) y mediante comparación con el índice de retención utilizando una serie de n-alcanos (C7-C40). Los datos resultantes se importaron a la plataforma MetaboAnalyst 5.0 (Xia y Wishart, 2011) para el análisis estadístico multivariante.

Análisis de Datos

Los datos fueron normalizados y se analizaron utilizando ANOVA para probar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las medias de los tratamientos seguidos por las comparaciones múltiples con la prueba de Tukey. Para cada parámetro se compararon todos los tratamientos con el software estadístico Minitab19.

Las áreas de los picos de cada metabolito se utilizaron para el análisis de datos. Los datos se normalizaron al área total y se alinearon mediante protocolos basados en comparaciones de metabolitos de los espectros de EM y los tiempos de retención (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2011). Los metabolitos expresados diferencialmente se seleccionaron con base en las comparaciones de la prueba t de Student entre los tratamientos con el control con un nivel de significancia de 0.05 y se informaron como el logaritmo base 2 del cambio de veces de cada compuesto (Carrera *et al.*, 2021). El análisis de datos multivariados se llevó a cabo utilizando la plataforma Metaboanalyst 5.0 e incluyó análisis de componentes principales (PCA), clustering y ANOVA (Lee *et al.*, 2019).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la Composta y del Té Aerobio de Composta

La caracterización fisicoquímica y microbiológica de la composta y del té aerobio de composta es el primer paso para establecer el potencial de estos insumos y pronosticar su comportamiento en un sistema agrícola. El Cuadro 1 presenta los resultados de parámetros fisicoquímicos y concentración de macro y micronutrientes de la composta madura y del té aerobio de composta. El pH de la composta obtenida fue 9.15, sin embargo, al momento de producir el té, este parámetro disminuyó a 4.87. En un estudio realizado por Hogg *et al.* (2002), menciona que el rango de pH óptimo recomendado para compostas debe oscilar entre 6.0 a 8.5. Dentro del análisis de conductividad eléctrica la composta fue 0.8 veces menor en comparación con el té de composta. No obstante, este valor se encuentra dentro del rango óptimo (< 4) según lo propuesto por Lasaridi *et al.*, (2006). La materia orgánica, carbono orgánico y cenizas, se encuentran dentro de los parámetros establecidos en los lineamientos para la operación orgánica de las actividades agropecuarias emitido por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (D.O.F., 2020). Similares resultados se encontraron en un estudio realizado por Bazán *et al.* (2014), sobre formulaciones a base de Nopal y estiércol bovino. Los macro y micronutrientes más abundantes identificados en la composta y el TAC fueron Ca, K, P, Fe y Mn. En cambio, el resto resultaron bajos en comparación con lo reportado por varios autores (Seddigh y Kiani, 2018; Siddiqui *et al.*, 2011; Hargreaves *et al.*, 2009), esto puede deberse a la poca disponibilidad presente en los materiales que componen la composta. Estos autores coinciden en que los diferentes métodos de elaboración influyen en la supresión de diferentes patógenos. Así mismo, la eficacia de los tés de composta podría variar según los materiales utilizados en la preparación de la composta y sus propiedades fisicoquímicas, nutricionales y biológicas (Zouari *et al.*, 2020).

El té de composta producido en este estudio fue aplicado inmediatamente después de su elaboración, previa dilución en agua de pozo, en una proporción de 1:10, obteniéndose un pH de 6.5 que no causó ningún tipo de fitotoxicidad en plantas tratadas con el TAC. Pane *et al.* (2012) mencionan que es importante la dilución de los tés de composta para reducir efectos de fitotoxicidad. Cabe destacar que el TAC diluido fue aplicado directamente al sustrato de las plantas (Carballo, 2007) 1 vez por semana durante 6 semanas.

Cuadro 1. Parámetros fisicoquímicos y concentración de macro y micronutrientes de la composta y del Té Aerobio de Composta (TAC).

Parámetro fisicoquímico	Unidades	Composta	TAC
pH		9.15	4.88
Cond. Eléctrica	dS ⁻¹ m	1.25	2.10
* Nitrógeno total	%	0.19	0.17
* Fósforo (P)	%	0.05	0.0022
* Potasio (K)	%	0.59	0.05
* Calcio (Ca)	%	0.64	0.02
* Magnesio (Mg)	%	0.09	0.0055
* Sodio (Na)	%	0.02	0.0049
* Azufre (S)	%	0.04	0.0063
* Hierro (Fe)	ppm	4673	1.15
* Cobre (Cu)	ppm	53.710	0.02
* Manganeso (Mn)	ppm	200	1.52
* Zinc (Zn)	ppm	39.62	0.21
* Boro(B)	ppm	6.35	0.03
Humedad	%	12.6	97.7
* Materia Orgánica	%	6.12	2.14
* Cenizas	%	93.9	0.13
* Carbono Orgánico	%	3.55	1.24
Relación C/N		18.9	7.18

** Resultados reportados en base húmeda*

Datos Climatológicos durante el Proceso de Elaboración y Temperatura de la Composta Madura

La temperatura máxima y humedad relativa promedio registrada durante los 47 días que duró el proceso de compostaje fue de 24 ± 3.36 °C y $40 \pm 14.48\%$ respectivamente. La temperatura en la composta a los 5, 10, 15, 22, 29, 36 y 43 días fue de 30, 29, 28, 35, 33, 28 y 25 °C respectivamente (Figura 7). Durante esta época no hubo precipitación y el proceso de compostaje no fue influenciado por la temperatura ambiental.

En cuanto a la etapa mesofílica I que se registró durante los primeros 15 días, se obtuvo una temperatura promedio de 29 °C, a una altura de 0.64 m; se podría asumir que si la

altura de la composta hubiese sido de 1.50 m de altura, la temperatura durante todo ese período podría haber alcanzado los 69 °C, con la que se podría llegar al proceso de higienización (Cortés-Berrios, 2018).

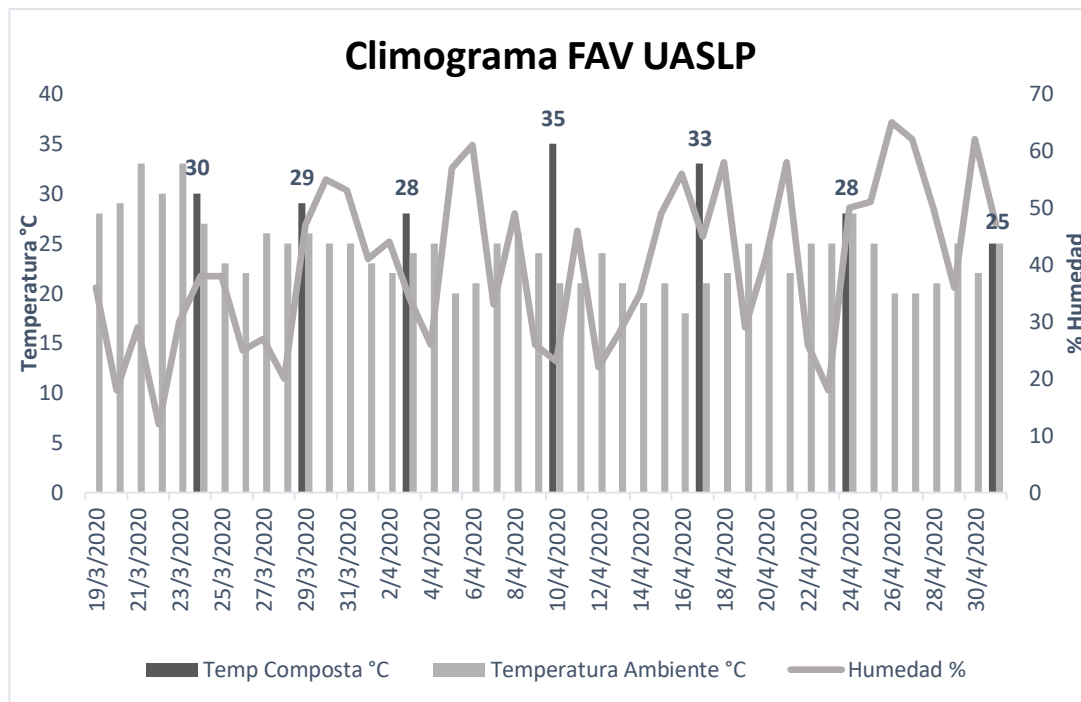


Figura 7. Climograma y registro de temperatura de la composta a los 5, 10, 15, 22, 29, 36 y 43 días.

Prueba de Germinación de Arvenses de la Composta Madura

Otro parámetro de calidad en la producción de compostas es la sanitización térmica, que se corroboró a través de una prueba de germinación de arvenses presentes en la composta madura. Se constató que en promedio se desarrollaron 7.5 ± 2.38 arvenses en la composta en comparación con lo obtenido en el suelo del predio 4.5 ± 2.08 utilizado como control. Liu *et al.* (2020) mencionan que la viabilidad de las semillas de arvenses depende de algunos factores, como la falta de oxígeno, que puede atribuirse a una alta actividad de microorganismos, la acumulación de compuestos tóxicos (como el ácido acético), las altas temperaturas (>60 °C) y la conductividad eléctrica. En este caso la máxima temperatura alcanzada fue de 35 °C.

Identificación de Microorganismos Presentes en el TAC

El análisis de la biodiversidad microbiana en el TAC es de relevancia, como desarrollo de estrategias alternativas necesarias para la sostenibilidad de la agricultura. Por sus

características morfológicas macroscópicas se pudo distinguir presencia de *Pseudomonas*, Hongos, Actinomicetos y Firmicutes en medios de cultivo BK, PDA, LB y Nutritivo respectivamente (Figura 8 y Cuadro 2). Respecto al análisis biosintético en el medio de cultivo CAS se desarrolló un halo de color naranja alrededor de las colonias bacterianas, lo cual indica presencia de bacterias productoras de sideróforos implicadas en el metabolismo de Fe. En medio Burk se observó fijación de nitrógeno atmosférico que es atribuido a determinadas bacterias que poseen la enzima nitrogenasa capaces de reducir el N atmosférico en amonio. Similares resultados han sido reportados por Zouari *et al.*, (2020) tanto en la identificación de microorganismos como en la caracterización de propiedades biosintéticas analizadas, así como en el potencial de biocontrol y promoción del crecimiento vegetal en extractos de composta.

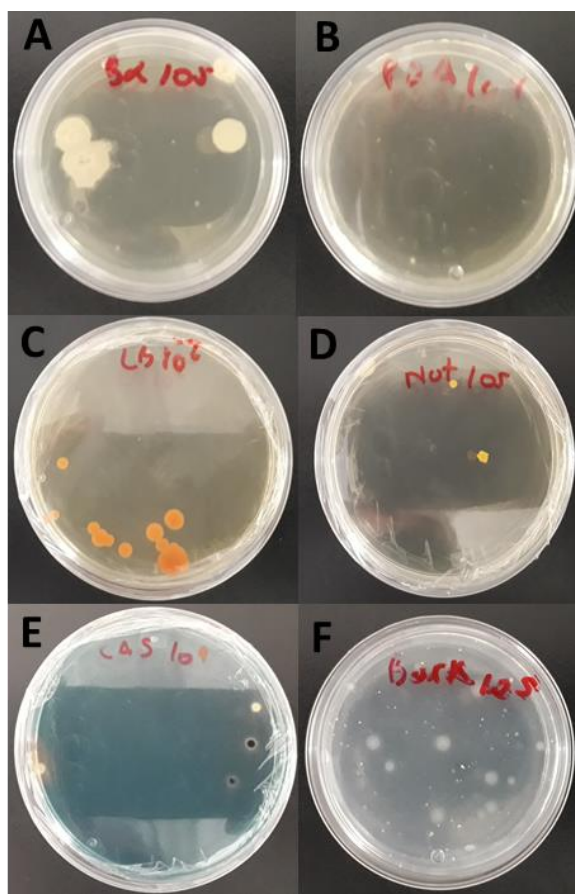


Figura 8. Microorganismos aislados del TAC utilizando diluciones seriadas de hasta 1×10^6 en **A.** Medio BK, **B.** Medio PDA, **C.** Medio LB, **D.** Medio Nutritivo y Análisis biosintético en medio **E.** CAS y **F.** Burk.

Cuadro 2. Microorganismos procedentes del TAC sembrados en diversos medios de cultivo y análisis biosintético en medios CAS y Burk.

Microorganismos	UFC	Medio
Pseudomonas	9×10^5	BK
Hongos	1×10^4	PDA
Actinomicetos	7×10^6	LB
Firmicutes	3×10^5	Nutritivo
Análisis biosintético	UFC	Medio
Sideróforos	4×10^4	CAS
Bacterias fijadoras de N	16×10^5	Burk

De esta manera podemos afirmar que los atributos del TAC están estrechamente relacionados a la calidad de la composta madura como materia prima. En este sentido, el TAC contiene macro y micronutrientes y una gran cantidad de microorganismos, como pseudomonas, hongos, actinomicetos y firmicutes, que pueden proporcionar beneficios para el desarrollo vegetativo y salud de las plantas.

Identificación de Cepas Aisladas de Cmm

La Tinción de Gram permitió identificar al patógeno como un bacilo Gram positivo. Por otra parte, las colonias presentaron formas circulares, mucoides y de color amarillo intenso (Figura 9 A y B).

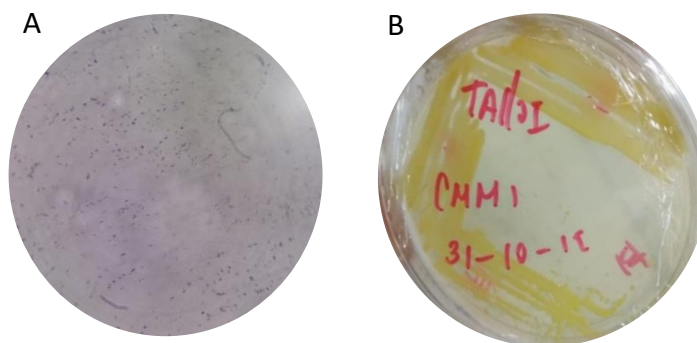


Figura 9. Identificación micro y macroscópica del agente causal. **A.** Observación microscópica a partir de la tinción de Gram. **B.** Siembra de bacteria aislada de muestras de tejidos de jitomate en medio de cultivo CMM¹.

En cuanto a la identificación molecular, el producto de PCR *tomA* amplificó en las cuatro muestras colectadas en la región de 250 pb. Luego de la identificación molecular, se utilizó la cepa denominada A10 (Figura 10) para realizar la infección en los tratamientos respectivos.



Figura 10. Amplificación de un gragmento de 219 pb del gen *tomA* específico de Cmm sobre 4 muestras de ADN de bacterias extraídas de tejidos de plantas infectadas.

La secuenciación del fragmento de 16S rRNA de la cepa A10 identificó al patógeno como *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* agente causal del cáncer bacteriano en jitomate (Cuadro 3).

Cuadro 3. Identificación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* con la secuencia de un fragmento del ADNr 16S.

Description <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> strain TM 113 16S ribosomal RNA gene.						
Accession	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Ident. %	Accession Lenght
NZ_CP033724.1	1509	3750	81%	0.0	93.84%	1404

Por consiguiente, la cepa (A10) aislada de Cmm, fue utilizada para los experimentos de infección en plantas de jitomate, según la metodología descrita por Eddin *et al.*, (2005) modificada, previamente detallada en la sección de materiales y métodos.

Parámetros de Crecimiento de Plantas de Jitomate Infectadas con Cmm y Tratadas con el TAC

Recapitulando los tratamientos evaluados T1 (TAC_{Sem} + Cmm), T2 (TAC_{Sem}), T3 (TAC + Cmm), T4 (TAC), T5 (Jit + Cmm) y T0 (Testigo), podemos observar en los parámetros de crecimiento de plantas de jitomate que los tratamientos 2 (TAC_{Sem}), 3 (TAC + Cmm) y 4 (TAC) desarrollaron una mayor altura y diámetro del tallo en comparación con los tratamientos 1 (TAC_{Sem} + Cmm), 5 (Jit + Cmm) y 0 (Testigo) (Figura 11). Este resultado sugiere aporte nutricional del té sobre las plantas tratadas. Los tratamientos de interés 3

(TAC + Cmm) y 5 (Jit + Cmm) mostraron diferencias significativas en ambos parámetros ($p < 0.05$). A pesar de que las plantas del T3 y T5 fueron infectadas con Cmm al mismo tiempo, la aplicación del TAC permitió un mejor desarrollo en plantas tratadas en comparación con las plantas infectadas T5 (Jit + Cmm) y T0 (Testigo). Estos resultados coinciden con lo descrito por Ingham (2005), en donde menciona que la aplicación de los téis de composta al suelo provee nutrientes para mejorar el desarrollo de plantas lo cual podría incidir en la supresión de enfermedades.

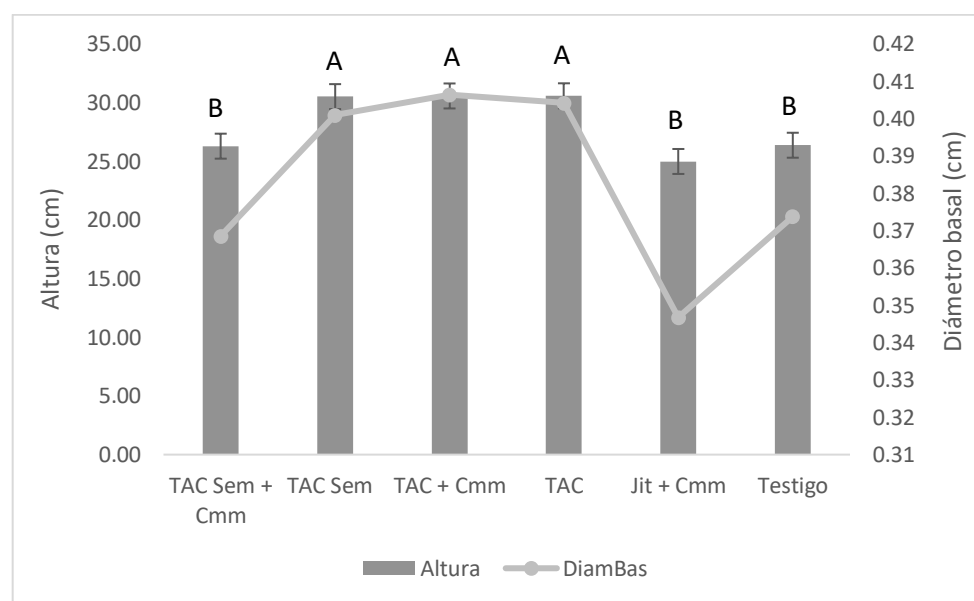


Figura 11. Altura y diámetro basal analizados durante 30 días luego de la infección. Se utilizaron las medias de cada tratamiento. Letras diferentes sobre las barras indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos de plantas que fueron infectadas con Cmm vs tratamientos de plantas tratadas con el té.

En cuanto al número de flores contabilizadas en cada tratamiento durante los 30 días que duró la evaluación agronómica, se pudo constatar que los tratamientos 1 y 5 no presentaron inflorescencias, producto de la severidad de la enfermedad en las plantas infectadas con Cmm (Cuadro 4). Por otra parte, los tratamientos 2, 3, 4 y 0 sí presentaron flores, pero en poca cantidad. Esto puede estar relacionado con varios factores: altas temperaturas registradas dentro del invernadero de vidrio durante el período de evaluación (Temp. máx: 40.20 ± 2.67 ; Temp. min: 18.96 ± 4.32 ; Humedad relativa: 90.28 ± 2.03).

En un estudio realizado por Xu *et al.*, 2017, mencionan que la temperatura óptima para el desarrollo floral debe oscilar entre los 21 a 24 °C, permitiendo desarrollar un número

mayor de flores en variedades que no son tolerantes a altas temperaturas (9.7 ± 0.8). Así mismo, en un estudio realizado por Girshe *et al.* (2018), en la iniciación y desarrollo floral, lo atribuyen en parte a las hormonas, especialmente el ácido giberélico y auxinas, presentes en té aerobios de composta que al ser aplicados foliarmente son rápidamente absorbidos y asimilados por las plantas.

A pesar de que la aplicación del TAC fue realizada directamente al sustrato una vez por semana, influyó en la floración de plantas infectadas y tratadas con el té, respecto a los tratamientos de plantas infectadas y tratadas con el té en época de semillero y de plantas infectadas.

Cuadro 4. Promedio del número de flores obtenidos en cada tratamiento a los 15 días luego del trasplante. Letras diferentes indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

	Tratamientos	No. Flores	Promedio de flores/planta	
T1	TAC _{Sem} + Cmm	0	n/f	
T2	TAC _{Sem}	19	0.339 ± 0.720	B
T3	TAC + Cmm	24	0.428 ± 1.006	B
T4	TAC	77	1.375 ± 1.700	A
T5	Jit + Cmm	0	n/f	
T0	Testigo	120	2.142 ± 2.844	A

n/f: no floreció.

Se evaluó el desarrollo del área de la cuarta hoja compuesta con la finalidad de observar su crecimiento, durante 30 días luego de la infección. En los tratamientos 1, 3 y 5 la cuarta hoja tuvo un área menor y son significativamente diferentes ($p < 0.05$) respecto a los T2, 4 y 6 (Figura 12). Estos resultados se relacionan con la pérdida de la turgencia en las hojas de plantas infectadas de jitomate debido a que el cáncer bacteriano produce marchitamiento de las hojas y posterior muerte de la planta (Figura 13). Por otra parte, la aplicación del té en plantas infectadas (T3) retrasa el desarrollo de la bacteria y no permite un marchitamiento acelerado en las hojas.

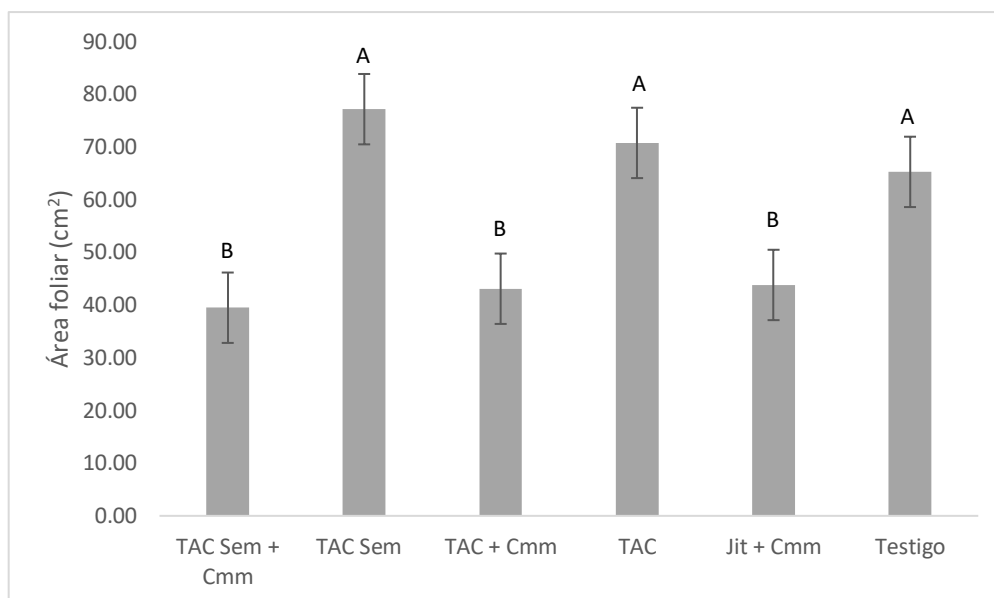


Figura 12. Desarrollo del área de la cuarta hoja compuesta durante 30 dpi. Letras diferentes sobre las barras indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos de plantas que fueron infectadas con *C. michiganensis* vs tratamientos con plantas sanas.

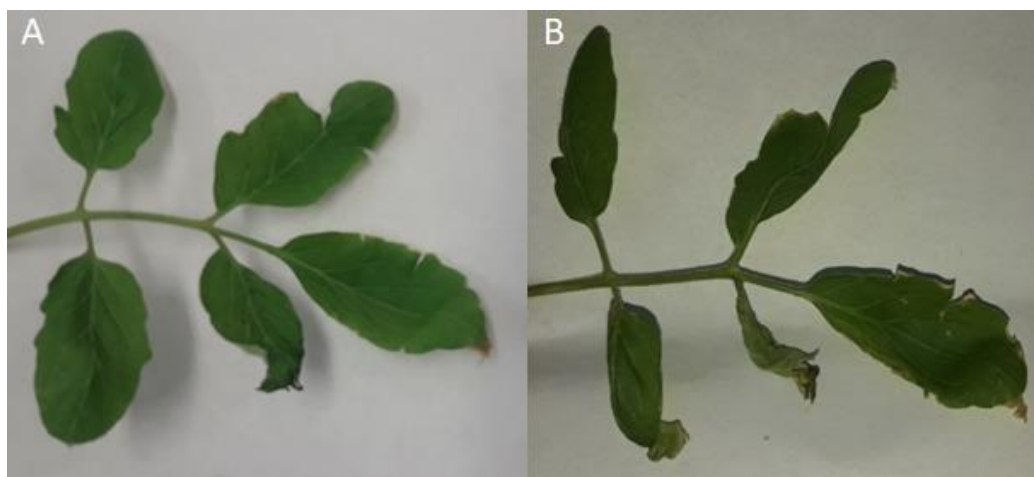


Figura 13. Desarrollo de la enfermedad en hoja compuesta de planta de jitomate. Tratamiento TAC + Cmm. **A.** Ocho días después de la infección. **B.** 15 días luego de la infección.

En resumen, las plantas tratadas con el TAC en época de semillero y luego del trasplante, comparadas con el tratamiento testigo, revelaron un área foliar promedio de 70 cm². En contraste, los tratamientos con plantas infectadas mostraron un crecimiento promedio de 40 cm². A pesar de esto, existió un menor desarrollo de la enfermedad en plantas tratadas con el TAC e infectadas con Cmm.

Índice de Severidad de la Enfermedad (ISE)

Se evaluó la aparición de síntomas en los diferentes tratamientos y se calculó el ISE con la fórmula descrita en materiales y métodos. A través de la evaluación del ISE, los tratamientos 1, 3 y 5 no presentaron diferencias significativas hasta los 16 dpi. A los 18 dpi, se determinó diferencias significativas entre los tratamientos con plantas infectadas. Se constató que las plantas del tratamiento 3 (TAC + Cmm) no fueron severamente afectadas por el fitopatógeno (Figura 14). Es decir, el TAC redujo la severidad de la infección, durante los 30 días de evaluación luego de la infección. Mientras que el T3 llegó a un ISE de 0.6 el T1 y T5 llegaron a 0.9 y 0.8 respectivamente, llegando a marchitarse totalmente. Similares resultados, es decir a una disminución en el ISE en plantas de jitomate infectadas con Cmm, se han reportado a partir de la aplicación de ácidos fenólicos (Zárate-Martínez, *et al.*, 2018) y extractos acuosos a base de *Larrea tridentata* (gobernadora) (Méndez, 2019).

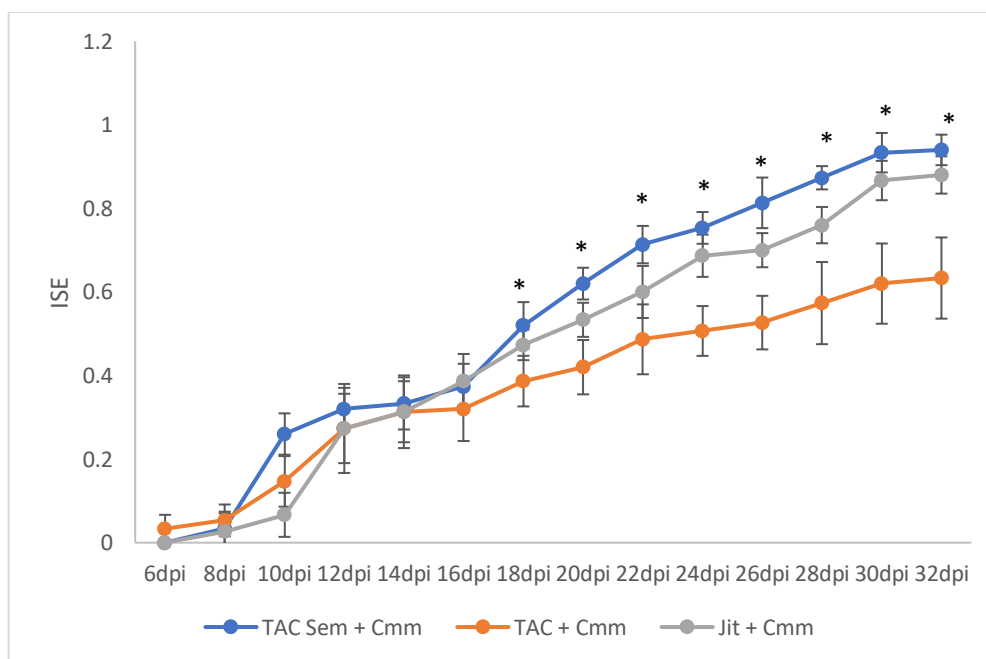


Figura 14. Índice de Severidad de la enfermedad (ISE). Asteriscos sobre las barras indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) a partir de los 18 dpi entre tratamientos de plantas infectadas con Cmm y tratadas con el TAC.

Determinación del Contenido de Clorofila y Polifenoles en Hojas de Jitomate

El contenido de clorofila es la base para la expresión de la tasa de fotosíntesis mientras que los flavonoides y antocianinas son metabolitos que juegan un papel importante en la

tolerancia al estrés de plantas y como mecanismo de defensa ante el ataque de patógenos respectivamente (López-Gresa *et al.*, 2011; D'Amelia *et al.*, 2018). Se obtuvo un menor contenido de clorofila en el T5 (Jit + Cmm) y el T0 (Testigo), mientras que los valores más altos fueron obtenidos en los tratamientos tratados con el TAC, principalmente en el T3 (TAC + Cmm) (Figura 15A). El contenido de flavonoides en hojas fue mayor en el T4 (TAC) en comparación con los tratamientos 2, 3, 5 y 6, (no existe diferencia con el tratamiento 1) (Figura 15B). El contenido de antocianinas fue mayor en el T5 que es significativamente distinto al T3 (Figura 15C). El Índice de Equilibrio de Nitrógeno (NBI) está estrechamente relacionado con el contenido de clorofila pues corresponde a la razón Clorofila/Flavonoles (o también Nitrógeno/Carbono) y de la misma manera el T3 obtuvo un mayor NBI respecto al T4 y T5 (Figura 15D). En general, los resultados sugieren un mayor aporte nutricional en los tratamientos con TAC, tal vez relacionados con microorganismos fijadores de nitrógeno presentes en el té. Similares resultados fueron obtenidos por Ronga *et al.* (2019) en el contenido de polifenoles en plantas de jitomate, a partir de la aplicación de agentes biológicos en situaciones de estrés.

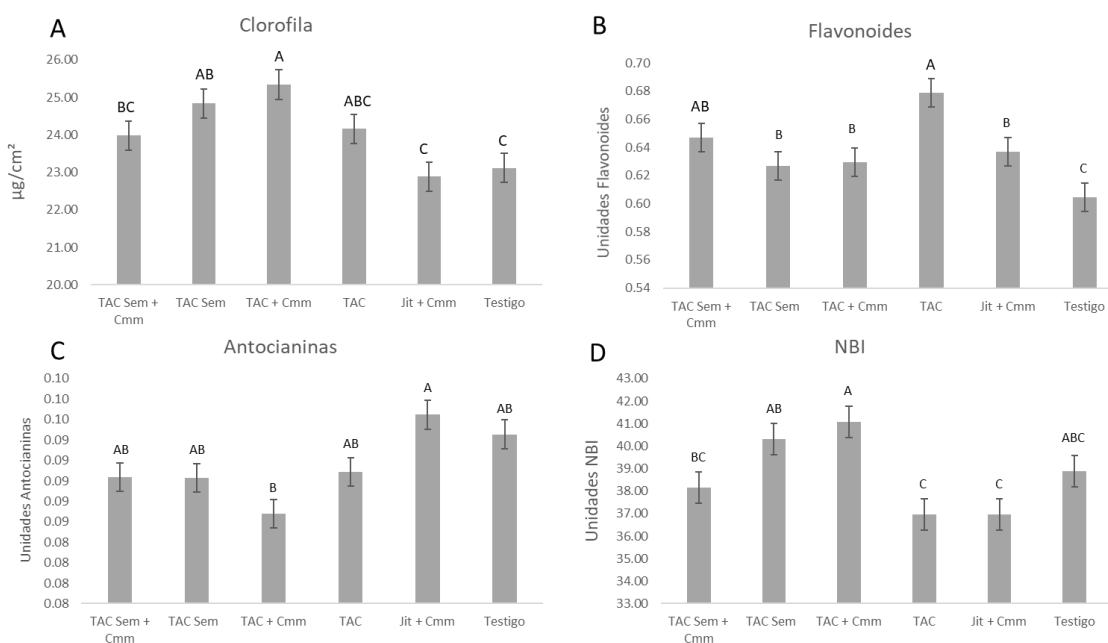


Figura 15. Determinación de **A.** Clorofila, **B.** Flavonoides, **C.** Antocianinas y **D.** Índice de equilibrio de Nitrógeno (NBI). Letras diferentes sobre las barras indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos de plantas infectadas con *C. michiganensis* vs tratamientos de plantas sanas.

La aplicación del TAC generó aumento en el contenido de clorofila y el NBI, y una disminución en los flavonoides y antocianinas producto del estrés biótico y abiótico en plantas de jitomate en plantas tratadas y no tratadas con el TAC respectivamente.

Conductividad Hidráulica

Se determinó la conductividad hidráulica induciendo flujos de agua, a través de secciones de tallos cortados, bajo tres gradientes de presión. Se observa que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el T5 (Jit + Cmm) y T2 (TAC_{Sem}) (Figura 16). Los tratamientos 1 (TAC_{Sem} + Cmm), 3 (TAC + Cmm), 4 (TAC) y 6 (Testigo) no presentaron diferencias significativas con respecto al T5; esto pudo deberse quizás a la gran variabilidad que existió al momento de manipular los tallos en el sistema y al bajo número de réplicas que se utilizó para realizar la técnica. Sin embargo, se observa una tendencia de una menor conductividad hidráulica en el tratamiento con plantas infectadas (T5), lo cual tendría sentido por el taponamiento por bacterias en las punteaduras del Xilema. En cambio, el tratamiento de interés (TAC + Cmm) tiene en una tendencia a comportarse similar al resto de tratamientos. Resultados similares fueron obtenidos por Romero *et al.* (2014), en el que mencionan que las plantas tratadas con un agente de biocontrol (*Azospirillum brasilense*) e infectadas con Cmm fueron más eficientes en la conductividad del agua, en comparación con las plantas infectadas. Este análisis permite complementar lo observado en el ISE, los resultados sugieren que la aplicación del TAC en plantas infectadas desacelera el desarrollo de Cmm, permitiendo un flujo de agua relativamente normal en el xilema.

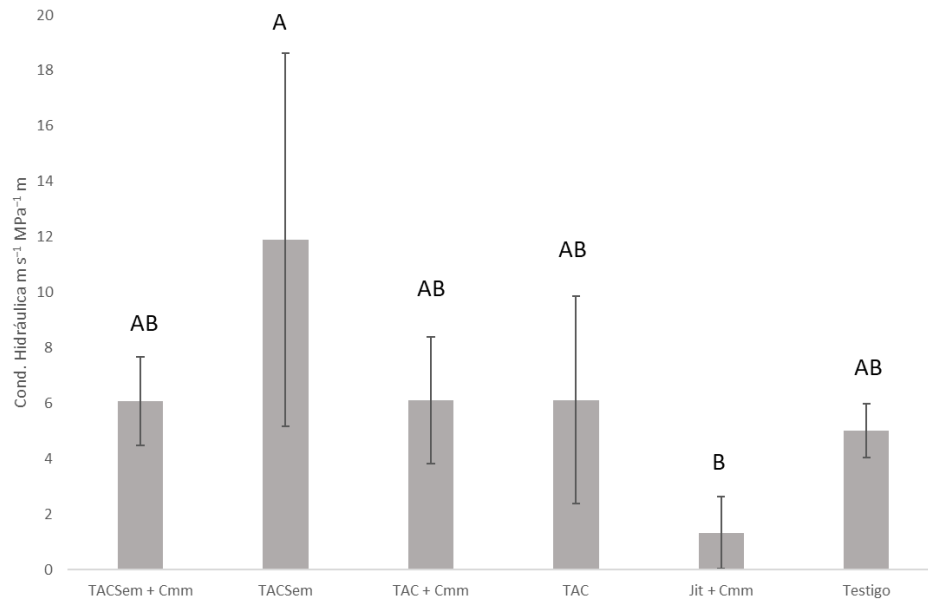


Figura 16. Análisis de conductividad hidráulica en los diferentes tratamientos. Letras diferentes sobre las barras indican que existen diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos de plantas que fueron infectadas con *C. michiganensis* vs el tratamiento tratado con el té en época de semillero.

Confirmación de la Infección

Para realizar la confirmación de la infección se realizó la extracción de ADN de tejidos de hoja de plantas infectadas con Cmm, para amplificar por PCR un fragmento de 219 pb del gen *tomA* y como control de calidad del ADN extraído se amplificó por PCR un fragmento de 221 pb del gen 25S rRNA específico de jitomate. Al realizar el PCR 25S amplificó en todas las muestras con sus respectivas réplicas (Figura 17), por lo que se concluye que el ADN fue de calidad. Sin embargo, al momento de realizar el PCR del fragmento *tomA* no amplificó en ningún tratamiento con plantas infectadas. Esto pudo deberse a la poca cantidad de bacteria presente en los tejidos, lo cual indicaría bajos títulos de bacteria en hojas.

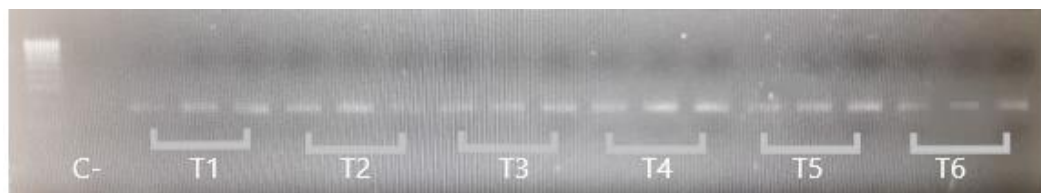


Figura 17. Amplificación del fragmento de 221 pb del gen 25S rRNA específico del jitomate de muestras extraídas de plantas infectadas y tratadas con el TAC.

Cinéticas de Crecimiento de *C. michiganensis* en el Fluido Apoplástico

Previamente se evaluó el efecto del Té Aerobio de Composta (TAC) en plantas de jitomate para la promoción del crecimiento vegetal, número de flores, Índice de Severidad de la enfermedad, área foliar, contenido de clorofila y polifenoles foliares y conductividad hidráulica, lo cual sugiere un efecto de disminución de la intensidad de la infección por Cmm en plantas tratadas con el TAC. Es probable que se genere un microambiente en los haces vasculares de plantas tratadas con el TAC poco favorable para Cmm, en comparación con plantas no tratadas e infectadas con Cmm. Para abordar lo anterior, se extrajo el fluido apoplástico de plantas de todos los tratamientos y se aplicó a medio XMM líquido para realizar cinéticas de crecimiento en microplaca con Cmm y calcular los parámetros de crecimiento microbiano μ (h^{-1}) y el tiempo de duplicación τ (h) de Cmm en cada medio de cultivo.

Para las cinéticas de crecimiento de Cmm, el cultivo en medio LB se utilizó como control positivo por ser un medio rico en nutrientes. El medio XMM es pobre en nutrientes y al ser complementado con los fluidos, se espera una mejora en los parámetros de crecimiento. De esta forma, Cmm mostró una tasa de crecimiento mayor en menor tiempo respecto a los tratamientos evaluados en medio LB (Cuadro 5). En contraste, la tasa de crecimiento en medio Xmm (que simula al fluido del Xilema de las plantas) fue nula y cuando el medio XMM fue complementado con los fluidos, sí se registró crecimiento. En este sentido, la tasa de crecimiento de Cmm en medio de cultivo Xmm con la aplicación del fluido apoplástico del T5 (Jit + Cmm) mostró una menor afinidad en este sustrato y su tiempo de duplicación fue mayor, respecto al tratamiento control que obtuvo una afinidad muy similar al control positivo. El fluido apoplástico del T1 (TAC_{Sem} + Cmm) muestra afinidad casi similar al T5 y no existen diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre estos, pero sí existen en el T4 (TAC) y T3 (TAC + Cmm) en comparación con el T5. En el T3, se observa una menor afinidad en la velocidad de crecimiento μ , en un mayor tiempo τ al ser comparado con el T0 (testigo) y el control negativo. Resultados similares fueron obtenidos por Jaramillo-Ortíz (2020), en el que menciona que Cmm mostró mayor afinidad en el medio suplementado con los fluidos de *S. lycopersicum*. Se podría deducir que en el fluido apoplástico de plantas sanas, existe una mayor concentración de nutrientes

y de metabolitos *Quorum sensing* que fomentan un ambiente favorable para el desarrollo del patógeno en especies comerciales de jitomate. Por lo tanto, la evidencia sugiere que Cmm tiene menor afinidad por fluidos provenientes de plantas tratadas con TAC, lo cual se podría relacionar con la composición metabólica de cada fluido y la composición metabólica determinada por el TAC.

Cuadro 5. Parámetros de crecimiento de Cmm en XMM complementados con fluido apoplástico de jitomate de los diferentes tratamientos.

Medio	Fluido	R ²	μ (h ⁻¹)	T (h)
LB	-	0.985	0.118 ± 0.002	A
XMM	-	-	-	SC
XMM	Testigo	0.939	0.115 ± 0.009	A
XMM	TAC _{Sem}	0.989	0.096 ± 0.003	B
XMM	TAC + Cmm	0.982	0.094 ± 0.007	BC
XMM	TAC	0.981	0.093 ± 0.012	BC
XMM	TAC _{Sem} + Cmm	0.991	0.079 ± 0.006	CD
XMM	Jit + Cmm	0.988	0.076 ± 0.004	D

S/C: sin crecimiento

Identificación de Metabolitos Secundarios en Fluido Apoplástico de *S. lycopersicum*

Para abordar la composición metabólica de cada fluido, se procedió a analizar por triplicado el fluido apoplástico de plantas de jitomate de cada tratamiento, mediante GC-MS. Para lo cual, se realizó un muestreo a los 16 dpi (cuando no había diferencias significativas en el ISE entre tratamientos).

Luego de la detección de los espectros de masas, construcción de los cromatogramas (Figura 18), deconvolución, normalización y alineamiento de picos, se logró identificar 24 metabolitos del fluido apoplástico obtenido a los 16 días después de la infección (dpi).

Tetradecanoic acid, D-GLUCITOL y Eicosane. Estos metabolitos se expresan en este tratamiento, lo cual podría ser un marcador de la enfermedad.

Cuadro 6. Expresión diferencial de metabolitos entre los tratamientos vs el control ($p < 0.05$), del primer muestreo de fluido apoplástico realizado a los 16 dpi.

Metabolite	$\log_2$ (FC)				
	T1	T2	T3	T4	T5
.beta.-Amino isobutyric acid	n/a	n/a	n/a	1.577*	n/a
Malic acid	1.856*	3.284	1.294*	1.810*	n/a
4-Aminobutyric acid	1.808*	1.258	1.864*	0.974*	0.856
Dodecanoic acid, 1-methylethyl ester	-1.674*	-1.144*	-1.921*	-1.783	-0.444
Dodecanoic acid	-3.343*	-3.471*	-3.896*	-3.477*	-2.657
Tetradecanoic acid	n/a	n/a	n/a	n/a	2.932*
D-(-)-Fructose	-0.161	-0.407	-0.127	0.118	-0.384
D-(+)-Talose	-4.139*	0.628	-4.697*	-4.277*	0.105
d-Galactose	1.087	n/a	n/a	n/a	n/a
d-Glucose	n/a	n/a	1.218*	2.151*	n/a
D-Sorbitol	-3.128*	-3.256*	-3.682*	-3.263*	-2.442*
D-Mannitol	n/a	2.007*	1.267*	n/a	n/a
D-GLUCITOL	n/a	n/a	n/a	n/a	3.226*
Hexadecanoic acid	-0.309	-0.092	-0.633	0.049	0.023
Myo-Inositol	1.087	1.276	1.551*	0.906	0.882
Octadecanoic acid	-1.529*	-1.245	-1.779*	-1.031	-0.249
Dehydroabietic acid	-2.135*	-2.199*	-2.731*	-2.142*	-0.446
Tetracosane	-0.599	-3.365*	-0.958	-0.292	-0.894
Eicosane	n/a	n/a	n/a	n/a	2.853*
Monopalmitin	-0.941	-3.194*	-1.132*	-0.894*	-0.478
Heptacosane	-3.292*	-3.420*	-3.844*	-3.425*	-0.802
Octacosane	-1.366*	-3.145*	-3.571*	-3.152*	-0.500
Nonacosane	n/a	n/a	n/a	2.200*	n/a
Melibiose	3.329*	2.166*	n/a	n/a	n/a

n/a: not available

* metabolitos con alto nivel de significancia estadística ($p < 0.05$)

Mediante el análisis de componentes principales (PCA) entre T0 y T3 del primer muestreo de fluido apoplástico (16 dpi), se reveló una agrupación clara del T0 separadas del T3 a lo largo de PC2 (Figura 19). El PC1 contribuyó al 85.20% de la varianza general, mientras que el PC2 contribuyó al 8.6%. El metabolito con la carga de PC2 más alta fue el Myo-Inositol, mientras que las cargas de PC2 más bajas fueron el Octadecanoic acid, Malic acid y 4-Aminobutyric acid (Figura 20).

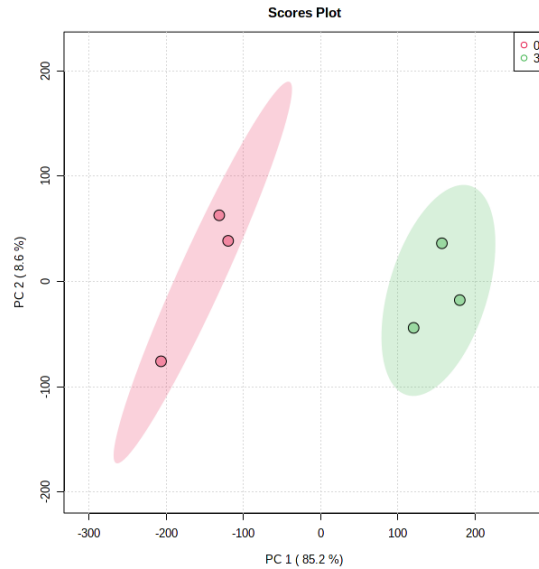


Figura 19. Análisis de componentes principales. Gráfico de puntos del perfil de metabolitos entre el T0 (Testigo) vs T3 (TAC + Cmm) a los 16 dpi.

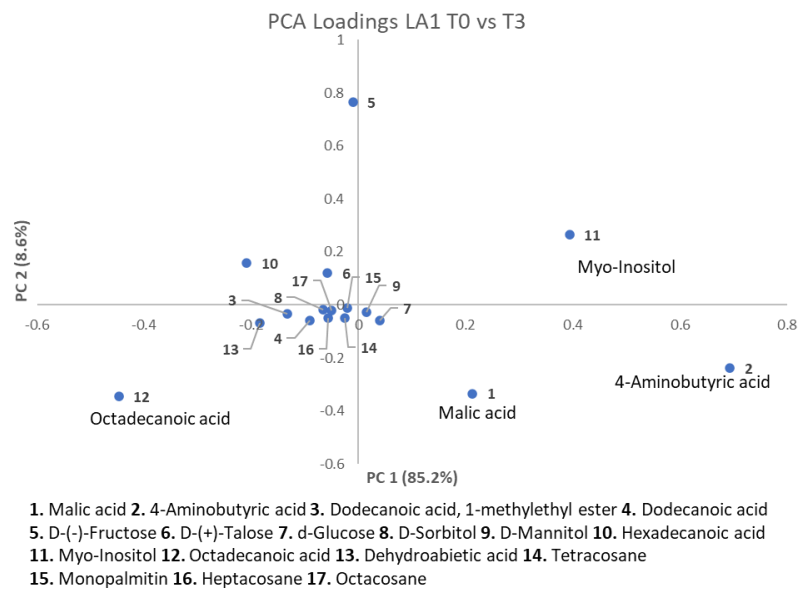


Figura 20. Gráfico de cargas del perfil de metabolitos de fluido apoplástico (FA) entre el T0 vs el T3, a los 16 dpi.

Al ejecutar el PCA con muestras de fluido apoplástico entre el T0 y T5 mostró una agrupación clara tanto en PC1 como en PC2 (Figura 21). El PC1 contribuyó al 41% de la variabilidad, mientras que el PC2 contribuyó al 32.9%. El gráfico de carga mostró los metabolitos con menor peso en el cuadrante inferior izquierdo Octadecanoic acid, y de mayor en el cuadrante superior izquierdo D-(-)-Fructose y en el cuadrante superior derecho Myo-Inositol, y 4-Aminobutyric acid (Figura 22).

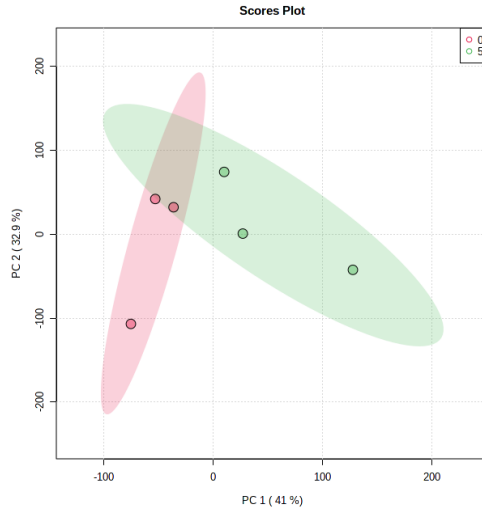


Figura 21. Análisis de componentes principales. Gráfico de puntos del perfil de metabolitos entre el T0 (Testigo) vs T5 (Jit + Cmm) a los 16 dpi.

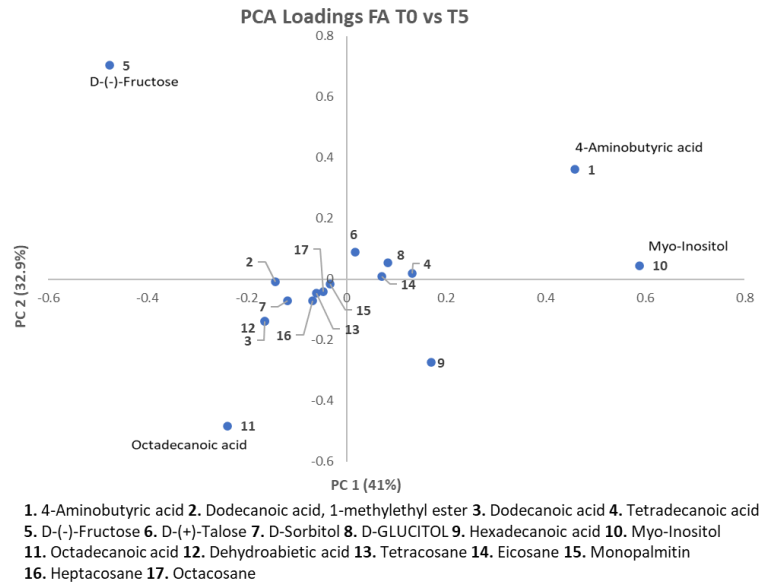


Figura 22. Gráfico de cargas del perfil de metabolitos de fluido apoplástico (FA) entre el T0 vs el T5 a los 16 dpi.

En el análisis de componentes principales realizado entre el T5 y el T3 se observa una separación marcada entre ambos grupos (Figura 23). El PC1 contribuyó al 74% de la varianza general, mientras que el PC2 contribuyó al 15.1%. Los metabolitos con las cargas de PC2 más altas fueron Malic acid, 4-Aminobutyric acid, Dehydroabietic acid y Octadecanoic acid y los metabolitos con las cargas de PC 2 más bajas fueron Myo-Inositol y Hexadecanoic acid (Figura 24).

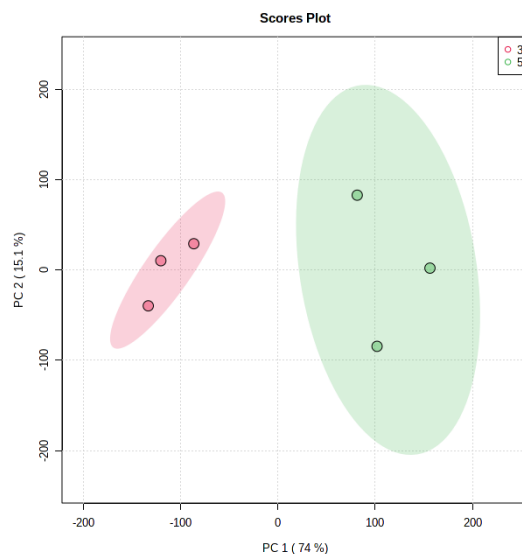


Figura 23. Análisis de componentes principales. Gráfico de puntos del perfil de metabolitos entre el T5 (Jit + Cmm) vs T3 (TAC + Cmm) a los 16 dpi.

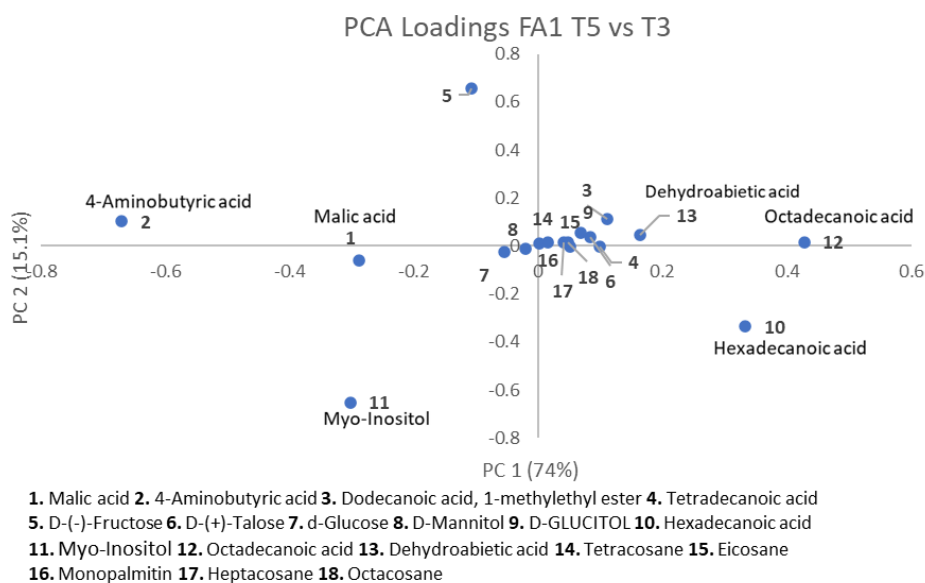


Figura 24. Gráfico de cargas del perfil de metabolitos de fluido apoplástico (FA) entre el T5 vs el T3 a los 16 dpi.

Los metabolitos Myo-Inositol, Malic acid, 4-Aminobutyric acid, Octadecanoic acid, que se observan en los gráficos de puntos del ACP tanto en el tratamiento con plantas infectadas y tratadas con el té (TAC + Cmm), como en el tratamiento con plantas infectadas (Jit + Cmm), comparados con el testigo (plantas sanas), así como la comparación entre los tratamientos T3 y T5, son aquellos que promueven la separación entre grupos. El Myo-Inositol es un metabolito importante en la simbiosis planta-

microorganismo (Kaloizoumis *et al.*, 2021). En cambio, *Ralstonia solanacearum* lo utiliza en su catabolismo para promover virulencia en un estadio de infección de manera dependiente (Hamilton *et al.*, 2021). Por otro lado, el ácido málico, un ácido orgánico relacionado a los metabolitos que se expresa en plantas contra el ataque de patógenos (Khanna *et al.*, 2019). El 4-Aminobutyric acid puede tener múltiples efectos sobre la interacción planta-bacteria, para aumentar la resistencia a enfermedades (Park *et al.*, 2010). El Octadecanoic acid es un compuesto que está relacionado con el estrés abiótico en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Ghatak *et al.*, 2018).

En este sentido, el análisis del significado biológico de cada uno de estos metabolitos que se expresan a los 16 dpi luego de la infección será de gran importancia, para conocer cuál es la ruta metabólica que influye en el mecanismo de defensa en la planta como lo sugiere Osbourn, 2010.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demostraron que la aplicación del té aerobio de composta (TAC) evaluado, mejora el desarrollo vegetativo de plantas de jitomate infectadas con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. El aporte de nutrientes como el N, y de microorganismos como bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en el TAC, se refleja en el contenido de clorofila y NBI. El número de flores y el área foliar de la cuarta hoja compuesta, a pesar de mostrar valores bajos, influyó en la floración y en un menor desarrollo de la enfermedad en plantas infectadas y tratadas con el TAC. Estos resultados coinciden con lo obtenido en la evaluación del Índice de Severidad de la Enfermedad, Conductividad Hidráulica y Cinéticas de Crecimiento de Cmm en fluido apoplástico de jitomate, en el que muestran que el TAC reduce la severidad de la infección permitiendo un flujo de agua relativamente normal en el xilema y revela que hay una menor afinidad de la bacteria en plantas tratadas con el té respectivamente. La reducción en la patogenicidad en plantas de jitomate tratadas con el TAC podría estar asociado a la expresión de metabolitos secundarios como el 4-Aminobutyric acid que puede producir efectos de resistencia a enfermedades. Sin embargo, el estudio del significado biológico de la expresión de los metabolitos secundarios de la interacción Planta-Patógeno-TAC, podría brindar información sobre las rutas metabólicas de dicha interacción que influye en el mecanismo de defensa vegetal.

LITERATURA CITADA

- Abdelrahman, M., Burritt, D. J., & Tran, L. S. P. (2018). The use of metabolomic quantitative trait locus mapping and osmotic adjustment traits for the improvement of crop yields under environmental stresses. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 83, pp. 86-94). Academic Press.
- Al-Dahmani, J. H., Abbasi, P. A., Miller, S. A., & Hoitink, H. A. J. (2003). Suppression of Bacterial Spot of Tomato with Foliar Sprays of Compost Extracts Under Greenhouse and Field Conditions. *Plant Disease*, 87(8), 913–919. <https://doi.org/10.1094/pdis.2003.87.8.913>
- Al-Mughrabi, K. I. (2006). Antibiosis ability of aerobic compost tea against foliar and tuber potato diseases. *Biotechnology*, 5(1), 69-74.
- Al-Mughrabi, K. I. (2007). Suppression of *Phytophthora infestans* in potatoes by foliar application of food nutrients and compost tea. *Aust. J. Basic Appl. Sci*, 1(4), 785-792.
- Al-Mughrabi, K. I., Bertheleme, C., Livingston, T., Burgoyne, A., Poirier, R., & Vikram, A. (2008). Aerobic compost tea, compost and a combination of both reduce the severity of common scab (*Streptomyces scabiei*) on potato tubers. *Journal of Plant Sciences*, 3(2), 168-175.
- Antil, R. S., Raj, D., Abdalla, N., & Inubushi, K. (2014). Physical, chemical and biological parameters for compost maturity assessment: a review. *Composting for sustainable agriculture*, 83-101.
- Avilés, M., Borrero, C., & Trillas, M. I. (2011). Review on compost as an inducer of disease suppression in plants grown in soilless culture. *Dynamic Soil, Dynamic Plant*, 5(2), 1-10.
- Bazán, E., Pérez, F. D. C. S., Fernández, S. F. P., & Sandoval, R. C. S. (2014). Efecto de las formulaciones de composta a partir de residuos de poda de nopal (*Opuntia ficus-indica*)/estiércol vacuno en plantaciones de nopal verdura. *Agroindustria de los productos orgánicos*. ISSN 1900-6241.

- Bella, P., Ialacci, G., Licciardello, G., La Rosa, R., & Catara, V. (2012). Characterization of atypical *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* populations in greenhouse tomatoes in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 635-642.
- Berek, A. K. (2017). Compost tea and its use as a source of nutrients and agents of plant security. *Savana Cendana*, 2(04), 68-70.
- Berg, G. (2009). Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(1), 11-18.
- Biggerstaff, C. M., Gleason, M. L., and Braun, E. J. (1999). Effect of soil moisture on tomato seed-to-seedling transmission of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, 89:S7. 5.
- Black, C. A., Evans, D., White, J. L., Ensminger, L. E., & Clark, F. E. (1965). Laboratory Measurement of Hydraulic Conductivity of Saturated Soil. *Methods of Soil Analysis. Part 2. Methods of Soil Analysis*. Recuperado de: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/books/abstracts/agronomymonogra/methodsofsoilana/210/preview/pdf>
- Boulard, T., Raepel, C., Brun, R., Lecompte, F., Hayer, F., Carmassi, G., & Gaillard, G. (2011). Environmental impact of greenhouse tomato production in France. *Agronomy for Sustainable Development*, 31(4), 757.
- Borboa-Flores, J., Rueda, E. O., Félix, E. A., Ponce, J. F., Cruz, M., Juárez, O. G., & Garcíacut;a Ortega, A. M. (2009). Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 32(4), 319-326.
- Borrero, C., Ordovas, J., Trillas, M. I., & Avilés, M. (2006). Tomato Fusarium wilt suppressiveness. The relationship between the organic plant growth media and their microbial communities as characterised by Biolog®. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(7), 1631-1637.

- Carrera, F. P., Noceda, C., Maridueña-Zavala, M. G., García, J. A., Ruiz, O. H., & Cevallos-Cevallos, J. M. (2021). Changes in the Metabolite Profile during Micropropagation of Normal and Somaclonal Variants of Banana Musa AAA cv. Williams. *Horticulturae*, 7(3), 39.
- Carlton, W. M., Braun, E. J., & Gleason, M. L. (1998). Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. *Phytopathology*, 88(6), 525-529.
- Cerda, A., Artola, A., Font, X., Barrena, R., Gea, T., & Sánchez, A. (2018). Composting of food wastes: Status and challenges. *Bioresource technology*, 248, 57-67.
- Cerovic, Z. G., Masdoumier, G., Ghazlen, N. B., & Latouche, G. (2012). A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids. *Physiologia plantarum*, 146(3), 251-260.
- Cevallos-Cevallos, J. M., Reyes-De-Corcuera, J. I., Etxeberria, E., Danyluk, M. D., & Rodrick, G. E. (2009). Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(11-12), 557-566.
- Cevallos-Cevallos, J. M., García, R., Etxeberria, E., & Reyes, J. I. (2011). GC-MS analysis of headspace and liquid extracts for metabolomic differentiation of citrus huanglongbing and zinc deficiency in leaves of 'Valencia' sweet orange from commercial groves. *Phytochemical Analysis*, 22(3), 236-246.
- Chang, R. J., Ries, S. M., and Pataky, J. K. (1992). Local sources of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. *Phytopathology* 82, 553–560. doi: 10.1094/Phyto-82-553.
- Cortés-Berrios, H., C. (2018). Abonos orgánicos para el cultivo de Nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la localidad de "Rancho Los Ángeles", Municipio de Soledad de Graciano Sánchez S.L.P. Tesis de Licenciatura, Facultad de Agronomía y Veterinaria, UASLP, Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí, México.
- Dangl, J. L., & Jones, J. D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411(6839), 826-833.

- D'Amelia, V., Aversano, R., Chiaiese, P., & Carputo, D. (2018). The antioxidant properties of plant flavonoids: their exploitation by molecular plant breeding. *Phytochemistry Reviews*, 17(3), 611-625.
- D'Hose, T., Cougnon, M., De Vlieghe, A., Vandecasteele, B., Viaene, N., Cornelis, W., ... & Reheul, D. (2014). The positive relationship between soil quality and crop production: A case study on the effect of farm compost application. *Applied Soil Ecology*, 75, 189-198.
- De Corato, U. (2020a). Soil microbiota manipulation and its role in suppressing soil-borne plant pathogens in organic farming systems under the light of microbiome-assisted strategies. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 7(1), 1-26.
- De Corato, U. (2020b). Agricultural waste recycling in horticultural intensive farming systems by on-farm composting and compost-based tea application improves soil quality and plant health: A review under the perspective of a circular economy. *Science of The Total Environment*, 738, 139840.
- De Corato, U. (2020c). Disease-suppressive compost enhances natural soil suppressiveness against soil-borne plant pathogens: A critical review. *Rhizosphere*, 13, 100192.
- de León, L., Siverio, F., López, M. M., & Rodríguez, A. (2008). Comparative efficiency of chemical compounds for in vitro and in vivo activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomato bacterial canker. *Crop Protection*, 27(9), 1277-1283.
- De Souza, E. M., Granada, C. E., & Sperotto, R. A. (2016). Plant pathogens affecting the establishment of plant-symbiont interaction. *Frontiers in Plant Science*, 7, 15.
- Desbrosses, G. G., Kopka, J., & Udvardi, M. K. (2005). *Lotus japonicus* metabolic profiling. Development of gas chromatography-mass spectrometry resources for the study of plant-microbe interactions. *Plant Physiology*, 137(4), 1302-1318.
- D.O.F. Diario Oficial de la Federación. (2020). Acuerdo por el que se modifican, adicionan y derogan diversas disposiciones del diverso por el que se dan a

conocer los Lineamientos para la operación orgánica de las actividades agropecuarias, publicado el 29 de octubre de 2013. Recuperado de:
https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5594612&fecha=08/06/2020
https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5594612&fecha=08/06/2020

- Drienovsky, R., NICOLIN, A. L., Rujescu, C., & Sala, F. (2017). Scan LeafArea—A software application used in the determination of the foliar surface of plants. *Research Journal of Agricultural Science*, 49(4), 215-224.
- Dixon, G. R., & Walsh, U. F. (1998). Suppression of plant pathogens by organic extracts a review. *In International Symposium on Composting & Use of Composted Material in Horticulture*, 383–390.
- Dreier, J., Meletzus, D., & Eichenlaub, R. (1997). Characterization of the plasmid encoded virulence region *pat-1* of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10(2), 195-206.
- Duc, N. H., & Posta, K. (2018). Mycorrhiza-induced alleviation of plant disease caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and role of ethylene in mycorrhiza-induced resistance in tomato. *Acta Biologica Hungarica*, 69(2), 170-181.
- Eddin, K. S., Marimuthu, T., Ladhalakshmi, D., Rabindran, R., & Velazhahan, R. (2005). A simple inoculation technique for evaluation of cotton genotypes for resistance to bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 321-328.
- Eichenlaub R., Gartemann KH., Burger A. (2007) *Clavibacter michiganensis*, a group of gram-positive phytopathogenic bacteria. In: Gnanamanickam S.S. (eds) *Plant-Associated Bacteria*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_12 385-421). Springer, Dordrecht.
- Eichenlaub, R., & Gartemann, K. H. (2011). The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. *Annual review of phytopathology*, 49, 445-464.

- Everts, K. L., Sardanelli, S., Kratochvil, R. J., Armentrout, D. K., & Gallagher, L. E. (2006). Root-knot and root-lesion nematode suppression by cover crops, poultry litter, and poultry litter compost. *Plant disease*, 90(4), 487-492.
- Fatmi, M., Bolkan, H., and Schaad, N. W. (2017). Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seed. Pages 111-117 in: Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and other Planting Material, 2nd ed. M. Fatmi, R. R. Walcott, and N. W. Schaad, eds. *The American Phytopathological Society*, St. Paul, MN, U.S.A.
- Carballo, M. T. (2007). Producción de Té de compost: influencia del origen del compost, la temperatura y la aireación en su calidad. *Serie Tesis Doctorales. Ed. Publicaciones Universidad de León*. pp 302. ISBN 8497733312.
- Flor, H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual review of phytopathology*, 9(1), 275-296.
- Gartemann, K. H., Abt, B., Bekel, T., Burger, A., Engemann, J., Flügel, M., ... & Bartels, D. (2008). The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *Journal of Bacteriology*, 190(6), 2138-2149.
- Ghatak, A., Chaturvedi, P., & Weckwerth, W. (2018). Metabolomics in plant stress physiology. *Plant Genetics and Molecular Biology*, 187-236.
- Gleason, M. L., Gitaitis, R. D., & Ricker, M. D. (1993). Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in eastern North America. *Plant Disease*, 77(11), 1069-1076.
- Ghorbani, R., Koocheki, A., Jahan, M., & Asadi, G. A. (2006). Effects of organic fertilisers and compost extracts on organic tomato production. *Aspects of Applied Biology* 79, *What will organic farming deliver?* COR 2006, 113-116.
- Girshe, L., Mengistu, H., & Tadesse, T. (2018). The Effects of Rate and Method of Aerated Compost Tea Application on Yield and Yield component of Tomato

- (*Lycopersicon esculentum* Mill.) at Burusa. *International Journal of Multidisciplinary and Current Research*, 6, 7.
- Hamilton, C. D., Steidl, O. R., MacIntyre, A. M., Hendrich, C. G., & Allen, C. (2021). *Ralstonia solanacearum* depends on catabolism of myo-inositol, sucrose, and trehalose for virulence in an infection stage-dependent manner. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, (ja).
- Hassani, M. A., Durán, P., & Hacquard, S. (2018). Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome*, 6(1), 1-17.
- Hargreaves, J. C., Adl, M. S., & Warman, P. R. (2009). Are compost teas an effective nutrient amendment in the cultivation of strawberries? Soil and plant tissue effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(3), 390-397.
- Harris, C., Mora, E., Ramiro, L., & Hernández, R. (2019). Chili (*Capsicum annuum* L.) and Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Traditional crops in the Nahua and Totonaku communities of Puebla, Mexico. *Agroproductividad*, 12(1), 33–38.
- Harrison, B. R., Wang, L., Gajda, E., Hoffman, E. V., Chung, B. Y., Pletcher, S. D., ... & Promislow, D. E. (2020). The metabolome as a link in the genotype-phenotype map for peroxide resistance in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *BMC genomics*, 21, 1-22.
- Hausbeck, M. K., Bell, J., Medina-Mora, C., Podolsky, R., & Fulbright, D. W. (2000). Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology*, 90(1), 38-44.
- Hiery, E., Poetsch, A., Moosbauer, T., Amin, B., Hofmann, J., & Burkovski, A. (2015). A proteomic study of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* culture supernatants. *Proteomes*, 3(4), 411-423.
- Hidalgo, P. R., Sindoni, M., & Marín, C. (2009). Evaluation of vermicompost based substrates and liquid organic amendments on passion fruit (*Passiflora edulis* v. *flavicarpa*) nursery propagation. *Revista Científica UDO Agrícola*, 9(1), 126–135.

- Hogg, D., Favoino, E., Centemero, M., Caimi, V., Amlinger, F., Devliegher, W., Brinton, W., Antler, S., (2002). Comparison of compost standards within the EU, North America and Australia, The Waste and Resources Action Programme (WRAP), Oxon. ISBN 1-84405-003-3.
- Holguín, R. J., Vázquez, R. C., & Rueda, E. O. (2007). Bacterial Canker Caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Tomato in the Baja California Peninsula of Mexico. *The American Phytopathological Society (APS)*, 90, 1550.
- Hong, J., Yang, L., Zhang, D., & Shi, J. (2016). Plant metabolomics: an indispensable system biology tool for plant science. *International journal of molecular sciences*, 17(6), 767.
- Ingham, E. (2005). *The compost tea brewing manual* (Vol. 728). Soil Foodweb Incorporated, Corvallis, OR, USA.
- Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D., Bahro, R., & Eichenlaub, R. (2000). The endo- β -1, 4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(7), 703-714.
- Jaramillo-Ortíz, S. (2020). Comportamiento del fitopatógeno *Clavibacter michiganensis* durante su interacción con la especie silvestre *Solanum arcanum* LA2157. Tesis de Maestría, Facultad de Agronomía y Veterinaria, UASLP, Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí, México.
- Jarquín, G. R.; Schwentesius R.; Escalona, A. M. A.; Ramírez, T. H. M. y Domínguez, G. N. (2013). Guía para la comprensión de lineamientos técnicos de operación orgánica. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Universidad Veracruzana, Red Mexicana de Tianguis y Mercados A.C. San Luis Potosí, S.L.P. 87 p.
- Jones, J. B., Zitter, T. A., Momol, T. M., & Miller, S. A. (eds.) (2014). Compendium of tomato diseases and pests. *The American Phytopathological Society*. ISBN: 978-0-89054-434-1

- Jung, W. J., Mabood, F., Souleimanov, A., Whyte, L. G., Niederberger, T. D., & Smith, D. L. (2014). Antibacterial activity of antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* DJM-51 against phytopathogenic *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* ATCC 7429 invitro. *Microbial Pathogenesis*, 77, 13–16. Doi: 10.1016/j.micpath.2014.10.008
- Kalozoumis, P., Savvas, D., Aliferis, K., Ntatsi, G., Marakis, G., Simou, E., ... & Karapanos, I. (2021). Impact of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Inoculation and Grafting on Tolerance of Tomato to Combined Water and Nutrient Stress Assessed via Metabolomics Analysis. *Frontiers in plant science*, 12, 814.
- Kaup, O., Gräfen, I., Zellermann, E. M., Eichenlaub, R., & Gartemann, K. H. (2005). Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Molecular plant-microbe interactions*, 18(10), 1090-1098.
- Khanna, K., Sharma, A., Ohri, P., Bhardwaj, R., Abd_Allah, E. F., Hashem, A., & Ahmad, P. (2019). Impact of plant growth promoting rhizobacteria in the orchestration of *Lycopersicon esculentum* Mill. resistance to plant parasitic nematodes: a metabolomic approach to evaluate defense responses under field conditions. *Biomolecules*, 9(11), 676.
- Kim, H. S., & Kim, K. H. (2011). Physical properties of the horticultural substrate according to mixing ratio of peatmoss, perlite and vermiculite. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, 44(3), 321-330.
- Kleitman, F., Barash, I., Burger, A., Iraki, N., Falah, Y., Sessa, G., ... & Manulis-Sasson, S. (2008). Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel. *European Journal of Plant Pathology*, 121(4), 463-475.
- Kumar, A., & Verma, J. P. (2018). Does plant—microbe interaction confer stress tolerance in plants: a review?. *Microbiological research*, 207, 41-52.
- Lara-Ávila, J. P. (2005). Obtención de la huella genética de agaves mezcladores de San Luis Potosi por RAPD y AFLP. Tesis de maestría. División de Biología Molecular,

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. San Luis Potosí, México.

- Lares, M., Housni, F. E., Cervantes, V. G. A., Nava, R. M. M., Del Toro, H. B., Cañedo, C. L., & Carmona, M. D. C. B. (2018). The Relationship between Consumption, Socioeconomic Level and Reasons of Tomato Intake in Mexico. *Agricultural Sciences*, 9(07), 777.
- Lasaridi, K., Protopapa, I., Kotsou, M., Pilidis, G., Manios, T., & Kyriacou, A. (2006). Quality assessment of composts in the Greek market: the need for standards and quality assurance. *Journal of Environmental Management*, 80(1), 58-65.
- Latorre, B. (2004). *Enfermedades de las Plantas Cultivadas*. Santiago, Chile: Ediciones Universidad Católica de Chile. Sexta Edición Ampliada.
- Lee, J. H., Jayaprakasha, G. K., Avila, C. A., Crosby, K. M., & Patil, B. S. (2019). Metabolomic studies of volatiles from tomatoes grown in net-house and open-field conditions. *Food chemistry*, 275, 282-291.
- Liang, Y., Cao, Y., Tanaka, K., Thibivilliers, S., Wan, J., Choi, J., ... & Stacey, G. (2013). Nonlegumes respond to rhizobial Nod factors by suppressing the innate immune response. *Science*, 341(6152), 1384-1387.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., & Fernie, A. R. (2006). Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature protocols*, 1(1), 387.
- Litterick, A., & Wood, M. (2009). The use of Composts and Compost Extracts in Plant Disease Control. *Disease Control in Crops*, 93-121. doi:10.1002/9781444312157.ch5
- Liu, J., & Wang, X. (2020). Tomato diseases and pests detection based on improved Yolo V3 convolutional neural network. *Frontiers in plant science*, 11, 898.
- Liu, T., Wang, M., Awasthi, M. K., Chen, H., Awasthi, S. K., Duan, Y., & Zhang, Z. (2020). Measurement of cow manure compost toxicity and maturity based on weed seed germination. *Journal of Cleaner Production*, 245, 118894.

- López-Gresa, M. P., Torres, C., Campos, L., Lisón, P., Rodrigo, I., Bellés, J. M., & Conejero, V. (2011). Identification of defence metabolites in tomato plants infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Environmental and Experimental Botany*, 74, 216–228. doi:10.1016/j.envexpbot.2011.06.003
- Lowe-Power, T. M., Hendrich, C. G., von Roepenack-Lahaye, E., Li, B., Wu, D., Mitra, R., ... & Allen, C. (2018). Metabolomics of tomato xylem sap during bacterial wilt reveals *Ralstonia solanacearum* produces abundant putrescine, a metabolite that accelerates wilt disease. *Environmental microbiology*, 20(4), 1330-1349.
- Maida, I., Chiellini, C., Mengoni, A., Bosi, E., Firenzuoli, F., Fondi, M., & Fani, R. (2016). Antagonistic interactions between endophytic cultivable bacterial communities isolated from the medicinal plant *Echinacea purpurea*. *Environmental microbiology*, 18(8), 2357-2365.
- Maridueña-Zavala, M. G., Freire, A., Cevallos, J. M., & Peralta, E. L. (2017). GC-MS metabolite profiling of *Phytophthora infestans* resistant to metalaxyl. *European Journal of Plant Pathology*, 149(3), 563–574. doi:10.1007/s10658-017-1204-y
- Martin, C. C. S. (2014). Potential of compost tea for suppressing plant diseases. *CAB Reviews*, 9(32), 1-38. doi: 10.1079/PAVSNNR20149032
- Martínez-Castro, E., Jarquin-Gálvez, R., Alpuche-Solís, Á. G., Vallejo-Pérez, M. R., Colli-Mull, J. G., & Lara-Ávila, J. P. (2018). Bacterial wilt and canker of tomato: fundamentals of a complex biological system. *Euphytica*, 214(4), 1-14.
- Martínez-Yáñez, M. (2018). *Control biológico del cáncer bacteriano del jitomate (Solanum lycopersicum L.) mediante la aplicación de extractos aerobios de composta*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Agronomía y Veterinaria, UASLP, Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí, México.
- McLafferty, F. W. (2009). Wiley Registry of Mass Spectral Data, 9th. *John Wiley and Sons*. Inc., Hoboken, NJ, 662.

- Medina-Mora, C. M., Hausbeck, M. K., & Fulbright, D. W. (2001). Bird's eye lesions of tomato fruit produced by aerosol and direct application of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant disease*, 85(1), 88-91.
- Méndez, R. (2019). Efectividad antibacterial in vitro e in vivo de nanopartículas de plata biosintetizadas a partir de extractos de *Larrea tridentata* contra *Clavibacter michiganensis* en plantas de *Solanum Lycopersicum*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación de Química Aplicada. Saltillo, Coahuila, México.
- Montenegro Miño, D. A., Salomón, Y., & Antonio, J. (2020). Determinación de clorofilas, flavonoides y nitrógeno en cerezos (*Prunus Avium* L."Santina") bajo tres condiciones de cultivo, mediante un método no destructivo. Memoria de título, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, Talca, Chile.
- Naidu, Y., Meon, S., & Siddiqui, Y. (2013). Foliar application of microbial-enriched compost tea enhances growth, yield and quality of muskmelon (*Cucumis melo* L.) cultivated under fertigation system. *Scientia Horticulturae*, 159, 33-40.
- O'Leary, B. M., Rico, A., McCraw, S., Fones, H. N., & Preston, G. M. (2014). The infiltration-centrifugation technique for extraction of apoplastic fluid from plant leaves using *Phaseolus vulgaris* as an example. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (94).
- Osbourn, A. (2010). Gene clusters for secondary metabolic pathways: an emerging theme in plant biology. *Plant physiology*, 154(2), 531-535.
- Pane, C., Valentini, F., Bonanomi, G., Cozzolino, L., Antignani, V., Puopolo, G., ... & Scala, F. (2007). Control of plant pathogens by using a compost tea. *J. Plant Pathol*, 89, 52.
- Pane, C., Celano, G., Villecco, D., & Zaccardelli, M. (2012). Control of *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Pyrenochaeta lycopersici* on tomato with whey compost-tea applications. *Crop Protection*, 38, 80-86.
- Park, D. H., Mirabella, R., Bronstein, P. A., Preston, G. M., Haring, M. A., Lim, C. K., ... & Schuurink, R. C. (2010). Mutations in γ -aminobutyric acid (GABA) transaminase

- genes in plants or *Pseudomonas syringae* reduce bacterial virulence. *The Plant Journal*, 64(2), 318-330.
- Pauly, N., Pucciariello, C., Mandon, K., Innocenti, G., Jamet, A., Baudouin, E., ... & Puppo, A. (2006). Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume–Rhizobium symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, 57(8), 1769-1776.
- Pedras, M. S. C., & Zheng, Q. A. (2010). Metabolic responses of *Thellungiella halophila/salsuginea* to biotic and abiotic stresses: metabolite profiles and quantitative analyses. *Phytochemistry*, 71(5-6), 581-589.
- Peralta, I. E., & Spooner, D. M. (2005). Morphological characterization and relationships of wild tomatoes (*Solanum L.* Sect. *Lycopersicon*). *Monographs In Systematic Botany*, 104, 227.
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., & Orešič, M. (2010). MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC bioinformatics*, 11(1), 1-11.
- Rao, A.V. and Agarwal, S. (2000) Role of Antioxidant Lycopene in Cancer and Heart Disease. *Journal of the American College of Nutrition*, 19, 563-569. doi: 10.1080/07315724.2000.10718953
- Raupach, G. S., & Kloepper, J. W. (2000). Biocontrol of cucumber diseases in the field by plant growth-promoting rhizobacteria with and without methyl bromide fumigation. *Plant disease*, 84(10), 1073-1075.
- Raviv, M., Krassnovsky, A., Kritzman, G., & Kirshner, B. (2010). Minimizing the risk of bacterial canker spread through plant residue composting. In *I International Conference on Organic Greenhouse Horticulture* 915 (pp. 151-156). DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.915.18
- Rodríguez, N., Cano, P., Figueroa, U., Favela, E., Moreno, A., Márquez, C., ... Rangel, P. P. (2009). Uso De Abonos Orgánicos En La Producción De Tomate En Invernadero. *Terra Latinoamericana*, 27(2395–8030), 319–327.

- Rojas, L. (2014). Control biológico del Cáncer Bacteriano *Clavibacter michiganensis* subs. *michiganensis* con dos cepas de *Bacillus subtilis* en tomate *Solanum lycopersicum* Mill. Variedad Cherry y Saladette in situ. Tesis de licenciatura, División de Agronomía, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México.
- Román, P., Martínez, M. M., & Pantoja, A. (2013). Manual de compostaje del agricultor: Experiencias en América Latina. *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO)*. E-ISBN 978-92-5-307845-5
- Romero, A. M., Vega, D., & Correa, O. S. (2014). *Azospirillum brasilense* mitigates water stress imposed by a vascular disease by increasing xylem vessel area and stem hydraulic conductivity in tomato. *Applied Soil Ecology*, 82, 38-43.
- Ronga, D., Caradonia, F., Francia, E., Morcia, C., Rizza, F., Badeck, F. W., ... & Terzi, V. (2019). Interaction of tomato genotypes and arbuscular mycorrhizal fungi under reduced irrigation. *Horticulturae*, 5(4), 79.
- Saavedra, T. M., Figueroa, G. A., & Cauhi, J. G. D. (2017). Origin and evolution of tomato production *Lycopersicon esculentum* in México. *Ciência Rural*, 47(3).
- SADER. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (Octubre, 14, 2019). Jitomate o tomate. Delegación SADER San Luis Potosí. Visitado el 20 de noviembre de 2019. Recuperado de <https://www.gob.mx/agricultura/sanluispotosi/articulos/jitomate-o-tomate>.
- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Agrícola Nacional JITOMATE. *Planeación Agrícola Nacional 2017-2030*, 2–20. Primera Edición, 2017.
- Scheuerell, S., & Mahaffee, W. (2002). Compost tea: principles and prospects for plant disease control. *Compost Science & Utilization*, 10(4), 313-338. <https://doi.org/10.1080/1065657X.2002.10702095>

- Scotti, R., Bonanomi, G., Scelza, R., Zoina, A., & Rao, M. A. (2015). Organic amendments as sustainable tool to recovery fertility in intensive agricultural systems. *Journal of soil science and plant nutrition*, 15(2), 333-352.
- Seddigh, S., & Kiani, L. (2018). Evaluation of different types of compost tea to control rose powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*). *International Journal of Pest Management*, 64(2), 178-184.
- Sen, Y., Feng, Z., Vandenbroucke, H., van der Wolf, J., Visser, R. G., & Van Heusden, A. W. (2013). Screening for new sources of resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) in tomato. *Euphytica*, 190(2), 309-317.
- Sen, Y., van der Wolf, J., Visser, R. G., & van Heusden, S. (2015). Bacterial canker of tomato: current knowledge of detection, management, resistance, and interactions. *Plant Disease*, 99(1), 4-13.
- Sharabani, G., Shtienberg, D., Borenstein, M., Shulhani, R., Lofthouse, M., Sofer, M., ... & Manulis-Sasson, S. (2013). Effects of plant age on disease development and virulence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato. *Plant Pathology*, 62(5), 1114-1122.
- Shrestha, K., Shrestha, P., Walsh, K. B., Harrower, K. M., & Midmore, D. J. (2011). Microbial enhancement of compost extracts based on cattle rumen content compost– Characterisation of a system. *Bioresource technology*, 102(17), 8027-8034.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2017). *Jitomate: 3.3 millones de toneladas en 2016*. Recuperado de <https://www.gob.mx/siap/articulos/jitomate-3-3-millones-de-toneladas-en-2016>
- Siddiqui, Y., Islam, T. M., Naidu, Y., & Meon, S. (2011). The conjunctive use of compost tea and inorganic fertiliser on the growth, yield and terpenoid content of *Centella asiatica* (L.) urban. *Scientia Horticulturae*, 130(1), 289-295.
- Smith, E. F. (1910). A new tomato disease of economic importance. *Science*, 794-796.

- Sperry, J. S., Donnelly, J. R., & Tyree, M. T. (1988). A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant, Cell & Environment*, 11(1), 35-40.
- Stork, I., Gartemann, K. H., Burger, A., & Eichenlaub, R. (2008). A family of serine proteases of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: *chpC* plays a role in colonization of the host plant tomato. *Molecular plant pathology*, 9(5), 599-608.
- Strider, D.L., (1969). Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. A literature review and bibliography. North Carolina Agricultural Experimental Station. *Tech. Bull.*, 193.
- Sukumar, P., Legue, V., Vayssieres, A., Martin, F., Tuskan, G. A., & Kalluri, U. C. (2013). Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant–microorganism interactions. *Plant, cell & environment*, 36(5), 909-919.
- Tambong, J. T. (2017). Comparative genomics of *Clavibacter michiganensis* subspecies, pathogens of important agricultural crops. *PLoS One*, 12(3), e0172295.
- Tóth, K., & Stacey, G. (2015). Does plant immunity play a critical role during initiation of the legume-rhizobium symbiosis?. *Frontiers in plant science*, 6, 401.
- Van Loon, L. C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. In *New perspectives and approaches in plant growth-promoting Rhizobacteria research* (pp. 243-254). Springer, Dordrecht.
- Wallis, F. M. (1977). Ultrastructural histopathology of tomato plants infected with *Corynebacterium michiganense*. *Physiological Plant Pathology*, 11(3), 333-342.
- Werner, N. A., Fulbright, D. W., Podolsky, R., Bell, J., & Hausbeck, M. K. (2002). Limiting Populations and Spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Seedling Tomatoes in the Greenhouse. *Plant Disease*, 86(5), 535–542. doi:10.1094/pdis.2002.86.5.535
- Xia, J., & Wishart, D. S. (2011). Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nature protocols*, 6(6), 743-760.

- Xu, X., Kumar, A., Deblais, L., Pina-Mimbela, R., Nislow, C., Fuchs, J. R., ... & Rajashekara, G. (2015). Discovery of novel small molecule modulators of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Frontiers in microbiology*, 6, 1127.
- Xu, J., Wolters-Arts, M., Mariani, C., Huber, H., & Rieu, I. (2017). Heat stress affects vegetative and reproductive performance and trait correlations in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Euphytica*, 213(7), 1-12.
- Yogev, A., Raviv, M., Kritzman, G., Hadar, Y., Cohen, R., Kirshner, B., & Katan, J. (2009). Suppression of bacterial canker of tomato by composts. *Crop Protection*, 28(1), 97–103. doi:10.1016/j.cropro.2008.09.003
- Zaccardelli, M., Perrone, D., Pane, C., Pucci, N., & Infantino, A. (2010). Control of corky root of tomato with compost and role of spore-forming bacteria to inhibit *Pyrenochaeta lycopersici*. In *III International Symposium on Tomato Diseases* 914 (pp. 393-396).
- Zaragoza, M. (febrero, 28, 2019). San Luis Potosí, segundo productor de tomate en el país. *El Financiero*. Visitado el 09 de abril del 2021. Recuperado de <https://www.elfinanciero.com.mx/bajio/san-luis-potosi-segundo-productor-de-tomate-en-el-pais>
- Zárate-Martínez, W., González-Morales, S., Ramírez-Godina, F., Robledo-Olivo, A., & Juárez-Maldonado, A. (2018). Efecto de los ácidos fenólicos en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) inoculadas con *Clavibacter michiganensis*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(SPE20), 4367-4379.
- Zouari, I., Masmoudi, F., Medhioub, K., Tounsi, S., & Trigui, M. (2020). Biocontrol and plant growth-promoting potentiality of bacteria isolated from compost extract. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 113(12), 2107-2122.