

Prevalencia de patógenos bacterianos en cultivos hortícolas a cielo abierto del municipio Jiménez, Estado Lara y evaluación de control alternativo mediante uso de extracto etanólico de *Lippia origanoides*.

Yoleidy Escalona*
María E. Sanabria
Dorian Rodríguez
Nelson Rincón

RESUMEN

Los rubros agrícolas de importancia en Jiménez-Estado Lara, son: cebolla, pimentón, tomate y papa, estos son afectados por enfermedades bacterianas controladas mayormente con aplicación indiscriminada de productos químicos. En el presente estudio, se determinó la identidad de los patógenos y se evaluó como alternativa ecológica la aplicación del extracto etanólico de *Lippia origanoides* K. El aislamiento bacteriano fue obtenido de muestras colectados en diferentes localidades, y las cepas fueron identificadas mediante técnicas convencionales. Los resultados indicaron que en las tres zonas evaluadas predominaron el tomate, pimentón y papa y las cepas que prevalecieron fueron *Pseudomona* sp., *Pectobacterium* sp., y *Xanthomonas* sp. La capacidad inhibitoria del Extracto al 4, 6 y 8% fue probada sobre el crecimiento de estas bacterias, determinándose que la concentración con mayor capacidad inhibitoria para todas fue de 6%. Estos resultados revelan el potencial del uso del EE como alternativa para el control de bacterias.

PALABRAS CLAVE: Etiología, *Xanthomonas*, bacteriosis.

*Posgrado de Fitopatología. Decanato de Agronomía. Universidad Centrocidental “Lisandro Alvarado”, Venezuela. E-mail: yoleidyescalona@ucla.edu.ve

Recibido: 20/11/2017

Aceptado: 03/03/2018

Bacterial pathogens in vegetable crops of the municipality Jiménez, Lara State and evaluating alternative control through implementation of ethanolic extracts of *Lippiaoriganoides*

ABSTRACT

The most important agricultural products in the municipality Jimenez are onions, pepper, tomatoes, and potatoes; these are affected by various bacterial diseases, for their control there is an indiscriminate use of chemical pesticides. In the present study, the identity of the pathogens was determined and ecological alternative using ethanolic extracts of *Lippia origanoides* K was evaluated. The bacterial isolate was obtained from different localities of the municipality, strains were identified by conventional techniques. Prevalence by area was tomatoes, pepper and potato and predominance of *Pseudomonas* sp., *Pectobacterium* sp *Xanthomonas* sp. The inhibitory capacity of EE at 4, 6 and 8% concentration was tested on the growth of these bacteria. The concentration with the highest inhibitory effect was 6% of EE. These results reveal the potential use of EE as an alternative for the control of bacteria.

KEY WORDS: Etiology, *Xanthomonas*, bacteriosis.

Introducción

El municipio Jiménez del estado Lara, Venezuela, se destaca en la producción de rubros hortícolas, debido a sus características climáticas, edáficas, de relieve y a una fuerte vocación agrícola de sus habitantes. La depresión de Quibor, enmarcada en este mismo municipio fue declarada en 1982, como una zona de aprovechamiento agrícola en el país, consolidándose como tal (Pierre y Betancourt, 2007), donde las principales especies cultivadas en esta entidad son: cebolla, pimentón, tomate y papa, con un aporte significativo a la producción nacional de estos rubros (MAT, 2008). Su manejo productivo es intensivo, caracterizado por una excesiva mecanización de los suelos, riegos y fertilización (Martínez y Alfonzo, 2003), esta situación, favorece la aparición de problemas fitosanitarios en los cultivos locales lo cual presenta implicaciones negativas que

el productor debe afrontar ya que los cultivos son afectados por plagas y enfermedades, entre éstas, las de origen bacteriano, tales como las manchas foliares, marchitez y pudriciones, presentan altos índices de severidad, por lo que generan grandes pérdidas económicas al agricultor, aunado a esto, se conlleva el uso indiscriminado de agroquímicos, lo cual genera graves problemas de salud en la comunidad y desequilibrios ecológicos, situación evidentemente insostenible en el tiempo (Pierre y Betancourt, 2007).

Según Stefanova *et al.* (2005) el manejo de las enfermedades bacterianas se ha hecho mundialmente difícil, debido a la resistencia a los fungicidas cúpricos y los antibióticos, los cuales durante muchos años, han sido empleados en la agricultura con ese fin, lo que ha motivado la búsqueda de alternativas biológicas, entre ellas los extractos vegetales (EV), acuosos (EA) o etanólicos (EE), los cuales han resultado promisorios por su destacado efecto bactericida (Molina, 2001; Pérez *et al.*, 2011).

Oliveira *et al.* (2007) afirmaron que el orégano silvestre (*Lippiaoriganoides* K.), a través de su metabolismo secundario sintetiza principalmente compuestos del grupo de los monoterpenos, como el carvacrol y el timol, efectivos por su actividad antimicrobiana, por cuanto promueven el aumento de la permeabilidad de la membrana citoplásmica y son capaces de desintegrar la exterior de las bacterias Gram-negativas, causando la liberación de lipopolisacáridos.

En este sentido, cabe mencionar que los rubros cultivados en esta zona, se han visto fuertemente afectados por enfermedades bacterianas, sin embargo no se dispone de documentación precisa acerca de los agentes causales ni de la prevalencia de los mismos, además es conocido que el uso indiscriminado de plaguicidas en el municipio Jiménez ha causado numerosos problemas ecológicos y de salud en sus habitantes. Por tal motivo, el objetivo de ésta investigación consistió en determinar la prevalencia de enfermedades bacteriana en cultivo a

cielo abierto del municipio Jiménez y evaluar el extracto etanólico foliar de *Lippia origanoides*, como alternativa para el control de patógenos bacterianos en los principales cultivos

1. Materiales y métodos

1.1. Determinación de la prevalencia de enfermedades bacterianas en cultivos hortícolas en el municipio Jiménez, en el estado Lara.

Para la evaluación de la prevalencia se procedió a cuantificar el número total de Unidades de Producción (UP) cultivadas a cielo abierto, las cuales fueron muestreadas en las diferentes localidades o sectores, de las Parroquia Diego de Lozada, Tintorero, Cabo José Dorante, Paraíso de San José y San Miguel, en el municipio Jiménez, durante el período octubre 2012- marzo 2013; el muestreo fue dirigido, cuantificándose el número total de plantas muestreado por cultivo, y el porcentaje que presentaban sintomatología bacteriana, tales como: marchitez, manchas foliares y pudriciones blandas, propias de bacteriosis (Agríos, 2005). De esta forma se calculó el número de individuos que, en relación con la población total, padecen una enfermedad determinada en un momento específico (Moreno *et al.*, 2000).

1.2. Aislamiento del patógeno, pruebas presuntivas y obtención de cultivo puro

Se colectaron muestras de hojas, tallos y frutos sintomáticos en tomate, pimentón, papa y cebolla, en las diferentes localidades bajo estudio, las mismas fueron llevadas al Laboratorio de Bacteriología del Posgrado de Agronomía, de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA), para el diagnóstico e identificación de las diferentes bacteriosis.

Para el aislamiento bacteriano, las muestras fueron desinfectadas con NaOCl(2%), lavadas tres veces con agua destilada estéril (ADE), maceradas y

mediante el método de dilución en serie, se obtuvieron alícuotas que fueron transferidas a cajas Petri con medio agar nutritivo (AN). Una vez ocurrida la formación de las colonias, se replicó, realizándose las pruebas presuntivas de KOH (3%), para determinar si eran Gram (-) ó Gram (+) (Suslowet *al.*,1982) y la tinción con rojo congo, para observar bajo el microscopio óptico (1000X), la forma de la célula bacteriana, seleccionándose las cepas presuntamente fitopatógenas.

Posteriormente, se realizaron diluciones en serie, para obtener a las 24 y 48 horas las colonias puras y proceder a someterlas a las siguientes pruebas para la identificación de las mismas, simultáneamente a conservar una muestra de la cepa en glicerol (20%), (French y Hebert, 1980).

1.3. Pruebas de patogenicidad

La preparación de los inóculos fue realizada a partir de cepas bacterianas puras desarrolladas en AN de 24-48 horas de crecimiento. Para ello se prepararon suspensiones con ADE con una concentración de 10^8 UFC/ ml, correspondiente al tubo N° 4, según la escala de McFarland (Barret, 1975). Para la inoculación, se utilizaron plantas de tomate, pimentón y cebolla provenientes de semillas y frutos sanos, sembradas en envases plásticos de 1 Kg, de capacidad, conteniendo una mezcla de sustrato preparado con tierra negra y cáscara de arroz (2:1), esterilizado con vapor.

Se inocularon plantas de 20 días de edad con las cepas bacterianas aisladas, mediante los métodos correspondientes, tales como: aspersion a las hojas con heridas y sin heridas e inoculación directa en el tallo, mediante colocación de algodón previamente impregnado con la suspensión bacteriana, sobre herida realizada en la base del tallo. Se inocularon tres plantas por cepa, el testigo consistió en 2 plantas tratadas de la misma manera para cada método, pero con agua destilada estéril (ADE); las plantas se mantuvieron en cámara húmeda en pre-inoculación por 48 horas y posterior a la inoculación por 72 horas, en

umbráculo a 27°C y 68% de HR, en promedio; se asperjaron con agua 2 veces al día y se realizaron observaciones diarias. Al observarse los síntomas, se realizaron los re-aislamientos, pruebas fisiológicas y bioquímicas, para corroborar que se trataba de las mismas bacterias inoculadas. Adicionalmente, en el caso del pimentón, debido a observación en el campo de síntomas de manchas bacterianas a nivel del pedúnculo del fruto, de manera simultánea se realizó un ensayo en el que se inoculó la cepa bacteriana directamente sobre esta estructura, corroborando las pruebas de patogenicidad.

1.4. Identificación y caracterización de las cepas bacterianas aisladas

Se realizó luego de 24 horas de crecimiento, a partir de colonias bacterianas puras en los medios de cultivo AN y YDC, observándose características de borde, brillo, elevación, consistencia y color de las cepas individuales. En colonias de 24 a 48 horas, procediéndose a la observación bajo el microscopio óptico (1000x) la forma de la célula bacteriana, previa tinción con rojo congo (Schaad *et al.*, 2001).

Para la determinación de las características fisiológicas y bioquímicas, se utilizaron las pruebas de KOH (3%); requerimiento de oxígeno (Prueba de Hugh y Leifson); bactofoenol rojo dextrosa agar, oxidasa, catalasa, hidrólisis de almidón, producción de H₂S, crecimiento a 35 y 40°C, producción de ureasa, digestión de las proteínas, licuefacción de la gelatina, hidrólisis de esculina, reducción de nitratos, utilización de carbohidratos y producción de ácidos a partir de los mismos (Klement *et al.*, 1990; Holt *et al.*, 1994; Schaad *et al.*, 2001).

1.5. Obtención de los extractos etanólicos foliares de *L. origanoides*

El extracto etanólico de orégano se obtuvo a partir de hojas plenamente desarrolladas y aparentemente sanas, secadas a la sombra, pulverizadas en una licuadora convencional Oster^{MR}. El polvo se colocó en un envase de vidrio, recubierto por un plástico negro, y se le agregó etanol (96%) hasta cubrirlo completamente. Se dejó macerar por 12 h, se filtró y con la ayuda de un rotavapor

Brinkmann^{MR}, se obtuvo el crudo, el cual se guardó bajo refrigeración (8°C) en frascos color ámbar, hasta el momento de realizar las pruebas de actividad biológica (Marcano y Hasegawa, 2002).

1.6. Evaluación *in vitro* del extracto etanólico de *L. origanoides* sobre el crecimiento de las bacterias diagnosticadas.

Las cepas bacterianas para este ensayo fueron seleccionadas bajo el criterio de ser representativas y con excelente crecimiento en agar nutritivo. Las bacterias en suspensión (100 µl ajustado a 10⁸ cel/ml) se sembraron en cápsulas Petri con AN, posteriormente, se impregnaron discos de papel de filtro estériles de 5 mm de diámetro, con 10 µl del EE al 4, 6 y 8%; como testigo negativo, se utilizó ADE. Los discos se ubicaron en forma equidistante a razón de 4/placa, lo cual constituyó una variante a la metodología original (Hernández y Trujillo, 2009). Se utilizó un diseño completamente al azar, con 5 repeticiones/tratamiento. Las evaluaciones se realizaron después de las 48 horas, midiéndose el tamaño del halo de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano y posteriormente los datos fueron sometidos al análisis de varianza, utilizando el programa Statistix 8.0.

2. Resultados y discusión

2.1. Prevalencia de enfermedades bacterianas en cultivos hortícolas del municipio Jiménez

Se abordaron veintiséis unidades de producción (UP) en el municipio Jiménez, cuya área agrícola se zonificó, correspondiendo la zona 1 a la parroquia Diego de Lozada (Piedra de Ojo, Si puedo, El Zancudo), siendo el cultivo más representativo el de tomate (52,94%), además de encontrarse pimentón (23,53%) y papa (23,53%); la zona 2, a las parroquias Cabo José Dorante (El Hato) y Tintorero (Rincón de Guardia, Colinas de Campo Alegre, Campo Lindo y Negrete Sur), donde el cultivo imperante fue el pimentón (90%), también se muestreo tomate en un 10%; y la zona 3, a las parroquias Paraíso de San José (Agua Negra, Sabanita y Palenque Arriba) y San Miguel (El Volcancito), en la cual sobresalió el

cultivo de papa, con un 76,92% seguido de cebolla y tomate, con 15,38% y 7,69% respectivamente. (Cuadro 1).

De las 26 UP muestreadas, 14 presentaron plantas con síntomas de bacteriosis, representando un total de 53,85%. Al respecto, las muestreadas por cultivo fueron: en cebolla 2, en pimentón 11, en tomate 5 y en papa 8, con prevalencias de 100; 36; 40 y 62,5%, respectivamente (Cuadro 2). En general, los síntomas predominantes fueron manchas, marchitez y pudriciones, con un 73,08; 42,30 y 26,92 %, respectivamente.

Cuadro 1. Cultivos encontrados en tres zonas del municipio Jiménez del estado Lara en el período de octubre 2012- marzo 2013

Zona	Cultivo	% Prevalencia
Zona 1. Parroquia Diego de Lozada	Tomate	52,94%
	Pimentón	23,53%
	Papa	23,53%
Zona 2. Parroquias Cabo J. Dorante y Tintorero	Pimentón	90%
	Tomate	10%
Zona 3. Parroquias San José y San Miguel	Papa	76,92%
	Cebolla	15,38%
	Tomate	7,69%

Cuadro 2. Fincas afectadas por enfermedades bacterianas en las localidades Piedra de Ojo, Si puedo, El Zancudo, El Hato, Rincón de Guardia, Colinas de Campo Alegre, Campo Lindo, Negrete Sur, Agua Negra, Sabanita, Palenque Arriba y San Miguel

Cultivo	Nº Fincas evaluadas	Nº Fincas afectadas	% de Prevalencia
Cebolla	2	2	100%
Pimentón	11	4	36%

Tomate	5	2	40%
Papa	8	5	62.5

Estos resultados podrían compararse con los obtenidos por Jiménez *et al.* (2013 a), quienes estudiaron la prevalencia de enfermedades bacterianas en plántulas de pimentón en casas de cultivo del municipio Jiménez, y reportaron que de un total de 19 estructuras evaluadas, 14 mostraron síntomas bacterianos, representando el 73,68%, valor éste un tanto superior al obtenido a nivel de campo en esta investigación, lo que posiblemente sea causado por el menor porcentaje de humedad, en comparación a las condiciones dentro de las estructuras protegidas, ya que un ambiente cálido, húmedo y sin corrientes de aire dentro de la estructura protegida favorece la aparición de enfermedades bacterianas (Baker y Linderman, 1979). Sin embargo el uso de estructuras protegidas llevando a cabo la implementación de unas series de medidas de prevención de plagas y enfermedades es la mejor opción para los productores en la actualidad, ya que tal como lo señala (Urrestarazu *et al.*, 2006).

2.2. Aislamiento de los patógenos bacterianos y pruebas de patogenicidad

Se obtuvieron 35 aislamientos bacterianos puros a partir de las muestras colectadas, los resultados del análisis de las pruebas presuntivas, permitieron identificar a nivel de género. En tomate, se aislaron 13 cepas (37,15%), en pimentón 12 (34,29%), en papa 8 (22,85%) y en cebolla 2 (5,71%); no obstante, se seleccionaron 12 cepas representativas, bajo los criterios de importancia patogénica en tales cultivos y mayor frecuencia de aparición, los mismos fueron inoculados, para comprobar los postulados de Koch.

Los 12, aislamientos seleccionados se codificaron de acuerdo a su procedencia, los de pimentón: P-0, P-1, P-2, P-3, P-4, P-5; de tomate: T-1, T-2, T-3; de cebolla: C-1, C-2 y de papa: Pa-1. Las bacterias inoculadas por cultivo produjeron

los síntomas observados en las muestras de las cuales fueron aisladas, con lo cual se comprobó los postulados de Koch, dándose dos excepciones en las codificadas como P-1 y T-2, las cuales no generaron síntomas en plantas y/o en fruto (caso P-1), luego de la inoculación.

2.3. Identificación y caracterización de la bacteria

La caracterización cultural, bioquímica y morfológica de los aislamientos (cuadros 3 y 4), permitió identificarlos en base a la coincidencia con las características descritas para diversas especies bacterianas reportadas (Schaad *et al.*, 2001), resultados estos que en gran parte están en concordancia con lo reportado en el caso del pimentón por O'Garro (1998); Mitrevet *al.* (2000); Fiori y Schiaffino (2004); Martinet *al.* (2004); Lewiet *al.* (2007); Herman *et al.* (2008); Honget *al.* (2012). En el caso del aislamiento "P-2" identificado como *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, no se le encontró un reporte análogo, sugiriéndose la realización de más estudios al respecto.

La presencia de *Ralstonia solanacearum* y *P. carotovorum* (antes *Erwinia caratovora*) fueron señaladas por Escalona *et al.* (2006) en pimentón, en la zona baja del municipio Jiménez. De igual modo, Jiménez *et al.* (2013a), en casas de cultivo del mismo municipio determinaron la presencia de *Xanthomonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Erwinia* spp., *Burkholderia* spp., *Pantoea* spp. y *Agrobacterium* spp., en plántulas.

Cuadro 3. Características culturales y morfológicas de los aislamientos bacterianos seleccionados por cultivo de muestras obtenidas del municipio Jiménez del estado Lara. Período:

AISLAMIENTO BACTERIANO												
	P-0	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5	T-1	T-2	T-3	C-1	C-2	Pa-1
Características culturales												
Color	Amarilla	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Blanca	Amarilla	Amarilla	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Blanca
Forma	Circular	Irregular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Irregular	Circular	Circular	Circular	Circular
Borde	Liso	Ondulado	Ondulado	Liso	Ondulado	Liso	Liso	Ondulado	Liso	Ondulado	Ondulado	Ondulado
Superficie	Convexa	Aplanada	Aplanada	Convexa	Aplanada	Convexa	Convexa	Aplanada	Convexa	Aplanada	Aplanada	Aplanada
Consistencia	Mucosa	Mucosa	Mucosa	Mucosa	Mucosa	Mucosa	Mucosa	Mucosa	Mucosa	Mucosa	Mucosa	Mucosa
Características morfológicas												
KOH al 3%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Forma	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo

Procedencia de los aislamientos: P-0, P-1, P-2, P-3, P-4, P-5: pimentón; T-1, T-2, T-3: tomate; C-1, C-2: cebolla; Pa-1: papa.

Según Tudor-Nelson et al. (2003) se ha observado la afectación del cultivo de pimentón por la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* y los esfuerzos para aumentar la producción en los mismos han sido limitados, principalmente por las dificultades encontradas en el control de la enfermedad (O'Garro, 1998 y Martin et al., 2004), por cuanto es favorecida por el clima cálido y húmedo, reduciendo considerablemente el rendimiento, la calidad del fruto y puede destruirlo por completo (Martin, et al., 2004). En este mismo sentido, *Ralstonia solanacearum* causante de la marchitez bacteriana, es mencionada por Hong et al. (2012) como una de las enfermedades más destructiva en las regiones tropicales, subtropicales y templadas del mundo, infectando a más de 200

especies de plantas diferentes y es de difícil erradicación, una vez que la bacteria se introduce en cualquiera de estos sistemas de producción.

Cuadro 4. Características fisiológicas y bioquímicas de los aislamientos bacterianos seleccionados por cultivo de muestras obtenidas del municipio Jiménez del estado Lara.

Medio de cultivo	AISLAMIENTO BACTERIANO												
	P-0	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5	T-1	T-2	T-3	C-1	C-2	Pa-1	
Pruebas bioquímicas y fisiológicas													
Medio Hugh y Leifson	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Medio YDC	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Fluorescencia en Medio KB	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Medio D1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Medio D3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Medio Arginina dehidrolasa	N/D	-	-	-	N/D	N/D	N/D	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D
Crecimiento a 40°C	N/D	-	+	N/D	N/D	N/D	N/D	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Hidrólisis de Esculina	+	N/D	N/D	N/D	N/D	+	+	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Litmus Milk	+	N/D	N/D	N/D	N/D	+	+	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Levan	N/D	N/D	N/D	+	N/D	N/D	N/D	N/D	+	N/D	N/D	N/D	N/D
Hidrólisis de Almidón	+	N/D	-	N/D	N/D	+	+	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Reducción de Nitratos	N/D	N/D	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	-	N/D	N/D	N/D	N/D
Oxidasa	N/D	N/D	N/D	-	N/D	N/D	N/D	N/D	-	N/D	N/D	N/D	N/D
Crecimiento a 37°C	N/D	N/D	N/D	-	+	N/D	N/D	N/D	-	+	+	+	+

Producción de Indol	N/D	N/D	N/D	N/D	-	N/D	N/D	N/D	N/D	-	-	-
Reducción de azúcares a partir de Sacarosa	N/D	N/D	N/D	N/D	-	N/D	N/D	N/D	N/D	-	-	-
Arabinosa	+	N/D	N/D	N/D	N/D	+	+	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Mannosa	-	N/D	N/D	N/D	N/D	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Melibiosa	N/D	N/D	N/D	N/D	+	N/D	N/D	N/D	N/D	+	+	+
Sacarosa	N/D	N/D	-	+	N/D	N/D	N/D	N/D	+	N/D	N/D	N/D
Bacteria Identificada	<i>Xc</i>	<i>Rs</i>	<i>Aac</i>	<i>Ps</i>	<i>Pc</i>	<i>Xc</i>	<i>Xc</i>	<i>Rs</i>	<i>Ps</i>	<i>Pc</i>	<i>Pc</i>	<i>Pc</i>

N/D: Prueba no determinante para identificar al aislamiento bacteriano a nivel de especie, una vez establecido su género

Especies bacterianas identificadas: *Xc*: *Xanthomonas campestris*; *Rs*: *Ralstonia solanacearum*; *Aac*: *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*; *Ps*: *Pseudomonas syringae*; *Pc*: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*;

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* (*Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*), ocasionante de la pudrición y posterior muerte de plántulas, afectándolo hasta en la etapa de post-cosecha (Hadas et al., 2001; El-Hendawy et al., 2002; Fiori y Schiaffino, 2004). También encontramos a *Acidovorax avenae* y *A. citrulli* (antes *A. avenae* subsp. *citrulli*), patógeno de cucurbitacea, tal como la patilla. En pimentón no está reportada como patógeno, sin embargo se ha encontrado asociada al mismo, debido a que este puede ser transmitido por semilla a través de colonización epífita, lo que trae consigo que patógenos bacterianos transmitidos en las plántulas no hospedantes como epífitas, cuando se plantan en la proximidad de plántulas susceptibles del huésped, pueden dispersar potencialmente el patógeno dando lugar a epidemias inesperadas (Dutta et al., 2014).

En el caso del tomate, se coincidió con Hanson *et al.* (1998); Wilson *et al.* (2002); Cuppels *et al.* (2006); Herman *et al.* (2008); Hong *et al.* (2012) en cuanto a las especies reportadas en este estudio; asimismo en el cultivo de cebolla. El tomate es principalmente afectado por la mancha bacteriana, cuyo agente etiológico es *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* (Rázuri *et al.*, 2005 y Pierre y Betancourt, 2007). Chaudhry y Rashid (2011) y Huang *et al.* (2012) consideraron esta bacteria entre los patógenos más importantes, señalando además que puede ser causada por al menos cuatro representantes de *Xanthomona*, taxonómicamente distintas. O'Garro (1998); Wilson *et al.* (2002) y Herman *et al.* (2008) señalaron que el aumento de la producción en los cultivos enfermos se dificulta, por el deficitario control, la reducción de la capacidad fotosintética del follaje infectado y adicionalmente, las lesiones en los frutos, que disminuyen el valor comercial del producto. Cuppels *et al.* (2006) la consideraron como una enfermedad muy persistente, económicamente importante y hacen referencia a que aunque no suele matar a las plantas, los síntomas en las bayas pueden disminuir su comerciabilidad.

En cebolla, la pudrición central de la cebolla ocasionada por *Pantoea ananatis*, puede ser transmitida por la semilla (Janse, 2012), la pudrición bacteriana del bulbo de la cebolla causada por *Burkholderia cepacia* (Sotokawa y Takikawa (2004), pero además encontramos la pudrición blanda cuyo agente causal es *Pectobacterium caratovorum* (= *Erwinia caratovora*), tal como lo menciona Abdalla *et al.*, 2013 esta última diagnosticada en este trabajo, la cual es una patología importante para el cultivo, ya que aunque la podredumbre blanda bacteriana ocurre en muchos tipos de cultivos, en cebolla puede reducir considerablemente el rendimiento de cosechas de tanto en el campo como en el almacén, ya que la encontramos también como patógeno poscosecha.

Para el caso de papa, el patógeno bacteriano diagnosticado fue *Pectobacterium carotovorum*, patógeno de importancia agrícola causante de la pudrición de la papa Rezaei y Taghavi (2010) y Salmaan *et al.* (2010); El cual también ha sido reportado por Trujillo *et al.* (2001) quienes comprobaron la presencia de este patógeno en semillas de este mismo cultivo colectadas en Quíbor y que además coincide con Hernández y Trujillo (2004), Tavasoliet *al.* (2011), Abdul *et al.* (2012) y Anajjar *et al.* (2014), al reportar la misma especie bacteriana afectando al cultivo de la papa. Al respecto, Tavasoli *et al.*, (2011) y Hernández y Trujillo (2004) señalaron como agente causal de la pudrición de la papa a *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* y a *Dickeya chrysanthemi.*, las cuales además de la papa tienen una amplia gama de hospedantes, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, mientras que *P. atrosepticum* se limita casi exclusivamente a la papa en las regiones templadas. Anajja *et al.* (2014) plantearon que a menudo *Pectobacterium carotovorum* persiste como una infección latente en tubérculos, pudiendo afectar hasta en post-cosecha, disminuyendo el rendimiento y aumentando el costo de producción; además de que causan sintomatologías diferentes dentro de un huésped. En este particular, en condiciones húmedas, puede provocar maceración de tejidos parenquimáticos del tallo subterráneo generando el síntoma del “pie negro”; En contraste, en condiciones secas se puede dar origen a marchitez, clorosis y desecación de la planta afectada.

Para el lapso de tiempo en el que se realizó este estudio, en la zona 1 que incluyó a las localidades Cubiro, El Zancudo y sus alrededores, el cultivo más representativo fue el de tomate, con predominio de *Pseudomonas* sp., En la 2, correspondiente a las localidades aledañas a Quíbor, tales como Rincón de Guardia y Negrete, el imperante fue el pimentón y los principales géneros bacterianos fueron *Pectobacterium* sp. y *Xanthomonas* sp. en igual proporción; en la 3, que incluyó Agua Negra, Palenque y sus alrededores, sobresalió el cultivo de papa y el principal género bacteriano fitopatógeno reportado fue *Pectobacterium* sp.

Cabe señalar que una vez realizado la identificación de las especies bacterianas por cultivo, se nota la presencia de bacterias que afectan más de un cultivo, allí tenemos el caso de bacterias que entre su rango de hospederos incluye varias especies de las solanáceas, la cual fueron en su mayoría las especies de cultivo muestreadas, entre las que podemos mencionar *X. campestris*, *R. solanacearum* y *Pseudomonas syringae* encontradas en pimentón y tomate. Además encontramos *P. caratovorum*, en todos los cultivos estudiados, ya que este patógeno tiene amplio rango de hospedero y se conoce como causante de pudrición blanda.

2.4. Evaluación *in vitro* del extracto etanólico foliar de *L. origanoides* sobre el crecimiento de las bacterias diagnosticadas

Todas las concentraciones del EE de orégano silvestre produjeron halos de inhibición sobre las bacterias probadas (CUADRO 5); el análisis de varianza reveló diferencias significativas ($P < 0,01$) entre los tratamientos y el testigo; evidenciándose además la susceptibilidad variable a los tratamientos, de acuerdo a la especie.

En 5 aislamientos (62.5%), el mayor efecto fue el que se presentó con el EE al 6%, mostrando mayor porcentaje de inhibición en el crecimiento de las cepas evaluadas, no obstante, estadísticamente hubo poca diferencia entre las medias de los tratamientos, por lo cual se recomiendan estudios con mayores concentraciones del extracto, para detectar diferencias, esto sin obviar que cada cepa bacteriana tiene sus características, lo cual hace particularmente complejo alcanzar un tratamiento estándar aplicable a un gran número de especies.

Cuadro 5. Halo de inhibición del crecimiento bacteriano ocasionado por el extracto etanólico foliar de *L. origanoides*.

Concentración del Extracto Etanólico (%)

Bacteria	Inhibición						Significa ncia	CV
	4		6		8			
	cm	%	cm	%	cm	%		
P-0 <i>Xanthomonas</i> <i>scampestris</i>	0.8790 a	21	0.9380 a	29	0.9333 a	28	< 0,01**	4.09
P-1 <i>Ralstonia</i> <i>solanacearum</i>	1.0953a	25	0.9842 ab	12	0.9882 ab	12	0.0034**	6.31
P-2 <i>Acidovorax</i> <i>avenae</i>	1,0355a	13	1,0435a	14	0,9792 ab	6	0.0079**	4.62
P-5 <i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i>	0.9957 a	20	0.9313a b	12	0.9167a b	10	0.0060**	5.58
T-3 <i>Pseudomonas</i> <i>syringae</i>	1,0228 a	17	1,0435a	19	1,0048 a	15	0.0034**	5.43
Pa-1 <i>Pectobacterium</i> <i>caratovororum</i>	1,0562a	19	1,0817a	22	1,0770a	21	0.0005**	5.14
C-1 <i>Pectobacterium</i> <i>caratovororum</i>	0.9177a	42	0.9872 a	53	0.8565 ab	24	0.0028**	11.89
C-2 <i>Pectobacterium</i> <i>caratovororum</i>	0.8962 ab	17	0.9550 a	25	0.9450 a	24	0.0066**	7.64

*Datos calculados con respecto al testigo (0% de Extracto Etanólico).
 Letras iguales indican sin diferencias significativas (P<0,01). Comparación de
 medias por pruebas de Tukey(¿?)

Se debe considerar además que la variabilidad a nivel de aislamientos puede ser grande, ya que las cepas P-0 y P-5 son provenientes del cultivo de pimentón e identificadas como *Xanthomonas campestris*, no obstante, su desempeño frente a los tratamientos fue distinto, lo que posiblemente se debió, a la diferente capacidad de crecimiento en el medio, lo cual a su vez es determinado por características intrínsecas particulares, que también podría estar relacionado a la zona de origen de dichas cepas, ya que la cepa P-0 es proveniente de la localidad Piedra de Ojo ubicada a 1503msnm en contraste con la P-5 proveniente de Colinas de Campo alegre a 684msnm. Además, cabe resaltar la susceptibilidad mayor de algunas especies, tal como es el caso de *Pectobacterium carotovorum* (C1) que con 6% de EE se redujo el halo en más de 50%, lo cual también puede deberse a condiciones genéticas de las cepas. Estos resultados coincidieron, parcialmente, con los obtenidos por Jiménez, et al. (2013, b) quienes determinaron la capacidad inhibitoria del EE foliar del orégano al 4, 6 y 10% y como control positivo al producto Kasumin, sobre el crecimiento de bacterias fitopatógenas de los géneros *Xanthomonas* spp., *Pseudomonas* spp. y *Erwinia* spp., provenientes del cultivo de pimentón y según estos mismos autores, la concentración de mayor capacidad inhibitoria del producto, para todas las bacterias fue al 6%, superando inclusive al tratamiento donde se aplicó el químico, el cual es uno de los más utilizados en la agricultura, para el control de enfermedades bacterianas.

Más recientemente, Pinto *et al.* (2013) estudiaron la actividad antimicrobial de diferentes especies de *Lippia* spp., incluyendo *L. origanoides*, encontraron que con una concentración de extracto metanólico de 1 mg/disco, se observaron halos de inhibición de 7 +/- 0,5 mm contra *Staphylococcus aureus* y los diámetros fueron variables en otras especies patógenas bajo estudio, no obstante, reportaron resistencia por parte de *Pseudomonas aeruginosa* y tal cual como en esta investigación, el uso de extractos de esta planta, podría ser una alternativa prometedora en el tratamiento de infecciones bacterianas. Del mismo modo, se corroboran los resultados de Oliveira *et al.* (2007), quienes realizaron un ensayo

con aceites esenciales (AE) de orégano, en el que utilizaron alícuotas de 10 µL de aceite diluido 1:1 con Tween 80 (0,5% en agua), reportando halos de inhibición de hasta 25 mm contra *S.aureus*, deduciéndose el mejor desempeño de éstos, en comparación con los EE, sin embargo, debe estudiarse la factibilidad económica y ecológica de extracción y uso en condiciones de campo.

Conclusiones

Estos resultados demostraron la potencialidad de *L. organoides* como control alternativo de bacterias fitopatógenas y las diferencias en respuesta inhibitoria del extracto que puede existir entre cepas bacterianas

Referencias

Abdalla, M.; Hamza, S.; Fayzalla, S. and Seeda, E. (2013). Post harvest control of bacterial soft rot pathogens of onion bulb in storage. . Plant Prot. and Path., Vol. 4 (11): 945 – 957.

Abdul R., A. Abu Bakker, M. Aslam, M. Mateen, A. Farooq, M. Ashraf, M. Ahmad, F. Latif, M. y M. Ahmad (2012). Incidence of potato blackleg caused by *Pectobacterium atrosepticum* in district Chiniot and its management through bio-products. *African Journal of Agricultural Research* 7(45): 6035-6048.

Anajjar B., S. Azelmat, M. Terta and M. Ennaji (2014). Evaluation of Phytopathogenic Effect of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* isolated from Symptomless Potato Tuber and Soil. *British Journal of applied science & Technology* 4(1): 67-78.

Baker, F. y Linderman, R. (1979). Unique features of the pathology of ornamental plants. *Annu. Rev. Phytopathol* 17:253-277.

Barret T. (1975). Preparation of Bacterial Vaccine. In: Proceeding of the first workshop of phytobacteriology. R.N. Goodman (ed.). Columbia. University of Missouri. pp. 1-6.

Chaudhry Z. and A. Rashid. (2011). Isolation and characterization of *Ralstoniasolanacearum* from infected tomato plants of soanskesar valley of Punjab. *Pakistan Journal Botanica*. 43(6): 2979-2985.

Cuppels D., F. Louws and T. Ainsworth (2006). Development and evaluation of PCR-based diagnostic assays for the bacterial speck and bacterial spot pathogens of tomato. *Plant Dis.* 90:451-458.

Dutta B., R. Gitaitis, S. Smith, S. and D. Langston (2014). Interactions of Seedborne Bacterial Pathogens with Host and Non-Host Plants in Relation to Seed Infestation and Seedling Transmission. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0099215>

El-Hendawy H., E. Osman, and H. Ramadan (2002). Pectic enzymes produced *in vitro* and *in vivo* by *Erwinia* spp. isolated from carrot and pepper in Egypt. *J. Phytopathology* 150:431-438.

Escalona Y. y R. Pire (2008). Crecimiento y extracción de N-P-K por plantas de pimentón (*Capsicum annuum* L.) abonadas con estiércol de pollo en Quíbor, estado Lara. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 25: 243-260.

Escalona Y., D. Rodríguez, N. Contreras y N. Jiménez (2006). Patógenos del suelo en el cultivo de pimentón en la zona baja del municipio Jiménez, estado Lara, Venezuela. *Bioagro* 18(1): 3-13.

Fiori M., and A. Schiaffino (2004). Bacterial stem rot in greenhouse pepper (*Capsicum annuum* L.) in Sardinia (Italy): Occurrence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J. Phytopathology* 152, 28-33

French E. y T. Hebert (1980). *Métodos de Investigación Fitopatológica*. Editorial IICA. San José, Costa Rica. 289p.

Hadas R., G. Kritzman, and S. Manuli (2001). Detection, quantification and characterization of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* contaminating pepper seeds. *Plant Pathology* 50: 117-123.

Hanson P., O. Licardo, O., Hanudin, J. and J. Chen (1998). Diallel analysis of bacterial wilt resistance in tomato derived from different sources. *Plant Dis.* 82:74-78.

Herman M., J. Davidson and C. Smart (2008). Induction of plant defense gene expression by plant activators and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in greenhouse-grown tomatoes. *Phytopathology* 98:1226-1232.

Hernández, Y. y G. Trujillo (2004). Relaciones serológicas entre aislamientos bacterianos de los géneros *Erwinia*, *Pectobacterium* y *Pantoea*. *Interciencia* 29(8): 447-454.

Hernández Y. y G. Trujillo (2009). Extractos etanólicos de *Gliricidia sepium*, una alternativa de control de bacterias fitopatógenas en plantas ornamentales. *Fitopatología Venezolana*. 22 (2): 40

Holt J., N. Krieg., P. Sereath., J. Staley y S. Williams (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. William & Wilkins. Baltimore. 1093p.

Hong J., D. Norman, D. Reed, M. Momol and J. Jones (2012). Diversity among *Ralstoniasolanacearum* strains isolated from the southeastern United States. *Phytopathology* 102:924-936.

Huang C., G. Vallad, S. Zhang , A. Wen , B. Balogh, J. Figueiredo, F. Behlau, J. Jones, M. Momoland S. Olson (2012). Effect of application frequency and reduced rates of acibenzolar-S-methyl on the field efficacy of induced resistance against bacterial spot on tomato. *Plant Dis*. 96:221-227.

Janse J. (2012). Bacterial diseases that may or do emerge, with (possible) economic damage for Europe and the Mediterranean basin: notes on epidemiology, risks, prevention and management on first occurrence. *Journal of Plant Pathology* 94, (Suplemento 4). 5- 29.

Jiménez Y., Y. Escalona, J. Montilla y M.E. Sanabria (2013a.). Prevalencia de enfermedades bacterianas en plántulas de pimentón (*Capsicum annuum* L.) en casas de cultivo del municipio Jiménez-estado Lara, Venezuela. XXIII Congreso Venezolano de Fitopatología. Caracas-Venezuela. Disponible en: <https://sites.google.com/site/ideafitopatologia2013/congreso/resumenes-socializados/caracterizacion-de-bacterias>.

Jiménez Y., Y. Escalona, M. E. Sanabria y J. Montilla, J. (2013b.). Control *in vitro* de bacterias asociadas al cultivo de pimentón con extracto etanólico de *Lippia origanoides* K. XXIII Congreso Venezolano de Fitopatología. Caracas-Venezuela. Disponible en: <https://sites.google.com/site/ideafitopatologia2013/congreso/resumenes-socializados/control-de-fitopatogenos-con-metabolitos>

Klement Z., K. Rudolph y D. Sands (1990). *Methods in Phyto bacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest. 568p.

Lewis M., B. McSpadden, N. Opina and S. Miller (2007). Diversity of *Ralstoniasolanacearum* Infecting Eggplant in the Philippines. *Phytopathology* 97:1467-1475.

Marcano D. y M. Hasegawa (2002). Fitoquímica orgánica. Universidad Central de Venezuela (UCV). 588 p

Martin H., V. Hamiltonand R. Kopittke (2004). Copper tolerance in Australian populations of *Xanthomonascampestrispv. vesicatoria* contributes to poor field control of bacterial spot of pepper. *Plant. Dis.* 88: 921-924.

Martínez, M. y P. Alfonzo (2003). Especies de malezas más importantes en siembras hortícolas del valle de Quibor, estado Lara, Venezuela. *Bioagro* 15(2): 91-96.

Ministerio del Poder Popular para La Agricultura y Tierras (2008). VII Censo Agrícola. Disponible en: <http://censo.mat.gob.ve/>.

Mitrev S., L. GardanandR. Samsó (2000). Characterization of bacterial strains of *Pseudomonas syringaepv. syringae* isolated from pepper leaf spot in Macedonia. *J. Plant. Pathology* 82 (3) 227-231.

Molina N. (2001). Uso de extractos botánicos en control de plagas y enfermedades. *Manejo Integrado de Plagas* No. 59: 76-77.

Moreno A., S. López y A. Corcho (2000). Principales medidas en epidemiología. *SaludPública de México*. vol 42. nro 4:337-348

O'Garro L. (1998). Bacterial spot of tomato and pepper on four east caribbean islands: Races, their abundance, distribution, aggressiveness, and prospects for control. *Plant Dis.* 82: 864-870.

Oliveira D., G.Leitao, H. Bizzo, D. Lopes, D.Alviano y S. Leitao (2007). Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippiaoriganoides* H.B.K. *Food Chemistry* 101:236-240

Pérez A., J. Rojas, J. Rodríguez, A. Doncel, I. Arrieta, J. Arrieta, J. Martínez, J. Mieles, A. Rodríguez y L. Chamorro (2011). Evaluación de métodos para medir la actividad inhibitoria de extractos vegetales nativos del departamento de Sucre sobre bacterias y levadura patógenas. *Rev. Colombiana Cienc. Anim.* 3(1): 90-101.

Pérez de Camacaro M., D. Rodríguez, M. Ojeda y M. Gallardo (2005). Caracterización física y química de ocho materiales de papa (*Solanumtuberosum* L.) cultivados en la localidad de Chirgua, Carabobo, Venezuela. *Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort.* 48:60-64.

Pierre F. y P. Betancourt (2007). Residuos de plaguicidas organoclorados y organofosforados en el cultivo de cebolla en la depresión de Quibor, Venezuela. *Bioagro* 19(2): 69-78.

Pinto C., V. Días, F. Pinto, R. Pinto, A. Trovatti, A. Ribeiro, C. Gadea, S. Dos Santos, T., and A. Lucchese (2013). Antimicrobial Activity of *Lippia* Species from the Brazilian Semiarid Region Traditionally Used as Antiseptic and Anti-Infective Agents. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 614501, 5 p.

Porras E. y M. Gallardo (2011). Caracterización agronómica de materiales genéticos de papa en la localidad lomas de Cubiro, estado Lara, Venezuela. *Agronomía Trop.* 61(2): 105-111

Pradhanang P., M. Momol, S. Olson and J. Jones (2003). Effects of plant essential oils on *Ralstoniasolanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. *PlantDis.* 87:423-427

Rázuri L., E. Romero, A. Galindo, J. Hernández, J. Rosales y J. Linares (2005). Efecto de la densidad de siembra sobre el rendimiento de la cebolla, variedad americana, con riego por goteo, en el valle de Quíbor. *Agriculturaandina.* 10: 9-22.

Rezaei R. and M. Taghavi (2010). Phenotypic and genotypic characteristics of Iranian soft rot bacterial isolates from different hosts. *Phytopathol.Mediterr.* 49: 194-204.

Salmaan, I. Hammed, A. and Alyaa, M. (2010). Purification and characterization of extra cellular Pectin lyase from *Erwiniacarotovora* isolate from spoilt potatoes. *Diyala Journal for Pure Sciences* 6(2): 383-397

Schaad N. W., J.B. Jones y W. Chun (2001). Laboratory Guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press. Minnessota. 373p.

Sotokawa N. and Y Takikawa (2004). Occurrence of bacterial rot of onion bulbs caused by *Burkholderiacepacia* in Japan. *J Gen PlantPathol* 70:348-352

Stefanova M., S. Rizo y M. Coronado (2005). Efecto *in vitro* de extractos de plantas sobre especies bacterianas del género *Xanthomonas*. *Fitosanidad.* 9 (3) 49-51.

Suslow T., M. Schroth y M. Isaka (1982). Application of rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* 72: 917-918.

Tavasoli E., A. Marefatand, N. Hassanzadeh (2011). Identity and genetic diversity of *Pectobacterium* spp., causal agents of potato soft rot in Zanjan, Iran. *African Journal of Plant Science.* 5(6), pp. 329-336.

Trujillo G., Y. Hernández, R. Figueroa, A. Trujillo y L. Subero (2001). Situación sanitaria de la semilla de cebolla utilizada en el valle de Quíbor, estado Lara, con

relación a bacterias fitopatógenas. XVII Congreso Venezolano de Fitopatología. Maracay-Venezuela. Resúmenes p. 49.

Tudor-Nelson S., G. Minsavage, R. Stally J. Jones (2003). Bacteriocin-like substances from tomato race 3 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 93:1415-1421.

Urrestarazu, M. Salas, M.C. Mazuela, P.C. Morales, E. (2006). Bioseguridad a través del agua de riego en la horticultura protegida. *Vida Rural*, 239: 56-58

Wilson M., H. Campbell, P. Ji, J. Jones y D. Cuppels (2002). Biological control of bacterial speck of tomato under field conditions at several locations in North America. *Phytopathology* 92:1284-1292.

Agradecimientos

Al CDCHT – UCLA por el financiamiento del proyecto 026-AG-2012