

**APLICACIÓN DE ALGUNAS PRUEBAS NO PARAMÉTRICAS  
PARA EL ANÁLISIS DE PEROXIDASAS EN HOJAS DE CARAOTA  
(PHASEOLUS VULGARIS L.)  
ENFERMAS CON ROYA.**

**Fanny Camacho de Torres\* y Marisela Ascanio\*\***

Universidad Central de Venezuela  
Facultad de Agronomía. \*Instituto de Botánica Agrícola  
\*\*Postgrado en Estadística. Maracay 2101, Estado Aragua  
Apartado Postal 4579, Venezuela

**COMPENDIO**

Con el propósito de evaluar el efecto de la roya sobre el metabolismo de la hoja de caraota (*P.vulgaris* L.), se comparó el patrón electroforético de las isoenzimas Peroxidasas (PRX) extraídas de hojas de tres cultivares de caraota: UCV-Manuare, Tacarigua y DOR-448 sanas e inoculadas artificialmente con el hongo *Uromyces appendiculatus*. Los patrones electroforéticos obtenidos se analizaron por comparación del número, intensidad y movilidad relativa (Rf) de las bandas obtenidas en las corridas de electroforesis de PRX, con los síntomas externos presentes en las hojas inoculadas. La prueba de Kruskal-Wallis sólo detectó diferencias significativas al 5% para la variable intensidad de las bandas en el cultivar Tacarigua, con respecto a las otras variables el programa no las comparó ya que no generaron error. El programa en ningún momento, comparó las medias obtenidas para número de bandas y síntomas en los tres cultivares; no obstante, al final del ensayo se observaron diferencias visuales entre cultivares inoculados y no inoculados. Se detectó correlación positiva entre las variables número de bandas y síntomas en los cultivares Tacarigua y DOR-448; sin embargo, no se encontró asociación entre estas variables para el cultivar UCV-Manuare. No hubo correlación entre número de bandas e intensidad de las mismas, o de esta última con movilidad relativa y síntomas tanto para el cultivar Tacarigua como para DOR-448.

**ABSTRACT**

In order to evaluate the effect of bean rust on the metabolism of bean leaves (*Phaseolus vulgaris* L.) the electrophoretic patterns of Peroxidase isozymes

(PRX) extracted of leaves of three cultivars (UCV-Manuare, Tacarigua and DOR-448); non inoculated and artificially inoculated with the **Uromyces appendiculatus fungus** were compared. The electrophoretic patterns were analyzed by comparison of the number, intensity and relative mobility (Rf) of the bands obtained in the electrophoresis of PRX with the displayed external symptoms in the inoculated leaves. The Kruskal-Wallis test established significant differences for intensity of the bands on Tacarigua. Positive correlation between the number of bands and symptoms was found for Tacarigua and DOR-448. Neither the intensity nor the mobility of the bands resulted correlated with the symptoms of bean rust.

### PALABRAS CLAVE

**Phaseolus vulgaris** L., pruebas no paramétricas, Kruskal-Wallis, Spearman, roya de caraota.

### KEY WORDS

**Phaseolus vulgaris** L., non parametric test, Kruskal-Wallis, Spearman, bean rust.

### INTRODUCCION

La caraota (**Phaseolus vulgaris** L.) ha sido tradicionalmente junto con el maíz, la base de la alimentación de la población venezolana. Su importancia radica fundamentalmente en el alto contenido proteico de sus granos (18-25%), además de ser fuente de algunas vitaminas y carbohidratos. Este cultivo en el país, en la zona donde se siembre es afectado por enfermedades foliares, siendo una de las más importantes la roya causada por **Uromyces appendiculatus** (Pers.) Unger (Mora *et al.*, 1985). Según Agrios (1985), las royas causadas por hongos Basidiomycetes del orden Uredinales, constituyen las enfermedades de plantas más destructivas a nivel mundial, afectando principalmente hojas y tallos, y ocasionalmente flores y frutos. Su sintomatología en forma general tiene el aspecto de numerosas manchas rojizas, anaranjadas, amarillentas y a veces blancas en el envés de las hojas.

La compleja reacción de defensa de las plantas a los patógenos, está con frecuencia asociada a la síntesis inducida de metabolitos fungitóxicos (fitoalexinas), de compuestos fenólicos y de enzimas que pueden ser nocivas al patógeno como resultado de un proceso celular altamente di-

námico, el cual ocurre como consecuencia de rápidos cambios metabólicos. Ha sido ampliamente demostrado, que los patógenos producen una variedad de señales bioquímicas potenciales, las cuales pueden ser detectadas por algunas plantas induciéndose una respuesta defensiva (Bent, 1996). La variación de las isoenzimas en las plantas enfermas, ha sido usada en fitopatología en la determinación de los cambios metabólicos ocurridos durante las alteraciones fisiológicas o como la señal de un mecanismo de defensa de la planta (Burdon y Marshall, 1983). En este sentido, se ha demostrado que bajo la influencia de ciertos estímulos (condición de estrés), se producen en la planta incrementos en la actividad de las peroxidasas, atribuyéndosele a estas enzimas un papel muy importante en los procesos de resistencia a los patógenos mediante la oxidación de compuestos fenólicos (Métraux y Raskin, 1993). Sin embargo, Chakravorty y Scoot (1993), indicaron que en los sistemas hospedero-patógeno, es muy difícil determinar el papel exacto de las peroxidasas.

El propósito de esta investigación fue evaluar el comportamiento de tres cultivares de caraota ante el ataque de *U. appendiculatus*, mediante el análisis de los patrones electroforéticos de las isoenzimas peroxidasas en hojas de plantas inoculadas y no inoculadas.

## MATERIALES Y METODOS

Los datos evaluados fueron obtenidos de un ensayo de inoculación con el hongo *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger, sobre plantas de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.). Para esta experiencia se sembraron semillas de caraota de los cultivares Tacarigua (susceptible), DOR-448 (resistente) y UCV-Manuare (con resistencia parcial), con el propósito de obtener al menos 450 plantas las cuales se arreglaron en un diseño completamente aleatorizado y se mantuvieron en condiciones de cobertizo, en el Instituto de Genética de la Facultad de Agronomía, de la UCV. A los 10 días de la siembra, la mitad de las plantas (225) fueron inoculadas con una suspensión de uredosporas del hongo *U. appendiculatus*. Luego, diariamente desde cumplidas 24 horas de la inoculación hasta 15 días después de la misma, se colectaron las dos hojas simples tanto de las plantas inoculadas como de las no inoculadas (testigos). Estas muestras se procesaron para realizar electroforesis de enzima peroxidasa, se-

gún protocolo del Laboratorio de Biotecnología del CENIAP-Maracay. Previamente, antes de someterlas al análisis electroforético, las hojas fueron observadas a fin de determinar desarrollo y caracterizar síntomas de la enfermedad, a estos últimos se les dió una medida ordinal. Resultando 270 datos de 6 tratamientos, 15 días de observaciones y 3 repeticiones.

Los datos fueron ordenados de la siguiente forma:

Tratamientos: Ti= Tacarigua inoculado

Tt= Tacarigua sano

Mi= UCV - Manuare inoculado

Mt= UCV - Manuare sano

Di= DOR - 448 inoculado

Dt= DOR - 448 sano

Variables medidas:

X1= Número de bandas de peroxidasa

X2= Intensidad de las bandas

X3= Movilidad relativa de las bandas

X4= Síntomas macroscópicos

Los análisis de los datos se realizaron usando métodos estadísticos no paramétricos (Wiedenhofer, 1993 y Chacín, 1999):

1. La prueba de chi cuadrado, según el análisis de la varianza de Kruskal - Wallis, en el programa de computador Statistix For Windows, ver 1.0.
2. Determinación del nivel de asociación de las variables evaluadas determinando el Coeficiente de Correlación de Spearman (rs) ya que las variables cualitativas fueron medidas en escala ordinal. Para ello se usó el programa de computación Statistix For Windows, ver 1.0, luego los coeficientes encontrados se llevaron a una tabla para determinar si existían o no diferencias significativas al 5%.

## RESULTADOS

Los síntomas observados en las hojas de estos cultivares, se expresaron inicialmente en forma de manchas blanquecinas muy pequeñas y ligeramente levantadas a los 7 días de la inoculación (ddi) en los cultivares UCV-Manuare y DOR-448, mientras que en el cultivar Tacarigua estos síntomas se evidenciaron a los 8 ddi. Posteriormente las lesiones o pústulas aumentaron de tamaño, tomando un color pardusco, para luego tornarse rojizas. Entre los 9 y 10 ddi la mayoría de las pústulas alcanzaron rápidamente la madurez en las hojas de los cultivares UCV-Manuare y DOR-448, desarrollándose en este lapso pústulas típicas de color rojizo (Figura 1). Por el contrario, en el cultivar Tacarigua, se observaron muy pocas pústulas en este estado. A los 11 ddi, las hojas del cultivar DOR-448 presentaron mayor número de pústulas maduras por superficie foliar, con respecto a las observadas en los cultivares UCV-Manuare y Tacarigua, tal tendencia se mantuvo hasta los 15 ddi. A los 15 ddi las uredosporas comenzaron a desprenderse desde las pústulas, completándose así el ciclo de infección.

La prueba de Kruskal-Wallis para el cultivar Tacarigua inoculado (Ti) y no inoculado (Tt), detectó diferencias significativas al nivel  $\alpha = 0.05\%$  con respecto a la variable  $X_2$  durante el tiempo del ensayo (15 días). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en relación a esta variable para ninguno de los otros cultivares (Cuadro 1). Esto se podría explicar, considerando que durante la digitalización de los geles el programa del computador estableció como referencia la intensidad de la primera banda encontrada en la corrida electroforética (que correspondió siempre a Ti), dándole automáticamente el valor máximo (100%), luego al comparar este valor con el de Tt, detectó diferencias estadísticas. No ocurrió así con las muestras de los cultivares UCV-Manuare inoculado (Mi) vs. UCV-Manuare no inoculado (Mt) y DOR-448 inoculado (Di) vs. DOR-448 no inoculado (Dt), a las cuales el programa mantuvo las lecturas reales, con medias muy similares que no generaron error.

En cuanto a la variable  $X_3$  (movilidad relativa de las bandas) sólo se detectaron diferencias estadísticas el día 12 entre los tratamientos Ti y Tt (Cuadro 2).

Para ninguno de los tres cultivares evaluados fueron comparables las medias obtenidas en  $X_1$  y  $X_4$ , durante el tiempo del ensayo (Cuadro 3). Sin embargo, al final del ensayo existieron valores visualmente diferentes en relación al número de bandas ( $X_1$ ) entre cultivares inoculados y no inoculados, que la prueba estadística no detectó y por lo tanto no los comparó, debido a que las me-

días fueron iguales no generándose error. Un análisis similar se aplicó en relación a los síntomas presentes en las hojas, los cuales no fueron comparados por la prueba estadística usada, aún cuando macroscópicamente éstos fueron notablemente diferentes a partir del día seis en UCV-Manuare, del día siete en Tacarigua y en DOR-448 a partir del día nueve hasta hacerse mas evidente tal diferencia el último día del ensayo (15 ddi).

Con respecto a las correlaciones, al comparar los valores  $r_s$  de Spearman tabulados de todas las variables versus cada cultivar en sus dos condiciones evaluadas (inoculado y no inoculado), se detectó para el caso del cultivar Tacarigua que hubo correlación solamente para la condición de inoculados. Siendo positiva entre  $X_1$  con  $X_4$ , pero también se detectó correlación negativa entre  $X_3$  con  $X_1$  y con  $X_4$ . Esto significa, que por cada aumento de la variable  $X_1$  (número de bandas) habrá un aumento en la variable  $X_4$  (síntomas). Por el contrario por cada aumento de las variables  $X_1$  (número de bandas), o de  $X_4$  (síntomas) se producirá una disminución en la variable  $X_3$  (movilidad relativa) o viceversa. No hubo correlación entre  $X_1$  (número de bandas) y  $X_2$  (intensidad de las bandas) o de esta última con las otras dos variables ( $X_3$  y  $X_4$ ) (Cuadros 4 y 5).

Para el cultivar UCV-Manuare, el estadístico detectó solamente correlación negativa entre  $X_2$  (intensidad) y  $X_3$  (movilidad relativa) en la condición inoculado, significando esto que por cada aumento en la variable movilidad relativa ( $X_3$ ) habrá una disminución en la variable intensidad de las bandas. Para la condición no inoculado del cultivar UCV-Manuare, también se detectó correlación negativa, pero entre  $X_1$  con  $X_2$ , es decir que a medida que se incrementa el número de las bandas existe una disminución en la intensidad de las mismas (Cuadros 6 y 7).

En el caso del cultivar DOR-448, el estadístico detectó correlación fundamentalmente en la condición inoculado, no encontrando asociación entre las variables en la condición no inoculado. Se detectó correlación positiva entre las variables  $X_1$  y  $X_4$ , es decir que cada aumento en el número de las bandas significa un aumento en la expresión de los síntomas. Asociación negativa se encontró entre  $X_1$  con  $X_2$  y  $X_3$ , lo cual significa que cada aumento en el número de bandas ocasionaría una disminución en la intensidad y movilidad relativa de las mismas. No hubo correlación entre  $X_2$  con  $X_3$  y con  $X_4$ , ni entre  $X_3$  con  $X_4$  (Cuadros 8 y 9).

## CONCLUSIONES

En forma general, se puede señalar que la prueba de Kruskal- Wallis sólo detectó diferencias significativas al 5% para la variable intensidad de las bandas en el cultivar Tacarigua. Sin embargo, es de hacer notar que el programa de digitalización de las bandas del computador le otorgó un valor de 100% a las primeras bandas que leyó y estas siempre correspondieron al cultivar Tacarigua inoculado, de allí que hubiesen diferencias marcadas entre éste y Tacarigua sin inocular. En el caso de los otros dos cultivares no ocurrió lo mismo, pues el programa les otorgó el valor real leído para cada condición, no encontrando diferencias estadísticas al nivel 5%.

Con respecto a las otras variables evaluadas, por un lado, el programa no las comparó por corresponder a un mismo valor; o bien las diferencias eran tales que no generaron error. Las diferencias pudieron deberse al azar ya que existían diferencias en las distintas repeticiones.

Para hacer esta prueba estadística mas precisa, las limitantes ocurridas durante el análisis pueden ser resueltas aumentando el número de repeticiones, de manera que el error se distribuya mejor.

El número de bandas y síntomas, fueron las variables que siempre se asociaron positivamente en dos de los cultivares (Tacarigua y DOR-448). No obstante, no debería descartarse que en el cultivar UCV-Manuare, pudiese darse un tipo de correlación similar entre estas variables al aumentar el número de repeticiones. Parece lógico pensar que una correlación positiva entre las variables antes mencionadas, ocurra en un sistema hospedero-patógeno, pues a medida que el patógeno va colonizando e invadiendo los tejidos del hospedero, se van ocasionando cambios en el complejo enzimático del hospedero, cambios éstos que están estrechamente asociados a las alteraciones cito e histológicas que se desencadenan en el hospedero y que finalmente, se expresarán en forma de lesiones o síntomas de muy diversas formas, según se activen o no los mecanismos de defensa de la planta. Uno de los sistemas enzimáticos implicados en los estados de estrés de las plantas, sea por estímulos bióticos o abióticos, es el de las peroxidasas (Cipollini, 1998), de allí que el sistema peroxidasas, es uno de los complejos enzimáticos que el fisiopatólogo debe considerar al evaluar cualquier interacción hospedero-patógeno.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AGRIOS, G. 1985. Fitopatología. Traducción al español de la segunda edición inglesa por M. Guzmán O. Limosa S.A. México. D.F. 756 p.
- BENT, H.F. 1996. Plant disease resistance genes: Function meets structure. *The Plant Cell* 8(10): 1757 – 1771.
- BURDON, J.J and D. R. MARSHALL. 1983. The use of isozymes in plant disease research. In: *Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A.* Edited by S.D. Tanksley and T.J. Orton. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. 516 p.
- CHAKRAVORTY, A. K and K.J. SCOTT. 1993. Resistance to fungal disease. Chapter 11 pp: 277-298. In: *Advanced methods in plant breeding and biotechnology. Biotechnology in Agriculture N° 4.* Edited by D.R. Murray. CAB. International U.K. 365 p.
- CHACIN, L, F. 1999. Avances recientes en el diseño y análisis de experimentos. Editado por Servicios Gráficos de la Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 257 p.
- CIPOLLINI Jr., D. F. 1998. The induction of soluble peroxidase activity in bean leaves by wind - induced mechanical perturbation. *American Journal of Botany* 85 (11): 1586 – 1591.
- MORA, N. O, O. BORGES y A. LAYRISSE. 1985. Análisis de la estabilidad del rendimiento en cultivares de Caraota negra (*Phaseolus vulgaris* L.) con fines de selección. *Revista de la Facultad de Agronomía (Maracay)*. 14: 51-65.
- METRAUX, J.P and I. Raskin. 1993. Role of phenolics in plant disease resistance. In: *Biotechnology in Plant Disease Control.* Edited by I.Chet. Wiley-Liss, Inc. pp: 191- 209.
- WIEDENHOFER, H. 1993. Pruebas no paramétricas para las Ciencias Agropecuarias. Muestras pequeñas. FONAIAP- Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Oficina de Estadística e Informática. Serie A. Maracay, Venezuela. 140 p.



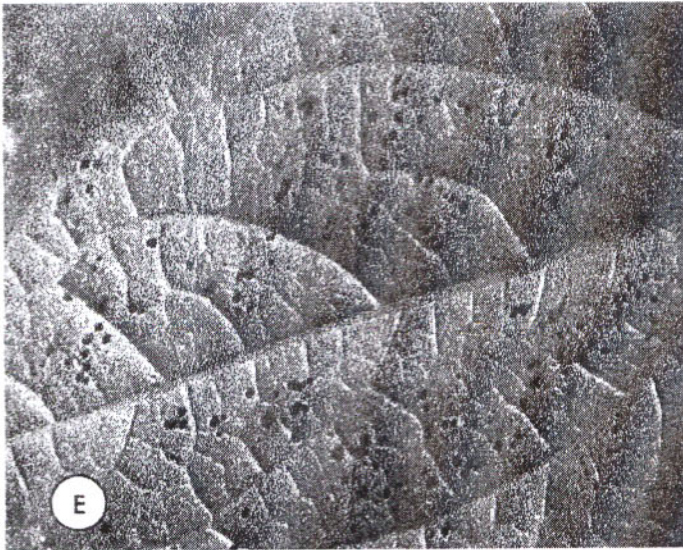
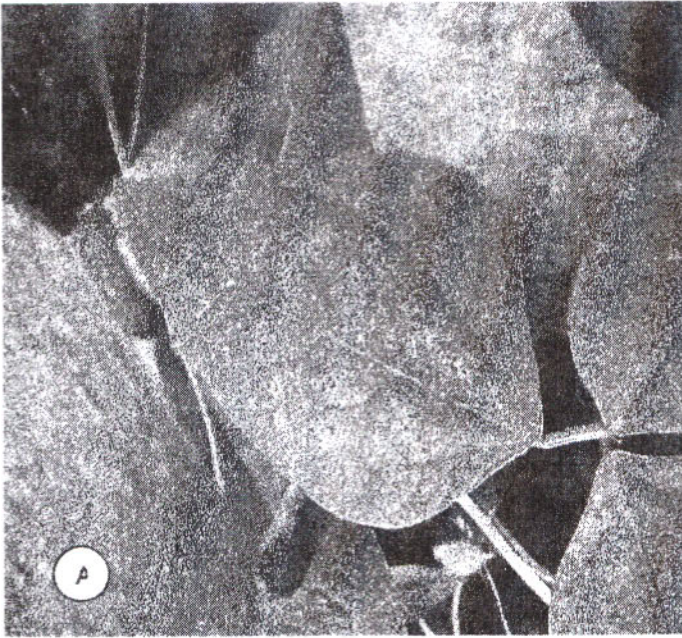


Figura 1. Síntomas de roya en la epidermis adaxial de la hoja de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.)

Cuadro 1. Valores promedios de la variable  $X_2$  (intensidad de las bandas de PRX) en tres cultivares de caraota (*P. vulgaris* L.) durante

D	1	2	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Ti	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Tt	80,5 b	81,1 b	75,8 b	81,6 b	90,8 b	84,7 b	83,6 b	87,1 b	89,9 b	85,6 b	84,6 b	90,3 b	93,2 b	61,8 b
Mi	Ns	ns	ns	ns	ns	Ns	Ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Mt	Ns	ns	ns	ns	ns	Ns	Ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Di	Ns	ns	ns	ns	ns	Ns	Ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Dt	Ns	ns	ns	ns	ns	Ns	Ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

D = días después de la inoculación

T = tratamientos: Ti= Cultivar Tacarigua inoculado

Tt= Cultivar Tacarigua sano

Mi= Cultivar UCV-Manuare inoculado

Mt= Cultivar UCV-Manuare sano

Di= Cultivar DOR-448 inoculado

Dt= Cultivar DOR-448 sano

Cuadro 2. Valores promedio de la variable  $X_3$  (Movilidad relativa de las bandas de PRX) en tres cultivares de caraota (*P. vulgaris* L.)

D \ T	1	2	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Ti	Ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	0,20*	ns	ns	ns
Tt	Ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	0,28*	ns	ns	ns
Mi	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Mt	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Di	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Dt	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

D = días después de la inoculación

T = tratamientos: Ti= Cultivar Tacarigua inoculado

Tt= Cultivar Tacarigua sano

Mi= Cultivar UCV-Manuare inoculado

Mt= Cultivar UCV-Manuare sano

Di= Cultivar DOR-448 inoculado

Dt= Cultivar DOR-448 sano

Cuadro 3. Valores promedios de la variable  $X_4$  (Síntomas de la roya) en tres cultivares de caraota (*P. vulgaris* L.) durante los 15 días del

D	1	2	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
T	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	*	*	*	*	*	*	*	*
Ti	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	*	*	*	*	*	*	*	*
Tt	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	*	*	*	*	*	*	*	*
Mi	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Mt	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Di	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	*	*	*	*	*	*	*	*
Dt	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	*	*	*	*	*	*	*	*

D = días después de la inoculación

T = tratamientos: Tt= Cultivar Tacarigua inoculado

Ti= Cultivar Tacarigua sano

Mi= Cultivar UCV-Manuare inoculado

Mt= Cultivar UCV-Manuare sano

Di= Cultivar DOR-448 inoculado

Dt= Cultivar DOR-448 sano

 $X_4$  = síntomas macroscópicos

Nc = no son comparables (igual valor)

**Cuadro 4.** Correlación encontrada entre las variables  $X_1, X_2, X_3$  y  $X_4$ , para el cultivar Tacarigua inoculado

	$X_1$	$X_2$	$X_3$
$X_2$			
$X_3$	- 0.5809*		
$X_4$	0.4367*		- 0.3045

\* = diferencias significativas al 5%, según determinación del coeficiente de correlación de Spearman (rs)

**Cuadro 5.** Correlación encontrada entre las variables  $X_1, X_2, X_3$  y  $X_4$ , para el cultivar Tacarigua no inoculado

	$X_1$	$X_2$	$X_3$
$X_2$	- 0.1765 ns		
$X_3$			
$X_4$	- 0.2165 ns	- 0.0751 ns	

\* = diferencias significativas al 5%, según el coeficiente de correlación de Spearman (rs)

**Cuadro 6.** Correlación encontrada entre las variables  $X_1, X_2, X_3$  y  $X_4$ , para el cultivar UCV-Manuare inoculado

	$X_1$	$X_2$	$X_3$
$X_2$	- 0.2086 ns		
$X_3$	- 0.2026 ns	- 0.2480*	
$X_4$	0.2249 ns	0.0622 ns	-0.0983 ns

\* = diferencias significativas al 5%, según determinación del coeficiente de correlación de Spearman (rs)

Cuadro 7. Correlación encontrada entre las variables  $X_1, X_2, X_3$  y  $X_4$ , para el cultivar UCV-Manuare no inoculado

	$X_1$	$X_2$	$X_3$
$X_2$	- 0.3411*		
$X_3$	- 0.1507 ns	- 0.1747 ns	
$X_4$			

\* = diferencias significativas al 5%, según determinación del coeficiente de correlación de Spearman (rs)

Cuadro 8. Correlación encontrada entre las variables  $X_1, X_2, X_3$  y  $X_4$ , para el cultivar DOR-448 inoculado

	$X_1$	$X_2$	$X_3$
$X_2$	- 0.3026*		
$X_3$	- 0.3348*	0.0328 ns	
$X_4$	0.4265*	0.0612 ns	-0.2651 ns

\* = diferencias significativas al 5%, según determinación del coeficiente de correlación de Spearman (rs)

Cuadro 9. Correlación encontrada entre las variables  $X_1, X_2, X_3$  y  $X_4$ , para el cultivar DOR-448 no inoculado

	$X_1$	$X_2$	$X_3$
$X_2$	- 0.1626 ns		
$X_3$	- 0.1208 ns	- 0.1924 ns	
$X_4$			

\* = diferencias significativas al 5%, según determinación del coeficiente de correlación de Spearman (rs)