

EFECTO DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE RUDA Y NEEM SOBRE EL CONTROL DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS DEL GÉNERO *Erwinia*¹

EFFECT OF ETHANOLIC EXTRACTS OF RUE AND NEEM ON THE CONTROL OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA OF THE GENUS *Erwinia*¹

Guillermo Briceño*, Johangel García*, Anna Maselli** y Ligia Carolina Rosales**

¹Trabajo financiado por el proyecto “Fortalecimiento del Sector Biotecnológico como Apoyo a la Seguridad Alimentaria”, Subproyecto “Estudio y Uso de Biocontroladores para el manejo de plagas y enfermedades para la obtención de una agricultura sostenible con base Biotecnológica” del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación.

*Ingenieros Agrónomos. UCV. **Investigadoras. INIA-CENIAP. Unidad de Protección Vegetal. Maracay, estado Aragua. Venezuela. Correo electrónico: guillermoal82@hotmail.com

RESUMEN

En la búsqueda de alternativas de control para las bacterias fitopatógenas, se realizó un ensayo para la obtención de extractos etanólicos a partir de plantas de ruda (*Ruta graveolens* L.) y nim (*Azadirachta indica* Adr. Juss), se evaluó su efecto en bacterias fitopatógenas del género *Erwinia*. A los extractos obtenidos se les determinó la presencia de metabolitos secundarios (MS), evidenciándose en ruda y nim aceites esenciales, alcaloides, flavonoides y saponinas; los polifenoles y taninos se encontraron presentes solamente en nim. La evaluación del efecto inhibitorio se realizó empleando el método de disco de papel de filtro en cajas Petri, donde los discos de 6 mm de diámetro previamente esterilizados se impregnaron con el extracto, a concentraciones de 0%, 5%, 15%, 20%, 25% y 30%. El modelo estadístico utilizado fue completamente aleatorizado con tres repeticiones por cada concentración. El extracto etanólico proveniente de ruda no evidenció efecto inhibitorio sobre ninguna de las bacterias fitopatógenas objeto de la investigación. Sin embargo, el nim presentó efecto inhibitorio sobre la bacteria *Erwinia* sp. aislada en plantas de berenjena, *Solanum melongena* L., siendo su efecto directamente proporcional a la concentración del extracto. Los datos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, observando diferencias estadísticas altamente significativas entre los tratamientos. El extracto etanólico de nim es una alternativa potencial para efectuar el manejo de las bacterias del género *Erwinia*, causante de daño en el cultivo de berenjena.

Palabras Clave: *Ruta graveolens* L.; *Azadirachta indica*; *Solanum melongena*; efecto inhibitorio; bacterias.

SUMMARY

In the search for alternatives to control plant pathogenic bacteria, a test was performed to obtain ethanol extracts from plants of rue (*Ruta graveolens* L.) and neem (*Azadirachta indica* Adr. Juss) and evaluated its effect on bacteria phytopathogen *Erwinia* genus. In the extracts was determined the presence of secondary metabolites (MS), evidenced in rue and neem oils, alkaloids, flavonoids and saponins, polyphenols and tannins were present only in nim. The evaluation of inhibitory effect was performed using the method of filter paper disc in Petri dishes, where discs of 6 mm diameter were impregnated with previously steri-lized extract at concentrations of 0%, 5%, 15%, 20% , 25% and 30%. The statistical model used was completely randomized with three replicates for each concentration. The ethanol extract from ruda not show any inhibitory effect on plant pathogenic bacteria under investigation. However, neem showed inhibitory effect on the bacteria *Erwinia* sp. eggplants isolated, its effect being directly proportional to the concentration of the extract. The data were analyzed using the Kruskal-Wallis test, showing highly significant differences between treatments. The ethanol extract of neem is a potential alternative to effect management of bacteria of the genus *Erwinia*, causing crop damage eggplant.

Key Words: *Ruta graveolens*; *Azadirachta indica*; *Solanum melongena*; Secondary Metabolites; eggplant.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela, la agricultura, el manejo de plagas y las enfermedades, se basaron en el uso indiscriminado de agroquímicos. El hombre en su intento de controlarlos, creó una alta dependencia de estos productos, ocasionando elevados costos de producción y alteraciones en el equilibrio natural de las poblaciones de insectos y microorganismos (Micheo, 1992).

La utilización de los agroquímicos es una práctica constante en los productores que la reconocen como primera opción. Además, ocurre que los agricultores frecuentemente se exponen a estos productos desde la preparación de las mezclas, en la aplicación con los equipos y durante el almacenamiento (FAO, 2003). Por otra parte, existe la presión de una mayor calidad de los cultivos por parte de los consumidores, y se puede observar a través del tiempo un aumento del uso de agroquímicos que en muchos casos es de manera irracional (Aguilar, 1992).

Por su condición de país tropical, Venezuela se caracteriza por poseer una gran variedad de especies de bacterias fitopatógenas que ocasionan pérdidas en los cultivos. En el caso del género *Erwinia* causan problemas en muchos cultivos de importancia agrícola como son: papa (*Solanum tuberosum* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), maíz (*Zea mays* L.), diferentes ornamentales, cebolla (*Allium cepa* L.), lechosa (*Carica papaya* L.), patilla (*Citrullus lanatus* (Thunb), lo cual hace que este género sea considerado para todos los estudios (Trujillo, 1996).

La agricultura del nuevo milenio debe establecer nuevas alternativas de control que produzcan un menor impacto ambiental y que permitan reducir significativamente el uso de plaguicidas. La utilización de los extractos vegetales para el control de enfermedades en las plantas representa una alternativa para el manejo integrado de los cultivos, debido a su bajo costo y el menor impacto sobre el ambiente y los alimentos (Guevara *et al.*, 2000, Maselli *et al.*, 2006).

Investigaciones recientes (Stauffer *et al.*, 2000; Rodríguez y Sanabria, 2005; Maselli *et al.*, 2006, 2008; Pino *et al.*, 2008) señalan que los extractos vegetales pueden ser utilizados exitosamente en el control o inhibición de bacterias y hongos fitopatógenos, además pueden constituirse en una herramienta para integrar a un manejo agroecológico del cultivo, sobre todo en pequeñas extensiones de terreno, como es el caso de las leguminosas y hortalizas.

En la búsqueda de alternativas de control más amigables con el ambiente, se planteó la obtención de extractos

vegetales etanólicos a partir de ruda (*Ruta graveolens* L.) y nim (*Azadirachta indica* A. Juss) y su evaluación *in vitro* sobre bacterias fitopatógenas del género *Erwinia*, aisladas de plantas de berenjena (*S. melongena* L.), mango (*Mangifera indica* L.), papa, maíz y parchita (*Passiflora edulis* Sims).

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) en Maracay, estado Aragua. Se realizaron los experimentos *in vitro* en el Laboratorio de Bacteriología y en el de Nematología Agrícola se obtuvieron los extractos vegetales etanólicos.

Obtención de extractos vegetales. El material vegetal que se utilizó, consistió en hojas de ruda y nim completas, que estaban libres de manchas y perforaciones por insectos. Éstas luego de ser colectadas se colocaron a secar en umbráculo bajo sombra por un período entre 7 y 10 d. Las hojas secas fueron molidas en una licuadora convencional hasta obtener un polvo fino. Seguidamente, se pusieron en un envase de vidrio de 3 l de capacidad y se les agregó etanol al 95% hasta cubrir todo el material por completo; se dejó macerar durante 48 h en un lugar fresco y protegido de la luz, luego mediante el uso de un rotoevaporador marca Yamato® Modelo BM 200 se destiló el alcohol y se obtuvo el extracto etanólico puro con cantidades despreciables de etanol, el cual se asume como concentración del extracto 100% puro. Posteriormente, se conservó en frascos estériles color ámbar en condiciones de refrigeración a una temperatura de 5 °C, hasta el momento en que se realizaron los ensayos (Marcano y Hasegawa, 2002).

Preparación de la solución bacteriana. Las suspensiones bacterianas fueron preparadas utilizando cultivos puros provenientes de la colección de bacterias fitopatógenas del Laboratorio de Bacteriología Vegetal del INIA-CENIAP; los del género *Erwinia* eran aislamientos obtenidos de plantas de berenjena, mango, papa, maíz y parchita, los cuales se sembraron en cápsulas de Petri, utilizando como medio de cultivo agar nutritivo (AN). A las 48 h de crecimiento se removieron con agua destilada estéril utilizando un triángulo de vidrio desinfectado. Estas suspensiones fueron homogenizadas mediante agitación. Se ajustó la concentración a 108 UFC/ml utilizando un espectrofotómetro marca Jenway 6320D, donde se midió la densidad óptica hasta un valor de 0,2, empleando una longitud de onda de 460 nm (Schaad *et al.*, 2001).

Evaluación de los extractos. La evaluación de los extractos se realizó siguiendo el método de discos de papel filtro en cápsulas de Petri con AN (Lorian, 1980). Los discos de papel de 6 mm de diámetro previamente esterilizados, se colocaron en cápsulas estériles con el extracto a concentraciones conocidas. Los tratamientos evaluados fueron 0% (testigo), 5, 15, 20, 25 y 30%, luego se dejaron secar durante 1 h dentro de una cámara de flujo laminar para evitar el exceso de extracto en el papel de filtro estéril. Posteriormente, se colocaron 5 discos de papel sobre AN donde previamente se había inoculado 100 µl de la suspensión bacteriana. Las cajas se incubaron por 48 h a 28 °C, seguidamente se realizaron las observaciones para identificar la presencia o ausencia del halo de inhibición alrededor de cada disco y en caso de estar presente tendría mayor efecto inhibitorio el que mostró mayor diámetro, el cual se midió con una regla graduada en mm.

Separación y determinación de los metabolitos secundarios (MS). El extracto puro obtenido a partir del macerado se usó para la separación y determinación cualitativa de los MS, a través del método propuesto por Marcano y Hasegawa (2002). El método de cromatografía de partición de capa fina (Thin Layer Chromatography, TLC) se utilizó para separar rápidamente la mezcla de MS en sus componentes. Para ello, se emplearon cromatofolios de sílica/gel Merck MR para TLC sílica / gel 60, F 254 de 0,25 mm de espesor, los cuales se cortaron en rectángulos de 6,5 cm x 2,5 cm con la ayuda de una tijera, colocando dos gotas de cada extracto a una distancia de 5 mm de la base y repitiéndose tres veces por metabolito para cada extracto.

Determinación de alcaloides y flavonoides. Se colocaron 10 ml de hexano en un beaker de 600 ml, sobre este se instalaron los cromatofolios con el extremo que tenía las dos gotas del extracto en contacto con el hexano, esperando hasta que el solvente lo recorriera, se retiró y dejó secar; posteriormente se situó bajo luz ultravioleta (UV). La presencia de una coloración anaranjada fluorescente evidencia la presencia de alcaloides; si la coloración es blanca fluorescente se estaría en presencia de flavonoides.

Determinación de polifenoles y taninos. En este caso el cromatofolio se colocó en contacto con 10 ml de agua destilada y ácido acético en una proporción 9:1, igualmente, se esperó que el solvente ascendiera, se retiró y esperó que secara, luego se agregó cloruro férrico al 1% a toda la corrida del extracto; evidenciando la presencia de los polifenoles y taninos de observarse una coloración parda.

Determinación de antraquinonas. El cromatofolio se colocó en contacto con ácido acético para luego esperar que el solvente recorriera, seguidamente se retira de la solución dejándose secar y agregar hidróxido de amonio. La prueba era considerada positiva para la presencia de antraquinonas si había una coloración rojiza cuando se observa con luz UV.

Determinación de aceites esenciales. La presencia o ausencia de aceites esenciales se determinó por un olor característico aromático en el extracto.

Determinación de saponinas. Se determinó a partir de la agitación manual del extracto acuoso por espacio de 20 min, confirmando la presencia de saponinas si pasado este tiempo persistía una espuma consistente.

Análisis estadístico. Para los análisis estadísticos se evaluaron los seis tratamientos de la siguiente forma: 0, 5, 15, 20, 25 y 30% de concentración de extracto con tres repeticiones por cada concentración, teniendo como unidad experimental cada disco de papel de filtro colocado sobre el medio de cultivo donde estaba creciendo la bacteria. Como respuesta se evaluó la presencia o ausencia de un halo de inhibición del crecimiento de la bacteria, encontrado alrededor de cada papel de filtro; en los casos donde estaba presente se midió el diámetro del halo de inhibición.

Los datos experimentales obtenidos fueron analizados con el programa estadístico Statistix 8.0 para Windows XP, comparando las diferentes concentraciones de los extractos para verificar si existía o no diferencias significativas en el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de la bacteria. Estos se analizaron por vía no paramétrica a través de la prueba para K (numero de muestras) muestras independientes de Kruskal - Wallis, ya que no se cumplió con el supuesto de homogeneidad de varianza del análisis de varianza (ANAVAR). Para realizar el análisis de comparaciones de medias se utilizó la prueba de comparaciones de rangos no paramétrica (Cochran y Cox, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El extracto de nim (concentración de 30%) presentó efecto inhibitorio (Figura 1) a la bacteria *Erwinia* sp. aislada del cultivo de berenjena, y no tuvo ningún impacto sobre las demás bacterias probadas. Los demás patógenos evaluados no evidenciaron respuesta con ninguno de los extractos estudiados. Estos resultados

determinaron que estos cultivos y las partes de plantas que fueron seleccionadas no tienen actividad biológica para las bacterias del género *Erwinia*.



FIGURA 1. Halo de inhibición del extracto de nim sobre la bacteria *Erwinia* sp. aislada del cultivo de berenjena

Este estudio da inicio a las investigaciones con estas plantas, dando oportunidad de seleccionar otros órganos como la semilla en el caso de Nim, o de las flores en el caso de ruda, y así poder detectar actividad biológica sobre el control de bacterias fitopatógenas.

En trabajos similares realizados por Chirinos *et al.* (2007), donde se evaluaron extractos acuosos de malojillo, verdolaga, nim, manzanilla y orégano en el control de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Pseudomonas* spp. y *Xanthomonas* spp., se obtuvo que los tratamientos de manzanilla, verdolaga, nim y malojillo tuvieron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las bacterias *Xanthomonas* spp. y *Pseudomonas* spp., así como, los de manzanilla y malojillo lograron un control efectivo sobre las bacterias *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* y *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*. El extracto de orégano no tuvo ningún control sobre las bacterias evaluadas.

Méndez *et al.* (2007) utilizaron extractos etanólicos de nim y flor escondida en ensayos *in vivo* sobre plantas de caraota para el control de la quemazón bacteriana por *Xanthomonas phaseoli* (E. F. Smith) Dowson (Xph).

Los resultados de la investigación reflejaron un retraso en la aparición de síntomas en las plantas que fueron tratadas con los extractos anteriores. Los tratamientos se realizaron aplicando los extractos etanólicos sobre las plantas de caraota 1 h antes de la inoculación con la bacteria Xph.

Chirinos *et al.* (2007) asegura que el poder de inhibición de cada extracto está relacionado con la especie de bacteria que afecta un determinado cultivo. Paralelamente, Viveros y Castaño (2006) señalan que la acción de estos extractos sobre el patógeno a controlar, depende directamente del tipo y cantidad de metabolitos secundarios que pueda poseer el mismo.

Evaluación de las concentraciones del extracto de nim. En el análisis de varianza (Cuadro 1) se observó diferencias entre tratamientos para la variable diámetro del halo de inhibición. Zarraga (2000) evaluó a nivel de campo el efecto bactericida del extracto acuoso de nim en el control de bacterias que infectan a la zábila, concluyendo que el mejor efecto control, considerando la incidencia y severidad de la enfermedad causada por *Rhizoctonia solani* Kühn y *Erwinia* sp., se adquirió con el extracto de hojas secas de nim a una dosis de 85,94 g l ha⁻¹.

CUADRO 1. Análisis de varianza de rangos de media por Kruskal - Wallis para el diámetro del halo de inhibición de las diferentes concentraciones de extracto etanólicos de nim en el control de *Erwinia* sp. aislada de berenjena.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P-value
Tratamiento	5	36 322, 2	7 264,45	32,8	0,0001
Error	84	18 625,8	221,74		
Total	89	54 948,0			

Análisis de los rangos de medias. Al verificar si existió o no diferencia significativa en el diámetro del halo de inhibición por tratamiento, el análisis reveló que el grupo homogéneo "A" fue el que presentó mayor efecto antagonico correspondiente al tratamiento de 30% de concentración del extracto, mientras que el testigo no presentó ningún cambio, ubicándose en el grupo homogéneo "C". Los grupos "AB" y "BC" se consideran

como grupos intermedios en donde existe una relación directamente proporcional entre el rango y el efecto antagónico (Cuadro 2; Figura 2).

CUADRO 2. Análisis de los rangos de medias por Kruskal-Wallis para la prueba de comparaciones pareadas de grupos homogéneos del diámetro (mm) del halo de inhibición de las diferentes concentraciones de extractos etanólicos de hoja de nim en el control de *Erwinia* sp. aislada de berenjena.

Tratamientos (%)	Medias de rango	Grupos homogéneos
30	80,333	A
25	64,967	AB
20	57,933	BC
15	44,433	BC
5	24,8333	C
0	20,500	C

Kruskal-Wallis estadístico 73,4875. P-value usando la aproximación de chi-cuadrado ($P < 0,0001$)

Determinación de metabolitos secundarios presentes en los extractos. Con el uso de cromatografía de partición de capa fina (TLC) se pudo evidenciar la presencia y ausencia de diferentes grupos de metabolitos secundarios, los cuales se muestran en el Cuadro 3.

Por su parte, Izco (1997) consideró que la presencia de un MS tiene más valor que la ausencia, y en el segundo caso, al no detectarlo, habría que considerar la posibilidad de que se localice en órganos distintos a los utilizados o que se presente en fases distintas del ciclo vital de la planta; por ejemplo, en la época de floración, fructificación o en la fase vegetativa. Otros factores a considerar serían la variación estacional o diaria, o la producción y destrucción del compuesto durante las fases previas a su identificación o en su extracción. Los resultados obtenidos para la determinación de MS del extracto etanólico de *R. graveolens* coincide con Gandhi *et al.* (1991), quienes identificaron compuestos químicos en las hojas de ruda como aceites esenciales, furanocoumarinas, alcaloides, bajas concentraciones de lípidos neutros, xantofilas, carotenoides y la rutina (rutinosina).

La presencia de alcaloides de archidona está limitada a algunas especies de rutáceas incluyendo *R. graveolens* (Gibraltarskaya y Eilert, 1993). En el caso de las furanocoumarinas, presentan 56% de su contenido en la superficie de las hojas.

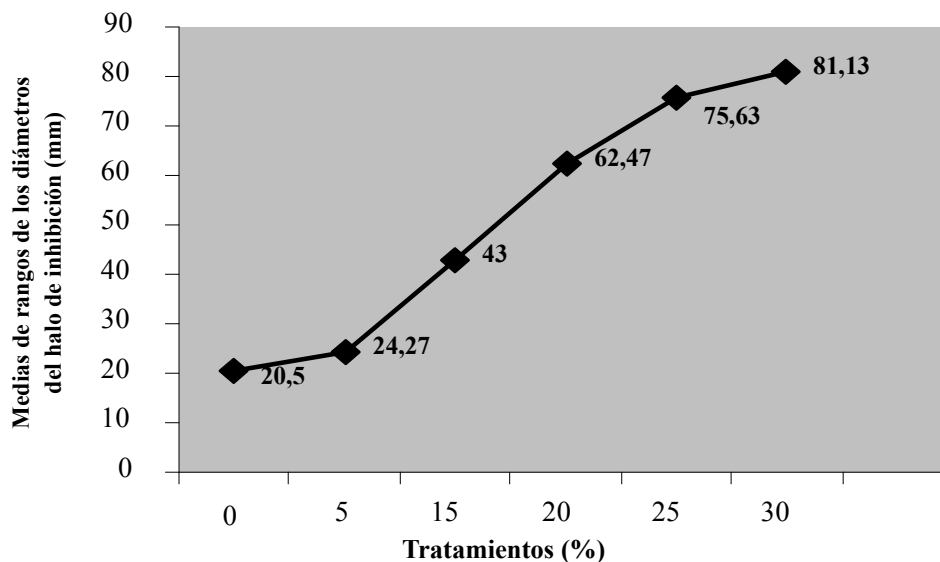


FIGURA 2. Análisis de los rangos de medias de Kruskal-Wallis del diámetro (mm) del halo de inhibición de las diferentes concentraciones de extracto etanólico de hoja de nim en el control de *Erwinia* sp. aislada de berenjena.

CUADRO 3. Metabolitos secundarios encontrados en los extractos etanólicos de hojas de ruda y nim.

Metabolitos	Extracto etanólico de hoja de ruda	Extracto etanólico de hoja de nim
Alcaloides	+	+
Flavonoides	+	+
Aceites esenciales	+	+
Saponinas	+	+
Antraquinonas	+	+
Polifenoles y taninos	-	+

(+) presencia; (-) ausencia

En los cultivos de células los callos celulares de *R. graveolens* producen MS como rutacridona, epóxido de hidroxirutacridona, alcaloides, cridona, furoquinolinas y coumarinas (Baumert *et al.*, 1998), en la mayoría de los casos en concentraciones más bajas que en las células de las plantas superiores (Heinstein, 1985); pero en algunas ocasiones estos metabolitos se encuentran en concentraciones más altas (Hamerski y Matern, 1990). Se aisló de *R. graveolens* MS como psoralinas, xanthotoxinas y bergapteno, ubicados en la superficie de frutos y semillas; el papel que desempeñan estas coumarinas es en defensa de la planta (Zobel *et al.*, 1991). Los flavonoides se encontraron tanto en el nim como la ruda, pero en cambio el grupo de los polifenoles y taninos, solo se detectaron en el extracto de nim y no así para el extracto de ruda.

Los compuestos fenólicos desempeñan funciones importantes y forman parte del metabolismo de la planta que los sintetizan, además pueden influir en el medio que rodea a la planta. Estos metabolitos actúan como antioxidantes e inactivan el centro activo de enzimas, presentando efecto antagónico sobre el crecimiento, en la atracción de insectos y también son persuasivos nutritivos de defensa frente a los animales fitófagos (Azcon *et al.*, 1993). Se señala entre otras propiedades, que los compuestos fenólicos inhiben el crecimiento y desarrollo de hongos fitopatógenos cultivados *in vitro* (Pernía *et al.*, 2001). De igual forma, la presencia de los taninos es común en plantas dicotiledóneas leñosas, lo cual se evidenció en este estudio en las plantas de nim y ruda. Este metabolito tiene como función la protección contra el ataque de enfermedades por fitopatógenos (Marcano y Hasegawa, 2002).

Igualmente, se evidenció que los taninos en altas concentraciones estimulan la resistencia de los tejidos jóvenes, como defensa al ataque de los microorganismos patógenos; por lo antes expuesto, se consideran fuertes inhibidores de muchas enzimas hidrolíticas. Sin embargo, su acción inhibidora se ve afectada por el paso del tiempo, y como resultado se produce un envejecimiento de los metabolitos, que disminuirá la resistencia a las infecciones. Esto se considera una limitante a tomar en cuenta en la investigación, puesto que hubo discrepancia en relación a los metabolitos secundarios determinados, y que estos resultados pudiesen tener alguna inherencia en el control de bacterias fitopatógenas del género *Erwinia* (Albornoz, 1980).

Las saponinas también estuvieron presentes en los extractos de nim y ruda, las cuales son consideradas por muchos autores como compuestos preformados de gran importancia por su actividad antifúngica. Sin embargo, se desconoce el mecanismo de acción para producir la resistencia a sus hospedantes contra hongos patógenos (Agrios, 2007).

Según Albornoz (1980), los alcaloides son de sabor amargo y han sido localizados en los tejidos periféricos de los órganos, como es el caso de la epidermis de las hojas. Esta característica y la ubicación de los mismos cumplen una importante función de protección contra el ataque de insectos, y se consideran reguladores del crecimiento. Los MS fueron detectados en los extractos etanólicos de nim y ruda. En investigaciones realizadas por Izco (1997), se determinó que los compuestos obtenidos en este estudio son los más comunes y están presentes en todos los órganos vegetales; además, el mismo autor indica que los compuestos fenólicos junto con los alcaloides, representan un enorme interés en la fotoquímica, por cuanto están presentes en las plantas superiores, específicamente en los órganos vegetales.

Los aceites esenciales también son MS reconocidos como insecticidas, como es el caso de los sintetizados por especies de Mimosaceae, Caesalpiniaceae y Papilionaceae (Leguminosaceae; Pascual-Villalobos, 1996).

Los MS detectados en esta investigación permiten establecer las bases que se deben considerar al momento de seleccionar plantas para el control de patógenos que atacan a los cultivos de importancia agrícola, porque los mismos forman parte de un grupo de compuestos orgánicos que son señalados como los responsables de ejecutar una serie de actividades biológicas, como es la de atraer y repeler insectos, estimulaciones hormo-

nales y fitoalexinas, entre otras, lo cual demuestra el potencial para el control y manejo integrado de plagas y enfermedades.

CONCLUSIÓN

- Los extractos etanólicos de las especies vegetales empleadas en esta investigación no mostraron actividad biológica en la mayoría de las bacterias estudiadas, es posible que muestren inhibición en bacterias fitopatógenas en otros cultivos. Futuras investigaciones pudieran estar dirigidas hacia otros organismos patógenos de importancia económica en la agricultura.
- Se deben continuar los estudios en esta área. Estos resultados aún preliminares indican que el extracto etanólico de nim representa una alternativa potencial para el manejo de las bacterias del género *Erwinia*, causante del daño en el cultivo de berenjena.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. 2007. Fitopatología. Editorial Limusa. México 35 p.
- Aguilar, J. 1992. Manejo integrado de insectos-plagas en hortalizas. FONAIAP Divulga 40:30-35.
- Albornoz, A. 1980. Productos naturales, sustancias y drogas extraídas de plantas. Universidad Central de Venezuela. Publicaciones U.C.V. Caracas, Venezuela 592 p.
- Azcon, J., M. Bieto y B. Talom. 1993. Fisiología y Bioquímica Vegetal. Interamericana McGraw-Hill. Health Group. Madrid 283 p.
- Baumert, A., D. Gröger, N. Kuzovkisa, and J. Reisch. 1998. Secondary metabolites produced by callus cultures of various *Ruta* species. *Plant Cell Tiss. Organ Culture* 28:159-162.
- Chirinos, J., Y. León y Y. Vallenilla. 2007. Evaluación de malojillo, verdolaga, nim, manzanilla y orégano como extractos acuosos en el control de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Pseudomonas* sp. y *Xanthomonas* spp. que ocasionan daños en yuca, pimentón, perejil y frijol. Memorias del XX Congreso Venezolano de Fitopatología, San Felipe, Yaracuy, Venezuela.
- Cochran, W. y G. Cox. 2001. Diseños experimentales. México. Trillas 661 p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2003. Código de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. Roma, Italia 36 p.
- Gandhi, M., A. Zankaranayaranan and L. Sharma. 1991. Post-coital antifertility activity of *Ruta graveolens* in female rats and hamsters. *Journal of Ethnopharmacology* 34:49-59.
- Gibraltarskaya, E. and U. Eilert. 1993. S-Adenosyl-L-methionine:1-3-dihydroxy-N-methylacridone 3-0-methyltransferase: A new enzyme from *Ruta graveolens*. *Planta Médica* 47-48 pp.
- Guevara, Y., Maselli, A. y M. Sánchez. 2000. Efecto de extractos vegetales sobre bacterias fitopatógenas. *Manejo Integrado de Plagas* 56:38-44.
- Hamerski, D. and U. Matern. 1990. Accumulation of coumarins in elicitor-treated cell suspension cultures of animalus. *Phytochemistry* 29:1 137-1 140.
- Heinstein, P. 1985. Future approaches to the formation of secondary natural products in plant cell suspension cultures. *J. Nat. Product* 48:8-9.
- Izco, J. 1997. Botánica. McGraw-Hill Interamericana de España. Madrid 781 p.
- Marcano, D. y M. Hasegawa. 2002. Fitoquímica orgánica. 2^{da}. Ed. Universidad Central de Venezuela. Caracas 518 p.
- Maselli, A., L. C. Rosales y Y. Guevara. 2006. Uso de extractos vegetales sobre *Xanthomonas phaseoli*, causante de la quemazón en *Phaseolus vulgaris* L. *Revista Digital CENIAP HOY* N° 12. Maracay, Venezuela. Consultado el: 05/02/2008
- Maselli, A., R. Méndez, J. García, G. Briceño, A. Solano, L. Alemán, L.C. Rosales y L. Velázquez. 2008. Evaluación de extractos vegetales para el control de bacterias fitopatógenas de los géneros *Xanthomonas* y *Erwinia*. *Fitosanidad* 12(3):164.
- Méndez, R., A. Maselli, L. Alemán y J. García. 2007. Evaluación *in vivo* de extractos etanólicos de nim (*Azadirachta indica*) y flor escondida (*Phyllanthus*

- niruri*) en el control de la bacteriosis causada por *Xanthomonas phaseoli* en plantas de caraota (*Phaseolus vulgaris* L). Memorias del XX Congreso Venezolano de Fitopatología, San Felipe, Yaracuy, Venezuela.
- Micheo, A. 1992. La agricultura venezolana. 3^{ra} ed. Caracas. Centro Gumilla 44 p.
- Lorian, V. 1980. Antibiotics in laboratory medicine. New York. Department of Patology Albert Einstein College of Medicine 432 p.
- Pascual-Villalobos, M. J. 1996. Plaguicidas naturales de origen vegetal: Estado actual de la investigación. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Madrid, España 35 p.
- Pernia, E., M. Tosta, E. García, S. Compagnone y A. Suárez. 2001. Compuestos fenólicos como posibles responsables de mecanismos de resistencia de musáceas a la sigatoca negra y amarilla (*Mycosphaerella fijiensis* y *M. munisiota*). Memorias V Congreso Venezolano de Química. Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias 1 218 p.
- Pino, O., F. J. Lazo, Y. Sánchez, A. Iglesias, L. García y B. P. Khambag. 2008. La flora cubana como fuente de bioplaguicidas. Fitosanidad 12(3):163.
- Rodríguez, D. y M. Sanabria, 2005. Efecto del extracto de tres plantas silvestres sobre la rizoctoniosis, la mancha sureña del maíz y los patógenos que las causan. INCI. 30(12):739-744.
- Schaad, N., J. Jones and W. Chun. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3^{ra} ed. APS - Press. Minnesota 254 p.
- Stauffer, B. A., A. Orrego y A. Aquino. 2000. Selección de extractos vegetales con efecto fungicida y/o bactericida. Revista de Ciencia y Tecnología 1(2):29-33
- Trujillo, G. E. 1996. Fundamentos de bacterias fitopatógenas. Trabajo de ascenso. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. Maracay 38-385 pp.
- Viveros, F. J. y J. Castaño. 2006. Evaluación *in vitro* de extractos vegetales sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Agron. 14(1):35-50.
- Zárraga, D. 2000. Evaluación de extractos de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) y lechosa (*Carica papaya* L.) para el control de hongos y bacterias en el cultivo de zábila (*Aloe vera*) en el sector "La Hicotea", municipio Colina, Estado Falcón. Trabajo de Grado. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Coro, Venezuela 63 p.
- Zobel, M., S. Brown and E. Nighswander. 1991. Influence of acid and salt sprays furanocoumarin concentrations on the *Ruta graveolens* leaf surfate. Annals of Botany 67:213-218.