

Efecto antibacteriano *in vitro* de exudados foliares de tabaco contra dos bacterias fitopatógenas

In vitro antibacterial effect of tobacco leaf exudates against two bacterial plant pathogens

Yanelis Capdesuñer Ruiz*, Maribel Rivas Paneca*, Erinelvis Rodríguez Hernández**, Madelín Gallo Rodríguez**, Janet Quiñones Galvez*, Ermis Yanes Paz*, Martha Hernández de la Torre*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50707

Resumen

Los productos naturales son una alternativa para el control de microorganismos que ocasionan enfermedades en los cultivos. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar diferentes solventes para la obtención de extractos crudos a partir de exudados foliares de líneas de tabaco, y el efecto *in vitro* de estos extractos contra dos bacterias fitopatógenas: *Xanthomonas campestris* (Xc) y *Pectobacterium carotovorum* (Pc). Se evaluaron solventes con polaridades entre 3.1 y 6.2 (diclorometano, n-butanol, acetato de etilo, metanol y etanol 90 %). El etanol 90 % se seleccionó como mejor solvente y como sustituto del diclorometano por su mayor rendimiento. Los extractos etanólicos crudos se obtuvieron a partir de exudados foliares de diez líneas de tabaco seleccionadas. La diversidad de la composición química de los extractos etanólicos se reveló por cromatografía en capa delgada. La actividad antibacteriana se evaluó por el método de difusión en agar con discos de papel de filtro y la medición del diámetro del halo de inhibición. Se observó inhibición para todos los extractos contra Xc destacándose los correspondientes a las líneas Nic 1061 "TI 1738" y Nic 1016 "Incekara" hasta 5 µg de extracto crudo /disco, con un mayor rendimiento para la línea Nic 1061. El extracto de la línea Nic 1015 fue el único con actividad contra Pc hasta 5 µg de extracto crudo seco por disco. Estos resultados sugieren un uso potencial de los extractos crudos de las líneas Nic 1061 y Nic 1015 "TI 1341" como un agente efectivo para la protección de cultivos contra estas bacterias.

Palabras clave: fitopatógenos, *Nicotiana tabacum*, protección de cultivos, solventes, superficie foliar.

Abstract

Natural products are an alternative to control microorganisms that cause diseases in crops. This work aimed to evaluate different solvents for obtaining crude extracts from tobacco leaf exudates and to determine *in vitro* effect of these extracts against two phytopathogenic bacteria: *Xanthomonas campestris* (Xc) and *Pectobacterium carotovorum* (Pc). Crude extracts from ten tobacco lines using solvents with polarities between 3.1 and 6.2 (dichloromethane, n-butanol, ethyl acetate, methanol and ethanol 90%) were obtained. Ethanol 90% was selected as the best solvent for obtaining extracts from tobacco leaf exudates and as a substitute of dichloromethane due to the best yield. The chemical composition diversity of the ethanolic extracts was revealed by thin-layer chromatography. The antibacterial activity was evaluated by agar disk diffusion method recording the inhibition zones. Growth inhibition was observed for all extracts against Xc, and the better activity corresponded to the lines Nic 1061 "TI 1738" and Nic 1016 "Incekara" until a minimal amount of 5 µg/ disc, with higher yield in case of the line Nic1061. Only the extract of the line Nic 1015 was able to inhibit the growth of Pc until a minimal inhibitory concentration of 5 µg/disc. These results suggest a potential use of crude extracts from lines Nic 1061 and Nic 1015 "TI 1341" as an effective agent for the crop protection against Xc and Pc respectively.

Key words: phytopathogens, *Nicotiana tabacum*, crop protection, solvents, leaf surface.

Recibido: noviembre 18 de 2014

Aprobado: abril 24 de 2015

* MSc Yanelis Capdesuñer Ruiz, MSc Maribel Rivas Paneca, MSc Janet Quiñones Gálvez, MSc Ermis Yanes Paz, Dra Martha Hernández de la Torre, Laboratorio de Ingeniería Metabólica, Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila, Carretera a Morón km 9 ½. Ciego de Ávila, CP69450, Cuba, Email: ycapdesuner@bioplantass.cu, yaneliscr@gmail.com.

** MSc Erinelvis Rodríguez Hernández, MSc Madelín Gallo Rodríguez. UCTB Estación Experimental del Tabaco de Cabaiguán. Sancti Spiritus. Cuba.

Introducción

Las plantas son fuente de alimentación para el reino animal y son afectadas por plagas y enfermedades que causan severas pérdidas anuales. El control de estas se basa, generalmente, en la utilización de productos químicos sintéticos, muchos de los cuales han producido problemas de desequilibrio ambiental, de salud humana y el surgimiento de plagas y enfermedades más agresivas y resistentes. Existe referencia de una alta incidencia de enfermedades y diversos cuadros clínicos por intoxicación en la población, también se detectan elevados niveles de pesticidas en cosechas y personas (Martínez *et al.*, 2010). El empleo irracional de fungicidas contamina aguas y suelos, ante lo cual las empresas productoras de estos compuestos están actualmente obligadas a sintetizar compuestos inocuos y a la vez efectivos. Este hecho ha creado una discrepancia entre la necesidad de los agricultores de proteger sus cultivos de las enfermedades, y la exigencia cada vez mayor de los mercados por disponer de alimentos más saludables (Lara y Landero, 2012). Como consecuencia, se buscan otras alternativas, entre ellas el uso de derivados botánicos para el control de plagas y enfermedades. Varias especies de plantas son materia prima para producir insecticidas comerciales (Celis *et al.*, 2008) por ello, actualmente se realizan múltiples estudios para aislar e identificar los metabolitos secundarios que presentan actividad defensiva, con la finalidad de extraerlos de las plantas y usarlos en el control de enfermedades (Lara y Landero, 2012).

Las plantas seleccionadas que contengan metabolitos secundarios capaces de ser utilizados como plaguicidas naturales, deben ser de fácil cultivo y con metabolitos secundarios con potente actividad, alta estabilidad química y de óptima producción (Cutler *et al.*, 1986). El tabaco es una planta de ciclo corto, considerada modelo de la familia *Solanaceae* y muy conocida por presentar compuestos tóxicos como mecanismos de defensa lo que la hace atractiva para estos fines. La superficie de la hoja de tabaco está cubierta por tricomas, en su mayoría glandulares (Akers *et al.*, 1978, Wagner, 1991) que están involucrados en la secreción de compuestos, principalmente diterpenos y ésteres de azúcares, seguidos de ceras y un menor número de compuestos volátiles y variados (Severson *et al.* 1984, Wagner, 1999; Tissier, 2012). Se cree que al encontrarse un gran número de estos compuestos en la superficie foliar, estén involucrados fundamentalmente en la defensa contra insectos y otros patógenos (Reuveni *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 2004; Shepherd *et al.*, 2005; Amme *et al.*, 2005; Seo *et al.*, 2012).

Por otra parte el aislamiento de estos compuestos de la superficie foliar, utilizando cada vez técnicas más eficientes y sencillas, permitirá obtener estos productos con un mayor grado de pureza, con una menor contaminación celular debido a la ventaja que tienen estos metabolitos de producirse en estructuras ex-

ternas de la hoja y su secreción a la superficie de la misma. Varios solventes orgánicos han sido utilizados con estos fines (Bailey *et al.*, 1975; Chang and Grunwald, 1980; Ohnishi *et al.*, 1983; Reuveni *et al.*, 1987; Lin and Wagner, 1994; Eklund *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2004) y entre ellos el diclorometano ha sido el más usado (Severson *et al.*, 1984; Wagner *et al.*, 2004). El diclorometano es uno de los solventes más usados para la extracción de una amplia variedad de metabolitos por ser altamente eficiente, debido a su alto poder de disolución, excelente propiedad de reciclado, alta estabilidad y elevada pureza (Rossberg *et al.*, 2006). No obstante, su uso presenta riesgos potenciales para la salud causando vértigo, somnolencia y pérdida del conocimiento por inhalación entre otros. Otros peligros en el uso de diclorometano es su reacción violenta con bases y oxidantes fuertes, originando peligro de incendio y explosión, y la reacción con algunas formas de plástico, caucho y recubrimientos (ILO, 2005). Todo esto ha provocado en los últimos años, una tendencia a evitar su uso y el surgimiento de nuevas regulaciones en muchos países (ILO, 2005; USDHHS, 2000; SCOEL recommendations 2009; Commission Regulation (EU), 2010), lo que nos obliga a buscar alternativas de sustitución, ya que las investigaciones se enfocan en otros usos alternativos del tabaco para la obtención de productos naturales (Wagner *et al.*, 2004).

Xanthomonas campestris y *Pectobacterium carotovorum*, esta segunda también conocida como *Erwinia carotovora*, son dos bacterias fitopatógenas del suelo con un amplio rango de hospederos que incluye cultivos de elevada importancia agrícola como: tomate, papa, algodón, zanahoria, cucurbitáceas, cebolla, pimiento entre otras plantas, por lo que estas bacterias pertenecen a la lista de las 10 bacterias patógenas de mayor importancia científica y económica (Mansfield *et al.*, 2012), y hasta el momento no se ha desarrollado una protección totalmente eficaz contra ellas.

Este trabajo tiene como objetivo general obtener extractos crudos a partir de los exudados foliares de diferentes líneas de tabaco para su posterior uso en el control de plagas y enfermedades de cultivos de importancia agrícola. Los objetivos específicos son: determinar el solvente capaz de sustituir el diclorometano en la obtención de extractos crudos de tabaco activos contra bacterias patógenas y determinar la actividad antibacteriana *in vitro* de estos extractos crudos obtenidos a partir de varias líneas contrastantes de tabaco frente a estas dos bacterias fitopatógenas como primer paso en la selección de líneas de tabaco candidatas para la obtención de productos naturales como control de enfermedades bacterianas.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas: Las cepas patogénicas *Xanthomonas campestris*, aislada de tomate y *Pectobacterium*

carotovorum aislada de papa, se proporcionaron por el Instituto de Sanidad Vegetal, Habana, Cuba y se preservaron en agar nutritivo que contiene 4 % de glicerol a 4 °C hasta su uso.

Material Vegetal: Se sembraron 10 accesiones de tabaco en semillero y bandejas flotantes (Cristanini, 1995) en la Estación de Tabaco de Cabaiguán, Sancti Spiritus, Cuba. Las siguientes líneas se proporcionaron por el Banco de Germoplasma del IPK-Gatersleben, Alemania: Nic 1003 ("TI 66"), Nic 1006 ("TI 193"), Nic 1015("TI 1341"), Nic 1016 ("Incekara"), Nic 1017 ("Red Russian"), Nic 1019 ("TI 998"), Nic 1061 ("TI 1738"), SNN (Samsung). Las líneas BHmN y CE (Corrojo Especial) por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Habana, Cuba.

A los 45 días las plantas se individualizaron y trasplantaron a bolsas para un total de 10 plantas por línea. Setenta días después de su trasplante a bolsas, se evaluaron indicadores como número de hojas, altura de la planta y masa fresca foliar. El análisis de los datos se realizó con el utilitario Statistical Package for Social Sciences (SPSS) (versión 15 para Windows, SPSS Inc.). Se realizaron pruebas paramétricas (ANOVA de un factor y Tukey) y las diferencias entre las medias se analizaron para $p \leq 0.05$.

Experimento 1: Determinación del solvente para la obtención de los extractos crudos de exudados foliares de tabaco.

Con el objetivo de seleccionar el mejor solvente para obtener los extractos crudos de exudados foliares de tabaco, se evaluaron cinco solventes con polaridades entre 3 and 6: diclorometano (3.1), n-butanol (3.9), acetato de etilo (4.4), metanol (5.1) y etanol 90% (6.2).

Se utilizaron de 5 a 6 hojas más jóvenes de dos plantas de la línea Nic 1061 para cada tratamiento lo que correspondió con una masa fresca de aproximadamente 60 g. Las plantas tenían una altura promedio de 80 cm. Se sumergieron las hojas en 500 mL del solvente, cuatro veces durante siete segundos, se filtraron a través de papel, se concentraron por rotoevaporación hasta un volumen de 50 mL y se guardaron a -20°C hasta su posterior evaluación. Se determinó el rendimiento expresado en mg de masa seca del extracto/g de masa fresca foliar.

Para determinar la presencia de metabolitos secundarios en los extractos de exudados foliares obtenidos a partir de diferentes solventes, se corrieron en cromatofolios de gel de sílice (DC-Tarjetas SI F 20 x 20 cm, Riedel de la Haën). La placa se activó 10 min a 60°C y la aplicación se realizó con 10 gotas por muestras. Se utilizó como sistema eluyente: benceno: acetato de etilo (86:14). Después de la corrida los cromatofolios se secaron 2-3 min a 60°C. El revelado se realizó con

una solución de ácido fosfomolibdico (20 g de ácido fosfomolibdico en 100 mL de etanol absoluto.

Experimento 2: Obtención de extractos crudos a partir de exudados foliares de líneas de tabaco.

Se tomaron tres plantas de las 10 líneas sembradas y se evaluó el número de hojas, la altura de las plantas, la masa fresca foliar y la masa seca foliar para determinar la tasa masa seca/masa fresca.

A partir de las hojas de tres plantas la extracción se realizó de la misma manera que en el experimento anterior utilizando como solvente el etanol 90 %. Se determinó la concentración de los extractos expresada en mg de masa seca·mL⁻¹ de solvente (dato no mostrado), y el rendimiento expresado en mg de extracto seco·g⁻¹ de masa fresca foliar, así como también se realizó una cromatografía de capa fina como se explica en el experimento anterior.

Experimento 3: Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de tabaco frente a bacterias fitopatógenas.

El ensayo de actividad antibacteriana se realizó por el método de difusión en agar usando discos de papel de filtro (Valgas *et al.*, 2007). Las placas se inocularon con cada bacteria (*Xanthomonas campestris* y *Pectobacterium carotovorum*) a DO 625 nm de 0.15 y 0.17 respectivamente. Una alícuota de 100 µL de solución bacteriana se extendió encima del medio Luria Bertani (LB).

Los extractos secos se disolvieron con dimetilsulfóxido (DMSO) a 5 y 25 µg·µL⁻¹. Con el objetivo de determinar la actividad antimicrobiana de los extractos crudos obtenidos a partir de los de diferentes solventes y los obtenidos a partir de las diferentes líneas utilizando el solvente seleccionado (experimentos 1 y 2) se aplicaron 20 µL de la concentración 25 µg·µL⁻¹ en discos de papel de filtro estériles de 0,7 cm de diámetro.

Con el objetivo de determinar diferentes concentraciones de los extractos se aplicaron 1, 5, 10, 15 y 20 µL (5, 25, 50, 75 y 100 µg respectivamente) de la concentración 5 µg·µL⁻¹ y 8, 12, 16 y 20 µL (200, 300, 400 y 500 µg respectivamente) de la concentración 25 µg·µL⁻¹ en discos de papel de filtro estériles de 0,7 cm de diámetro.

Los discos con los extractos se secaron y colocaron a una distancia entre ellos de 1.5-2,0 cm en las placas, previamente inoculadas con cada bacteria. La solución de kanamicina a 50 µg·µL⁻¹ (10 µL) se usó como un control positivo en el ensayo *in vitro*, al ser la bacteria susceptible a este antibiótico. Se utilizó el dimetilsulfóxido como control negativo o control de solvente (20 µL) para todos los casos, ya que este fue el solvente utilizado para disolver los extractos secos.

Las placas se incubaron por 24 h a 37°C y se midió el diámetro del halo de inhibición incluyendo el diámetro del disco. Cada tratamiento se hizo por triplicado y el experimento por duplicado.

Resultados y discusión

A los 70 días después del trasplante a bolsas las líneas con mayor altura y número de hojas fueron Nic 1016, SNN y Nic 1061, (tabla 1). Estos dos indicadores generalmente tienden a estar muy relacionados porque a medida que la planta crece en altura emite un mayor número de hojas durante este crecimiento.

Las plantas con mayor altura se encontraron en las líneas mencionadas pero sin diferencia con la línea CE, cubriendo valores entre 60 y 68 cm aproximadamente, lo que corresponde a una altura pequeña para la edad de las plantas pero normal para condiciones de bolsas en invernadero. Las plantas con altura mediana presentaron valores entre 40 y 55 cm aproximadamente. La línea de menor altura fue la BHmN sin diferencia con la Nic 1015 que mostraron alrededor de 35 cm (tabla 1).

Para el caso del número de hojas se definen tres grupos; un primer grupo comprendido por las líneas Nic 1016, SNN y Nic 1061 con los mayores valores entre 18 y 19 hojas por planta, un segundo grupo en el que se encuentra la línea Nic 1003 con 16 hojas y un tercer grupo representado por el mayor número de líneas con valores de entre 12 y 14 hojas por planta (tabla 1).

La masa fresca total de hojas de tres plantas por línea varió entre 50 g y 450 g aproximadamente lo cual está influenciado por el número de hojas por planta, aunque líneas con menor número de hojas mostraron altos valores de masa fresca ((BHmN, Nic 1019 y CE

(tabla 1). La relación masa seca/masa fresca foliar nos permite analizar cuáles líneas presentan una mayor producción de metabolitos en las hojas, en este aspecto se destacan las líneas Nic 1016, SNN y Nic 1006, con valores alrededor de 0,7 y se presentan el resto de las líneas con valores intermedios entre 0,4 y 0,5 con excepción de la línea BHmN que muestra la menor tasa con un valor de 0,3. No obstante este aspecto es importante pero no es determinante en nuestro caso ya que centramos el interés en compuestos de la superficie de la hoja que están incluidos pero menos representados en el total de metabolitos de la hoja.

El número de hojas por planta pudiera ser un criterio a tener en cuenta cuando se quiere obtener extractos a partir de este órgano vegetal, por lo que seleccionamos para el experimento de diferentes solventes la línea Nic 1061 de mayor número de hojas, altura y valores intermedios de masa fresca y tasa de masa seca/masa fresca.

Experimento 1: Determinación del solvente para la obtención de los extractos crudos de exudados foliares de tabaco.

En este experimento se logran mayores rendimientos con el uso del etanol 90%, seguido del diclorometano y al final los solventes: metanol, acetato de etilo y n-butanol sin diferencias entre ellos (figura 1 A). El incremento en la polaridad del etanol 90%, teniendo en cuenta además el 10% de agua que presenta, pudo haber contribuido a la extracción de otros compuestos más polares que no fueron extraídos con los otros solventes y estos incrementan la masa del extracto seco y por supuesto el rendimiento. Por lo que este solvente

Tabla 1. Indicadores morfológicos de 10 líneas de tabaco a los 70 días después del trasplante a bolsas.

Líneas	Masa fresca total de hojas (g)	Tasa masa seca/masa fresca de hojas	Altura de la planta (cm)	Número de hojas por planta
Nic 1016	447.30 a	0.64 b	63.88 a	19 a
BHmN	192.10 b	0.31 f	32.75 f	12 c
Nic 1019	189.40 b	0.43 de	48.13 cd	13 c
CE	145.10 c	0.52 c	59.75 ab	13 c
SNN	126.00 d	0.70 a	68.25 a	18 a
Nic 1061	102.00 e	0.39 e	65.50 a	18 a
Nic 1017	93.70 ef	0.38 e	53.63 bc	14 c
Nic 1006	86.70 f	0.64 b	45.13 cd	13 c
Nic 1003	67.20 g	0.47 cd	41.50 de	16 b
Nic 1015	48.80 h	0.52 c	34.88 ef	13 c

Medias con letras diferentes representan diferencias significativas entre líneas de tabaco para cada indicador (Anova de un factor y Tukey en un análisis estadístico realizado en SPSS para $p \leq 0.05$, $n=3$).

puede tener la capacidad de extraer compuestos polares y menos polares.

La cromatografía en capa fina de los extractos reveló una extracción efectiva y similar de los compuestos mayoritarios en todos los casos (figura 1 B). Todos los solventes evaluados fueron capaces de extraer los compuestos mayoritarios, sin grandes diferencias en el patrón cromatográfico. En todos los extractos obtenidos con diferentes solventes se revela un compuesto A cerca del punto de aplicación y un compuesto B cerca del frente de corrida, con una mayor intensidad del compuesto A para el extracto etanólico, seguido del extracto metanólico y menor para el extracto butanólico (figura 1 B).

Debido a que el diclorometano se ha convertido en un factor de referencia para los lavados de las superficies foliares de tabaco, existen pocos datos publicados en la última década relacionados con la eficiencia de extracción de otros solventes para estos fines (Whitfield, 2004). Existe una mayor tendencia a utilizar el tabaco en la producción y obtención de productos naturales por lo que es determinante el desarrollo de métodos de extracción escalables.

Whitfield (2004) con el objetivo de desarrollar métodos para la producción y extracción de proteínas de la superficie foliar de tabaco transgénico también evaluó diferentes solventes y el número de lavados. Sus estudios mostraron que un mayor número de lavados de los solventes evaluados (3 lavados) puede lograr rendimientos comparables para algunos casos a los alcanzados con diclorometano. Además, demostró que la extracción individual de cada compuesto también dependía del número de lavados pero en todos los casos el 100% de la cantidad de cada compuesto se alcanzó después de los tres lavados. De forma general obtuvo los mejores resultados con n-propanol, metanol y etanol.

En este experimento los 4 lavados realizados para todos los solventes deben permitir una mayor extracción de metabolitos en general del etanol 90% en comparación con el diclorometano y el resto de los solventes en igualdad de condiciones por lo que la intensidad de los compuestos A y B representados en la cromatografía parece corresponder con el máximo para cada compuesto, lo que determina que el n-butanol no es capaz de extraer en estas condiciones iguales cantidades del compuesto B si lo comparamos con el diclorometano y el resto de los solventes evaluados. No obstante se requiere un estudio de la composición química de todos los extractos obtenidos para llegar a esta conclusión.

Es conocido además el efecto de deterioro que ocasiona en las hojas el diclorometano. En este experimento se observaron algunos daños no evaluados en las hojas tratadas con diclorometano, y en mejores condiciones las hojas tratadas con etanol 90 % lo que ha sido comprobado por Whitfield (2004) quien observó menor efecto en las condiciones de las hojas cuando se usaron solventes como etanol y metanol, medianamente afectadas las hojas tratadas con isopropanol y n-propanol y altamente afectadas las hojas tratadas con diclorometano, por lo que esto es un aspecto también a tener en cuenta en la selección del solvente si se quiere integrar el paso de extracción de los compuestos de la superficie en operaciones de bioprocesos o de análisis químico del interior de la hoja.

Teniendo en cuenta los rendimientos en los extractos secos (mayor en etanol 90 %) y la semejanza en el patrón cromatográfico de los extractos de diclorometano y etanol, y aún cuando los solventes de metanol y acetato de etilo presentan patrones similares, proponemos el empleo del etanol 90% en la obtención de los exudados foliares a partir de las diferentes líneas por ser más eficiente que el diclorometano y el resto de los solventes y teniendo en cuenta las otras consi-

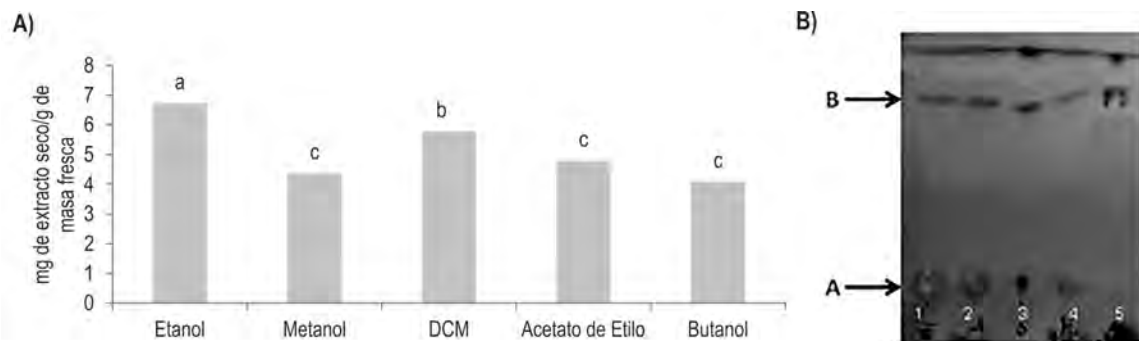


Figura 1 A. Rendimiento de la extracción en mg de extracto seco·g⁻¹ de masa fresca foliar de los exudados obtenidos en 500 mL de los diferentes solventes: etanol 90%, metanol, DCM (diclorometano), acetato de etilo y n-butanol a partir de la línea Nic 1061 B: Cromatografía en capa fina para la separación de los extractos crudos obtenidos a partir de exudados foliares de la línea Nic 1061 con diferentes solventes. 1. Extracto con etanol 90%. 2. Extracto con metanol 3. Extracto con diclorometano 4. Extracto con acetato de etilo 5. Extracto con butanol. Medias con letras diferentes representan diferencias significativas entre solventes (Anova de un factor y Tukey en un análisis estadístico realizado en SPSS para $p \leq 0.05$, $n=6$).

deraciones como que el etanol 90 % es más inocuo, más seguro, menos agresivo, de más fácil manipulación, concentración y recuperación, más disponible y más económico.

El etanol 90% se ha seleccionado para la obtención de extractos crudos para los próximos experimentos, no obstante la selección del solvente más adecuado siempre depende de los compuestos que uno pretende aislar y su actividad, por lo que es posible que el 100 % de efectividad no se logre debido a la gran diversidad de estructuras químicas presentes en la superficie de la hoja del tabaco entre diferentes genotipos, pero al menos se logra una buena representación de los compuestos mayoritarios. Es necesario comprobar la actividad de los compuestos aislados luego de la extracción.

Experimento 2: Obtención de extractos crudos a partir de exudados foliares de líneas de tabaco

Se obtuvieron los exudados foliares de tabaco a partir de diez líneas de tabaco utilizando como solvente el etanol 90%. Los extractos crudos concentrados hasta 50 mL mostraron intensidad diferente en la coloración (datos no mostrados) que correspondió con diferentes concentraciones en mg de extracto seco·mL de etanol 90% (datos no mostrados). Las líneas presentaron un rendimiento diferente entre ellas, (figura 2 A).

El mayor rendimiento se alcanzó con la línea Nic 1006 con valores de 8 mg de extracto seco·mg⁻¹ de masa fresca foliar, luego le siguió la Nic 1003, y luego la Nic 1019 y Nic 1015, esta última sin diferencia con la Nic 1061 cubriendo valores entre 4 y 7 mg de extracto seco·mg⁻¹ de masa fresca foliar. El rendimiento más bajo se obtuvo con la línea Nic 1016 (figura 2 A), la que a pesar de tener una gran masa fresca foliar, altura y número de hojas por planta (tabla 1) no se extrajeron grandes cantidades de componentes de la superficie foliar. Esto demuestra que los indicadores morfológicos no son determinantes en la selección de

las líneas candidatas, la composición química de las líneas está más relacionada con el factor genético. No obstante una vez detectada la capacidad genética de síntesis de los compuestos de interés, el conocimiento de los aspectos morfológicos es importante a la hora de establecer un proceso de producción.

La cromatografía en capa fina de los extractos en estas condiciones reveló una diversidad en composición química dada por la línea de tabaco, así como también la concentración de los extractos y los compuestos mayoritarios en todos los casos (figura 2 B). En la mayoría de los extractos se revela un compuesto A cerca del punto de aplicación que no aparece en los extractos (3 y 9, figura 2 B) y un compuesto B cerca del frente de corrida que no aparece en los extractos (2 y 8, figura 2 B) y Otros compuestos C y D se muestran en los extractos 4 y 6 (figura 2B). Se observa la presencia de un compuesto E en las líneas 1, 4 y 5 y de un compuesto F en las líneas, 1, 4, 5 y 6 (figura 2 B). Otro compuesto G más próximo al frente de corrida se muestran solo en los extractos 5 y 6 (figura 2 B).

Este sistema permite la separación de diferentes componentes de una muestra y mostrar la diversidad química que presentan los extractos etanólicos obtenidos, dado por la gran diversidad química característica de la familia *Solanaceae* en general y la diversidad de genotipos (Wollenweber *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2011; Tissier, 2012, Sallaud *et al.*, 2012), lo que posibilita una diversidad de aplicaciones potenciales de estos extractos. Otros métodos de cromatografía se requieren para la cuantificación e identificación de los compuestos presentes.

Aunque los metabolitos secundarios son los más frecuentemente asociados a la resistencia a enfermedades, también proteínas defensivas llamadas filoplaninas, relacionadas con la patogénesis, forman parte de la superficie foliar de hojas de tabaco y son consideradas productos de tricomas glandulares, confiriéndole

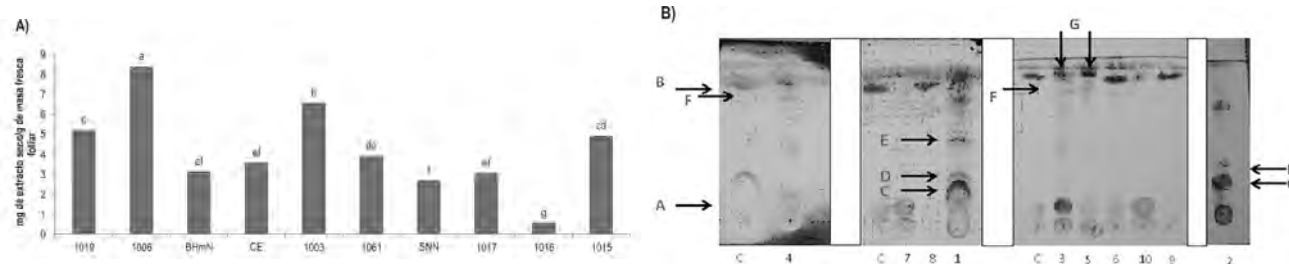


Figura 2 A. Rendimiento de la extracción en mg de extracto seco·g⁻¹ de masa fresca foliar de los exudados obtenidos en 500 mL de etanol 90 %: a partir de las 10 líneas B: Cromatografía en capa fina para la separación de los extractos crudos C: Se utilizó como control el extracto etanólico obtenido de la línea 1061 en el experimento 1 de diferentes solventes. 1: CE, 2: SNN, 3: Nic 1017, 4: Nic 1019, 5: BHmN, 6: Nic 10103, 7: Nic 1061, 8: Nic 1015, 9: Nic 1016, 10: Nic 1006. Se señalan con letras A-G diferentes compuestos revelados. Medias con letras diferentes representan diferencias significativas entre líneas de tabaco (Anova de un factor y Tukey en un análisis estadístico realizado en SPSS para p≤0.05, n=6).

resistencia a patógenos (Sheperd *et al.*, 2005). En este caso con el uso de solventes de mediana polaridad se favorece la extracción de los metabolitos secundarios mayoritarios de la superficie foliar como diterpenos y ésteres de azúcares. Debido a que las filoplaninas son compuestos polares, sólo extracciones acuosas permitirían obtener filoplaninas en los extractos, por lo que no se espera la presencia de estas en los extractos obtenidos (Sheperd *et al.*, 2005).

Todos los extractos son seleccionados para la evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* contra las bacterias patógenas: *Xanthomonas campestris* y *Pectobacterium carotovorum*.

Experimento 3: Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de tabaco frente a bacterias fitopatógenas.

En la determinación de la actividad antibacteriana de extractos obtenidos para la comparación de diferentes solventes frente a *Xc* y *Pc*, la línea Nic 1061 mostró su capacidad para inhibir el crecimiento de *Xc* con todos los extractos (tabla 2). Un análisis de los halos de inhibición no reveló diferencias significativas entre los extractos que provocaron una inhibición de 2,0 cm de diámetro aproximadamente. Esto evidencia dos resultados: los extractos de la línea Nic 1061 inhiben el crecimiento de *Xc* y los solventes evaluados son capaces de extraer el compuesto activo o los compuestos activos en cantidades similares.

La kanamicina utilizada como control positivo, provocó una inhibición de 3,0 cm de diámetro significativamente diferente a la de los extractos para el caso de *Xc*. Sin embargo, en el ensayo contra *Pc* no se mostró inhibición del crecimiento por los extractos, y una menor inhibición provocada por la kanamicina de aproximadamente 2,0 cm de diámetro. El uso de la kanamicina sólo nos permite en ensayos *in vitro*, lograr un indicador de inhibición del crecimiento en bacterias susceptibles a ella, pero este antibiótico no es utilizado *in vivo*, además de que no es posible realizar una comparación real de su efecto con el efecto que podrían

ocasionar los extractos crudos, que se conforman por una mezcla de compuestos. Otros autores han utilizado la kanamicina y otros antibióticos en ensayos *in vitro* de antibiogramas (Pino *et al.*, 2012; Owooseni y Sangoyomi, 2014). En próximos experimentos la kanamicina podría utilizarse en concentraciones más bajas para evitar influencia de esta sobre los discos evaluados en un reducido espacio de la placa, también un menor número de discos pueden ser evaluados por placa para evitar solapamiento de halos si los productos aplicados muestran una gran inhibición del crecimiento bacteriano.

El dimetilsulfóxido utilizado para disolver los extractos secos, no mostró inhibición del crecimiento al evaluarse como control negativo lo que demuestra la no interferencia de este disolvente en los resultados obtenidos y su uso eficaz para estos experimentos.

Geetha *et al.* (2013) comprobaron que el dimetilsulfóxido resultó ser el más seguro, en una comparación entre disolventes para detectar efectos fitotóxicos y presencia de compuestos bioactivos.

La semejanza encontrada en los ensayos de inhibición para los extractos obtenidos a partir del uso de diferentes solventes apoya la idea de sustituir el diclorometano por el etanol 90 % en este propósito en particular, ya que corrobora que se han extraído los mismos compuestos que tienen propiedades antibacterianas contra *Xc*. Esta línea mostró actividad sólo para una bacteria lo cual indica que todos los extractos deben ser evaluados contra las dos bacterias y sugiere la existencia de diferentes compuestos activos para la interacción con diferentes bacterias.

En la determinación de la actividad antibacteriana de extractos obtenidos para la comparación de líneas de tabaco frente a *Xc* y *Pc* se observó que todos los extractos crudos evaluados mostraron menor halo de inhibición en comparación con la kanamicina en los ensayos de ambas bacterias (figura 3). Para el caso de *Xc* los mejores extractos se obtuvieron a partir de las líneas Nic 1019 (4), BHmN (5), Nic 1061 (7) and Nic 1016 (9), mientras que para el caso de *Pc* sólo el

Tabla 2. Efecto antibacteriano *in vitro* de extractos de exudados foliares de tabaco (*N. tabacum* L.), línea Nic 1061 obtenidos con el empleo de diferentes solventes contra las bacterias fitopatógenas *Xanthomonas campestris* (*Xc*) y *Pectobacterium carotovorum* (*Pc*). La zona de inhibición se determina por el diámetro expresado en centímetros (cm) e incluye el diámetro del disco (0,7cm). K: kanamicina como control positivo (500 µg).

Bacterias	Solventes utilizados y diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano (cm), Línea Nic 1061					
	Etanol 90%	Diclorometano	n-Butanol	Metanol	Acetato de etilo	K
X. c	2,1 b	2,2 b	1,7 b	2,1 b	2,1 b	3,0 a
P. c	ni	ni	ni	ni	ni	2,5 a

Medias con letras diferentes representan diferencias significativas entre solventes y kanamicina para cada bacteria independiente. (Anova de un factor y Tukey en un análisis estadístico realizado en SPSS para $p \leq 0.05$, $n=6$).

extracto de la línea Nic 1015 (8) mostró efecto inhibitorio (tabla 3) (figura 3). Entonces es posible obtener extractos activos contra estas dos bacterias utilizando solventes más comunes, menos tóxicos y más baratos que el diclorometano.

Para el ensayo de diferentes concentraciones menores a 500 µg/disc se seleccionaron los extractos de las líneas BHmN (5), Nic 1061 (7) and Nic 1016 (9) contra *X. campestris* y el extracto de la línea Nic 1015 (8) contra *P. carotovorum*. Los extractos 7 y 8 mostraron inhibición de las bacterias *X. campestris* y *P. carotovorum* respectivamente a la concentración de 5 µg/disc con diferencias significativas con concentraciones entre 300 y 500 µg/disc para la línea Nic 1061 y entre 400 y 500 µg/disc para la línea Nic 1015 (tabla 4).

Shobha y Kale (2008) encontraron extractos activos *in vitro* contra bacterias y hongos patógenos del suelo, entre ellos *Xanthomonas campestris* y *Erwinia carotovora*, pero a partir de preparaciones obtenidas de exudados de la lombriz de tierra *Eudrilus Eugeniae*.

Experimentos similares se llevaron a cabo por Owoeni y Sangoyomi (2014) en la búsqueda de solventes eficientes para obtener extractos de plantas activos contra la bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum* que afecta a miembros de la familia *Solanaceae* y mostraron extractos más activos *in vitro* a partir del cloroformo, seguido del metanol y el etanol con diámetros del halo de inhibición entre 0,8 y 1,5 cm.

Seo *et al.* (2012) identificaron dos diterpenos naturales presentes en tabaco (esclareol y cis-abienol) que

Tabla 3. Efecto antibacteriano *in vitro* de extractos etanólicos (500 µg) de exudados foliares de tabaco (*N. tabacum* L.) (10 líneas) contra las bacterias fitopatógenas *Xanthomonas campestris* (*Xc*) y *Pectobacterium carotovorum* (*Pc*). La zona de inhibición se determina por el diámetro expresado en centímetros (cm) e incluye el diámetro del disco (0,7cm). K: kanamicina como control positivo (500 µg).

Líneas de tabaco evaluadas y diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano (cm)											
Bacterias	CE	SNN	Nic 1017	Nic 1019	BHmN	Nic 1003	Nic 1061	Nic 1015	Nic 1016	Nic 1006	K
<i>X.c</i>	1,3 c	1,3 c	1,4 c	1,7 b	1,7 b	1,5 c	1,9 b	1,4 c	1,8 b	1,5 c	3,3 a
<i>P.c</i>	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	1,6 b	ni	ni	2,6 a

Medias con letras diferentes representan diferencias significativas entre líneas de tabaco y kanamicina para cada bacteria independiente (Anova de un factor y Tukey en un análisis estadístico realizado en SPSS para p≤0.05, n=6).

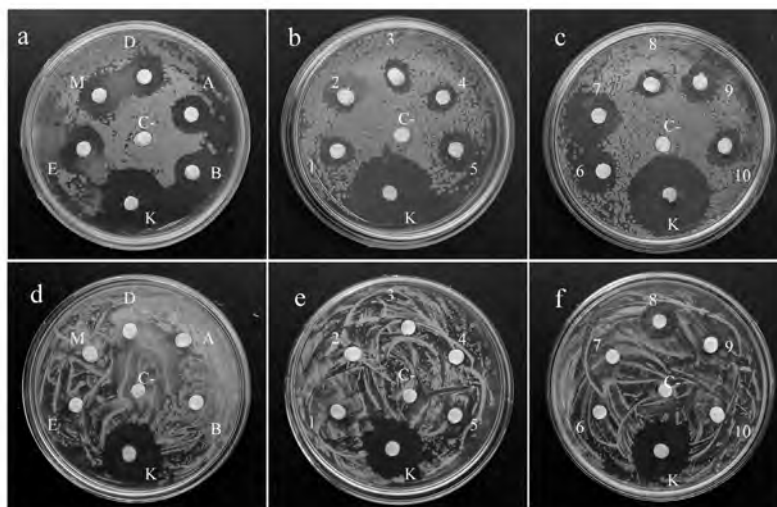


Figura 3. Efecto antibacteriano *in vitro* de extractos crudos (500 µg) de exudados foliares de tabaco (*N. tabacum* L.) por el método difusión en agar con discos de papel de filtro contra dos bacterias fitopatógenas *Xanthomonas campestris* (A, B, C) y *Pectobacterium carotovorum* (D, E, F) determinado por el halo de inhibición de crecimiento bacteriano. Extractos obtenidos con cinco solventes (E: etanol 90 %, M: metanol, D: diclorometano, A: acetato de etilo, B: n-butanol) línea Nic 1061 contra *Xanthomonas campestris* (a) y *Pectobacterium carotovorum* (d). Extractos etanólicos obtenidos a partir de 10 líneas de tabaco 1: CE, 2: SNN, 3: Nic 1017, 4: Nic 1019, 5: BHmN, 6: Nic 10103, 7: Nic 1061, 8: Nic 1015, 9: Nic 1016, 10: Nic 1006 contra *Xanthomonas campestris* (b, c) y *Pectobacterium carotovorum* (e, f). K: kanamicina como control positivo 500 µg. C-: dimetilsulfóxido como control negativo.

Tabla 4. Efecto antibacteriano *in vitro* de diferentes concentraciones de extractos etanólicos de exudados foliares de tabaco (*N. tabacum* L.) de líneas seleccionadas por su actividad antibacteriana contra las bacterias fitopatógenas *Xanthomonas campestris* (Xc) y *Pectobacterium carotovorum* (Pc). La zona de inhibición se determina por el diámetro expresado en centímetros (cm) e incluye el diámetro del disco (0,7 cm). K: kanamicina como control positivo (500 µg).

Cantidad de extracto aplicada en cada disco de papel de filtro (µg) diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano (cm)											
Bacterias	Líneas	5	25	50	75	100	200	300	400	500	K
Xc	BHmN	ni	1,0 c	1,1 c	1,4 bc	1,5 bc	1,4 bc	1,6 b	1,6 b	1,6 b	3,0 a
	Nic 1061	0,9 c	0,9 c	1,3 bc	1,4 bc	1,5 bc	1,5 bc	1,8 b	1,8 b	1,8 b	3,1 a
	Nic 1016	ni	0,8 c	1,2 bc	1,3 bc	1,5 b	1,6 b	1,5 b	1,5 b	1,6 b	2,9 a
Pc	Nic 1015	0,8 c	0,9 bc	1 bc	0,9 bc	1 bc	1,0 bc	1,0 bc	1,4 b	1,4 b	1,9 a

Medias con letras diferentes representan diferencias significativas entre concentraciones para cada línea de tabaco independiente (Anova de un factor y Tukey en un análisis estadístico realizado en SPSS para $p \leq 0.05$, $n=6$).

inhibieron la enfermedad provocada por *Ralstonia solanacearum* en plantas de tabaco, tomate y *Arabidopsis* después de aplicado el producto a las raíces sin haber mostrado actividad antibacteriana. Lo que sugiere que es posible que los terpenos presentes en los extractos crudos estén involucrados en la respuesta antibacteriana pero según el mecanismo de acción estos podrían servir como inductores de defensa en la planta aun cuando no hayan mostrado una inhibición directa del crecimiento bacteriano.

La selección de candidatos para obtener extractos crudos que tengan efecto inhibitorio sobre las bacterias fitopatógenas de interés se basa como primer criterio, en que estos extractos etanólicos muestren un efecto inhibitorio *in vitro* de los patógenos. Otros criterios a tener en cuenta es que la planta, en el proceso de extracción, presente grandes rendimientos de los metabolitos en general, así como también algunos indicadores morfológicos que pudieran guardar relación con la síntesis del producto natural. Sin embargo, aun cuando el número de hojas es de los más bajos y los rendimientos son intermedios, según nuestros resultados para el control de *P. carotovorum* el extracto obtenido de la línea Nic 1015 se selecciona como candidato potencial por ser el único que mostró una evidente inhibición del crecimiento de la bacteria. Para el caso de *X. campestris*, cuatro extractos muestran similar efecto inhibitorio, por lo que este criterio en combinación con los resultados en número de hojas, y rendimiento, nos lleva a la selección de la línea Nic 1061 con mayor número de hojas y rendimiento intermedio. No obstante las líneas Nic 1019, BHmN y Nic 1016 también pueden considerarse como candidatos potenciales para la obtención de exudados foliares etanólicos en el control de *X. campestris*. Una combinación de un solo producto a partir de estos extractos seleccionados pudiera dar un buen resultado en el control de ambas bacterias.

Conclusiones

Se seleccionó el etanol 90% como mejor solvente para la obtención de extractos crudos provenientes de exudados foliares de tabaco y se obtuvieron extractos crudos etanólicos a partir de exudados foliares de líneas de tabaco que mostraron una diversidad química en cuanto a concentración, composición y rendimiento, además de actividad antibacteriana *in vitro* contra las bacterias fitopatógenas evaluadas: *X. campestris* y *P. carotovorum* para algunos casos. Estos resultados sugieren el uso potencial de los extractos etanólicos obtenidos a partir de las líneas Nic 1061 y Nic 1015 como mejores candidatos contra *X. campestris* y *P. carotovorum* respectivamente como un efectivo agente para la protección de cultivos, previa evaluación en condiciones *in vivo* en invernadero y en campo como alternativa al uso de bactericidas químicos para la protección de cultivos de interés agrícola.

Referencias bibliográficas

- Akers, C. P., Weybrew, J. A., y Long, R. C. (1978). Ultrastructure of glandular trichomes of leaves of *Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi. *American Journal of Botany*, 65, 282-292.
- Amme, S., Rutten, T., Melzer, M., Sonsmann, G., Vissers, J.P.C., Schlesier, B., y Mock, H. P. (2005). A proteome approach defines protective functions of tobacco leaf trichomes. *Proteomics*, 5, 2508-2518.
- Bailey, J. A., Burden, R. S., y Vincent, G. G. (1975). Capsidiol: An antifungal compound produced in *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana clevelandii* following infection with tobacco necrosis virus. *Phytochemistry*, 14, 597.
- Celis, A., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., y Cuca L.E. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia *Piperaceae*. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26 (1), 97-106.
- Chang, S. Y., y Grunwald, C. (1980). Structural organization of tobacco leaf polar cuticular lipids. *Botanical Gazette*, 141(4), 360-365.
- Commission Regulation (EU) No 276/2010 of 31 March 2010. Official Journal of the European Union, L 86/11. Consultado el: 02-07-2014.

- Cristanini, G. (1995). La producción de posturas en sistemas flotantes (float system)/ hidropónicos. *L' informatore agrario/ supplemento*. 51 (5), 43-53.
- Cui, H., Zhang, S., Yang, H., Ji, H., y Wang, X. (2011). Gene expression profile analysis of tobacco leaf trichomes. *BMC plant biology*, 11:76.
- Cutler, H. G., Severson, R. F., Cole, P. D., Jackson, D. M., y Johnson, A. W. (1986). Secondary metabolites from higher plants in M.B. Green and P.A. Hedin (eds.). *Natural Resistance of Plants to Pests: Roles of Allelochemicals. American Chemical Society Symposium Series No. 296*, Washington, D.C. 178-196.
- Eklund, A. M., Forsblom, I., Berg, J. E., Damberg, C., y Wahlberg, I. (1998). Tobacco chemistry. Four new cyclized cembranoids from tobacco. *Acta Chemica Scandinavica*, 52, 1254-1262.
- Geethaa, S., Thavamany, P. J., Chiew, S. P., y Thong, O. M. (2013). Interference from ordinarily used solvents in the outcomes of *Artemia salina* lethality test. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 4 (4), 179-182.
- International Labour Organization (ILO). (2005). International Occupational Safety and Health Information Centre (CIS). International Chemical Safety Cards [en línea]. [Geneva, Switzerland]: abril 2000; actualizado abril 2005 [citado julio de 2007]. DICHLOROMETHANE. <http://www.ilo.org/public/english/protection/safework/cis/products/icsc/dtash/index.htm>. Consultado 07-07-14.
- Jackson, D. M., Chorlyk, O. T., Stephenson, M. G., Johnson, A. W., Harlow, C. D., Simmons, A. M., y Sisson, V. A. (1998). Potential of *Nicotiana* species for production of sugar esters. *Tobacco Science*, 42 (1), 1-9.
- Lara, F. M., y Landero N. (2012). Químicos vegetales: alternativa contra los agentes patógenos. *Cienc. hombre*, XXV (1). Enero-Abril.
- Lin, Y., y Wagner G. J. (1994). Rapid and simple method for estimation of sugar esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1709-1712.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S., Machado, M., Toth, I., Salmond, G., y Foster, G. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(6), 614-629.
- Martínez, S., Terrazas, E., Álvarez, T., Mamani, O., Vila, J., y Mollinedo, P. (2010). Actividad antifúngica *in vitro* de extractos polares de plantas del género *baccharis* sobre fitopatógenos, *Revista Boliviana de Química*, 27(1), 13-18.
- Ohnishi, A., Chinju, M., y Katö, K. (1983). Isolation and characterization of cuticular polyester from the leaf of *Nicotiana tabacum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47(5), 975-981.
- Owoseni, A. A., y Sangoyomi, T. E. (2014). Effect of Solvent Extracts of Some Plants on *Ralstonia solanacearum*. *British Microbiology Research Journal*, 4(1), 89-96.
- Pino, O., Sánchez, Y., Rojas, M.M, Abreu, Y., y Correa, T.M. (2012). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimpinella anisum* L. *Revista Protección Vegetal*. 27 (3), 181-187.
- Reuveni, M., Tuzun, S., Cole, J. S., Siegel, M. R., Nesmit, W. C., y Kué, J. (1987). Removal of duvatrienediols from the surface of tobacco leaves increases their susceptibility to blue mold. *Physiological and molecular plant pathology*, 30(3), 441-451.
- Rossberg, M., Lendle, W., Pfeleiderer, G., Tögel, A., Dreher, E. L., Langer, E., Rassaerts, H., Beck, U., Lipper, K. A., Torkelson, T.R., Löser, E., Beutel, K. K., y Mann, T. (2006). "Chlorinated Hydrocarbons" in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim. doi:10.1002/14356007.a06_233.pub2.
- Sallaud, C., Giacalone, C., Topfer, R., Goepfert, S., Bakaher, N., Rosti, S., y Tissier, A. (2012). Characterization of two genes for the biosynthesis of the labdane diterpene Z-abienol in tobacco (*Nicotiana tabacum*) glandular trichomes. *The Plant Journal*, 72(1), 1-17.
- SCOEL recommendations from The Scientific Committee on Occupational Exposure Limits (SCOEL) for Methylene Chloride (Dichloromethane). SCOEL/SUM/130, June (2009). European Commission Employment, Social Affairs & Inclusion Health and Safety at work. p. 38. Consultado 22-07-2014.
- Seo, S., Gomi, K., Kaku, H., Abe, H., Seto, H., Nakatsu, S., Neya, M., Kobayashi, M., Nakaho, K., Ichinose, Y., Mitsuahara, I., y Ohashi, Y. (2012). Identification of Natural Diterpenes that Inhibit Bacterial Wilt Disease in Tobacco, Tomato and Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 53(8), 1432-1444.
- Severson, R. F., Arrendale, R. F., Chorlyk, O. T., Johnson, A. W., Jackson, D. M., Gwynn, G. R., Chaplain, J. F., y Stephenson M. G. (1984). Quantitation of the major cuticular components from green leaf of different tobacco types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(3), 566-570.
- Shepherd, R. W., Bass, W. T., Houtz, R. L., y Wagner, G.J. (2005). Phytoplanins of Tobacco Are Defensive Proteins Deployed on Aerial Surfaces by Short Glandular Trichomes. *The Plant Cell*, 17(6), 1851-1861.
- Shobha, S. V., y Kale, R. D. (2008). *In vitro* Studies on Control of Soil-Borne Plant Pathogens by Earthworm *Eudrilis Eugeniae* Exudates. *Green Pages*. <http://www.eco-web.com/edi/080106.html>. Consultado 26-01-2014.
- Tissier, A. 2012. Glandular trichomes: what comes after expressed sequence tags?. *The Plant J.*, 70(11), 51-68.
- USDHHS. US Department of Health and Human Services. Toxicological Profile for Methylene Chloride. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. September (2000). Division of Toxicology/Toxicology Information Branch. p. 269. Consultado 16-07-2014.
- Valgas, C., Machado de Souza, S., Smânia, E. F. A., y Smânia, A. Jr. (2007). Screening Methods to determine Antibacterial Activity of Natural Products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 369-380.
- Wagner, G. J. (1991). Secreting glandular trichomes: More than just hairs. *Plant Physiology*, 96(3), 675-679.
- Wagner, G. J. (1999). Leaf Surface Chemistry In Tobacco: Production, Chemistry, and Technology; D. L. Davis and M. T. Nielsen, eds.; *Blackwell Science*: Cambridge, p. 292- 303.
- Wagner, G. J., Wang E., y Shepherd R. W. (2004). New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany*, 93(1), 3-11.
- Wang, E., Wang, R., Deparasis, J., Loughrin, J.H., Gan, S., y Wagner, G. J. (2001). Suppression of a P450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance. *Nature biotechnology*, 19(4), 371-374.
- Wang, E., Hall, J. T., y Wagner, G. J. (2004). Transgenic *Nicotiana tabacum* L. with enhanced trichome exudate cembratrieneols has reduced aphid infestation in the field. *Molecular Breeding*, 13, 49-57.
- Whitfield, M. B., (2004). Integrated Bioprocessing of Native and Engineered Components from Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Thesis for the Degree of Master of Science in the Crops Science, Department at North Carolina State University.
- Wollenberg, E., Dörsam, M., Dörr, M., Roitman, J. N., y Valant-Vetschera, K. M. (2005). Chemodiversity of Surface Flavonoids in *Solanaceae*. *Zeitschrift für Naturforschung C-Journal of Biosciences*, 60(9-10), 661-670.