

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMIA
POSTGRADO DE AGRONOMIA

“EFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE FLOR ESCONDIDA (*Phyllanthus niruri* L.) EN EL CONTROL DE *Xanthomonas phaseoli* (Mit.) Dowson EN CARAOTA (*Phaseolus vulgaris* L.)”.

Ing° Agr° Aída Luz Solano N.

Enero, 2012

Trabajo de grado presentado como requisito final para optar al título de *Magister Scientiarum* en Agronomía, orientación Protección Vegetal.

Inv. Anna Maselli
Tutor

RESUMEN

Con la finalidad de estudiar el efecto del extracto etanólico de flor escondida (*Phyllanthus niruri* L.) (EEFE) en el control de *Xanthomonas phaseoli* en plantas de caraotas (*Phaseolus vulgaris* L.), se determinó la concentración óptima del EEFE en el control de *X. phaseoli* en condición *in vitro*, evaluando el efecto del extracto sobre la germinación y emergencia de las semillas de caraotas y el control sobre la bacteria bajo condición *in vivo*, estableciendo cambios histológicos foliares causados por *X. phaseoli* en plantas tratadas con el EEFE. El ensayo se realizó en el laboratorio de bacteriología vegetal del edificio 2 de Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas- Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP) en Maracay, estado Aragua; para la concentración óptima del EEFE en el control de *X. phaseoli*, se utilizó el método de discos de papel en cajas petri con agar nutritivo (Lorian, 1980), partiendo de una suspensión bacteriana de concentración 1×10^8 ufc/ml, tomando 0,1 ml y esparciéndola en una placa con AN, impregnando discos de papel de filtro con el EEFE a tres concentraciones: 2,5; 5,0 y 10,0 %; incubadas a temperatura de 28 °C por 24 horas, estableciendo el mayor diámetro de halo inhibitorio sobre cada disco. El efecto del EEFE sobre la germinación y emergencias de las semillas se evaluó mediante una prueba de germinación estándar, embebiéndose las semillas por 1-5 minutos en el EEFE a concentración óptima, a partir de 7 días se evaluó porcentaje de germinación de semillas, tamaño de la radícula y parte aérea de las plántulas establecidos por la ISTA. El efecto del EEFE sobre el control de *X. phaseoli*, se estableció mediante un lote de 120 plantas distribuidas en los siguientes tratamientos: (T0) no inoculado y no tratado con EEFE; (T1) inoculado y no tratado con EEFE; (T2) no inoculado y tratado con EEFE y (T3) inoculado y tratado con EEFE, la inoculación se realizó 30 dds y el EEFE se aplicó desde la siembra embebiendo las semillas y asperjando el follaje una hora antes y después de la inoculación con la bacteria; con aspersiones semanales hasta la fase de floración de la planta, estableciendo porcentaje de incidencia y grado de severidad (1-5) de la enfermedad, cuantificando las variables relacionadas con el rendimiento. Los cambios histológicos foliares, se determinaron mediante estudios de cortes transversales de la sección media de hojas de cada tratamiento bajo el microscopio óptico. La concentración al 10 % del EEFE de flor escondida, inhibió el crecimiento de *X. phaseoli*, logrando ocho veces más diámetro inhibitorio que las concentraciones de 2.5 y 5.0 % respectivamente; las plantas tratadas con el EEFE mostraron mayor porcentaje de germinación en comparación a las no tratadas, siendo los metabolitos secundarios presentes en el EEFE como: alcaloides, flavonoides, fenoles, saponinas y aceites esenciales; compuestos biológicamente activos los cuales podrían beneficiar la germinación de semillas y el crecimiento de las plantas; no causando efecto fitotóxico ni alelopático sobre la germinación de las semillas, de igual manera se evidenció efecto inhibitorio del EEFE sobre *X. phaseoli*, puesto que los tratamientos no aplicados el EEFE presentaron los más altos valores de porcentaje de incidencia y grados de severidad de la enfermedad, las variables de interés agronómico mostraron los más altos valores en los tratamientos aplicados el extracto. En relación a los cambios histológicos foliares se evidenció aumento del grosor de la cutícula más la pared externa de las células epidérmicas, densidad estomatocítica y de tricomas en ambas epidermis; siendo mayor en la epidermis abaxial; además se determinó diferencias en el grosor del parénquima de empalizada y esponjoso en plantas tratadas y no tratadas con el EEFE.

Palabras claves: Extractos etanolicos, *Xanthomona phaseoli*, flor escondida y *Phyllanthus niruri*.

SUMMARY

In order to study the effect of ethanol extract hidden flower (*Phyllanthus niruri* L.) (EEFE) in the control of *Xanthomonas phaseoli* in beans plants (*Phaseolus vulgaris* L.), we determined the optimal concentration in the control EEFE *X. phaseoli* *in vitro* condition, assessing the effect of the extract on germination and emergence of seeds of beans and control the bacteria under *in vivo* conditions, establishing leaf histological changes caused by *X. phaseoli* in plants treated with the EEFE. The trial was conducted in the laboratory of plant bacteriology of building 2 of Plant Protection, National Agricultural Research Institute, National Center for Agricultural Research (INIA-CENIAP) in Maracay, Aragua state, for the optimum concentration of the control EEFE *X. phaseoli*, we used the method of paper discs in Petri dishes with nutrient agar (Lorian, 1980), from a bacterial suspension of concentration 1×10^8 cfu / ml, using 0.1 ml and spreading on a plate with AN, impregnating disks filter paper with the EEFE at three concentrations: 2.5, 5.0 and 10.0%; incubated at temperature of 28 ° C for 24 hours, establishing the largest diameter of inhibitory halo on each disk. The effect of EEFE on germination and seed emergencies was assessed using a standard germination test, imbed the seeds for 1-5 minutes in the EEFE to optimum concentration from 7 days were evaluated seed germination percentage, size of the radicle and shoot of seedlings established by the ISTA. The effect of EEFE on control of *X. phaseoli*, was established through a batch of 120 plants distributed in the following treatments: (T0) uninoculated and untreated with EEFE; (T1) inoculated and not treated with EEFE; (T2) uninoculated and treated with EEFE and (T3) inoculated and treated with EEFE, inoculation was performed 30 dap and EEFE was applied from sowing seed soaking and spraying the foliage one hour before and after inoculation with bacteria, with weekly sprays until the flowering stage of plant, establishing the percentage of incidence and severity (1-5) of the disease, quantifying the performance-related variables. Foliar histological changes, were determined through studies of cross sections of the middle section of leaves of each treatment under the optical microscope. The concentration of 10% of EEFE hidden flower, inhibited the growth of *X. phaseoli*, achieving eight times more inhibitory diameter that concentrations of 2.5 and 5.0% respectively; the plants treated with the EEFE showed higher germination percentage compared to the untreated, being the secondary metabolites present in the EEFE as: alkaloids, flavonoids, phenols, saponins and essential oils, biologically active compounds which could benefit seed germination and plant growth, causing no phytotoxic or allelopathic effect on seed germination, just as is evidenced EEFE inhibitory effect on *X. phaseoli*, since the EEFE treatments applied had the highest incidence rate values and degrees of disease severity, agronomic variables showed the highest values in the treatments applied the extract. In relation to the histological changes were evidenced leaf thickening of the cuticle over the outer wall of epidermal cells, trichomes and stomatal density in both epidermis, being higher in the abaxial epidermis, also was determined differences in the thickness of the parenchyma palisade and spongy plants treated and not treated with the EEFE.

Keywords: ethanolic extracts, *Xanthomona phaseoli*, flower hidden and *Phyllanthus niruri*.

DEDICATORIA

Entre ángeles y querubines, Dios escogió el mejor pedacito de vida, que a mí mundo llegó, llenando de sonrisas cada mañana, al verte despertar, cargarte y sentir tu tibia piel, han sido los momentos más hermosos y eternos de mi vida, y jamás olvidare que Dios te envió a dar alegría a mi ser. Eres fuente de mi vida, luz de mi camino, el motor que impulsa el logro de mis sueños, quien me motiva a ser una mejor persona cada día y ser tu gran ejemplo...

Para mi pequeño Marcos Eloy...

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la luz que guía mis pasos y la sabiduría para elegir lo correcto para triunfar.

A mis padres, quienes me enseñaron con amor a luchar por mis sueños.

A mis hermanos, quienes me han brindado su cariño y apoyo fraternal.

A mis sobrinos, por se parte de mi vida.

A mí esposo, por ser mi gran amor, compañero y más grande apoyo, quien camina junto a mí, cuidando cada uno de mis pasos.

Un especial agradecimiento al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT), adscrito al Ministerio del Poder Popular para la Ciencia y Tecnología, por su apoyo financiero brindado.

A la Inv. Anna Maselli, por haber confiado en mí para la realización de este trabajo, por su apoyo incondicional, orientación oportuna, su amistad y gran apoyo.

Al personal del laboratorio de Bacteriología vegetal del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-CENIAP), Maracay.

Al Ing. Jorge Ugarte del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la U.C.V.- FAGRO.

A todos quienes de una u otra manera hicieron posible este sueño...

Muchas gracias

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Titulo.....	i
Trabajo como requisito para optar por el titulo <i>Magíster Scientiarum</i>	ii
Veredicto.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Resumen.....	vi
Summary.....	viii
Tabla de contenido.....	ix
Tabla de cuadros.....	xii
Tabla de figuras.....	xiv
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	3
ANTECEDENTES.....	4
Generalidades sobre <i>Xanthomonas phaseoli</i> (Mit.) Dowson (<i>Xp</i>).....	4
Sintomatología de la quemazón bacteriana de la caraota causada por <i>X. phaseoli</i>	5
Descripción de <i>X. phaseoli</i>	5
Diseminación de <i>X. phaseoli</i>	6
Supervivencia del patógeno <i>X. phaseoli</i>	6
Efecto de <i>X. phaseoli</i> sobre la fisiología de las plantas	8
Efecto sobre la fotosíntesis.....	8
Efecto sobre la transpiración.....	8
Métodos de control de <i>Xanthomonas phaseoli</i>	9
Biológico.....	9
Químicos.....	9
Culturales.....	10
Mecanismos de acción de los metabolitos secundarios en la interacción planta-patógeno.....	10
Mecanismos constitutivos.....	11

Defensa Pasiva.....	11
Defensa activa.....	12
Mecanismos Inducidos.....	13
Investigaciones sobre control de patógenos a partir de metabolitos secundarios.....	14
Investigaciones sobre control de bacterias a partir de metabolitos secundarios (MS)	16
Generalidades de la flor escondida (<i>Phyllanthus niruri</i> L.).....	18
Investigaciones sobre control de patógenos a partir de EEFE.....	19
Efecto de algunos extractos vegetales sobre la germinación de las semillas.....	20
Efecto alelopático de algunos extractos vegetales.....	21
Potencial osmótico como factor de interferencia en el efecto alelopático.....	23
Importancia de los estudios anatómicos en la interacción planta-patógeno en <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	24
MATERIALES Y METODOS.....	26
Determinación de la concentración óptima del EEFE en el control in vitro de <i>X. phaseoli</i> (Mit) Dowson.....	26
Obtención y preparación del EEFE.....	26
Preparación de la suspensión bacteriana de <i>X. phaseoli</i>	26
Determinación de la concentración óptima del EEFE para la inhibición de la bacteria <i>X. phaseoli</i>	27
Evaluación del efecto del EEFE sobre la germinación de semillas de caraota (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad comercial “Tacarigua”.....	28
Determinación de la concentración osmótica del EEFE.....	28
Evaluación del efecto del EEFE en el control de <i>X. phaseoli in vivo</i> bajo condición de umbráculo.....	29
Inoculación de la bacteria <i>X. phaseoli</i> en las plantas de caraotas.....	30
Aplicación del EEFE en plantas de caraotas.....	30
Evaluación del efecto del EEFE sobre plantas de caraotas.....	30
Evaluación del efecto de los tratamientos aplicados sobre la anatomía foliar de plantas de caraota.....	32

ANALISIS ESTADISTICO.....	33
RESULTADOS Y DISCUSION.....	34
Concentración óptima del EEFE en el control de <i>X. phaseoli</i>	34
Metabolitos secundarios presentes en el EEFE.....	35
Evaluación del efecto del extracto etanólico de flor escondida sobre la germinación y emergencia de semillas de caraota.....	37
Determinación del efecto del potencial osmótico del EEFE sobre la germinación de semillas y emergencia de plántulas de caraotas.....	40
Efecto del EEFE en el control de <i>X. phaseoli</i> en condición de umbráculo.....	41
Cambios histológicos foliares causados por <i>X. phaseoli</i> en plantas de caraotas tratadas con EEFE.....	53
CONCLUSIONES.....	64
RECOMENDACIONES.....	65
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	66
ANEXOS.....	77

TABLA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Criterio utilizado para determinar el grado de severidad y % de infección de <i>Xanthomonas phaseoli</i>	31
Cuadro 2. Análisis de varianza para los halos de inhibición del EEFE sobre la bacteria <i>X. phaseoli</i> bajo condición <i>in vitro</i>	34
Cuadro 3. Inhibición del crecimiento de la bacteria <i>X. phaseoli</i> con el EEFE.....	35
Cuadro 4. Determinación y cuantificación de los grupos de metabolitos secundarios en EEFE.....	35
Cuadro 5. Análisis de varianza del EEFE sobre la germinación de las semillas de caraota variedad Tacarigua bajo condición <i>in vitro</i>	37
Cuadro 6. Análisis de varianza del efecto del EEFE sobre la emergencia de plántulas de caraota variedad Tacarigua bajo condición <i>in vitro</i> mediante las variables: largo y ancho de la radícula.....	38
Cuadro 7. Análisis de varianza del efecto del EEFE sobre la emergencia de plántulas de caraota variedad Tacarigua, bajo condición <i>in vitro</i> mediante el largo de la plántula.....	39
Cuadro 8. Análisis de varianza para la incidencia de la bacteria <i>X. phaseoli</i> (Mit) Dowson en plantas de caraotas en las semanas de evaluaciones.....	42
Cuadro 9. Análisis de varianza para los grados de severidad de la bacteria <i>X. phaseoli</i> en plantas de caraotas en las semanas de evaluaciones.....	44
Cuadro 10. Análisis de la varianza para la variable número de semillas/vainas en plantas de caraotas	46

Cuadro 11. Análisis de la varianza para la variable número de vainas/planta en plantas de caraotas.....	47
Cuadro 12. Análisis de la varianza para la variable largo de vainas/planta en plantas de caraotas.....	49
Cuadro 13. Análisis de la varianza para la variable ancho de vainas/planta en plantas de caraotas.....	50
Cuadro 14. Análisis de la varianza para la variable peso de semillas/planta en plantas de caraotas.....	52
Cuadro 15. Análisis de la varianza para las variables: espesor de la cutícula más la pared externa de las células epidérmicas adaxiales y abaxiales en los diferentes tratamientos.....	55
Cuadro 16. Análisis de la varianza para la variable densidad estomatica de la epidermis adaxial y abaxial en los diferentes tratamientos.....	57
Cuadro 17. Análisis de la varianza para la variable longitud estomatica de la epidermis adaxial y abaxial en los diferentes tratamientos.....	59
Cuadro 18. Análisis de la varianza para la variable densidad de tricoma de la epidermis adaxial y abaxial en los diferentes tratamientos.....	60
Cuadro 19. Análisis de la varianza para la variable parénquima de empalizada en los diferentes tratamientos.....	61
Cuadro 20. Análisis de la varianza para la variable parénquima esponjoso en los diferentes tratamientos.....	63

TABLA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Efecto del EEFÉ sobre la germinación de semillas de caraotas tratadas y no tratadas.....	37
Figura 2. Comparación de plántulas tratadas y no tratadas con EEFÉ. A. Largo de la radícula. B. Ancho de radícula.....	39
Figura 3. Largo de plántulas tratadas y no tratadas con EEFÉ	40
Figura 4. Efecto del potencial osmótico sobre la germinación de semillas de caraotas.....	41
Figura 5. Incidencia de la quemazón bacteriana causada por <i>X. phaseoli</i> en plantas de caraota tratadas con EEFÉ.....	43
Figura 6. Severidad de la quemazón bacteriana causada por <i>X. phaseoli</i> en plantas de caraota tratadas con EEFÉ.....	45
Figura 7. Comparación del número de semillas por vainas en los diferentes tratamientos.....	47
Figura 8. Comparación del número de vainas por planta en los diferentes tratamientos.....	48
Figura 9. Comparación del largo de vainas por planta en los diferentes tratamientos.....	49
Figura 10. Comparación del ancho de vaina por planta en los diferentes tratamientos.....	51

Figura 11. Comparación del peso de semillas por planta en los diferentes tratamientos.....	52
Figura 12. Detalle de la anatomía de la lamina foliar de T0 en sección transversal mostrando epidermis adaxial y abaxial, estomas paracíticos y densidad estomatica.....	53
Figura 13. Detalles de la anatomía de la lámina foliar en sección transversal, mostrando epidermis adaxial y abaxial, parénquima de empalizada y esponjoso.....	54
Figura 14. Comparación del grosor de la epidermis adaxial de la lamina foliar de los tratamientos evaluados.....	55
Figura 15. Comparación del grosor de la epidermis adaxial de la lamina foliar de los tratamientos evaluados.....	56
Figura 16. Comparación de la densidad estomatica de la lamina foliar de los diferentes tratamientos evaluados en ambas epidermis.....	58
Figura 17. Comparación de la longitud estomatica de la lamina foliar de los tratamientos evaluados en ambas epidermis.....	59
Figura 18. Comparación de la densidad de tricomas de la lamina foliar de los tratamientos evaluados en ambas epidermis.....	61
Figura 19. Comparación del grosor del parénquima de empalizada de la lamina foliar de los tratamientos evaluados.....	62
Figura 20. Comparación del parénquima esponjoso de la lamina foliar de los tratamientos evaluados.....	63

INTRODUCCION

La caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) constituye una de las once especies vegetales que alimentan al mundo, por cuanto aporta proteínas (22.7 %), grasas (1.6 %); además de calorías, vitaminas y sales minerales (Irigoyen y Garbagnoli, 1.997). América Latina es la zona, de mayor producción y consumo de este rubro, en esta zona se ubica el 30 % de la producción mundial (Santiago, 1.998). Esta leguminosa se ha destacado como la más usada en la dieta de la mayoría de los habitantes de países latinoamericanos y ha sido, junto con el maíz (*Zea mays* L.) y la yuca (*Manihot esculenta* Cranz), la base de la alimentación rural de Venezuela, donde se consume hasta tres veces por día (Salomón, 2.002).

La productividad de la caraota a nivel nacional ha decaído notablemente, esto debido a severas limitantes que determinan su bajo rendimiento entre las que se encuentra: una disminución considerable en la superficie sembrada, determinada por la falta de incentivos a los productores, y principalmente la alta incidencia de enfermedades fúngicas y bacterianas, transmitidas en su mayoría por las semillas. Entre estas últimas podemos mencionar la quemazón bacteriana ocasionada por *Xanthomonas phaseoli* (Mit.) Dowson, la cual ha producido pérdidas importantes en áreas productoras de este rubro en Venezuela y es considerada una de las de mayor importancia económica por su amplia distribución, su capacidad de reducir la productividad y el difícil control (Pastor y Schwartz, 1.995).

El uso de plaguicidas en cultivos de importancia económica como única estrategia de control de enfermedades ha generado un incremento en las mutaciones del componente patogénico otorgándole plasticidad genómica y por consiguiente, mayor resistencia a los agroquímicos comercialmente utilizados (Ramírez, 2001). Por esta razón los movimientos ecológicos a nivel mundial, han incentivado el uso de sustancias naturales para el control de plagas y enfermedades en vegetales, a tal punto que muchos productos de exportación deben adecuarse a condiciones de cultivos orgánicos como el caso de las hortalizas, generando la búsqueda de nuevas alternativas para el manejo de enfermedades y plagas agrícolas basado en el biocontrol, empleando bioproductos de origen vegetal, explorando el potencial presente en los metabolitos secundarios (Stauffer *et al.*, 2000).

Bajo esta premisa Venezuela la considera una preocupación mundial, generando normativas que regulen el uso de sustancias nocivas al medio ambiente, por lo que la constitución de la república bolivariana de Venezuela en su capítulo IX, “De los Derechos ambientales” en sus artículos 127 y 129, **instituyen que toda persona tiene derecho individual y colectivamente a disfrutar de una vida y de un ambiente seguro, sano y ecológicamente equilibrado, siendo una obligación fundamental del Estado, garantizar que la población se desenvuelva en un ambiente libre de contaminación.**

Por esta razón en el país se han venido realizando proyectos enmarcados bajo esta normativa que permitan promover la investigación y desarrollo de alternativas que disminuyan los riesgos para los seres humanos y el ambiente, siendo uno de ellos el proyecto: “Estudios y uso de biocontroladores en el manejo de plagas y enfermedades para la obtención de una agricultura sustentable con base biotecnológica” N° 2006000129 del BID-FONACIT-II; el cual tiene dentro de sus objetivos encontrar entre las plantas silvestres, algunas cuyos extractos tengan efecto fúngico y bactericida y puedan ser utilizados como una alternativa en el manejo de enfermedades en los cultivos sin impacto ambiental; siendo la base fundamental de la realización de este trabajo: evaluar el efecto del extracto etanólico de flor escondida sobre *Xanthomonas phaseoli* con los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL:

- Determinar el efecto del extracto etanólico de flor escondida (*Phyllanthus niruri* L.) (EEFE) en el control de *Xanthomonas phaseoli* (Mit.) Dowson en plantas de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad “Tacarigua”.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- ❖ Determinar la concentración óptima del EEFE para el control de *Xanthomona phaseoli*, en condición *in vitro*.
- ❖ Evaluar el efecto del EEFE sobre la germinación de semillas y emergencia de plántulas de caraota variedad comercial “Tacarigua”.
- ❖ Evaluar el efecto del EEFE en el control de *Xanthomonas phaseoli*, en plantas creciendo bajo condición *in vivo*.
- ❖ Describir los cambios histológicos foliares causados por *Xanthomonas phaseoli* en plantas de caraotas, tratadas con EEFE.

ANTECEDENTES

I.- Generalidades sobre *Xanthomonas phaseoli* (Mit.) Dowson (*Xp*)

A nivel mundial las leguminosas de grano son afectadas por numerosas enfermedades causadas por hongos y bacterias, estas últimas atacan la raíz y el follaje, causándoles graves daños que culminan con la muerte de las plantas (Subero, 1998). La bacteriosis más importante en el cultivo de la caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) es la “quemazón bacteriana”, llamada también añublo, tizón de la caraota, causado por *Xanthomonas phaseoli* (*Xp*), considerada como la enfermedad más frecuente e importante del cultivo. A nivel mundial las variantes común y fuscan, cepas estrechamente relacionadas de *Xp*, han ocasionado elevadas pérdidas en la producción de granos secos en países como África, Argentina, Australia, Brasil, Canadá, Colombia, Chile, Estados Unidos; Europa, Nueva Zelandia y Puerto Rico (Salomón, 2002). En Venezuela la quemazón bacteriana de la caraota fue señalada por Pontis Videla (1954) y Albarracin *et al.* (1982), quienes la señalan como una enfermedad de importancia económica en América del Sur y que debe tenerse en cuenta en las investigaciones referentes a esta enfermedad en países como Argentina, Brasil, Colombia y Venezuela.

Valarini y Mentel (1991) aseveraron que la quemazón bacteriana de la caraota es una enfermedad ampliamente distribuida y que aparece en cualquier lugar donde se cultive esta leguminosa; la misma debido a su amplia distribución, es capaz de reducir la productividad por su difícil control. Subero (1998) la consideró como una enfermedad devastadora en este cultivo durante la época húmeda, causando daños considerables en el follaje y necrosis severa de las vainas, llegando a producir marchitamiento y muerte de las plantas de forma violenta.

A.- Sintomatología de la quemazón bacteriana de la caraota causada por *X. phaseoli*

Los síntomas iniciales de la quemazón bacteriana de la caraota se inicia con pequeñas manchas acuosas sobre el envés de las hojas, las cuales aumentan de tamaño tomando formas irregulares que al unirse, la zona atacada se torna flácida y se rodea de un halo

amarillo delgado, que posteriormente se vuelve necrótica, llegando a producir defoliación y en algunos casos marchites, esta sintomatología puede ser parecida a una deficiencia hídrica (Agrios, 2007).

La bacteria puede penetrar también en los tejidos vasculares de las hojas y propagarse dentro del tallo, donde se observan diminutos puntos acuosos que crecen formando manchas, que se van expandiendo gradualmente en dirección longitudinal para luego tornarse oscuras, donde consumen el tejido provocando depresiones; sobre las vainas aparecen también pequeñas manchas acuosas que pueden extenderse, coalescer y volverse de color parduzco o rojizo conformen maduran, con frecuencia el sistema vascular de las vainas se infectan, lo cual hace que los tejidos internos cercanos queden acuosos, dando como resultado la infección de la semilla a nivel del punto de unión (funículo) con la vaina, las semillas que son infectadas cuando pasan por sus primeros estadios de desarrollo se pudren y arrugan o bien pueden mostrar varios grados de manchado y arrugamiento, dependiendo del clima y grado de infección. (Agrios, 2007).

B.- Descripción de *X. phaseoli*

La quemazón bacteriana de la caraota es causada por *X. phaseoli* y sus variantes fuscans [*X. phaseoli* var. fuscans (Burk) Starr *et* Burk], es una bacteria con forma de bastón corto, recto, sus dimensiones son 0.4 a 1.0 por 1.2 μm ; se caracteriza por presentar un solo flagelo polar, en medio artificial agar nutritivo (AN), las colonias bacterianas son de color amarillo claro, redondeadas, regulares y elevadas en el centro (Albarracin, 1982). Las especies de este género no forman esporas, son células simples, Gram negativas, aeróbicas, con reacción de catalasa negativa o débil positiva y oxidasa positiva; producen ácidos a partir de carbohidratos tales como arabinosa, glucosa, galactosa, trealosa, celobiosa y muy raras veces con sorbitol. Su crecimiento es óptimo en temperaturas alrededor de 25 a 30 °C (Agrios, 2007).

C.- Diseminación de *X. phaseoli* (*Xp*).

La infección por *Xp* se efectúa por los estomas, hidátodos y heridas, y generalmente la invasión es intercelular a través de los tejidos parenquimáticos; posteriormente invade todo los tejidos de la planta y alcanza la superficie de los frutos y de las semillas, a través de los haces vasculares (Trujillo, 1983). Las lluvias fuertes favorecen la penetración de la bacteria a la planta, ya que se produce ruptura en los tejidos parenquimáticos, lo cual facilita el acceso de la bacteria al interior de las células vegetales, invadiendo así completamente la planta (Agrios, 2007).

D.- Supervivencia del patógeno *Xanthomonas phaseoli* (*Xp*)

La semilla es la principal fuente de diseminación de *Xp*, debido a que ésta constituye el inóculo primario de la infección, se requieren solo 103.104 células bacterianas/semilla para contaminar plantas en condiciones de campo, se ha demostrado que a partir de una contaminación de 0,5 % en semillas, se puede ocasionar una epidemia seria en el cultivo (Trujillo, 1983). La bacteria sobrevive en semillas infectadas y permanece activa por más de 20 años, en residuos de hojas, tallos, frutos infestados que permanecen sobre el suelo o epifíticamente en otras plantas o malezas (Salomón, 2002).

Huerta y Rodríguez (1994) aseguraron que el potencial de supervivencia de la bacteria en el suelo es cercano a 70 días en la superficie del suelo y de 50 días cuando permanece enterrada; tiempo durante el cual su virulencia sólo es afectada ligeramente. Estos mismos autores concluyeron que los cultivos puros de *Xp*, son capaces de sobrevivir y conservar su virulencia hasta por 2 meses en el suelo libre de plantas, y por más de 6 meses cuando se encuentran en la rizosfera de malezas. La supervivencia del patógeno en el suelo de estación a estación se puede explicar por dos razones: la primera es que las células hipobióticas se colocan profundamente entre los tejidos en descomposición de los cultivos, los cuales no podrían ser fácilmente accesibles a la degradación y la segunda es que invernan en la rizosfera de malezas vivas no hospederas (Leben, 1981).

De igual manera se conoce que la bacteria *Xp*, puede crecer epifíticamente en hojas de especies de cultivos no hospedantes tales como: soya (*Glycine max* L. Merr.), maíz (*Zea mays* L.), remolacha (*Beta vulgaris* L.), caupí (*Vigna unguiculata* ssp. *unguiculata*) y malezas como: *Chenopodium album* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Solanum nigrum* L., *Ambrosia artemisiifolia* L. y *Echinochloa crugalli* (L) Beauvois (Catafi y Saettler, 1980).

La supervivencia de bacterias fitopatógenas en la rizosfera de plantas no hospederas es posible, debido a que los compuestos orgánicos que escapan o son secretados por la raíz, contienen azúcares, aminoácidos y otras partículas, que le sirven de alimento o como estimulantes, aunque también pueden ejercer un efecto contrario convirtiéndose en sustancias antibióticas (Bruehl, 1987).

E.- Efecto de *X. phaseoli* sobre la fisiología de las plantas (Agrios, 2007)

Efecto sobre la fotosíntesis

El hecho de que los patógenos interfieran con la fotosíntesis lo demuestra la clorosis que producen en muchas plantas infectadas y las lesiones necróticas. Las manchas foliares, tizones ó quemazones y otros tipos de enfermedades en las que son destruidos los tejidos de las hojas, la fotosíntesis disminuye debido a la reducción e incluso la muerte de la superficie foliar, disminuyendo la tasa fotosintética en particular durante las últimas etapas de la enfermedad, afectando los cloroplastos y ocasionando su degeneración. El contenido total de clorofila de las hojas se reduce pero al parecer, la actividad fotosintética del resto de la clorofila se mantiene sin alterar; debido a que la fotosíntesis disminuye debido a las toxinas que produce el patógeno, la cual inhiben la acción de algunas de las enzimas que intervienen directa ó indirectamente en el proceso fotosintético; en infecciones vasculares, los estomas permanecen parcialmente cerrados, ocasionando que el contenido de clorofila disminuya y la fotosíntesis se inhiba incluso antes del marchitamiento de la planta.

Efecto sobre la transpiración

En la quemazón bacteriana en donde la bacteria infecta las hojas, por lo general se produce un incremento en la transpiración, debido a una disminución parcial de la protección que la cutícula le brinda a la hoja, aumenta la permeabilidad de sus células y se presenta alteraciones en los estomas; cuando se presenta destrucción de la cutícula ó epidermis, da como resultado que las zonas afectadas sufran una pérdida incontrolable de agua, por ende la absorción y traslocación del agua ya no se llevara a cabo en las hojas, lo cual se marchitaran y perderán su turgencia; en donde la fuerza de succión de las hojas que transpiran en exceso aumenta normalmente y originan la desintegración y/o alteración de los vasos subyacentes a través de la producción de tilides y gomas.

F.- Métodos de control de *X. phaseoli*

Biológico

Los estudios que avalan la existencia de organismos controladores de *Xp* son escasos. Levy *et al.* (1992) reportaron que en aislamientos de *Rhizobium phaseoli* y *Pseudomonas fluorescens* ejercen cierta acción inhibitoria en el crecimiento de esta bacteria ya que pueden sintetizar algunos antibióticos no identificados que la afectan.

Guerra *et al.*, (2008) , trabajaron en la búsqueda de alternativas promisorias de control a la bacteria *Xanthomonas phaseoli* con bacterias aisladas de la rizosfera del cultivo, mediante confrontaciones a nivel *in vitro*, realizándose 137 aislamientos obteniéndose siete que resultaron antagonistas a la bacteria *X. phaseoli*. Las bacterias antagonistas fueron identificadas del género *Bacillus* sp., *Pseudomonas* spp., *Pseudomonas putida* Biovar A y *Pseudomonas fluorescens* Biovar III.

Químicos

El uso de plaguicida no ha sido eficiente en el control de *Xp*, sin embargo se ha logrado reducir la severidad de esta bacteria con productos a base de cobre (Cu) y azufre (S), no

obstante debe tenerse especial cuidado con las dosis de aplicación, ya que una dosis inadecuada traería como consecuencia la reducción de los rendimientos, debido a que estas sustancias en altas dosis detienen el crecimiento de las plantas (Reynolds *et al.* 1987).

El manejo de enfermedades mediante el uso de agroquímicos, representa entre el 20 y el 30 % de los costos de producción, tomando en consideración que los residuos tóxicos afectan el medio ambiente y la salud de los productores. El 57% de las importaciones de plaguicidas se producen en los países del tercer mundo, siendo las condiciones de manipulación de éstos muy precarias, en la cual los agricultores frecuentemente se exponen a los productos durante la preparación de las mezclas, en la aplicación en los cultivos, la limpieza de los equipos o en el almacenamiento de los productos, ocurriendo frecuentes casos de intoxicaciones o envenenamientos, tanto para el productor como su familia esta situación ha conducido a entes internacionales a establecer convenios y medidas con el propósito de reducir este problema (UNEP, 2004).

Culturales

La eliminación de malezas hospederas de *Xp*, restos de cosecha infectados y la rotación de cultivo, disminuyen las fuentes de inóculos primarios (Rincón y Ruiz, 1983), ya que pueden reducir la incidencia y diseminación de la bacteria, principalmente los cultivos en asociación los cuales se comportan como una barrera biológica en el movimiento físico de los patógenos por acción del viento y las lluvias (Van Rheenen *et al.* 1981).

II.- Mecanismos de acción de los metabolitos secundarios en la interacción planta-patógeno

Las plantas son organismos inmóviles que están obligados a discriminar entre los diferentes retos que les plantea su entorno y responder a ellos, estas respuestas a su ambiente biótico y abiótico les permiten la mejor distribución de sus recursos para crecer, reproducirse y defenderse (Nürnberg *et al.*, 2004). La propuesta de una función defensiva para los compuestos fitoquímicos se conoció hace un siglo, cuando en 1905, Marshall Ward postuló que los “anticuerpos” y las toxinas producidas por las plantas desempeñaban una función importante para frenar el proceso infeccioso; estos compuestos defensivos

podían encontrarse, preformados antes de la infección, sintetizados en respuesta a la misma y ser, por tanto inducibles o subsiguientes a la infección (Heil and Baldwin, 2002); estos mecanismos de defensa de las plantas tiene utilidad agronómica potencial, lo que ha despertado el interés de muchos grupos de investigación tanto públicos como privados, en el estudio de las bases moleculares y genéticas de la resistencia inducidas (Molina *et al.*, 2007).

Existe un extenso repertorio de “metabolitos secundarios” (MS), presentes en concentraciones variables en todos los tejidos vegetales adultos, cuya función primordial parece ser la defensa contra invasiones microbianas; a diferencia de las fitoalexinas estos compuestos se caracterizan por su estado permanente (Bunch, 1997).

Las plantas han desarrollado un amplio rango de estrategias para controlar los microorganismos invasores, conocidas comúnmente como respuestas de defensa o estrés, estos mecanismos de defensa de las plantas pueden ser divididos en dos categorías: mecanismos constitutivos y mecanismos inducidos por la infección (Medeiros *et al.*, 2003).

Mecanismos constitutivos

Defensa Pasiva

Tienen por misión servir de barrera inicial a la propagación de bacterias u hongos dentro de los tejidos de la planta, pueden ejercer una presión selectiva sobre los patógenos potenciales (Bermúdez, 1999), quienes con el tiempo desarrollan por mutación, mecanismos de resistencia y perpetúan así el ciclo de cambio por mutación en patógeno y hospedador, a ese fenómeno se debe en parte la enorme diversidad química de los productos naturales derivados de plantas, estos compuestos antipatógenos se alojan principalmente en la epidermis de los tejidos y órganos, o en el interior de las vacuolas (Bourgaud, 2001). La primera línea de defensa de las plantas frente al patógeno la constituye su propia superficie, que el patógeno debe penetrar para producir la infección, las defensas estructurales presentes en la planta antes de que se produzca el reconocimiento del patógeno están constituidas por la cantidad y tipo de ceras que cubren las células epidérmicas, la estructura

de la pared celular de éstas células, el tamaño, localización y forma de los estomas y lenticelas, y la presencia de estructuras especiales en la epidermis que dificultan la penetración de patógenos tales como pelos y espinas (Kniskern, 2001).

Las ceras presentes en la superficie de hojas y frutos actúan como repelentes del agua, previendo la formación de una película de humedad en la que los patógenos podrían depositarse, germinar (hongos) y multiplicarse (bacterias); una zona muy tupida de pelos en la superficie de la planta, puede ejercer este mismo efecto de repelente de agua y por lo tanto reducir la posibilidad de colonización de la superficie por parte del patógeno; una cutícula gruesa podría incrementar la resistencia a la infección, en aquellos casos en los que el patógeno sólo es capaz de producir infección cuando penetra en el interior del huésped; el grosor y composición de la pared celular son factores importantes en la generación de resistencias a la entrada de patógenos (Kniskern, 2001).

Defensa activa

Las defensas bioquímicas presentes en la planta antes de que se produzca el reconocimiento del patógeno, resultan mucho más efectivas que las defensas estructurales; las plantas producen una amplia variedad de sustancias a través de su superficie, especialmente en el caso de las raíces; algunos de los compuestos secretados son producidos exclusivamente por determinadas especies de plantas y parecen tener una función de inhibidores frente a determinado tipo de patógeno (Van Etten *et al.*, 1994).

Mecanismos Inducidos

A nivel estructural, los compuestos fenólicos son importantes para la defensa ya que constituyen los polímeros lignina y suberina. Ambos polímeros se sintetizan rápidamente alrededor del sitio de infección permitiendo aislar al patógeno del resto de la planta (Vivanco *et al.*, 2005). Este proceso de lignificación inducido por la infección, forma parte de la respuesta de defensa desarrollada por cereales, frente al ataque de hongos.

Las plantas además hacen uso de antibióticos, ya sean del grupo de los compuestos fenólicos, de los alcaloides o de los terpenoides, a diferencia de los sintéticos, los antibióticos naturales no tienen un modo de acción especie-específico, por lo atacan a las membranas celulares de los patógenos y para que sean efectivos, se requieren de altas concentraciones en la zona a defender (Bourgaud *et al.*, 2001). Ejemplos de antibióticos naturales son, dentro del grupo de los compuestos fenólicos, algunos isoflavonoides de leguminosas; de los terpenos están los sesquiterpenos, tales como el capsidiol, sintetizado por la planta de tabaco. Mientras que son pocos los alcaloides que puedan actuar como antibióticos, como ejemplo está el del benzofenantridina alcaloide escoulerina.

Las plantas también utilizan los MS como agentes de señalización durante la interacción con patógenos, tras la infección con un patógeno, algunas especies vegetales, tales como el tabaco, trigo, pepino y arroz; desarrollan una resistencia hacia otros patógenos, a esta resistencia se la ha denominado resistencia sistémica adquirida (SAR del inglés systemic acquired resistance), y puede ser transmitida desde una parte a otra de la misma planta (Lynn y Chang, 1990). Uno de los compuestos implicados en la transmisión de la señal es el ácido salicílico, un metabolito formado a partir del ácido cinámico. El ácido salicílico puede metilarse siendo así volátil, por lo que incluso permite activar la respuesta sistémica adquirida en las plantas vecinas.

III.- Investigaciones sobre control de patógenos a partir de metabolitos secundarios

En la naturaleza existen compuestos de origen vegetal que han sido poco estudiados por su actividad antipatogénica, como es el caso de los alcaloides, los cuales pertenecen a uno de los grupos de metabolitos secundarios más diversos que se encuentran en los organismos vivos, particularmente los alcaloides quinolizidínicos que se caracterizan por presentar un núcleo base quinolizidínico y constituyen un grupo importante de compuestos naturales en la familia Fabaceae, especialmente en los géneros: *Lupinus*, *Baptista*, *Thermopsis*, *Genista*, *Cytisus*, *Chamaecytisus*, *Laburman* y *Calia* (Wink, 2003). Por esta razón, Zamora *et al.*, (2005), determinaron el perfil de alcaloides en semillas de *Lupinus exaltatus*, y asimismo evaluaron *in vitro* la actividad antifúngica del extracto crudo de alcaloides y lupanina, en concentraciones de: 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mg/ml, contra *Sclerotium rolfsii*, *alternaria solani*,

Rhizoctonia solani y *Fusarium oxysporum*; logrando determinar que el crecimiento micelial de *S. rolfsii* fue inhibido en un 100 % con la concentración más alta del extracto crudo de alcaloides, mientras que *A. solani* y *R. solani*, la inhibición del micelio fue del 94,7 y 91 % respectivamente; la lupanina afecto únicamente a *S. rolfsii*, con la concentración más alta, mostrando una inhibición del crecimiento micelial del 89,5 %.

Determinados exudados producidos en la superficie de las hojas, son tóxicos para hongos, es el caso de los producidos por las plantas de tomate y caña de azúcar, que se producen en cantidades suficientes como para inhibir la germinación de las esporas de los hongos *Botrytis* y *Cercospora*, respectivamente; así mismo, en el caso de determinadas variedades de cebolla resistentes al hongo *Colletotricum circinans* se ha comprobado la secreción de compuestos fenólicos no producidos por las variedades susceptibles de cebolla; la presencia de fenoles y taninos, y de algunos compuestos derivados de ácidos grasos como algunos dienos, presentes a elevadas concentraciones en frutos jóvenes, hojas o en semillas, han sido propuestos como los responsables de la resistencia de ciertos tejidos más jóvenes a organismos fitopatógenos (Osborn, 1996). Muchos de estos compuestos actúan como inhibidores de numerosas enzimas hidrolíticas fúngicas, otros compuestos con actividad inhibitoria son las saponinas (compuestos esteroides y triterpenoides glucosilados) (Morrissey and Osborn, 1999).

Tappel y Marr (1954), señalan que muchas sustancias fenólicas son bactericidas ya que reaccionan químicamente con los sistemas sensitivos de las enzimas y las vuelve catalíticamente inactivas; entre los estudios que avalan la actividad bactericida ó bacteriostática de sustancias fenólicas se encuentra el trabajo de Velásquez (1983) quien evaluó *in vitro* el extracto etanólico de la resina de gobernadora (*Larrea tridentata*) contra la bacteria *Pseudomonas solanacearum* (Smith), demostrando un excelente efecto bactericida aun en dosis mínimas, lo cual demuestra que los fenoles son sustancias bioactivas que ejercen un efecto antagónico sobre algunas bacterias.

Ávalos y Pérez (2009) y Delgado *et al.*, (2003), los monoterpenos presentes en los aceites esenciales son compuestos que resultan menos perjudiciales que los fungicidas químicos,

desde el punto de vista ambiental y tienen un efecto sobre insectos plagas y microorganismos que afectan cultivos de importancia agrícola.

IV.- Investigaciones sobre control de bacterias a partir de metabolitos secundarios (MS)

Las enfermedades bacterianas se han controlado con productos químicos; los cuales representan actualmente un alto costo para el productor, la utilización de extractos vegetales, representaría una de las alternativas de control conducentes a reducir el uso de bactericidas químicos.

Stauffer *et al.* (2000), probaron 98 especies vegetales de 46 familias botánicas; 7 monocotiledóneas; 46 dicotiledóneas; 1 conífera; y 2 pteridofitas, para determinar su posible efecto fungicida y/o bactericida, con la factibilidad de ser utilizados en el control de enfermedades que afectan cultivos, de éstas el ajo (*Allium sativum*), cebolla (*Allium cepa*), quebracho colorado (*Shinopsis balansae*) y Eucalipto (*Eucalyptus sp*), demostraron potencialidad para la inhibición del crecimiento de la bacteria *Xanthomonas phaseoli in vitro*. Este efecto podría deberse a la presencia de MS tales como los taninos y a juicio de estos investigadores, los extractos de estas plantas deberían ser consideradas como tratamientos alternativos para el control de enfermedades bacterianas, ya que son una herramienta eficaz, que podría en un futuro disminuir los agroquímicos, por su condición de no ocasionar daños a la naturaleza y al hombre.

Stefanova *et al* (2005), determinaron el efecto *in vitro* de extractos metabólicos de hojas y tallos de *Bixa orellana*, *Gliricida sepium*, *Ocimum basilicum* y *Petiveria alliaceae*, frente a 14 aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, mostrando que el extracto de *B. orellana* posee efecto inhibitorio *in vitro* sobre las especies bacterianas probadas.

En Venezuela son escasos los trabajos realizados en biocontrol de bacteria, siendo la investigación de extractos vegetales en el control de bacterias fitopatógenas, como el primer reporte a nivel nacional realizado por Guevara *et al.*, (2000), quienes realizaron

ensayos para determinar el posible efecto de diferentes extractos vegetales sobre algunas bacterias patógenas del mango (*Mangifera indica*), lechoso (*Carica papaya*), banano (*Musa paradisiaca*) y girasol (*Helianthus annuus* L.); los resultados mostraron para *Erwinia mangifera*, bacteria patógena a los frutos y tronco del mango, efecto bactericida con los extractos de cundeamor (*Momordica charantia*) y poca inhibición del crecimiento bacteriano con el extracto de alelí (*Melia azedarach* L.). El extracto de mamón (*Melicocca bijuga*) inhibió el crecimiento de la bacteria *Pseudomonas* sp. patógeno del banano, sin embargo, para *Pseudomonas syringae* pv. *helianthi*, bacteria patógena del girasol, no se observó inhibición del crecimiento con los extractos vegetales probados.

Parra (2005) probó varios extractos vegetales, obteniendo mayor efectividad en el control de *Pectobacterium chrysanthemi*, en relación a Cuprimicin. Los resultados obtenidos mostraron que el extracto de nim (*Azadirachta indica* J.) inhibió la bacteria en 92,31 %, mientras que para rabo de alacran (*Heliotropium indicum* L.), urupagüita (*C. erecta*) y cariaquito (*Lanthana* sp.) su efectividad estuvo entre 63 y 67 %, todos a una concentración del 100 %.

Briceño (2008), evaluó el efecto bactericida de los extractos etanólicos de hojas de ruda (*Ruta graveolens* L.) y nim (*Azadirachta indica* Adr. Juss) sobre las bacterias del género *Erwinia* aisladas del cultivo de berenjena *in vitro*, donde encontró efecto inhibitorio en todas las concentraciones probadas (5, 15, 20, 25 y 30 %) del EE de nim, no obstante el EE de ruda no mostró tal efecto, sin embargo cabe señalar que en este ensayo se encontraron diferencias altamente significativas para el diámetro del halo de inhibición de la bacteria a diferentes concentraciones, evidenciándose que a medida que aumenta la concentración del extracto mayor es el poder inhibitorio, donde el mayor efecto lo obtuvo la concentración más alta probada al 30 %, además es importante destacar que esta investigación constituye el primer reporte del efecto bactericida *in vitro* del EE de nim sobre bacterias del género *Erwinia* en el país. Estos resultados sugieren que este método de control biológico, puede ser utilizado como una alternativa en el manejo integrado de las enfermedades en los cultivos involucrados, sin el detrimento ambiental ocasionado por los agroquímicos.

V.- Generalidades de la flor escondida (*Phyllanthus niruri* L.)

Phyllanthus L. (Phyllanthaceae) taxón recientemente descrito de Euphorbiaceae, es una de las familias más diversificadas de Malpighiales, con cerca de 2.000 especies y 59 géneros dispersos por todo el mundo, incluye especies de hábitos variados, sin látex, de inflorescencias cimosas, flores diclinas, en general con disco, gineceo de tres (raras veces cuatro) carpelar-lócular, lóculos usualmente bi-ovulado, frutos comúnmente capsulares y semillas sin carúncula (Da Silva y Ferreira de Sales, 2007). *Phyllanthus* se destaca por presentar un elevado número de especies (alrededor 800), dispersas por todas las regiones del mundo (Lorenzi, 2002).

Phyllanthus niruri L. conocida también como flor escondida, chancapiedra, rompe piedra, pitirishi, stone breaker, shatter stone, sasha foster, quinina criolla, es una hierba silvestre, originaria de los bosques lluviosos de Amazonas y otras áreas tropicales, incluyendo las Bahamas, India y China y puede llegar a crecer a una altura de 30 a 60 cm (Correa *et al.*, 2002).

Esta especie se caracteriza por ser una planta herbácea rastrera, con pequeñas hojas compuestas de 7 a 12 cm de largo, compuestas con folíolos oblongos, comúnmente alternas, pecioladas y estipuladas, frecuentemente glabras. Ramificación filantoide variada, en general deciduos, plagiotrópicos y dispuestos en espiral, su ramificación presenta aspecto pinnatiforme (asemeja una hoja compuesta pinada) o bipinatiforme (asemeja una hoja compuesta bipinada). Inflorescencias axilares usualmente cimosas pequeñas de color blanquecino-verdoso, ubicadas en la cara abaxial de los folíolos. Los frutos tipo cápsula globosa, de 2 a 3 mm de diámetro, con semillas triangulares. El sistema radical es largo y poco ramificado, esta hierba es muy común en tierras destinadas a jardines y plantas ornamentales, rara vez cultivada por sus propiedades medicinales (Lorenzi, 2002).

VI.- Investigaciones sobre control de patógenos a partir de extractos de f. escondida

El extracto de *Phyllanthus niruri* ha sido reportado como efectivo contra los hongos: *Alternaria solani*, *Fusarium moniliforme* y *Sclerotium rolfsii* (Sanabria *et al.*, 2003),

obtuvieron reducciones de los hongos entre el 46 y 63 % en concentración del 10 % de extracto etanólico; y el 100 % de reducción con concentración del 25 %. Otro trabajo señalado por Rodríguez y Sanabria (2005) evaluaron el efecto controlador de *P. niruri* sobre los hongos *Rhizoctonia solani* y *Bipolaris maydis* y determinaron la disminución del 36 % y 80 %, respectivamente, de las enfermedades causadas por ellos en maíz, lo cual demuestran el potencial de esta planta para ser usada en el manejo de enfermedades en plantas.

Rodríguez *et al.*, (2006), trabajaron con extracto etanolico de *P. niruri* al 10 %, logrando inhibir el hongo *Phytophthora infestans* en un 100 %, determinando presencia de alcaloides débilmente básicos y básicos en el EE, quienes concluyeron que dichos alcaloides podrían estar asociado al efecto inhibitorio del hongo.

Méndez *et al.*, (2007), utilizaron extracto etanolico de *P. niruri* en plantas de caraotas bajo condición de umbráculo, para el control de la quemazón bacteriana causada por la bacteria *Xanthomonas phaseoli*, evidenciando en sus resultados un retraso en la aparición de los síntomas en plantas tratadas con el EE, una hora antes de ser inoculadas con la cepa bacteriana en relación a su testigo, lo que les permitió evidenciar efecto inhibitorio del extracto.

García (2008), evaluó el efecto de extractos etanólicos de flor escondida (*Phyllanthus niruri* L.) y rabo de alacrán (*Heliotropium indicum* L.) en el control de bacterias fitopatógenas del género *Xanthomonas* aisladas de ocumo (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott), obteniendo un efecto antagónico *in vitro* del EE de flor escondida a partir de una concentración del 30 % sobre la bacteria, a diferencia del EE de rabo de alacrán el cual no produjo efecto inhibitorio sobre la misma.

VII.- Efecto de algunos extractos vegetales sobre la germinación de las semillas

Conocer el empleo de algunas plantas con el fin de mejorar y proteger las cosechas, es una primicia para el desarrollo de una agricultura menos contaminante y sostenible. La

utilización de extractos vegetales y compostaje en la agricultura, deben ser estrategias muy bien evaluadas, ya que algunas plantas pueden ser muy sensibles a metabolitos fitotóxicos presentes en los extractos vegetales o en los residuos orgánicos utilizados en compostaje (Varnero *et al.*, 2006).

Estas sustancias en elevadas concentraciones pueden generar efectos perjudiciales en el desarrollo de las plantas, inhibiendo la germinación de semillas o el crecimiento de raíces por lo que es altamente riesgosa su utilización en cultivos, sin embargo estos riesgos han venido disminuyendo con el uso de bioensayos con semillas sensibles a fitotóxicos (Emino y Warman, 2004), en los que se han evaluado los efectos sinérgicos de estas sustancias sobre la germinación y el crecimiento de las plantas, usando diversas metodologías siendo las de mayor alcance lo que corresponden a la determinación del porcentaje de germinación.

Zárate-Hernandez *et al.* 2006, estudiaron la fitotoxicidad de los extractos de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev, la cual ha sido considerada una especie tóxica por el alto contenido de alcaloides quinolizidínicos, principalmente en las semillas y hojas, este trabajo determinó que los extractos acuosos de hoja y de raíz de *C. secundiflora*, causaron efectos fitotóxicos afectando la germinación de semillas, longitud de la parte aérea y raíz en plántulas de *Lactuca sativa*, *Amaranthus hybridus*, *Lolium perene*, *Ipomoea purpurea* y *Bidens odorata*, donde los extractos acuosos de hoja, mostraron mayor efecto inhibitorio de la germinación que del crecimiento de la raíz en las cinco especies estudiadas, siendo *I. purpurea* y *B. odorata* las especies menos afectadas. De igual manera Miquilena y Lazo (2005) encontraron que las malezas *Amaranthus dubius*, *Echinochloa colona* y *Trianthema portulacastrum* influían sobre el porcentaje de germinación y la longitud radical de las especies cultivadas de cebolla, pepino, lechuga, tomate y arroz.

Layne-Garsaball y Mendez-Natera (2006), determinaron el efecto de extractos acuosos del follaje del corocillo (*Cyperus rotundus* L.) sobre la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de ajonjolí (*Sesamun indicum* L.), y encontraron que la germinación fue estimulada a concentraciones de extractos de 0,5 y 1,0 %, y decreció a

concentraciones de 1,5 y 2,0 %, mientras que el crecimiento presentó estímulo en cuanto a la relación altura de la plántula/longitud de la radícula a concentraciones de 0,5 y 1,0 % y disminuyó a concentraciones mayores (1,5 y 2,0 %), la altura de las plántulas, longitud de la radícula y los respectivos pesos secos de estos órganos disminuyeron con el incremento de la concentración del extracto.

Efecto alelopático de algunos extractos vegetales

La alelopatía es un mecanismo de interferencia vegetal, mediado por la adición de fitotoxinas al ambiente (Weston, 1996), distintos compuestos químicos con potencial alelopático están presentes en numerosas especies de plantas, distribuidos en diferentes tejidos (Einhellig 1996). Es conocido el potencial alelopático de algunos extractos vegetales en la inhibición de la germinación, crecimiento y desarrollo de otros organismos vegetales (Chiapusio *et al.*, 2004); muchos trabajos han hecho énfasis en la determinación del potencial alelopático de los extractos vegetales para su aplicación en cultivos de interés.

Los bioensayos que utilizan plantas o tejidos vegetales han sido utilizados satisfactoriamente en la detección de la actividad biológica de numerosos compuestos sintéticos y naturales (Macias *et al.* 2000). Las pruebas biológicas para tales estudios incluyen típicamente la germinación de la semilla, el crecimiento de la radícula, y medida de la actividad fotosintética (Aliotta *et al.* 2006). Las tentativas de describir respuestas de la germinación en estudios fitotóxicos también incluyen el uso de índices tales como velocidad de la germinación acumulada (Einhellig *et al.* 1982), coeficiente del índice de la germinación (Días, 1991) y velocidad de la germinación (Wardle *et al.* 1991). Las pruebas biológicas de la germinación y del crecimiento son herramientas primarias para determinar actividad fitotóxica y puede detectar efectos alelopáticos potenciales bajo condiciones controladas de laboratorio.

Blanco *et al.* (2005) evaluaron el efecto de extractos acuosos de malezas: *Cyperus rotundus*, *Rottboellia cochinchinensis* y *Commelina diffusa* y agua como testigo sobre el desarrollo radical temprano del plátano (*Musa AAB*), para verificar el poder alelopático de los extractos, se determinó la longitud radical, donde lograron obtener diferencias

significativas a los 21 días después de la siembra, donde las especies *C. rotundus* y *R. cochinchinensis* favorecieron el desarrollo radical del plátano, mientras que la *C. diffusa* ocasionó una reducción del 70, 50 y 61 % en el número, longitud total y peso fresco de raíces, respectivamente, comparado con el testigo.

Robayo y Rodríguez (2006), estudiaron el efecto alelopático de los extractos etanólicos de *Swinglia glutinosa* y *Piper aduncum*, en tres dosis diferentes, sobre semillas de cinco arvenses asociadas a cultivos de clima calido, donde presentaron inhibición de germinación de todas las especies estudiadas en las diferentes concentraciones, así mismo se observó fitotoxicidad de alto grado en las plántulas germinadas de las mismas especies arvenses tratadas con los extractos.

De igual manera Zamorano y Fuentes (2005) evaluaron el potencial alelopático de extractos de nabo silvestre y raigras sobre las arvenses de la sabana de Bogotá, cenizo, malva blanca y bledo; donde determinó que no se puede generalizar el efecto herbicida de los extractos debido a una posible selectividad, por esta razón sugiere realizar estudios específicos con extractos vegetales para cada especie vegetal a controlar ó evaluar.

Potencial osmótico como factor de interferencia en el efecto alelopático

Como resultado del estrés osmótico, las plantas pueden responder con un amplio rango de respuestas fisiológicas a nivel molecular, celular y de organismo (Hasegawa *et al.* 2000). Estas incluyen, por ejemplo, cambios en el desarrollo y la morfología de las plantas (inhibición del crecimiento apical, incremento en el crecimiento de las raíces y cambios en el ciclo de vida), ajuste en el transporte iónico (concentración, expulsión y secuestro de iones) y cambios metabólicos (metabolismo del carbono y la síntesis de solutos compatibles).

Diversos estudios mostraron que el potencial osmótico de los extractos de plantas y sus componentes químicos afecta la germinación de las semillas (Wardle *et al.* 1992), por lo tanto se recomienda controles osmóticos, que permitan determinar la osmolaridad de los

extractos para indicar inhibición de la germinación de semillas (Haugland & Brandsaeter 1996).

Dentro de los trabajos que hacen uso de la determinación del efecto del potencial osmótico, como factor de interferencia sobre la respuesta del potencial alelopático de los extractos, Ugarte (1999), evaluó el efecto de un gradiente de potenciales osmóticos sobre la germinación y disminución del crecimiento radical de especies hortícola (tomate, cebolla, rábano y lechuga) como plantas indicadoras, realizando una curva de calibración, que permitió determinar un potencial osmótico experimental capaz de marcar un umbral a partir del cual se afecta la germinación y crecimiento tanto radical como plántular, lo cual interfiere directamente sobre la respuesta del potencial alelopático.

VIII.- Importancia de los estudios anatómicos en la interacción planta-patógeno en *Phaseolus vulgaris* L.

El estudio de la anatomía vegetal en la interacción planta-patógeno, ha sido de gran importancia para la determinación de la relación entre resistencia de una especie vegetal y la virulencia del patógeno, sin embargo es importante señalar que en Venezuela son pocos los trabajos anatómicos relacionados con bacterias y en especial atención en *Phaseolus vulgaris*, por lo que mencionaremos algunos trabajos que han sido la base para estudios anatómicos comparativos en esta especie.

Cabezas de Herrera y García (1974), estudiaron los cambios estructurales producidos en *Vicia faba* y *Phaseolus vulgaris* L. inoculados con *Pseudomonas viriflava*; determinando que la primera alteración ocurre en las membranas de los orgánulos subcelulares. En una serie de cortes ultrafinos obtenidos a intervalos después de la inoculación de los órganos aéreos (tallos y hojas) de ambas especies, se pudo observar un desgarramiento progresivo y una destrucción posterior de todos los elementos celulares, la bacteria *Pseudomonas viriflava* no solo penetró el tejido vascular sino las células adyacentes, este trabajo demostró que los patógenos inducían cambios ultraestructurales en las células de las plantas y éstos podían ser evaluados.

Sigee y Epton (1975), determinaron la ultraestructura de *Pseudomonas phaseolicola* en hojas resistentes y susceptibles a la enfermedad del añublo de halo de la caraota (*Phaseolus vulgaris* L.), caracterizando los cambios ultraestructurales provocados por el patógeno en el interior de la célula vegetal tanto de plantas susceptibles como resistentes, de igual manera establecieron que los tejidos vegetales de las plantas susceptibles son aun más vulnerables que los resistentes al ataque de los patógenos.

Contreras *et al.* (2001), analizaron a nivel estructural, la interacción de la bacteria *Xp* en genotipos de caraota resistentes, moderadamente resistentes y susceptibles, determinando que la fase inicial de infección, se efectuaba a partir del tejido parenquimático del mesófilo; y en estadios más tardíos la bacteria se multiplicaba rápidamente en los espacios intercelulares, pudiendo penetrar las células parenquimáticas e invadir el espacio entre nervaduras adyacentes, desarrollando las típicas manchas angulares de apariencia húmeda. De igual manera, pudieron apreciar los cambios ocurridos en las células de la epidermis, mesófilo y tejido vascular, en los tres genotipos inoculados con la bacteria. Indicando concordancia entre los eventos que ocurrieron a nivel celular y la expresión de los síntomas en las plantas.

MATERIALES Y METODOS

I.- Determinación de la concentración óptima del extracto etanólico de flor escondida (*Phyllanthus niruri* L.) (EEFE) para el control *in vitro* de *Xanthomonas phaseoli* (Mit) Dowson

La concentración óptima del EEFE en el control de la bacteria *X. phaseoli*, se llevó a cabo en el laboratorio de Bacteriología Vegetal del edificio 2 de Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas- Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP) en Maracay, estado Aragua, latitud de 10° 17', longitud 67° 36' y altitud de 480 msnm, bajo temperatura promedio de 27 °C.

Obtención y preparación del EEFE

Para la obtención del EEFE, se colectaron aproximadamente 5 Kg de plantas sanas de flor escondida en el campo experimental del INIA-CENIAP, donde fueron secadas a la sombra por 8 días a temperaturas máximas de 32 °C y mínimas de 28 °C. El material vegetal seco se pulverizó con una licuadora convencional marca Ester. El polvo resultante se colocó en un frasco de vidrio color ámbar de 3 litros de capacidad, fue macerado por 8 días en 2500 ml de etanol (98%). Esta mezcla previamente filtrada fue sometida a evaporación bajo presión reducida, mediante el empleo de un rotoevaporador Brikmann, obteniendo así un EEFE crudo, el cual fue almacenado bajo refrigeración (8 °C) en frascos de color ámbar hasta su posterior utilización, el proceso descrito es presentado en el anexo 1.

Preparación de la suspensión bacteriana de *X. phaseoli*

En la preparación del inóculo se utilizó una suspensión bacteriana a partir de una cepa de la bacteria *X. phaseoli* procedente del CENIAP, con 24 horas de crecimiento en un medio de agar nutritivo (AN). La bacteria fue caracterizada e identificada mediante pruebas morfológicas y bioquímicas, las cuales nos permitieron verificar la pureza de la cepa. La suspensión bacteriana se obtuvo a partir del raspado superficial de la placa de AN donde

crecía la bacteria, con agua destilada estéril, ajustando su concentración mediante un espectrofotómetro Jeway 6320D a una densidad óptica de 0.2 que equivale a 1×10^8 ufc/ml, incorporándose una gota de tween ochenta como adherente a la planta, asegurando la penetración de la bacteria.

Determinación de la concentración óptima del EEFE para la inhibición de la bacteria *X. phaseoli*

La evaluación de la concentración óptima, se realizó mediante un diseño de experimento completamente aleatorizado con 3 repeticiones, la unidad experimental estuvo constituida por una placa de petri conteniendo 5 discos de papel. Para este ensayo se utilizó el método de discos de papel en cajas petri con agar nutritivo (Lorian, 1980), donde se tomó 0.1 ml de suspensión bacteriana y se esparció en una placa con AN, posteriormente se impregnaron discos de papel de filtro de 5 mm de diámetro con el EEFE a tres concentraciones: 2.5; 5.0 y 10.0 %; incubadas a temperatura de 28 °C por 24 horas. El efecto del EEFE sobre la bacteria se determinó mediante la presencia del halo de inhibición formado alrededor del disco, el cual fue medido en mm, estableciéndose como concentración óptima del EEFE, aquella capaz de producir mayor efecto inhibitorio sobre la bacteria, como se observa en el anexo 2.

II.- Evaluación del efecto del EEFE sobre la germinación de semillas de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad comercial “Tacarigua”

Para evaluar el efecto del EEFE sobre la germinación de las semillas de caraota, se embebieron las semillas por 1-5 minutos en la concentración óptima del EEFE determinada *in vitro*. Las semillas se colocaron en bandejas de 100 semillas de capacidad por 4 repeticiones para un total de 400 semillas a evaluar, estas bandejas fueron cubiertas de papel absorbente húmedo, y llevadas a una cámara de germinación a temperatura promedio de 28 °C (Ver anexo 3). A partir de 7 días se efectuaron las evaluaciones de germinación de las semillas y emergencia de plántulas tales como: número de plántulas normales; además se cuantificó el porcentaje de germinación de las semillas, tamaño de la radícula y parte aérea de las plántulas.

Determinación de la concentración osmótica del EEFE

Con la finalidad de determinar la influencia de la concentración osmótica del EEFE sobre la germinación de las semillas de caraota, se construyó una curva de calibración de acuerdo a la metodología planteada por Wardle *et al* (1992) en donde se estiman los rangos de potenciales osmóticos, que nos permite evidenciar el inicio de un efecto negativo sobre la germinación que pudiese enmascarar algún efecto alelopático presente en el EEFE, para ello se empleó un azúcar no fitotóxico como el “sorbitol”, que actúa como medio osmótico inerte (Wardle *et al.*, 1992). En la prueba de germinación se emplearon 18 capsulas de petri cubierta de papel absorbente con 10 semillas cada una, evaluándose 18 concentraciones de D-Sorbitol en 5 ml de agua destilada, es decir una capsula por concentración; las semillas fueron embebidas en la solución de sorbitol antes de la siembra, posteriormente al día 5 después de la siembra (dds) se realizó la determinación del porcentaje de germinación (Ver anexo 4). Para cada concentración de D-Sorbitol se determinó su potencial osmótico, los cuales fueron establecidos mediante un osmómetro “Osmette A” modelo 5002, el cual mide agua libre vs solutos y son expresados en mOsmol/KgH₂O (Anexo 5). De igual manera el EEFE se le determinó su potencial osmótico, el cual se compararía en la curva de calibración de la germinación de las semillas de caraota y establecer si existe efecto negativo del mismo sobre el cultivo.

III.- Evaluación del efecto del EEFE en el control de *X. phaseoli in vivo* bajo condición de umbráculo

El ensayo se realizó en el umbráculo del edificio 02 de Protección vegetal, INIA-CENIAP, Maracay estado Aragua. El cual se caracterizó por tener una estructura principal de vigas de 4x4 de hierro con paredes de maya de 1x1 cm y 1.82 m de alto, con un brocal de cemento de 0.80 m de altura y 0.18m de ancho, sin piso de cemento y techo a dos aguas con tela de saran; provisto de 11 mesones de cemento de 0.93m de alto con 1.27m de ancho y 1.98m de largo; las dimensiones del umbráculo son de 6.20 x 15.85 m, originando un área de 98.27 m², con altura total desde la base de 2.62m. (Ver anexo 6). Las condiciones climáticas de la

zona al momento del ensayo fueron: temperaturas promedios de 26 °C, evaporación 5.35 mm (medidas en Tina tipo A) y 83 % HR.

Para este ensayo se distribuyeron 60 unidades experimentales bajo un diseño de experimento completamente aleatorizado, con un arreglo de tratamientos en factorial 2² y 15 repeticiones por tratamiento. La unidad experimental estuvo constituida por 2 plantas por bolsa, para un total de 120 plantas en todo el experimento. Desde el inicio de la investigación el lote de plantas establecido se dividió en cuatro grupos de 30 plantas por grupo. Se procedió a inocular dos de los grupos de plantas a los 30 días después de la siembra (dds) y los dos grupos restantes fueron tratados con el EE; generando los cuatro tratamientos: (T0) no inoculado y no tratado con EE; (T1) inoculado y no tratado con EE; (T2) no inoculado y tratado con EE y (T3) inoculado y tratado con EE.

Inoculación de la bacteria *X. phaseoli* en las plantas de caraotas

Para esta evaluación se realizó la inoculación a los 30 días después de la siembra, utilizando una suspensión bacteriana de *X. phaseoli* de concentración 1×10^8 ufc/ml, mediante el método de punción (Pastor *et al.*, 1981), para ello se utilizó un cojín de alfileres provisto de un colchón de algodón impregnado con la solución bacteriana, provocando así heridas mecánicas a las primeras hojas verdaderas de la planta facilitando la penetración de la bacteria, posteriormente se asperjó con la solución bacteriana; las plantas testigos fueron tratadas de igual manera pero utilizando agua destilada estéril. Para garantizar las condiciones ambientales óptimas para la expresión de la enfermedad, se procedió a colocar los tratamientos por 48 horas dentro de una cámara húmeda, construida con plástico transparente y provisto de humidificadores. (Ver anexo 7a). Transcurrido este periodo, se retiró la cámara dejando los tratamientos sobre los mesones bajo las condiciones ambientales de umbráculo (Anexo 7b)

Aplicación del EEFÉ en plantas de caraotas

Para la aplicación de los tratamientos T2 (no inoculado y tratado con EEFÉ) y T3 (inoculado y tratado con EEFÉ), al momento de la siembra se embebieron las semillas en el EEFÉ a

concentración óptima resultante en las pruebas *in vitro*, posteriormente se asperjó el follaje una hora antes y después de la inoculación con la bacteria; realizándose aspersiones semanales con EFFE hasta la fase de floración de la planta (Anexo 8).

Evaluación del efecto del EFFE sobre plantas de caraotas

Para este ensayo se tomo como parámetros de medición de daño, la severidad e incidencia de la enfermedad definiendo a “Severidad de la enfermedad” como la cantidad de tejido foliar lesionado por el patógeno sobre la planta; e incidencia como el porcentaje total de plantas enfermas sobre la población total de plantas sembradas (CIAT, 1991). El efecto de la bacteria sobre las plantas se evaluó a partir de los 7 días después de la inoculación (37 dds), a partir de la aparición de los síntomas clásicos de la quemazón bacteriana, se realizo las observaciones pertinentes en cada semana hasta la fase de la cosecha, resultando 5 semanas de evaluación.

La evaluación de la severidad e incidencia de la enfermedad, sobre los tratamientos T1 (inoculado y no tratado con EE) y T3 (inoculado y tratado con EE), se utilizo una escala arbitraria para evaluar daños por bacterias bajo condición de umbráculo, constituida por 5 grados (1-5), basándose en las observaciones del follaje y tomando en cuenta los siguientes criterios: 1= sin síntomas; 2= 5-20 % de infección foliar; 3 = 20-40 % de infección foliar de la hoja; 4 = 40-70 % de infección foliar de la hoja; 5 = > 70 % de infección foliar de la hoja (Anexo 9). En el cuadro 1, se presenta la correspondencia entre los grados de severidad y el porcentaje de infección en la planta, permitiendo la identificación de comportamiento tolerante (grado 1-2), intermedio (grado 3-4) ó susceptibles a la bacteria (grados 5).

Cuadro 1. Criterio utilizado para determinar el grado de severidad y % de infección de *Xanthomonas phaseoli*

Grado de severidad	1	2	3	4	5
Criterios: % de infección (Área foliar afectada)	0	5-20	20-40	40-70	>70

Resistente (grado 1-2); Intermedio (grado 3-4); Susceptible (grado 5)

El efecto de la bacteria sobre el desarrollo del cultivo de caraota, se determino mediante las mediciones después de la cosecha y se midieron las siguientes variables: número de vainas/plantas, largo de vainas, ancho de vainas, número de semillas/vainas y peso de semillas/plantas.

Las mediciones se realizaron después de la cosecha, utilizando los descriptores de caraota del IPGRI (1982), de la siguiente manera:

- Numero de vainas por planta: valor promedio del número de vainas contadas en 10 plantas.
- Largo de la vaina: valor promedio de 10 vainas secas medidas desde la inserción en el pedúnculo hasta el ápice, excluido el diente apical. Medido en centímetros (cm).
- Ancho de la vaina: valor promedio de 10 vainas secas medidas en la porción central o mediana expresada en mm. Se mide en la parte más amplia de la vaina entre las suturas ventral y dorsal.
- Número de semillas/vainas: valor promedio del número de semillas contadas en 10 vainas secas.
- Peso de semillas por planta: se determino con el pesaje de las semillas totales por planta, medido en gramos (g).

IV.- Evaluación del efecto de los tratamientos aplicados sobre la anatomía foliar de plantas de caraota

Se colectaron hojas ubicadas en el estrato medio de la planta, por cada tratamiento establecido al inicio de la enfermedad. El material foliar colectado se fijo en FAA 70% (formaldehído, ácido acético, etanol 70 %), hasta su procesamiento. Se realizaron secciones transversales a mano alzada en segmentos de aproximadamente 1 cm² de las hojas previamente fijadas, en la cual se incluyó la nervadura central. Adicionalmente se realizaron macerados de la lámina foliar, usando para ello cloro comercial diluido en agua en proporción 1:1 (v:v).

Las preparaciones microscópicas se estudiaron bajo el microscopio óptico y se realizaron descripciones de los cambios de la histología foliar; adicionalmente, con la ayuda de un ocular calibrado e incorporado al microscopio. Se efectuaron las siguientes medidas cuantitativas: grosor de la cutícula más pared tangencial externa de la epidermis adaxial y abaxial; densidad y longitud de estomas; densidad de tricomas; grosor del parénquima en empalizada, y del parénquima esponjoso. Para ello, se efectuaron un mínimo de 30 medidas en distintas preparaciones escogidas al azar, para los cálculos posteriores de los valores promedios y desviación estándar. Asimismo se tomaron imágenes de las preparaciones con la ayuda de una cámara digital incorporada al microscopio óptico.

IV.- ANALISIS ESTADISTICO

Para las variables cuantitativas establecidas: determinación de la concentración óptima del EEFÉ en el control de *X. phaseoli*; % germinación de semillas y emergencias en plántulas de caraotas; % incidencia y grado de severidad (1-5) de la bacteriosis; variables de rendimiento en el cultivo y cambios histológicos foliares en los diferentes tratamientos; se les realizaron análisis de varianza (ANOVA), luego de la verificación y cumplimiento de los supuestos básicos estadísticos. Para las variables resultantes significativas se les realizaron pruebas de medias, con la ayuda de un programa estadístico STATISTIC, versión 8.

RESULTADOS Y DISCUSION

I. Concentración óptima del EEFE en el control de *X. phaseoli*

Al determinar la concentración óptima del EEFE, se encontraron diferencias altamente significativas entre las medias ($P < 5\%$) en los tratamientos, como se observa en el cuadro 2.

Cuadro 2. Análisis de varianza para los halos de inhibición del EEFE sobre la bacteria *X. phaseoli* bajo condición *in vitro*.

F. V.	G.L.	S.S.	S.M.	F	P
Tratamientos	2	228,044	114,022	55,73	0,0000 **
Repetición	14	32,444	2,317	1,13	0,3747 ns
E, E,	28	57,289	2,047		
Total	44	317,778			
C.V. (%)	64,37				

ns: No existen diferencias estadísticamente significativas *: Existen diferencias estadísticamente significativas; **: Existen diferencias altamente significativas ($P < 0,05$)

Luego de realizar las comparación de medias por pruebas de Tukey se formaron dos grupos homogéneos, obteniendo el mayor valor al 10 %, mostrando un diámetro promedio del halo inhibitorio de 5,40 mm, seguido por 2.5 y 5.0 % ambas con valores de 0,47 mm respectivamente (Cuadro 3); este resultado coincide con el señalado por García (2008), quien señala que el diámetro del halo de inhibición es proporcional a la concentración del EEFE, sin embargo es importante señalar que establecer un efecto inhibitorio sobre la bacteria a bajas concentraciones del extracto, representaría el primer paso de una potencial aplicación del mismo en ensayos *in vivo*, por otro lado se debe destacar que aumentar el porcentaje de sólidos solutos en el extracto se tendría que obtener mayor cantidad de material vegetal lo cual se considera una práctica poco sustentable económicamente con alto impacto en el ecosistema.

Cuadro 3. Inhibición del crecimiento de la bacteria *X. phaseoli* con el EEFE

Concentración (%)	Medición del halo de inhibición (mm)
2.5	0,47 b
5.0	0,47 b
10.0	5,40 a

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas (P<5%)

La concentración al 10 % obtuvo ocho veces más diámetro inhibitorio que al 2.5 y 5.0 % respectivamente, siendo el punto de partida para futuras concentraciones ideales, en la cual se muestra un efecto bacteriostático ó bactericida para el genero *Xanthomonas*.

Metabolitos secundarios presentes en el EEFE

Para establecer relación entre el efecto del EEFE y la inhibición del crecimiento de *X. phaseoli* se determinó en dicho extracto la presencia de los diferentes grupos de metabolitos secundarios (MS), con la finalidad de inferir cual de estos MS podrían ser sustancias biológicamente activas en el control de la bacteria, a continuación se muestra los MS presentes en el EEFE.

Cuadro 4. Determinación y cuantificación de los grupos de metabolitos secundarios en EEFE

Metabolitos	EE Flor escondida	Concentración mg.mL ⁻¹
Alcaloides	+	147,80
Flavonoides	+	104,39
Fenoles	+	70,15
Saponinas	+	NC
Aceites esenciales	+	NC

Presencia (+); No cuantificado (NC) Fuente: Análisis realizado en el lab. UCLA-Barquisimeto

Los alcaloides fueron los grupos de MS con mayor concentración en el EEFE con valores de 147,80 mg.mL⁻¹, coincidiendo con los resultados obtenidos por Delgado *et al.*, (2003); Rodríguez *et al.*, (2006) y García (2008), quienes le atribuyen a los alcaloides cualidades de actividad antipatógena. También se determinaron flavonoides y fenoles con 104,39 mg.mL-

1 y 70,15 mg.mL⁻¹ respectivamente, resultados similares obtuvieron Tappel y Marr (1954), Velásquez (1983) y Vivanco *et al.*, (2005), quienes sugieren que estos dos grupos de MS, están involucrados en la defensa de la planta ante invasiones microbianas, siendo los primeros activadores de fitoalexinas y señalizadores químicos en los procesos de defensa inducida y los fenoles como sustancias bioactivas que ejercen un efecto antagónico sobre algunas bacterias reaccionando químicamente con los sistemas sensitivos de las enzimas volviéndolas catalíticamente inactivas.

También se detecto por medio de métodos cualitativos la presencia de saponinas y aceites esenciales, sin embargo no fueron cuantificadas sus concentraciones. García *et al.*, (2002); Delgado *et al.*, (2003); Gómez, (2006) y Ávalos y Pérez (2009), señalan que los MS presentes en los aceites esenciales se encuentran en todos los órganos de la planta de flor escondida, y poseen efecto sobre microorganismos que afectan cultivos de importancia agrícola, además de resultar menos perjudiciales al medio ambiente que los biocida inorgánicos convencionales. Sin embargo es importante destacar que la presencia de estos MS en el EEFE nos sugiere actividad biológica en la inhibición del crecimiento de *X. phaseoli*, no obstante no se puede aseverar que sea este el modo de acción del extracto en el control de la bacteria, ya que se deben realizar estudios concluyentes que avalen estas premisas.

II. Evaluación del efecto del EEFE sobre la germinación de semillas y emergencia de plántulas de caraota

Al comparar el efecto del EE con respecto al porcentaje de germinación de semillas de caraotas, se encontró diferencias estadísticamente significativas ($P < 5\%$) entre ambos tratamientos (cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza del EEFE sobre la germinación de las semillas de caraota variedad Tacarigua bajo condición *in vitro*

F.V.	% Germinación				
	G.L.	S.S	S.M.	F	P
Tratamientos	1	22.781	22.7811	6.15	0.0175 *
Repetición	39	133.614	3.4260	0.93	0.5950 ns
E.E.	39	144.386	3.7022		
Total	79				
C.V.	1.94				

ns: No existen diferencias estadísticamente significativas *: Existen diferencias estadísticamente significativas; **: Existen diferencias altamente significativas (P<0,05)

La germinación en las semillas tratadas con el EEFE con respecto a las no tratadas se registraron valores promedios de 100 % y 99 % respectivamente, mostrando efecto positivo en el desarrollo de la semilla, lo cual se evidencia en el incremento del porcentaje de germinación, tal como se muestra en la figura 1.

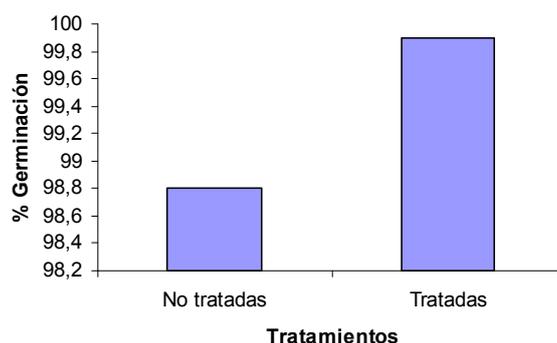


Figura 1. Efecto del EEFE sobre la germinación de semillas de caraotas tratadas

Resultados similares fueron referidos por Blanco *et al.*, (2005), quienes aseveran que muchas sustancias con actividad biológica, que se encontraron presentes en algunos extractos vegetales, pueden estimular los procesos de germinación y desarrollo de las semillas.

De igual manera al evaluar la longitud y ancho de la radícula de semillas tratadas se presento diferencias estadísticamente significativas (P<5%) en ambos tratamientos (cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis de varianza del efecto del EEFE sobre la emergencia de plántulas de caraota variedad Tacarigua bajo condición *in vitro* mediante las variables: largo y ancho de la radícula

F.V.	Largo de la radícula					Ancho de la radícula			
	G.L.	S.S	S.M.	F	P	S.S	S.M.	F	P
Tratam	1	12.0199	12.0199	5.07	0.0300*	0.00054	5.41E-04	19.43	0.0001*
Repetic.	39	97.7178	2.5056	1.06	0.4318	0.00087	2.23E-05	0.80	0.7548ns
E.E.	39	92.4564	2.3707			0.00109	2.78E-05		
Total	79								
C.V	11.97					14.87			

ns: No existen diferencias estadísticamente significativas*; Existen diferencias estadísticamente significativas; **: Existen diferencias altamente significativas (P<0,05)

El largo de la radícula de plántulas tratadas con el EEFE mostró un incremento del 6 % en comparación a las no tratadas con valores de 13,26 y 12,42 cm respectivamente (Figura 2A), de igual manera se observó un aumento en el ancho de las radículas de las semillas tratadas de 0,038 mm y 0,032 mm en las no tratadas, como se muestran en la figuras 2B. Estos resultados coinciden con lo señalado por Rodríguez y Hechavarría (2004) y Morán y Dávila (1989), quienes sugieren que muchos extractos vegetales estimulan la germinación de semillas y emergencia de las plántulas.

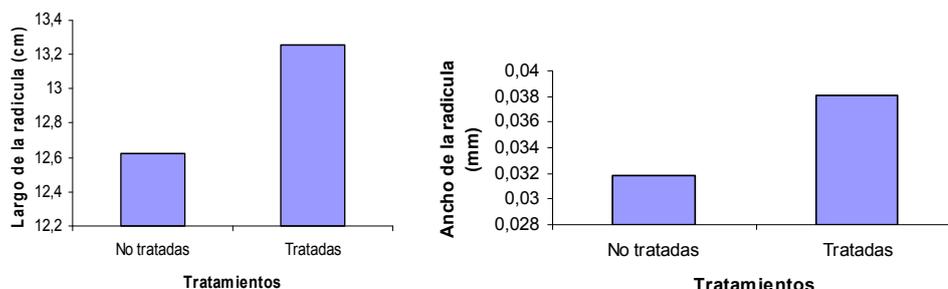


Figura 2. Comparación de plántulas tratadas y no tratadas con EEFE. A. Largo de la radícula. B. Ancho de radícula

Al evaluar la respuesta de las plántulas de caraotas tratadas y no tratadas con EEFE en función de su longitud, se encontraron diferencias estadísticamente significativas (P<5%) entre los tratamientos (cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis de varianza del efecto del EEFE sobre la emergencia de plántulas de caraota variedad Tacarigua bajo condición *in vitro* mediante el largo de la plántula

Largo de la plántula					
F.V.	G.L.	S.S	S.M.	F	P
Tratamientos	1	535.839	535.839	43.7	0.0000**
Repetición	39	341.473	8.756	0.60	0.9410
E.E.	39	555.590	14.531		
Total	79				
C.V.	35.57				

ns: No existen diferencias estadísticamente significativas *: Existen diferencias estadísticamente significativas; **: Existen diferencias altamente significativas (P<0,05)

Luego de realizar la comparación de medias por pruebas de Tukey, las plántulas tratadas mostraron longitudes promedios de 13,27 cm, entre tanto las no tratadas alcanzaron valores de 7,60 cm, apreciándose un incremento del 43 % de la longitud de plántulas tratadas (Figura 3).

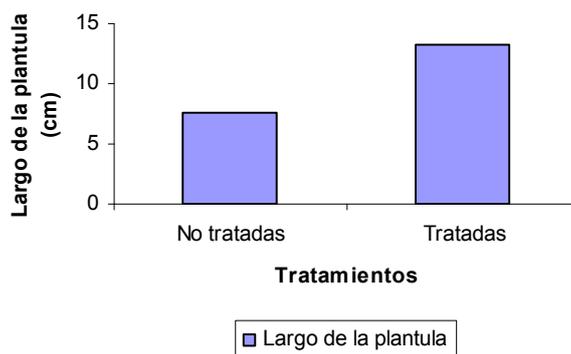


Figura 3. Largo de plántulas tratadas y no tratadas con EEFE

Similares resultados fueron descritos por Laynes y Méndez (2006), quienes señalaron que algunos extracto poseen compuestos biológicamente activos que actúan como estimuladores de emergencia de las plántulas. Estos trabajos respaldan los resultados obtenidos en este ensayo, en el cual se evidencia un efecto positivo del EEFE al 10 % en el crecimiento y desarrollo de las plántulas de caraota.

Determinación del efecto del potencial osmótico del EEFE sobre la germinación de semillas y emergencia de las plántulas de caraotas

A partir de la prueba del efecto del potencial osmótico de semillas de caraotas, se elaboró una curva en función de la inhibición de la germinación (Figura 4).

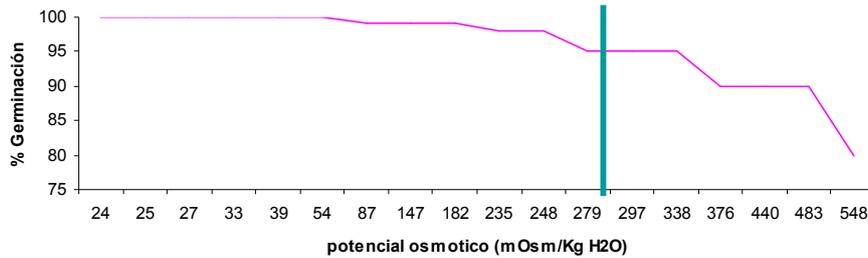


Figura 4. Efecto del potencial osmótico sobre la germinación de semillas de caraotas

Estos resultados determinaron que valores de potencial osmótico por encima de 279 mOsm/Kg H₂O, muestra apreciable disminución en el porcentaje de germinación de las semillas de caraota observándose un declive a partir de 98 %. Sin embargo, la lectura del potencial osmótico del EEFE obtenido, dio un valor de 140 mOsm/Kg H₂O, el cual está muy por debajo de 279 mOsm/Kg H₂O umbral donde se presenta disminución en la germinación de las semillas, este resultado nos sugiere que no existe un gradiente osmótico que refiera un posible efecto alelopático en el EEFE sobre las semillas de caraota, indicando que la aplicabilidad del extracto no representa ningún riesgo al cultivo.

III.- Efecto del EEFE en el control de *X. phaseoli*, en condición de umbráculo

La incidencia y severidad de la quemazón bacteriana producida por la bacteria *X. phaseoli*, se registró a partir de los 37 días después de la siembra (dds), observándose la aparición de los síntomas clásicos de la enfermedad, iniciándose evaluaciones semanales de los tratamientos con la finalidad de determinar y cuantificar el efecto del EEFE sobre el avance de la quemazón por medio del porcentaje de incidencia y grado de severidad.

Al determinar el efecto del EEFE sobre la incidencia de la quemazón bacteriana, se encontraron diferencias altamente significativas ($P < 5\%$) entre los tratamientos y las semanas de evaluación (cuadro 8).

Cuadro 8. Análisis de varianza para la incidencia de la bacteria *X. phaseoli* (Mit) Dowson en plantas de caraotas en las semanas de evaluaciones

F. V.	G.L.	S.S.	S.M.	F	P
Planta	7	534	76,3	0,31	0,9455
Semanas	4	66540	16635 ns	68,56	0,0000 **
Tratamientos	3	84095	28031,6 ns	115,53	0,0000 **
E, E,	145	35181	242,6		
Total	159	1855,60			
C,V, (%)	46,55				

ns: No existen diferencias estadísticamente significativas *: Existen diferencias estadísticamente significativas; **: Existen diferencias altamente significativas (P<0,05)

Al momento de realizar las comparaciones de medias por la prueba de Tukey, para la semana 1 (37 dds) se generaron dos grupos homogéneos. Un primer grupo se formó con los tratamientos inoculados T1 y T3, los cuales expresaron la sintomatología de la enfermedad, registrando porcentajes de incidencia de 25 % y 4,88 % respectivamente, indicando la patogenicidad de la bacteria. Un segundo grupo, formado por los tratamientos no inoculados T0 y T2, no evidenciando incidencia de la enfermedad (Figura 5).

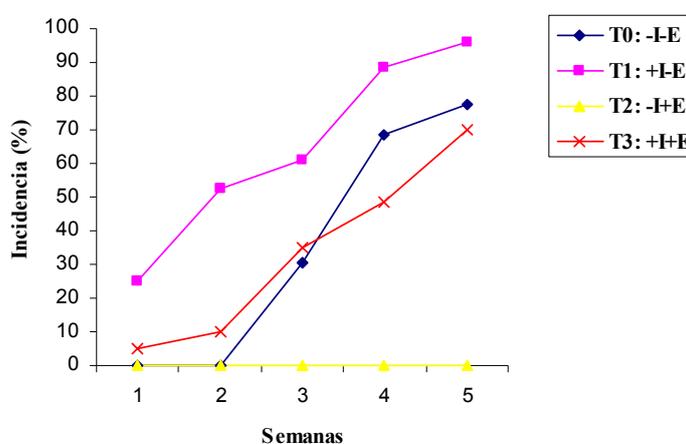


Figura 5. Incidencia de la quemazón bacteriana causada por *X. phaseoli* en plantas de caraota tratadas con EEFÉ (+I= inoculadas; -I= No inoculadas; +E= Aplicado el EEFÉ; -E= No aplicado el EEFÉ).

La semana 2 (44 dds), coincide con el inicio de floración en todos los tratamientos y se mantiene la misma tendencia, donde T1 y T3 duplican la incidencia en 52,5 % y al 10 % respectivamente, mientras que T0 y T2 siguen sin manifestar los síntomas de la enfermedad. Para la semana 3 (51 dds) T0 manifiesta síntomas de la quemazón bacteriana

registrando incidencia del 30,6 %; es importante señalar, que T0 desarrolla la enfermedad debido a la cercanía a los tratamientos inoculados, los cuales se produjo la diseminación de la bacteria; por su parte T1 y T3 representaron valores de 61,25 y 35 % respectivamente, mientras que T2 sigue sin expresar la enfermedad. En esta tercera semana, se observa el inicio de llenado de vainas para T0, T1 y T3, mientras que T2 muestra vainas desarrolladas. Este resultado nos sugiere que el EEFÉ influye positivamente en el biorritmo fenológico de la planta, pudiendo hacerla precoz en el proceso reproductivo.

En la semana 4 (58 dds), T0 tratamiento testigo supera en incidencia a T3 mostrando valores de 68.75 y 48.75 % respectivamente. No obstante T1 obtiene el mayor valor con 88.75 %; este avance de la enfermedad, en forma progresiva en la fase reproductiva es fundamentado por Webster (1978), quien explica que la etapa reproductiva, de la caraota es la más susceptible al impacto de enfermedades en el cultivo.

Es importante señalar que T1 mostró desde el inicio hasta el final de la evaluación, los más altos porcentaje de incidencia de la enfermedad, alcanzando 96.25 % para la semana 5 (64 dds), máximo valor registrado en el ensayo. Esto indica que el patógeno debe disponer de buenas condiciones para su óptimo desarrollo, en la expresión máxima de la enfermedad (Salomón, 2002). Es importante señalar que T3 alcanzó 70% de incidencia para la semana 5, superado por T0 con 77,5 %. El tratamiento T2 no mostró los síntomas de la enfermedad a lo largo del ensayo.

De igual manera el efecto del EEFÉ sobre la severidad de la quemazón bacteriana mostró diferencias altamente significativas ($P < 5\%$) entre los tratamientos y las semanas de estudios (cuadro 9).

Cuadro 9. Análisis de varianza para los grados de severidad de la bacteria *X. phaseoli* en plantas de caraotas en las semanas de evaluaciones

F. V.	G.L.	S.S.	S.M.	F	P
Planta	7	13.30	1.900	0.84	0.5541
Semanas	4	414.16	103.54	45.90	0.0000 **
Tratamientos	3	1101.05	367.02	162.70	0.0000 **
E. E.	145	327.09	2.256		
Total	159	1855.60			
C.V. (%)	37.08				

ns: No existen diferencias estadísticamente significativas *: Existen diferencias estadísticamente significativas; **: Existen diferencias altamente significativas (P<0,05)

Luego de las comparaciones de medias por pruebas de Tukey. se pudo observar para la semana 1 tres grupos homogéneos, en el cual T1 alcanzó 2.88 grado de severidad seguido de T3 con 1.63 grado y el último grupo formado por T0 y T2 quienes no expresaron grado alguno (Figura 6).

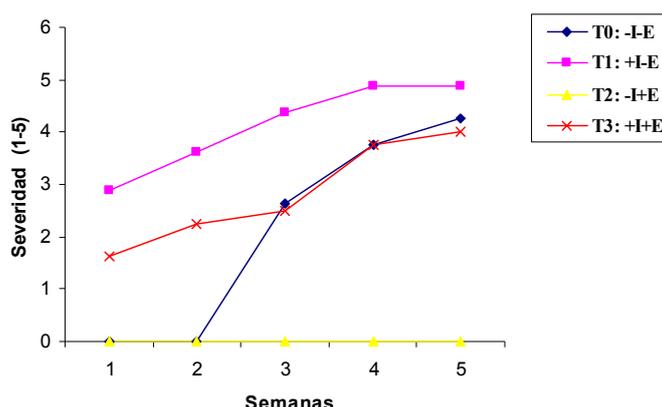


Figura 6. Severidad de la quemazón bacteriana causada por *X. phaseoli* en plantas de caraota tratadas con EEFÉ (+I= inoculadas; -I= No inoculadas; +E= Aplicado el EEFÉ; -E= No aplicado el EEFÉ).

Este comportamiento en los tratamientos se mantuvo en la semana 2; sin embargo T1 y T3 presentan aumento progresivo en la severidad alcanzando valores de 3.63 y 2.25 grado respectivamente. Para la semana 3, T0 inicia los síntomas de la bacteriosis con 2.63 grados de severidad colocándose por encima de T3 con 2.5; mientras que T1 sigue aumentando el grado de severidad de forma progresiva y manteniéndose, por encima del resto de los tratamientos con valores de 4.38. No obstante. T2 siguió sin expresar grados de severidad.

En la semana 4 se registran grados de severidad para T0 y T3 ambos con 3.75; entre tanto que T1 mantuvo un aumento progresivo, alcanzando 4.87 grados de severidad.

Para la semana 5. T0 mostró grados de severidad superiores a T3 con 4.25 y 4 respectivamente; T1 fue el tratamiento que registró los más altos grados de severidad a lo largo del ensayo con 4.87 grados y finalmente T2 no expresó síntomas de la bacteriosis. Estos resultados sugieren que existe efecto inhibitorio del EEFÉ sobre la incidencia y severidad de la quemazón bacteriana producida por *X. phaseoli*, puesto que se evidencia en el comportamiento de los tratamientos y la influencia de la edad del cultivo. T0 después de no presentar síntomas las dos primeras semanas de evaluación presenta una notoria expresión de la enfermedad, colocándose entre los tratamientos inoculados. T1 muestra el avance progresivo de los síntomas hasta estabilizarse en la última semana reportando los valores más altos de la evaluación. T2 no desarrolló la enfermedad y T3 expresó valores intermedios, tanto de incidencia como de severidad, ubicándose por debajo de los tratamientos no tratados, lo cual coincide con Méndez *et al* (2007), quienes lograron retraso e inhibición de la enfermedad en plantas de caraotas tratadas con EEFÉ.

En la cuantificación del rendimiento, la variable número de semillas por vainas en plantas tratadas con el EEFÉ, se detecto diferencias altamente significativas ($P < 5\%$) entre los tratamientos (cuadro 10).

Cuadro 10. Análisis de la varianza para la variable número de semillas/vainas en plantas de caraotas

Número de semillas/vainas					
F.V.	G.L	S.S	S.M	F	P
Tratamientos	3	51.7500	17.2500	35.34	0.0000 **
Repetición	7	2.0000	0.2857	0.59	0.7602 NS
E.E.	21	10.2500	0.4881		
Total	31	64.0000			
C.V.	19.96				

ns: No existen diferencias estadísticamente significativas *; Existen diferencias estadísticamente significativas; **: Existen diferencias altamente significativas ($P < 0,05$)

Mediante comparaciones de medias por pruebas de Tukey se formaron dos grupos homogéneos. El primer grupo integrado por T0, T1 y T3, con valores promedios de 3, 2 y 3 semillas/vainas respectivamente, y el segundo lo formó T2 que alcanzó un valor promedio de 6 semillas/vainas, siendo este valor más alto por tratamiento y duplicando el valor promedio de semillas/vainas (Figura 7).

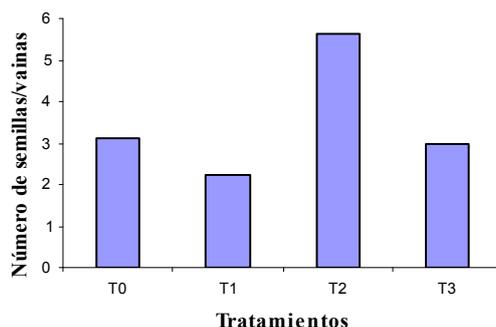


Figura 7. Comparación del número de semillas por vainas en los diferentes tratamientos: T0 (no inoculado y no tratado con EEFE); T1 (inoculado y no tratado con EEFE); T2 (no inoculado y tratado con EEFE) y T3 (inoculado y tratado con EEFE).

Los resultados obtenidos sugieren que existe efecto del EE sobre el número de semillas/vainas en los tratamientos aplicados, puesto que T2 logró obtener mayor número de semillas en comparación a T1 y T0 quienes obtuvieron valores bajos en el número de semillas en el ensayo, esto demuestra que la bacteriosis afecta directamente al llenado de vainas, siendo uno de los impactos económicos más importantes de la enfermedad (Subero, 1998; Agrios, 2007).

Los valores obtenidos en cuanto al número de vainas/planta arrojaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 5\%$) en los tratamientos evaluados (Cuadro 11).

Cuadro 11. Análisis de la varianza para la variable número de vainas/planta en plantas de caraotas

F.V.	Número de vainas/planta				
	G.L	S.S	S.M	F	P
Tratamientos	3	9.3438	3.11458	4.25	0.0171*
Repetición	7	3.4688	0.49554	0.68	0.6908 ns
E.E.	21	15.4063	0.73363		
Total	31	28.2188			
C.V.	27.14				

ns: No existen diferencias estadísticamente significativas *: Existen diferencias estadísticamente significativas; **: Existen diferencias altamente significativas (P<0,05)

En esta evaluación, se pudo apreciar que T2 obtuvo el valor más alto de vainas/plantas (4) en comparación al resto de los tratamientos en estudios, donde T0, T1 y T3 alcanzan valores promedios de alrededor de 3 vainas/plantas (Figura 8). Estos resultados nos indican que el estadio reproductivo es la etapa más susceptible del cultivo para la infección por *X. phaseoli*, afectando directamente sus rendimientos (Salomón. 2002), de igual manera se evidenció efecto inhibitorio del EEFE sobre el desarrollo de la bacteria, puesto que la producción de vainas fue mayor en plantas tratadas con dicho extracto (T2 y T3).

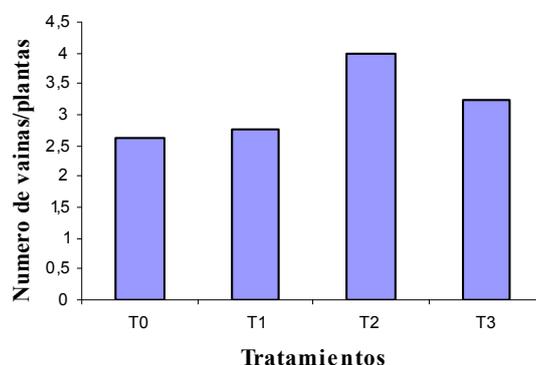


Figura 8. Comparación del número de vainas por planta en los diferentes tratamientos: T0 (no inoculado y no tratado con EEFE); T1 (inoculado y no tratado con EEFE); T2 (no inoculado y tratado con EEFE) y T3 (inoculado y tratado con EEFE).

Por otra parte, la variable largo de vainas por planta mostró diferencias en las respuestas en cuanto a los tratamientos evaluados, donde T2 obtuvo el mayor valor de largo de vainas alcanzando 8.48cm de longitud, estando por encima del 18 % del promedio del resto de los tratamientos. T3 registró un valor de 6.94cm, T0 con 6.4cm y T1 que obtuvo el valor más bajo del largo de vaina de todo el ensayo logrando 6.15cm (Figura 9).

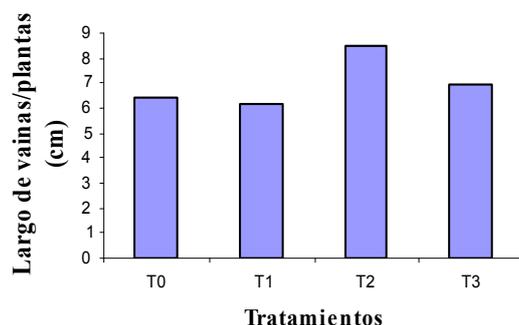


Figura 9. Comparación del largo de vainas por planta en los diferentes tratamientos: T0 (no inoculado y no tratado con EEFÉ); T1 (inoculado y no tratado con EEFÉ); T2 (no inoculado y tratado con EEFÉ) y T3 (inoculado y tratado con EEFÉ).

Los valores obtenidos en este ensayo arrojaron diferencias altamente significativas ($P < 5\%$) en el largo de vainas por planta entre los tratamientos (Cuadro 12).

Cuadro 12. Análisis de la varianza para la variable largo de vainas/planta en plantas de caraotas

F.V.	Largo de vainas/planta				
	G.L	S.S	S.M	F	P
Tratamientos	3	26.0718	8.69059	18.09	0.0000 **
Repetición	7	3.2130	0.45900	0.96	0.4871 NS
E.E.	21	10.0864	0.48030		
Total	31	39.3711			
C.V.	6.27				

ns: No existen diferencias estadísticamente significativas *; Existen diferencias estadísticamente significativas; **: Existen diferencias altamente significativas ($P < 0,05$)

Al realizar la comparación de medias por pruebas de Tukey el tratamiento T2 obtuvo el mejor comportamiento en cuanto a largo de vainas y T1 alcanzó el más bajo valor de la variable en estudio; estos valores nos sugieren la existencia de un efecto positivo del EEFÉ sobre el control de la enfermedad, ya que los tratamientos donde se aplicó el extracto (T2 y T3) presentaron los más altos valores de largo de vaina/planta, mientras que el tratamiento no tratado mostraron la menor longitud de vainas.

Al evaluar el ancho de vainas por plantas. se detectaron diferencias significativas ($P < 5\%$) entre los tratamientos (Cuadro 13).

Cuadro 13. Análisis de la varianza para la variable ancho de vainas/planta en plantas de caraotas

Ancho de vainas/planta					
F.V.	G.L	S.S	S.M	F	P
Tratamientos	3	0.05296	0.01765	6.18	0.0035 *
Repetición	7	0.01882	0.00269	0.94	0.4964 NS
E.E.	21	0.05997	0.00286		
Total	31	0.13175			
C.V.	6.27				

ns: No existen diferencias estadísticamente significativas *: Existen diferencias estadísticamente significativas; **: Existen diferencias altamente significativas ($P < 0,05$)

Observándose que T0 registra el valor más alto de ancho de vainas en todos los tratamientos evaluados, alcanzando un ancho de vaina de 0.9mm, seguido por T2 con un valor de 0.89mm y T3 de 0.83mm, mientras que T1 obtiene el más bajo valor de ancho de vainas de 0.8mm, como se puede apreciar en la figura 10.

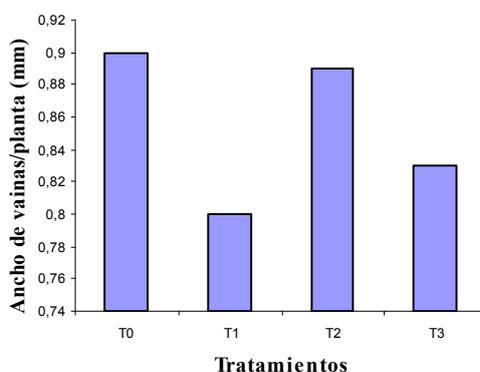


Figura 10. Comparación del ancho de vainas por planta en los diferentes tratamientos: T0 (no inoculado y no tratado con EEFÉ); T1 (inoculado y no tratado con EEFÉ); T2 (no inoculado y tratado con EEFÉ) y T3 (inoculado y tratado con EEFÉ).

En las comparaciones de medias el tratamiento con mejor comportamiento y el cual alcanzo el valor más alto en el ancho de vaina fue el T0. En contraparte, T1 alcanzó el más bajo valor de ancho de vaina; estos resultados demuestran el impacto negativo de la bacteria en

el desarrollo de la vaina, puesto que los tratamientos T0 y T2 no presentaron grandes diferencias en el ancho de la vaina, siendo estos tratamientos los que no estaban expuestos a la bacteria. En los tratamientos expuestos a la bacteria (T1 y T3) se pudo observar disminución en el ancho de la vaina, como lo han señalado Salomón, 2002; Contreras, 1983; Subero, 1998; entre otros; estos resultados sugieren efecto positivo del EEFE sobre control de la bacteria *X. phaseoli*.

En cuanto al peso de semillas por planta se observó que T2 superó al resto de los tratamientos en un 28 %, logrando obtener un peso de 4.16 g de semillas/planta, seguido por T0 el cual alcanzó 2.89g. T3 con 2.64g y T1 con 2.03g. El ultimo, T1 obtuvo el valor más bajo del peso de semillas de todo el ensayo, esta variabilidad en cuanto a pesos se puede apreciar en la figura 11.

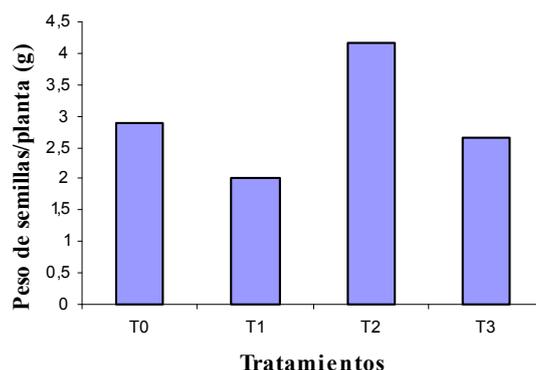


Figura 11. Comparación del peso de semillas por planta en los diferentes tratamientos: T0 (no inoculado y no tratado con EEFE); T1 (inoculado y no tratado con EEFE); T2 (no inoculado y tratado con EEFE) y T3 (inoculado y tratado con EEFE).

Estos valores arrojaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 5\%$) (Cuadro 14). En donde T2 resulto el tratamiento con mayor peso de semilla y mejor comportamiento entre todos los tratamientos resultantes, mientras que el tratamiento con el más bajo peso de semillas lo obtuvo T1.

Cuadro 14. Análisis de la varianza para la variable peso de semillas/planta en plantas de caraotas

F.V.	Peso de semillas/planta				
	G.L	S.S	S.M	F	P
Tratamientos	3	19.3114	6.43712	9.73	0.0003 *
Repetición	7	14.5893	2.08418	3.15	0.0194*
E.E.	21	13.8987	0.66184		
Total	31	47.7993			
C.V.	19.96				

ns: No existen diferencias estadísticamente significativas *: Existen diferencias estadísticamente significativas; **: Existen diferencias altamente significativas (P<0,05)

Conociendo el impacto negativo de la incidencia y severidad de la bacteria *X phaseoli* sobre el rendimiento del cultivo de la caraota, principalmente en la etapa reproductiva ya que afecta el desarrollo de las vainas, produciendo semillas anormales, arrugadas y en muchas ocasiones vanas (Gaunt, 1995; Contreras, 1983). Los resultados nos indican que el EEFE posee efecto inhibitorio sobre el desarrollo de la bacteria y evidencia posibles beneficios en el rendimiento del cultivo.

IV.- Cambios histológicos foliares causados por *X. phaseoli* en plantas de caraotas, tratadas con EEFE

En la histología de los tercios medios foliares de caraotas, se pudo apreciar que la lámina foliar es bifacial, es decir presentaba epidermis superior (adaxial) y epidermis inferior (abaxial), ambas unistrata. Posee células que en sección transversal mostraron forma tubular con paredes externas delgadas y cutícula poco evidente. en ambas epidermis (Figura 12A). La hoja se caracterizó, por presentar estomas en ambas epidermis como hojas anfiestomaticas, mostrando mayor número de estomas en la epidermis abaxial. (Figura 12B y C), evidenciándose estomas paracíticos. De igual manera, se evidenciaron tricomas simples principalmente, en la cara abaxial. (Figura 12D).

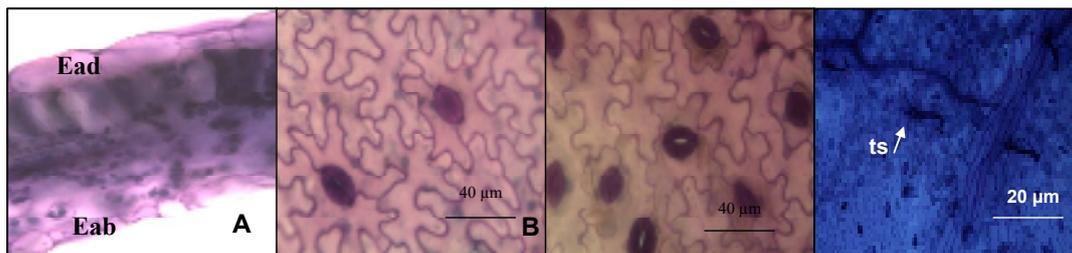


Figura 12. A. Detalle de la anatomía de la lamina foliar de T0 en sección transversal mostrando epidermis adaxial (Ead) y abaxial (Eab) (40X). B. Vista frontal de la epidermis foliar adaxial, mostrando estomas paracíticos. C. Vista frontal de la epidermis foliar abaxial, mostrando densidad estomatica. D. Vista frontal de la epidermis foliar, mostrando tricomas simples (ts).

En el mesófilo se caracterizó un estrato de células alargadas del parénquima en empalizada, hacia la superficie adaxial; de dos a tres estratos de células redondeadas en la cara abaxial; ambas con células de paredes delgadas, visualizándose cloroplastos en todo el mesófilo; presencia de espacios intercelulares o cámaras aeríferas de parénquima esponjoso (Figura 13).

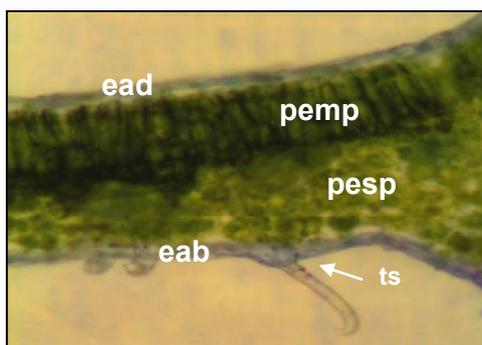


Figura 13. Detalles de la anatomía de la lámina foliar en sección transversal, mostrando epidermis adaxial (ead) y abaxial (eab), parénquima en empalizada (pemp), parénquima esponjoso (pesp) y tricoma simple (ts). 10X.

Al comparar las variables cuantitativas determinadas en la lámina foliar de los tratamientos, se encontró para el espesor de la cutícula más la pared externa de las células epidérmicas adaxiales y abaxiales, diferencias altamente significativas ($P < 5\%$) entre los tratamientos, como se muestra en el cuadro 15.

Cuadro 15. Análisis de la varianza para las variables: espesor de la cutícula más la pared externa de las células epidérmicas adaxiales y abaxiales en los diferentes tratamientos

F.V.	Epidermis abaxial + Cutícula					Epidermis adaxial + Cutícula			
	G.L	S.S	S.M	F	P	S.S	S.M.	F	P
Tratam	3	50265.5	16755.2	320.8	0.0000 **	459.83	153.101	19.17	0.0000 **
Repetic	29	1942.8	67.0	1.28	0.1884 ns	9124.9	314.653	39.40	0.0000 **
E.E.	87	4543.9	52.2			694.9	7.987		
Total	119	56752.2				10279.1			
C.V.	18.2	9.03				8.17			

ns: No existen diferencias estadísticamente significativas *: Existen diferencias estadísticamente significativas; **: Existen diferencias altamente significativas (P<0,05)

Al comparar las medias por pruebas de Tukey en la epidermis adaxial, se diferenciaron dos grupos homogéneos, en la cual uno estuvo conformado por T1, T3 y T2 con valores promedios de 23.19 μm ; 22.88 μm y 21.68 μm respectivamente y el otro grupo formado por T0 quien registró un valor de 18.26 μm (Figura 14a).

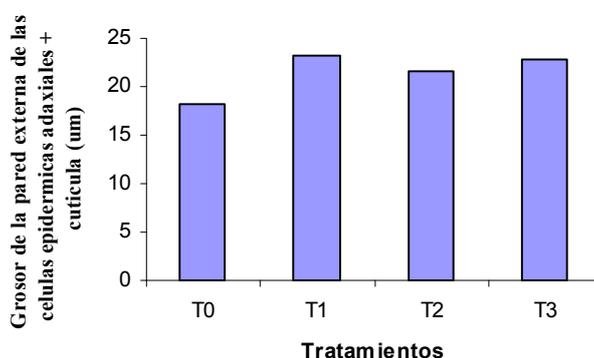


Figura 14a. Comparación del grosor de la epidermis adaxial de la lamina foliar de los tratamientos: T0 (no inoculado y no tratado con EEFE); T1 (inoculado y no tratado con EEFE); T2 (no inoculado y tratado con EEFE) y T3 (inoculado y tratado con EEFE).

No obstante, al comparar las medias por pruebas de Tukey de la epidermis abaxial, se diferenciaron tres grupos homogéneos, en donde uno se encontró conformado por plantas tratadas con el EEFE. T2 con un valor promedio de 21.28 μm ; otro grupo formado por T3 con 16.16 μm y el ultimo grupo por plantas no tratadas: T0 y T1, con valores de 8.48 y 9.6 μm respectivamente (Figura 15b).

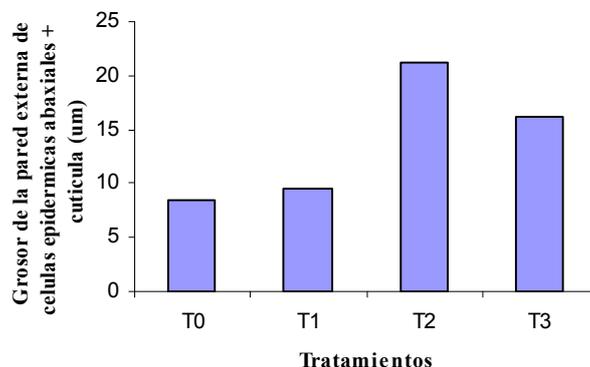


Figura 15b. Comparación del grosor de la epidermis abaxial de la lamina foliar de los tratamientos evaluados

Estos resultados muestran que en la epidermis adaxial T1 y T3 presentaron aumento del 19 %, en comparación a T0; lo cual podría atribuirse a la invasión de masas de células bacteriales en la epidermis, causando disrupción de células epidérmicas (Contreras *et al.* 2001). Sin embargo, en la epidermis abaxial se pudo apreciar que tanto T2 y T3, duplicaron el grosor de la epidermis en comparación a los tratamientos T0 y T1. Es conocido que la primera línea de defensa de las plantas ante el ataque del patógeno lo constituye la epidermis, y que el patógeno debe penetrarla para producir la infección (Kniskern. 2001), este aumento de la epidermis abaxial se presume fue estimulado por el EEFÉ, incrementando la resistencia a patógenos que penetran la epidermis ejemplo hongos, sin embargo en el caso de *X. phaseoli*, sabemos que su diseminación se efectúa por heridas y que su primera fase de invasión se inicia por el envés de la hoja (Trujillo. 1983). El EEFÉ ejerce un efecto en la conformación de la epidermis, siendo un factor de resistencia estructural en la defensa de la planta (Agrios. 2007).

La densidad estomática, tanto de la cara adaxial como la abaxial, se observó diferencias altamente significativas ($P < 5\%$) entre los tratamientos (Cuadro 16). Las comparaciones de medias, en el número de estomas en la epidermis adaxial, T1 mostró que el valor más alto con 8.87 e/mm^2 , seguido por T0 con 2.47 e/mm^2 . T2 con 2.13 e/mm^2 y T3 con 1.66 e/mm^2 (Figura 16A).

Cuadro 16. Análisis de la varianza para la variable densidad estomática de la epidermis adaxial y abaxial en los diferentes tratamientos

F.V.	Densidad estomática de la epidermis abaxial					Densidad estomática de la epidermis adaxial			
	G.L	S.S	S.M	F	P	S.S	S.M.	F	P
Tratam	3	10733.5	3577.8	651.83	0.0000 **	1043.30	347.76	278.3	0.0000 **
Repetic	29	162.9	5.62	1.02	0.4499 ns	28.37	0.978	0.78	0.7691 ns
E.E.	87	477.5	5.49			108.70	1.249		
Total	119	11373.9				1180.37			
C.V.	11.69					29.54			

ns: No existen diferencias estadísticamente significativas *; Existen diferencias estadísticamente significativas; **: Existen diferencias altamente significativas (P<0,05)

No obstante al comparar las medias por pruebas de Tukey de la densidad estomática en la epidermis abaxial, los valores promedios más altos lo muestran T1 y T0 con 30.87 e/mm² y 27.73 e/mm² respectivamente, seguido por T3 con un valor de 12.93 e/mm² y el valor más bajo lo registra T2 con 8.6 e/mm² (Figura 16 B).

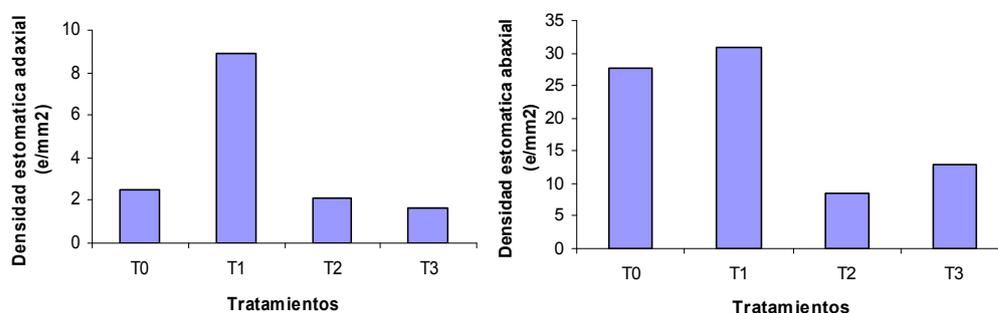


Figura 16. Comparación de la densidad estomática de la lamina foliar de los diferentes tratamientos evaluados. A. Epidermis adaxial. B. Epidermis abaxial

Los resultados mostraron que los tratamientos que no se les aplicó el EE (T0 y T1), presentaron mayor densidad estomática en ambas epidermis en comparación con los tratamientos con EE (T2 y T3); muchos autores (Trujillo *et al.* 1997 y Hernandez *et al.* 2006) proponen que una alta densidad estomática caracteriza a materiales susceptibles a enfermedades cuya infección se inicia por heridas naturales en la lamina foliar, siendo el caso de *X. phaseoli* quien infecta las hojas produciendo aumento de la transpiración, y por ende alteraciones en los estomas, en cuanto a forma, ubicación y número (Agrios. 2007).

Estos resultados entre los tratamientos sugirieron efecto del EE sobre la densidad estomática, como barreras físicas para el control de la invasión de la bacteria en el interior la hoja. (Kniskern. 2001).

La longitud de las células estomáticas fue determinada en ambas epidermis, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($P < 5\%$) entre los tratamientos. como se observa en el cuadro 17.

Cuadro 17. Análisis de la varianza para la variable longitud estomática de la epidermis adaxial y abaxial en los diferentes tratamientos

F.V.	Longitud estomática de la epidermis abaxial					Longitud estomática de la epidermis adaxial			
	G.L	S.S	S.M	F	P	S.S	S.M.	F	P
Tratam	3	25.689	8..56300	1.16	0.3288 ns	41.62	13.8720	1.25	0.2864 ns
Repetic	29	177.490	6.12033	0.83	0.7080 ns	260.59	8.9859	0.81	0.7349 ns
E.E.	87	640.821	7.36576			964.94	11.0913		
Total	119	844.000				1267.15			
C.V.	13.11					15.69			

ns: No existen diferencias estadísticamente significativas *: Existen diferencias estadísticamente significativas; **: Existen diferencias altamente significativas ($P < 0,05$)

La longitud de los estomas en la epidermis adaxial, mediante comparaciones de medias por pruebas de Tukey, formó un único grupo, donde T1 promedió 22.16 μm , seguido de T2 con 21.2 μm , T3 con 20.96 μm y T0 20.56 μm (Figura 17a). En la epidermis abaxial T0 registró el valor promedio de 21.21 μm , seguido de T3 con 21.12 μm y T1 y T2 con valores de 20.24 μm respectivamente (Figura 17b).

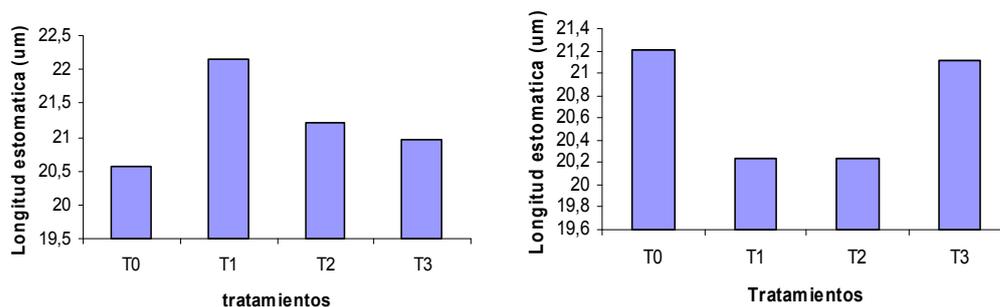


Figura 17. Comparación de la longitud estomatica de la lamina foliar de los tratamientos evaluados. A. Epidermis adaxial. B. Epidermis abaxial

Los resultados anteriores indicaron que la longitud de las células estomáticas, tanto de la epidermis adaxial como la abaxial no presentaron variabilidad en el tamaño de los estomas, por lo tanto, no se mostró efecto del EE sobre esta variable. Algunos autores Bourgaud, 2001; Kniskern, 2001; Agrios, 2007, entre otros; describen que los cambios en la estructura de la epidermis se realiza a través del tiempo, por medio de presión selectiva sobre los patógenos potenciales como defensa pasiva; sugiriendo que el EEFE no induce cambio alguno en el tamaño de los estomas, siendo ésta una característica intrínseca de la planta.

La densidad de tricomas en ambas epidermis determinó diferencias altamente significativas ($P < 5\%$) entre los tratamientos (Cuadro 18).

Cuadro 18. Análisis de la varianza para la variable densidad de tricoma de la epidermis adaxial y abaxial en los diferentes tratamientos

F.V.	Densidad de tricomas de la epidermis abaxial					Densidad de tricomas de la epidermis adaxial			
	G.L	S.S	S.M	F	P	S.S	S.M.	F	P
Tratam	3	46.158	15.3861	22.46	0.0000 **	52.9000	17.6333	65.00	0.0000 **
Repetic	29	16.175	0.5578	0.81	0.7296 ns	7.8667	0.2713	1.00	0.4798 ns
E.E.	87	59.592	0.6850			23.6000	0.2713		
Total	119	121.925				84.3667			
C.V.	64.91					135.87			

ns: No existen diferencias estadísticamente significativas; *: Existen diferencias estadísticamente significativas **: Existen diferencias altamente significativas ($P < 0.05$);

Según pruebas de medias, la densidad de tricomas de la epidermis adaxial, se encontró que T0 es el único tratamiento que registró tricomas con un valor promedio de 1.53 t/mm^2 (Figura 18A). Sin embargo, la densidad de tricomas en la epidermis abaxial, formo dos grupos homogéneos, destacándose T0 con un valor promedio de 2.33 t/mm^2 , seguido del segundo grupo conformado por T1. T3 y T2 con valores promedios de 1.07 t/mm^2 . 0.93 t/mm^2 y 0.77 t/mm^2 respectivamente (Figura 18B).

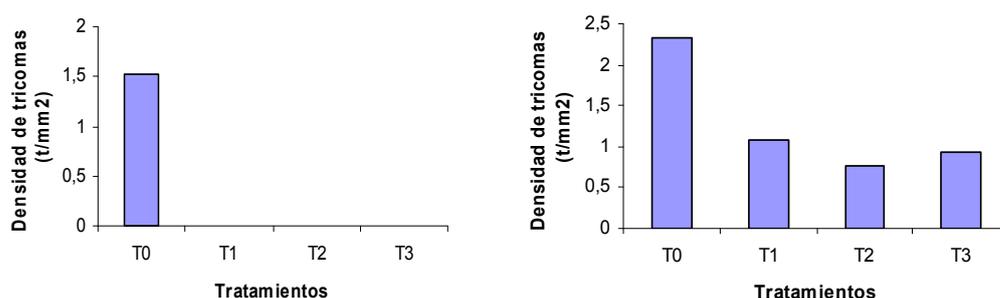


Figura 18. Comparación de la densidad de tricomas de la lamina foliar de los tratamientos evaluados. A. Epidermis adaxial. B. Epidermis abaxial.

Los resultados indicaron, que la densidad de tricomas se observo principalmente en la epidermis abaxial en los tratamientos evaluados, encontrándose T0 con los más altos valores en ambas epidermis, mientras que los tratamientos restantes mostraron menos del 60 %. Estos resultados indicaron efecto del EE sobre la densidad de tricomas, conociendo que el numero de tricomas puede estar condicionada por el ambiente (Kniskern, 2001); siendo de suma importancia en la adaptabilidad y protección de la planta ante la invasión de patógenos que colonizan la superficie foliar.

El parénquima de empalizada evidenció diferencias estadísticamente significativas ($P < 5\%$) entre los tratamientos (Cuadro 19).

Cuadro 19. Análisis de la varianza para la variable parénquima de empalizada en los diferentes tratamientos

Parénquima de empalizada					
F.V.	G.L	S.S	S.M	F	P
Tratamientos	3	18634.7	6211.58	250.18	0.0000 **
Repetición	29	906.5	31.26	1.26	0.2059 ns
E.E.	87	2160.1	24.83		
Total	119	21701.3			
C.V.	11.82				

ns: No existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$); *: Existen diferencias estadísticamente significativas; ** Existen diferencias altamente significativas ($P < 0.05$)

Mediante comparaciones de medias por pruebas de Tukey se formaron dos grupos homogéneos. El primer grupo se conformo por T2 y T3, mostrando los valores más altos del grosor del parénquima con 53.34 y 55.78 μm respectivamente, y el segundo grupo por T0 y T1 con valores de 28.96 y 30.48 μm respectivamente (Figura 19).

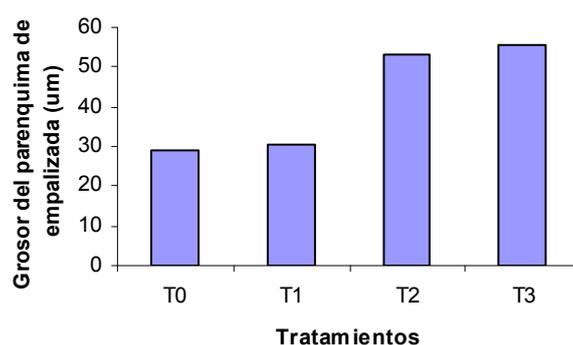


Figura 19. Comparación del grosor del parénquima de empalizada de la lamina foliar en los tratamientos evaluados

El resultado de la comparación mostró que los tratamientos con EEFÉ (T2 y T3), obtuvieron un 45 % de incremento comparado con los no tratados con EEFÉ (T0 y T1). Son conocidas las implicaciones que produce las alteraciones en los tejidos fotosintéticos causados por *X. phaseoli*, porque disminuye la fotosíntesis afectando los cloroplastos y ocasionando su degeneración además, de efectuar la invasión intercelular por medio de estos tejidos (Agrios, 2007). Los resultados determinaron que el EEFÉ ejerció un efecto sobre el desarrollo y arreglo de las células parenquimáticas, beneficiando los procesos fisiológicos y bioquímicos de la planta, así como el aumento de la resistencia a la infección de la bacteria.

En los valores obtenidos en las mediciones del parénquima esponjoso se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 5\%$) entre los tratamientos (Cuadro 20).

Cuadro 20. Análisis de la varianza para la variable parénquima esponjoso en los diferentes tratamientos

Parénquima esponjoso					
F.V.	G.L	S.S	S.M	F	P
Tratamientos	3	28036.7	9345.57	195.3	0.0000 **
Repetición	29	1724.0	59.45	1.24	0.2191 ns
E.E.	87	4163.3	47.85		
Total	119	33924.0			
C.V.	10.10				

ns: No existen diferencias estadísticamente significativas *; Existen diferencias estadísticamente significativas; **: Existen diferencias altamente significativas ($P < 0,05$)

A partir de pruebas de medias se formaron tres grupos homogéneos, el primer grupo se conformó con T2 registrando valores de $90\mu\text{m}$. el segundo grupo por T3 con $75.76\mu\text{m}$ y el último grupo formado por T0 y T1 con valores de 52.16 y $56.15\mu\text{m}$ respectivamente (Figura 20).

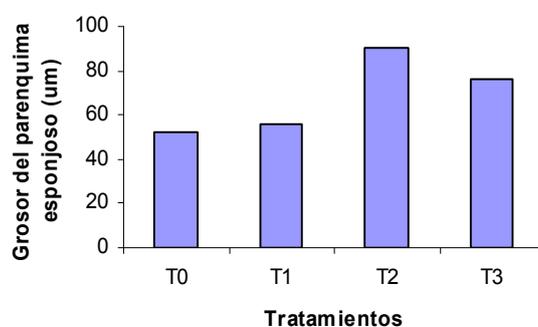


Figura 20. Comparación del parénquima esponjoso de la lamina foliar de los tratamientos evaluados.

El grosor del parénquima esponjoso, se incremento en un 34 % en los tratamientos aplicados el EEFÉ (T2 y T3) en comparación a los no aplicados (T0 y T1). Este resultado nos indica que el EEFÉ ejerce un control sobre la infección y desarrollo de *X. phaseoli*, ya que las infecciones iniciales son a través de las células del mésofilo, logrando la invasión a

los tejidos vasculares llegando a penetrar las semillas, asegurando así su supervivencia (Swings y Civerolo. 1993 y Contreras. 2001).

CONCLUSIONES

La concentración de 10 % del EEFE inhibió el crecimiento de *X. phaseoli*, no mostrando efecto fitotóxico ni alelopático sobre la germinación de las semillas.

En el ensayo *in vivo*, se evidenció un efecto inhibitorio del EEFE sobre la patogenicidad de *X. phaseoli* en la fase reproductiva del cultivo, presentándose los más altos valores en porcentaje de incidencia y grados de severidad en los tratamientos no aplicados el extracto.

Los tratamientos aplicados el EEFE mostraron mejor comportamiento agronómico en la germinación y desarrollo de plántulas en comparación a las no tratadas.

Se apreciaron diferencias en la histología de la lamina foliar en plantas tratadas con el EEFE, en cuanto al grosor de la cutícula más la pared externa de las células epidérmicas, densidad estomatica y densidad de tricomas en ambas epidermis; registrando altos valores en la epidermis abaxial.

El EEFE, mostró diferencias apreciables en el tamaño del parénquima de empalizada y esponjoso, sugiriendo efecto sobre la anatomía estructural de la lámina foliar, potenciando así la defensa pasiva de la planta, en la penetración e invasión de la bacteria.

RECOMENDACIONES

De los resultados obtenidos en relación a la concentración óptima del EEFE, es importante continuar con ensayos *in vivo* para obtener concentraciones óptimas menores al 10%.

Evaluar los metabolitos secundarios presentes en el EEFE, para establecer posible modo de acción del efecto inhibitorio sobre *X. phaseoli*.

Continuar evaluando cambios histológicos, en el estudio de otras bacterias fitopatógenas de interés agrícola tratadas con extractos vegetales.

Los resultados obtenidos en esta investigación deben ser validados con ensayos a nivel de campo, además de continuar con nuevos ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* en otras bacterias fitopatógenas de interés agrícola.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Agrios, G. 2007. Fitopatología. Edit. Limusa. México. 821p.

Aliotta, G., Cafiero, G., Martínez-Otero, A. 2006. Weed germination, seedling growth and their lesson for allelopathy in agriculture. In: *Allelopathy: a physiological process with ecological implications*. (Eds. Reigosa, MJ., Pedrol, N., González, L.). Springer, Netherlands. pp. 285- 297.

Albarracin, M.; Trujillo, G. y Borges, O. 1982. La quemazón bacteriana de la caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) en Venezuela Rev. Fac. Agron. (Maracay), XII. (3-4): 213-225.

Ávalos G., A. y Pérez U., E. 2009. Metabolismo secundario en plantas. Reduca (Biología). Serie fisiología vegetal. 2(3): 119-145. Universidad Complutense. Madrid

Bermúdez, A. 1999. Enfoques metodológicos para la investigación etnobotánica sobre plantas medicinales. Memorias del Instituto de Biología Experimental. Caracas. Venezuela. 2:3-6

Blanco, G., Sánchez, D., Hernández, O. y Pérez, A. 2005. Evaluación preliminar del efecto de extractos acuosos provenientes de tres especies malezas en el desarrollo radical temprano del plátano (*Musa* AAB). pp. 604-609. En: Memorias XVII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas (ALAM). Varadero, Matanzas, Cuba.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Sci, 161. Pp 839-851.

Briceño S., G. A. 2008. Obtención de extractos etanólicos a partir de hojas de ruda (*Ruta graveolens* L.) y nim (*Azadirachta indica* Adr. Juss) y evaluación de su efecto en bacterias fitopatógenas del género *Erwinia*. Tesis de pregrado para la obtención del título de Ing. Agrónomo. Maracay-Venezuela. 35p.

Bruehl, G. 1987. Soilborne plant pathogenic bacteria survive. Mac Millan publishing company, New York, USA. Pp 25-40.

Bunch, R. 1997. Principios de la agricultura orgánica. Hoja a hoja (Costa Rica) 20:2-6.

Cabezas de Herrera, E. y Garcia, J.O. 1974. Ultrastructural changes produced in *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Pseudomonas viridiflava*. Phytopathologische Zeitschrift. Engl., Res. Engl. 81: 354-363.

Cafati, C. y Saettler, W. 1980. Effect of host on multiplication and distribution of bean common blight bacteria. Phytopathology 70(7): 675-670.

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1991. Progreso en la investigación y producción de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Cali-Colombia. 462p.

Chiapusio, G., Pellissier, F. y Gallet, C. 2004. Uptake and translocation of phytochemical 2-benzoxazolinone (BOA) in radish seeds and seedlings. J. Exp. Bot. 55(402), 1587-1592.

Contreras de Velásquez, N. 1983. Detección de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye en semillas de caraotas (*Phaseolus vulgaris* L.). 155p.

Contreras, N.; Trujillo, G.; Borges, O. y Centeno, F. 2001. Analisis ultraestructural de la interacción de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* con genotipos resistentes, moderadamente resistentes y susceptibles de *Phaseolus vulgaris* L. Interciencia, 26(11). Caracas- Venezuela. pp. 554-557.

Correa, A.; Batista, R. y Quintas, L. 2002. Plantas medicinais do cultivo a terapeutica. Petrópolis- Rio de Janeiro: Vozes.

Da Silva, M. y Ferreira de Sales, M. 2007. Phyllanthus L. (Phyllantaceae) en Pernambuco, Brasil. Acta Botanica Brasilica. Vol. 21 N° 1. São Paulo-Brasil.

Delgado, L., Gil, A., Lucena, J., P. Manzanilla, P., Sanabria, M y Perozo, Y. 2003. Metabolitos secundarios presentes en flor escondida (*Phyllanthus niruri* L. Euphorbiaceae). XV Congreso de botánica. 224 p.

Dias, L.S., 1991. Allelopathic activity of decomposing straw of wheat and oat and associated soil on some crop species. *Soil Tillage Res.* 21: 113-120.

Einhellig, F.A; Schon, M.K; Rasmussen, J. A. 1982. Synergistic effects of four cinnamic acid compounds on grain shorgum. *J. Plant Growth Regul.* 1: 251-258.

Einhellig, F. A. 1996. Interactions involving allelopathy in cropping systems. *Agron. J.* **88**:886-893.

Emino, E. y Warman, P. 2004. Biological assay for compost quality. En: *Compost Science & utilization.* 12(4). Pp 342-348.

García, J. M; Cenoz, I. y García, C. 2002. Composición natural para controlar la patología poscosecha de frutas y hortalizas y método de aplicación. Oficina Española de Patentes y Marcas, ES 2 163 999 1.

García R., J. A. 2008. Evaluación del efecto de extractos etanólicos vegetales de *Phyllanthus niruri* L. (Flor escondida) y *Heliotropium indicum* L. (Rabo de alacrán) en el control de bacterias fitopatógenas del género *Xanthomonas*. Tesis de grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Central de Venezuela. Maracay-Venezuela. 53p.

Gaunt, R. E. 1995. the relationship between plant diseaseseverity and yield. *Annu. Rev. phytophatol.* 33:199-144.

Gómez, M. 2006. Aceites esenciales contra hongos fitopatógenos. *Revista Andalucía Investiga*: 3, <http://www.andaluciainvestiga.com/>

Guerra, R.; Maselli, A.; Alemán, L. y Merchan, J. 2008. Evaluación de rizobacterias en el control de *Xanthomonas phaseoli* en el cultivo de carota (*Phaseolus vulgaris* L.). Taller Latinoamericano de Biocontrol de Fitopatógenos. Ciudad de La Habana (Cuba). 22-29 Sep.

Guevara, Y.; Maselli, A. y Sanchez, M.. 2000. Los extractos acuosos vegetales en el control de bacterias fitopatógenas. FONAIAP Divulgan N° 66. Abril-Junio. 6p.

Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.K. & Bohnert H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 463–499.

Haugland, E. & Brandsaeter, L. 1996. Experiments on bioassay sensitivity in the study of allelopathy. *Journal of Chemical Ecology* 22:1845-1859.

Heil, M. and Baldwin, I. 2002. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental evidence support for a slippery concept. *Trends plant science*, vol 7. 61-67p.

Hernandez, Y., Portillo, F., Portillo, M., Navarro, C., Rodríguez, J. y Velazco, J. 2006. Densidad estomatica en materiales de platano (*Musa* AAB, AAAB y ABB) susceptibles y resistentes a sigatoca negra (*Mycosphaerella fijensis*, Morelet). *Rev. Fac. Agron.* V 23 n3. Caracas-Venezuela.

Huerta, L. y M. Rodríguez. 1994. Supervivencia del agente causal del tizón común del frijol (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (E.F. Sm.) Down., en el suelo y en la rizosfera de algunas malezas en Chapingo, Edo. De México. *Serie protección vegetal* 1:29-33p.

Irigoyen, E. y Garbagnoli, C. 1997. Bacteriosis común del poroto (*Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* (E.F. Smith) Dowson: detección, infección y transmisión por semillas. *Fitopatología* 32(3) 166-172 p.

IPGRI. 1982. *Phaseolus vulgaris*. Descriptors International board for plants. Genetic Resources Rome. 32p.

Kniskern J., R. M. 2001. Two modes of host-enemy coevolution. *Population Ecology*. Vol. 43: 3-14p.

Layne-Garsaball, J. y Mendez-Natera, J. 2006. Efecto de extractos acuosos del follaje del corocillo (*Cyperus rotundus* L.) sobre la germinación de semillas y el crecimiento de plantulas de ajonjolí (*Sesamun indicum* L.) cv. arapatol. *IDESIA*. 24(2). Chile. Pp 61-75.

Leben , C. 1981. How plant-pathogenic bacteria survive. *Plant Disease*. 633-637p.

Levy, E.; Gouch, F.; Berlin, K.; P. and Smith, J. 1992. Inhibition of septoria tritici and other phytopathogenic fungi and bacteria by *Pseudomonas fluorescen* and its antibiotics. *Plant Pathology*. 41(3): 335-341.

Lorenzi, H. 2002. Plantas medicinai no Brazil-natives e exoticas. Nova Odessa-Sao Paulo. *Plantarum*. 60p.

Lorian, V. 1980. Antibiotics in laboratory medicine. New York. Departament of Patology Albert Einstein College of Medicine. 432p.

Lynn, D. and Chang M. 1990. Phenolic signals in cohabitation: implications for plant development. . *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41, 497-526.

Macías, F. A.; Castellano, D.; and Molinillo, M. J. G. 2000. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. *J. Agric. Food Chem.* 48:2512–2521.

Medeiros, R.B.; Ferreira, M.A.S. y Dianese, J.C. 2003. Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta-patógeno. Brasilia. Editora UNB. Pág. 289

Méndez, R., Maselli, A., Alemán, L. y García, J. 2007. Evaluación *in vivo* de extractos etanolicos de nim (*Azadirachta indica*) y flor escondida (*Phyllanthus niruri* L.) en el control de la bacteriosis causada por *Xanthomonas phaseoli* en plantas de caraotas (*Phaseolus vulgaris* L.). Memorias del XX Congreso venezolano de fitopatología, San Felipe, Yaracuy, Venezuela.

Miquilena, L y Lazo, J.V. 2005. Evaluación del potencial alelopático de exudados radicales de las especies *Amaranthus dubius* Mart, *Echinochloa colona* Link y *Trianthema portulacastrum* L. sobre especies cultivadas, ubicadas en agroecosistemas de los estados Aragua y Falcón, Venezuela. pp. 625-630. En: Memorias XVII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas (ALAM). Varadero, Matanzas, Cuba.

Molina, A.; Sánchez-Vallet, A. y Sánchez-Rodríguez, C. 2007. Inmunidad innata en plantas y resistencia a patógenos: Nuevos conceptos y potenciales aplicaciones en protección vegetal. Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal. 43-46p.

Morán L. E, Dávila M.I. 1989. Actividad citoquinínica del mesocarpio del chayote (*Sechium edule*) en cultivo de tejidos de la raíz de la zanahoria (*Daucus carota*). Rev Ciencias Agricultur. (37-38):108-11.

Nueva Constitución de Venezuela. 1999. Tomado de la gaceta oficial núm. 36.860. Año CXXVII- mes III. Caracas, jueves 30 de diciembre de 1999. 50p.

Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B. y Piater, L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. en immunological reviews, vol. 198, 249-266p.

Osborn, A.E. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. Plant Cell. Vol. 8. 1821-1831p.

Parra, K. 2005. Evaluación del efecto bactericida de 20 extractos etanolicos de plantas sobre *Pectobacterium chrysanthemi*, fitopatogeno de la zábila (*Aloe vera* L.) y del cocuy (*Agave cocui trelease*). Tesis de Pregrado para optar al título de Ingeniero Agrónomo de la Universidad Experimental Francisco de Miranda. Venezuela. 150p.

Pastor C., M. A., Beebe, S. E. y Correa, F. J. 1981. Comparing two inoculation techniques for evaluation resistance in beans to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. E: Lozano, J. C. (Ed). Proceeding of the 5th International conference on plant pathogenic bacteria, August,

1981, at Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Calí- Colombia, M. O., EU. 493-503p.

Pastor C., M.A. y Schwartz, H.F. 1995. Problemas de campo en los cultivos de frijol en el trópico. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Calí-Colombia. 303-340 p.

Ramírez, L. 2001. Efectos agudos crónicos de los plaguicidas en la salud humana. En memorias del Simposio “Impacto de los agroquímicos en el Occidente del país”. Barquisimeto. Lara. Venezuela. 30p

Reynolds, K.; Zanelli, M. and J. Laurence. 1987. Effects of sulfur dioxide exposure on the development of common blight in field-grown red kidney beans. *Phytopathology* 77(2): 331-334.

Robayo, D. y Rodríguez, Y. 2006. Determinación de la actividad alelopática de extractos de *Swinqlia glutinosa* Murray y *Piper aduncum* L., sobre germinación de semillas de arvenses. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Cundinamarca, Fusagasuga, Colombia. 84 p.

Rodríguez G., H. y Hechavarria S., I. 2004. Efectos estimulantes del crecimiento de extractos acuosos de plantas medicinales y gel de *Aloe vera* (L.) N. L. Burm. *Rev. Cubana Plant Med*; 9:2.

Rodríguez, D. y Sanabria, M. 2005. Efecto del extracto de tres plantas silvestres sobre la rizoctoniosis, la mancha sureña del maíz y los patógenos que las causan. *INTERCIENCIA* 30, 739-744.

Rodríguez, D., Sanabria, M. y Rodríguez, J. 2006. Comparación del efecto de los extractos acuoso y etanólico de *phyllanthus niruri* ante *phytophthora infestans*. VII Congreso SEAE Zaragoza N° 83. 5p.

Rincón, O. y Ruiz, R. 1983. El cultivo del frijol. Temas de orientación agropecuaria N° 139 Colombia 76 p.

Santiago M., J. 1998. La producción de leguminosas con referencia especial a comunidades campesinas de Venezuela. Un programa integral de investigación de leguminosas. (Memorias del taller realizado en Sartanejas, Abril de 1998). 58p

Sanabria, M., Rodríguez, D. y Rodríguez, J. 2003. Control *in vitro* de *Fusarium moniliforme*, *Sclerotium rolfii* y *Alternaria solani* con extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* L. Resumen. Fitopatología. Venezuela. 16, 31-34.

Salomón, J. 2002. Evaluación y selección de familias F2 y F3 de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) por su reacción a *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli*. Tesis de Msc presentada en la U.C.V. Maracay. 58 p.

Sigee, D.C. y Epton, H.A.S. 1975. Ultrastructure of *Pseudomonas phaseolicola* in resistant and susceptible leaves of French bean. *Physiological Plant Pathology* 6(1). *Ingl., Res. Ingl.* 29-34.

Stauffer B.; A. Orrego, A. y Aquino J. F. 2000. Selección de extractos vegetales con efecto fungicida y/o bactericida. *Revista de Ciencia y Tecnología*. Vol. 1 N° 2. Asunción-Paraguay. 29-33p.

Stefanova, M.; Rizo P., S. y Coronado I., M. 2005. Efecto *in vitro* de extractos de plantas sobre especies bacterianas del género *Xanthomonas*. *Fitosanidad* vol. 9, N° 3. La Habana-Cuba. 49-51.

Subero, L. 1998. Enfermedades causadas por hongos y bacterias en leguminosas comestibles. Un programa integral de investigación de leguminosas. (Memorias del taller realizado en Sartanejas, Abril de 1998). 131-133p.

Swings, J.G. y Civerolo, E. 1993. *Xanthomonas*. First ed. Chapman & Hall. London. 399 pp.

Tappel, A.L. and Marr, A. G. 1954. Antioxidants and enzymes effect of alpha-tocopherol, propyl gallate and nordihydroguaiaretic acid on enzymatic reactions. *Journal of Agriculture and food Chemystri* 2:554-558.

Trujillo, G. 1983. Algunos aspectos epidemiológicos de la quemazón de la caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) causada por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* en el Estado Aragua. Trabajo de ascenso para optar a la categoría de Prof. Asociado, presentado en U.C.V-Facultad de Agronomía. 123 p.

Trujillo, I., Hermoso, L. y De García E. 1997. Caracterización estructural de clones de banano: resistentes y no resistentes a la Sigatoka Amarilla. *Anales de Botánica Agrícola*. 4:59-62.

Ugarte M., J. L. 1999. Especies arbóreas atacadas por tiña (*Tillandsia recurvada* L.) y guaterpajaritos (*Loran thaceae*) en Maracay, susceptibilidad relativa, aspectos anatómicos y evaluación de algunos métodos de control químico y estudio de la alelopatía potencial. Tesis de Postgrado en Botánica Agrícola, Facultad de Agronomía, UCV- Maracay. pp 188.

United Nations Environment Programme (UNEP). 2004. Childhood pesticide poisoning. Information for advocacy and action. United nations environment program. Chatelaine, Suiza. 36p.

Van Etten, H.D.; Mansfield, J.W.; Bailey, J.A. and Farmer, E.E. 1994. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus phytoanticipins. *Plant Cell*. Vol 6: 1191-1192p.

Van Rheenen, H.; Hasselbach, O. And S. Muigai. 1981. The effect of growing beans together with maize on the incidence of bean disease and pests. *Neth. J. Plant Pathology* 87(5): 193-199.

Valarini, P. y Menten, J. 1991 Inoculacao artificial de sementes de Feijoo con *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e seu efecto sobre a qualidade sanitaria e a germinacao. *Summa Phytopatologica*, 17:3-4. 227-231p.

Varnero, M.; Orellana, R.; Rojas, C. y Santibáñez, C. 2006. Evaluación de especies sensibles a metabolitos fitotóxicos mediante bioensayos de germinación. El medioambiente en Iberoamerica: Visión desde la física y la química en los albores del siglo XXI. Sociedad Iberoamericana de física y química ambiental. Badajoz, España. Tomo III. Pp. 363-369

Velásquez, M. J. L. 1983. Evaluación del poder bactericida o bacteriostático de la fracción etanólica de la resina de gobernadora contra las bacterias fitopatógenas *Erwinia amylovora*, *E. atroseptica* y *Pseudomonas solanacearum*. Tesis de licenciatura. Universidad autónoma Agraria Antonio Narro. Buena vista, Saltillo, Coahuila, Mexico. 57 p

Vivanco, J., Cosío, E., Loyola-Vargas, V. y Flores, H. 2005. Mecanismos químicos de las plantas. Investigación y ciencia. Febrero. 68-75.

Wardle, D.A; Ahmed, M.; Nicholson, K.S. 1991. Allelopathic influence of nodding thistle (*Carduus nutans* L.) seeds on germination and radicle growth of pasture plants. New Zeal. J. Agric. Res. 34: 185-191.

Wardle, D.A; Nicholson, K.S and Ahmed, M. 1992. Comparison of osmotic and allelopathic effects of grass leaf extracts on grass seed germination and radicle elongation. Plant Soil 140: 315-319.

Webster, D. 1978. Evaluation of resistente in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli*. Tesis (Ph.D.) University of Wisconsin, Madison, E.U. 117p.

Weston, L A. 1996. Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. *Agron. J.* **88**:860-866.

Wink, M. 2003. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism; Annual Plant Reviews, volumen 2. ed. Sheffield academic Press.

Zamora, J. F.; Bernal, A.; Ruiz, M.; Soto, M.; Escalante, A. y Vibrans, H. 2005. Perfil de alcaloides de semillas de *Lupinus exaltatus* Zucc. (Fabaceae) y la actividad antifúngica del extracto alcaloideo y lupanina contra fitopatógenos. Rev. Mexicana de Fitopatología, julio-diciembre, año/vol. 23, num. 002. Sociedad Mexicana de fitopatología. A.C. Ciudad Obregón, México. Pp 124-129.

Zamorano, C. y Fuentes, C.L. 2005. Potencial alelopático de *Brassica campestris subsp. rapa* y *Lolium temulentum* sobre tres especies de malezas de la sabana de Bogotá. *Agron. Colomb.* 23(2), 261-268.

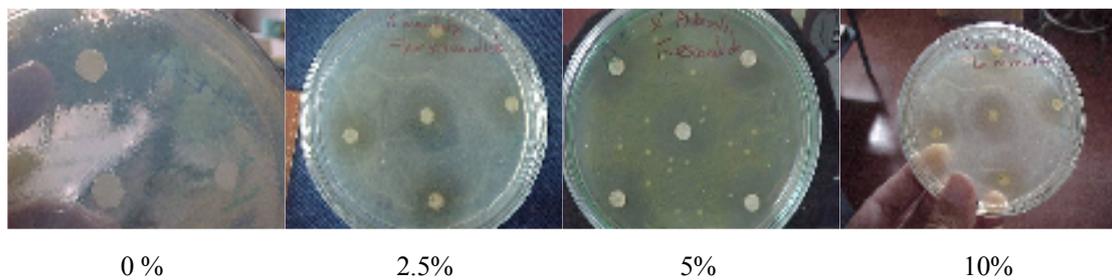
Zarate-Hernández, J.; García, R.; Zavala, F.; Pérez, R. y Soto, M. 2006. Fototoxicidad de los extractos de *Clias secundiflora* (Orti) Yakovlev. *Revista de Chapingo. Serie horticultura*, Julio-Diciembre. 12(2). Chapingo-Mexico. Pp. 197-202.

ANEXO

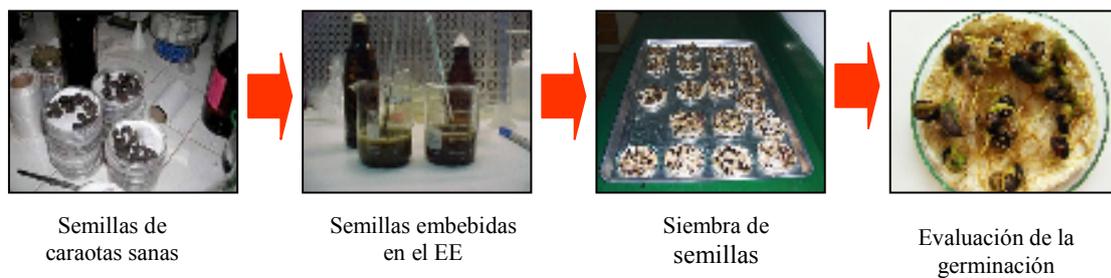
Anexo 1. Obtención y preparación del Extracto Etanólico (EE) de flor escondida



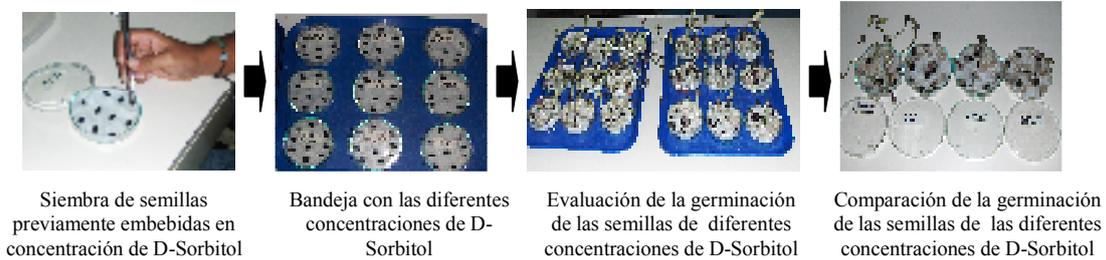
Anexo 2. Evaluación de la concentración óptima del extracto etanólico (EE) para la inhibición de la bacteria



Anexo 3. Esquema de evaluación del efecto del extracto etanólico (EE) de flor escondida sobre la germinación de semillas de caraota



Anexo 4. Esquema para la determinación del potencial osmótico en semillas de caraota



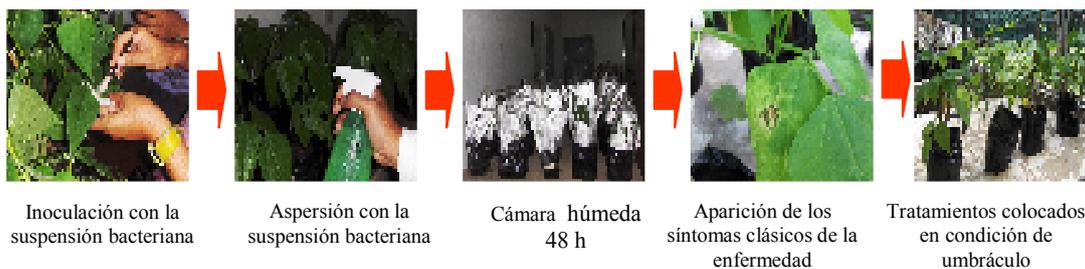
Anexo 5. Efecto del potencial osmótico (mOsm/Kg H₂O) de un gradiente de soluciones de D-sorbitol, sobre el porcentaje de germinación de semillas de caraotas

[D-sorbitol] (mg)/ 5 ml de agua destilada	Potencial Osmótico (mOsm/kg H ₂ O)	% Germinación
1	24	100
2	25	100
4	27	100
8	33	100
16	39	100
30	54	100
60	87	99
120	147	99
150	182	99
200	235	98
220	248	98
240	279	95
260	297	95
300	338	95
350	376	90
400	440	90
450	483	90
500	548	80

Anexo 6. Descripción del umbráculo



Anexo 7a. Esquema de inoculación de las plantas de caraotas con *Xanthomonas phaseoli*



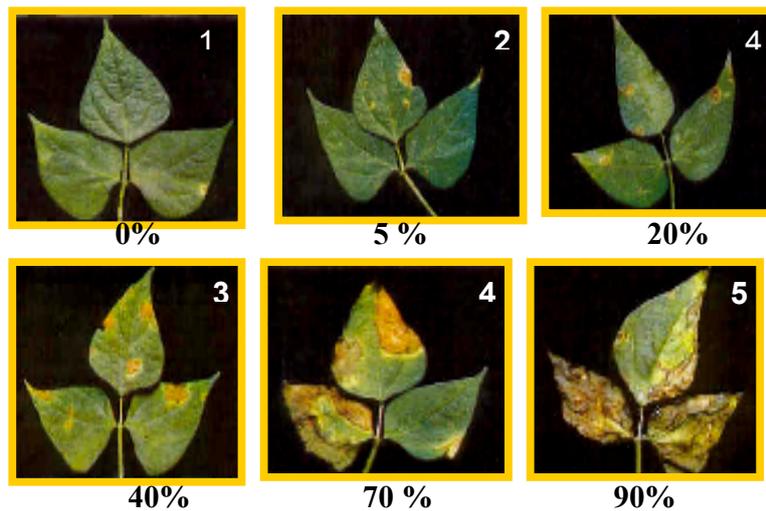
Anexo 7b. Disposición de los diferentes tratamientos en condición de umbráculo



Anexo 8. Aplicación del EE de flor escondida en plantas de caraotas



Anexo 9. Escala de daño de la quemazón bacteriana producida por *Xanthomona phaseoli* en plantas de caraotas, medida en grados de severidad (1-5) y porcentaje de infección



Anexo 10. Comparación de medias por prueba de Tukey, para la medición del halo de inhibición del EEFB sobre la bacteria *X. phaseoli* en los tratamientos evaluados

tratamientos	Medias	Grupos Homogéneos
3	2.0000	A
2	0.8047	B
1	0.7657	B

Alpha 0.05; Error por comparación: 0.5223
 Valor crítico: 3.00 Valor crítico por comparación: 1.2926
 Error de términos usados: Tratamiento*Repetición, 28 DF

Anexo 11. Comparación de medias por prueba de Tukey, para el % de germinación de semillas de caraotas, tratadas con EEFE

% Germinación		
tratamientos	Medias	Grupos Homogéneos
2	99.900	A
1	98.824	B

Alpha 0.05; Valor crítico: 2.858
Error de términos usados: Error 39 DF

Anexo 12. Comparación de medias por prueba de Tukey, en la emergencia de plántulas de caraotas, tratadas con EEFE, mediante largo y ancho de radícula, largo y ancho de plántulas.

Largo de radícula		
tratamientos	Medias	Grupos Homogéneos
2	13.259	A
1	12.477	B

Ancho de radícula		
tratamientos	Medias	Grupos Homogéneos
2	0.0381	A
1	0.0329	B

Alpha 0.05 ; Valor crítico: 2.858
Error de términos usados: Error 39 DF

Largo de Plántula		
tratamientos	Medias	Grupos Homogéneos
2	13.255	A
1	7.580	B

Ancho de Plántula		
tratamientos	Medias	Grupos Homogéneos
2	0.0854	A
1	0.0839	A

Alpha 0.05 ; Valor crítico: 2.858
Error de términos usados: Error 39 DF

Anexo 13. Comparación de medias por prueba de Tukey, en la severidad de la bacteria *X. phaseoli* por semanas de evaluación para cada tratamiento

Semanas	Medias	Grupos Homogéneos
5	5.9375	A
4	5.5937	A
3	4.2813	B
2	2.5625	C
1	1.8750	C

Alpha 0.05; Error por comparación: 0.3755
 Valor crítico: 3.857 Valor crítico por comparación: 1.0240
 Error de terminus usados: PLANTA*SEM*TRAT. 145 DF

Anexo 14. Comparación de medias por prueba de Tukey. en el % de incidencia de la bacteria *X. phaseoli* por semanas de evaluación para cada tratamiento

Tratamientos	Medias	Grupos Homogéneos
1	64.750	A
0	35.375	B
3	33.725	B
2	0.0000	C

Alpha 0.05; Error por comparación: 3.4830
 Valor crítico: 3.632; Valor crítico por comparación: 8.9454
 Error de terminus usados: PLANTA*SEM*TRAT. 145 DF

Anexo 15. Comparación de medias por prueba de Tukey, en las variables de rendimiento en plantas de caraotas tratadas con EEF. mediante ancho y largo de vainas; numero de semillas por vaina y peso de semillas por plantas

Ancho de vainas/planta		
tratamientos	Medias	Grupos Homogéneos
0	0.8950	A
2	0.8875	A
3	0.8287	AB
1	0.7975	B
3	0.7975	B
1	2.2500	B
tratamientos	Medias	Grupos

Alpha 0.05; Error por comparación: 0.0267
 Valor crítico: 3.943; Valor crítico por comp: 0.0745
 Error de terminus usados: REP*TRAT. 21 DF

Largo de vainas/planta		
tratamientos	Medias	Grupos Homogéneos
2	8.4750	A
3	6.9413	B
0	6.4038	B
1	6.1487	B
tratamientos	Medias	Grupos

Alpha 0.05; Error por comparación: 0.3465
 Valor crítico: 3.943; Valor crítico por compa. 0.9660
 Error de terminus usados: REP*TRAT. 21 DF

3	2.6425	B
1	2.0263	B

Alpha 0.05; Error por comparación: 0.03493
 Valor crítico: 3.943; Valor crítico por comp: 0.9738
 Error de terminus usados: REP*TRAT. 21 DF

Alpha 0.05; Error por comparación: 0.4068
 Valor crítico: 3.943; Valor crítico por compa. 1.1340
 Error de terminus usados: REP*TRAT. 21 DF

Vainas/planta		
tratamientos	Medias	Grupos Homogéneos
2	4.0000	A
3	3.2500	AB
1	2.7500	B
0	2.6250	B

Alpha 0.05; Error por comparación: 0.4283
 Valor crítico: 3.943; Valor crítico por comp: 1.1939
 Error de terminus usados: REP*TRAT. 21 DF

Anexo 16. Comparación de medias por prueba de Tukey. en las variables: longitud y densidad estomática; densidad de tricomas; grosor de la epidermis en la epidermis abaxial y adaxial; grosor del parénquima de empalizada y esponjoso en plantas de caraotas tratadas con EEFE

Longitud de estomas en la epidermis abaxial		
tratamientos	Medias	Grupos Homogéneos
T0	21.207	A
T3	21.120	A
T1	20.240	A
T2	20.240	A

Alpha 0.05; Error por comparación: 0.7008
 Valor crítico: 3.705; Valor crítico por comp: 1.8357
 Error de terminus usados: REP*TRAT. 87 DF

Longitud de estomas en la epidermis adaxial		
tratamientos	Medias	Grupos Homogéneos
T1	22.160	A
T2	21.200	A
T3	20.960	A
T0	20.560	A

Alpha 0.05; Error por comparación: 0.8599
 Valor crítico: 3.943; Valor crítico por compa. 2.2526
 Error de terminus usados: REP*TRAT. 87DF

Densidad estomática en la epidermis abaxial		
tratamientos	Medias	Grupos Homogéneos
T1	30.867	A
T0	27.733	B
T3	12.933	C
T2	8.600	D

Alpha 0.05; Error por comparación: 0.6049
 Valor crítico: 3.705; Valor crítico por comp: 1.5847
 Error de terminus usados: REP*TRAT. 87 DF

Densidad estomática en la epidermis adaxial		
tratamientos	Medias	Grupos Homogéneos
T1	8.8667	A
T0	2.4667	B
T2	2.1333	BC
T3	1.6667	C

Alpha 0.05; Error por comparación: 0.2886
 Valor crítico: 3.943; Valor crítico por compa. 0.7561
 Error de terminus usados: REP*TRAT. 87DF

Densidad de tricomas en la epidermis abaxial		
tratamientos	Medias	Grupos Homogéneos
T0	2.3333	A
T1	1.0667	B
T3	0.9333	B
T2	0.7667	B

Alpha 0.05; Error por comparación: 0.2137
 Valor crítico: 3.705; Valor crítico por comp: 0.5598
 Error de terminus usados: REP*TRAT. 87 DF

Densidad de tricomas en la epidermis adaxial		
tratamientos	Medias	Grupos Homogéneos
T0	1.5333	A
T1	0.0000	B
T2	0.0000	B
T3	0.0000	B

Alpha 0.05; Error por comparación: 0.1345
 Valor crítico: 3.943; Valor crítico por compa. 0.3523
 Error de terminus usados: REP*TRAT. 87DF

Epidermis abaxial		
tratamientos	Medias	Grupos Homogéneos
T2	18.880	A
T3	13.760	B
T1	7.200	C
T0	6.080	C

Alpha 0.05; Error por comparación: 0.5395
 Valor crítico: 3.705; Valor crítico por comp: 1.4132
 Error de terminus usados: REP*TRAT. 87 DF

Epidermis adaxial		
tratamientos	Medias	Grupos Homogéneos
T1	20.787	A
T3	20.483	A
T2	19.280	A
T0	15.857	B

Alpha 0.05; Error por comparación: 0.7297
 Valor crítico: 3.943; Valor crítico por compa. 1.9116
 Error de terminus usados: REP*TRAT. 87DF

Grosor del parénquima de empalizada		
tratamientos	Medias	Grupos Homogéneos
T3	55.780	A
T2	53.340	A
T1	30.480	B
T0	28.960	B

Alpha 0.05; Error por comparación: 1.2866
 Valor crítico: 3.705; Valor crítico por comp: 3.3703
 Error de terminus usados: REP*TRAT. 87 DF

Grosor del parénquima esponjoso		
tratamientos	Medias	Grupos Homogéneos
T2	90.000	A
T3	75.760	B
T1	56.147	C
T0	52.160	C

Alpha 0.05; Error por comparación: 1.7861
 Valor crítico: 3.943; Valor crítico por compa. 4.6790
 Error de terminus usados: REP*TRAT. 87DF