



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Tema: Evaluación de la actividad nematocida *in vitro* de aceites esenciales frente a *Meloidogyne*

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previa la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autor: Diana Carolina Iler Iler

Tutor: Ph.D. Mirari Yosune Arancibia Soria

Ambato – Ecuador

Octubre – 2017

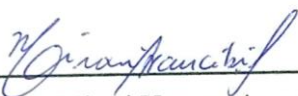
APROBACIÓN DEL TUTOR

Ph.D. Mirari Yosune Arancibia Soria.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 31 de Julio del 2017




Ph.D. Mirari Yosune Arancibia Soria.

C.I: 1802142461

Tutora

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Diana Carolina Iler Iler, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Diana Carolina Iler Iler

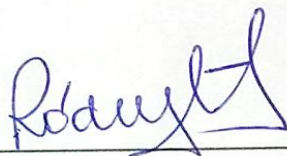
C.I. 050357408-9

Autora

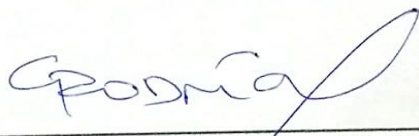
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

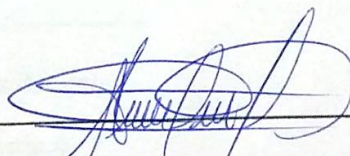
Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Dr. Carlos Alberto Rodríguez Meza; Ph.D.
C.I. 1802166502



Ing. Wilson Patricio Orozco Freire, Mg.
C.I. 1721363008

Ambato, 10 de Agosto del 2017

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este proyecto de investigación o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando no suponga una ganancia económica y se realice respetando los derechos de autor.



Diana Carolina Iler Iler

C.I. 050357408-9

Autora

DEDICATORIA

*A mis padres Lourdes Aler Ortiz y Jorge Aler Zapata y
hermana Jessica que con su afecto y apoyo incondicional me
incentivaron a ser cada día mejor y me guiaron hasta lograr
cumplir cada meta propuesta, a Alejandro por su cariño y
compañía durante todo este tiempo.*

AGRADECIMIENTOS

Por ser mi creador y mi fortaleza agradezco primero a Dios sabiendo que en cada logro alcanzado y meta cumplida él estuvo junto a mí.

Mis sinceros agradecimientos a la doctora Mirari Arancibia por la preocupación, apoyo, paciencia y sobre todo la confianza depositada en mi persona para la realización de la presente investigación.

A la empresa Isabrubotanik S.A por la donación de los aceites esenciales utilizados en la presente investigación.

A Gabriel Moreno y Dany Navas por su amistad, motivación y toda la colaboración brindada durante la realización del presente.

Agradezco a la doctora Sandra Horvitz cuyos conocimientos impartidos fueron muy importantes para la redacción de este proyecto.

Gracias a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica De Ambato por permitirme hacer uso de sus equipos e instalaciones.

Agradezco a los profesores que además de compartir sus saberes, nos preparan para afrontar los retos que nos esperan como profesionales, formando nuestra personalidad y motivándonos a ser buenos profesionales con su ejemplo. A mis compañeros y amigos que compartieron las aulas con mi persona durante estos cinco años de etapa universitaria gracias por los buenos momentos vividos.

A mi familia por brindarme su total apoyo para llegar a ser una buena profesional y cumplir mis objetivos propuestos.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I EL PROBLEMA

1.1	Tema de investigación.....	3
1.2	Justificación.....	3
1.3	Objetivos.....	4
1.3.1	Objetivo general.....	4
1.3.2	Objetivos específicos.....	4

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1	Antecedentes investigativos.....	5
2.1.1	Tomate <i>Lycopersicon esculentum</i> en el Ecuador.....	5
2.1.2	Nematodos fitoparásitos.....	5
2.1.3	Manejo de nematodos fitoparásitos.....	9
2.1.4	Aceites esenciales.....	11
2.1.5	Aceites esenciales con actividad nematocida.....	11
2.2	Hipótesis.....	14
2.2.1	Hipótesis nula.....	14
2.2.2	Hipótesis alternativa.....	14
2.2.3	Variable independiente.....	14
2.2.4	Variable dependiente.....	14

CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Aceites esenciales.....	15
3.2	Extracción e identificación de nematodos.....	15
3.3	Preparación de las suspensiones de aceites esenciales.....	16
3.4	Evaluación de la actividad nematocida.....	16
3.5	Daños producidos por los aceites esenciales en los nematodos.....	17
3.6	Diseño experimental.....	17

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Análisis y discusión de los resultados	19
4.1.1	Identificación del género <i>Meloidogyne spp</i>	19
4.1.2	Actividad nematocida de aceites esenciales.....	20
4.1.3	Daños en los nematodos producidos por los aceites esenciales.	24
4.1.4	Cálculo de la concentración efectiva 50 (CE ₅₀).....	26
4.2	Verificación de hipótesis	26

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1	Conclusiones.....	27
5.2	Recomendaciones	27
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
	ANEXOS	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Meloidogyne</i>	7
Figura 2. Vista al microscopio óptico del nematodo <i>Meloidogyne</i> (J2).....	8
Figura 3. Raíces de tomate <i>Lycopersicon esculentum</i> , A. Presencia de agallas provocadas por nematodo <i>Meloidogyne</i> , B. raíces normales	8
Figura 4. Nematodo <i>Meloidogyne</i> segundo estadio visto en Microscopio óptico A. imagen bibliográfica, B. imagen experimental.....	20
Figura 5. Porcentajes de mortalidad corregida de <i>Meloidogyne</i> J2 a diferentes tiempos de exposición a tres concentraciones de AE	21
Figura 6. Estructura de nematodos <i>Meloidogyne</i> J2 observados en el Microscopio óptico de contraste de fases.....	24
Figura 7. Nematodos <i>Meloidogyne</i> J2 de observados en el Microscopio electrónico de barrido.....	25
Figura 8. Tamizado de suspensión de raíces	35
Figura 9. Montaje de materia vegetal tamizada en embudo Baermann.....	35
Figura 10. Medidas morfométricas de <i>Meloidogyne</i> en microscopio óptico de contraste.....	35
Figura 11. Conteo de nematodos vivos y muertos expuestos a los aceites esenciales.....	36
Figura 12. Metalizador y Microscopio electrónico de barrido.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los nematodos fitoparásitos del orden Tylenchida.....	6
Tabla 2. Principales componentes de los aceites esenciales con actividad nematicida.....	11
Tabla 3. Factores y niveles para diseño experimental.....	18
Tabla 4. Comparación de medidas de estructuras de nematodos experimentales con valores bibliográficos	19
Tabla 5. Porcentajes de mortalidad obtenidos por exposición de <i>Meloidogyne</i> J2 a 4 aceites esenciales.....	23
Tabla 6. Concentración efectiva de aceites esenciales frente a <i>Meloidogyne</i> a diferentes tiempos de exposición.....	26

RESUMEN

Los nematodos fitoparásitos pertenecientes al género *Meloidogyne* atacan las raíces de un gran número de especies de plantas y su control se basa en aplicación de productos químicos que generan muchas afectaciones tanto a personas como al medio ambiente. Actualmente se buscan alternativas más orgánicas y en ese sentido los aceites esenciales por su actividad biocida frente a microorganismos como hongos, bacterias e incluso insectos, resultan una alternativa viable al uso de nematicidas químicos. En la presente investigación se evaluó la actividad nematicida de 4 tipos de aceites esenciales (orégano, tomillo, eucalipto y romero) a tres diferentes concentraciones (0,25%, 0,50%, 0,75% v/v) frente a nematodos *Meloidogyne* juveniles en segundo estadio (J2), extraídos de raíces de tomate (*Lycopersicon esculentum*), durante 48 horas a diferentes periodos de tiempo. Los mejores resultados para los 4 aceites esenciales se obtuvieron a la concentración de 0,75%, sin embargo los aceites esenciales de orégano y tomillo fueron significativamente mejores que los de eucalipto y romero, logrando una mortalidad del 100% tras 8 horas de exposición para el orégano y 100% de mortalidad a las 24 horas para el tomillo. Adicionalmente mediante microscopia óptica y microscopia electrónica de barrido se evaluaron daños en nematodos expuestos a aceites esenciales, los cuales mostraron vacuolas oscuras y daños de órganos internos. Los excelentes resultados obtenidos con dos de los aceites esenciales estudiados ofrecen posibilidades alentadoras de llegar a ser una alternativa al uso de nematicidas químicos en la industria agrícola.

Palabras clave: Nematodos fitoparásitos, microscopia electrónica de barrido, actividad biocida, aceites esenciales, *Meloidogyne* J2.

ABSTRACT

Plant-parasitic nematodes from the genus *Meloidogyne* attack a great number of species of plants and their control is based on the application of chemical products which causes problems for the people and the environment. Therefore organics alternatives are being sought. In this sense the essential oils whit proven biocide activity against microorganisms such as fungi, bacteria and even insects, represent a viable alternative to the use of chemical nematicidas. In this research was evaluated the nematicidal activity of 4 types of essential oil (oregano, thyme, eucalyptus y rosemary) at three different concentrations (0.25%, 0.50%, 0.75% v/v) against second stage juvenile (J2) of *Meloidogyne* spp extracted from tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots, during 48 hours at different time periods. Although, all essential oils showed higher nematicidal activity at 0.75% concentration, essential oils from oregano and thyme were significantly better than those of eucalyptus and rosemary, achieving a mortality percentage of 100% after 8 hours of exposure for the oregano essential oil and 100% mortality at 24 hours for thyme. In addition, damage was evaluated in J2 nematodes exposed to essential oils by means of light microscopy and scanning electron microscopy. The structure of the nematodes showed dark vacuoles and internal organ damage. The excellent results obtained with two of the essential oils studied offer encouraging possibilities to become an alternative to the use of chemical nematicides in the agricultural industry

Key words: Phytoparasite nematodes, scanning electron microscopy, biocidal activity, essential oils, *Meloidogyne* J2.

INTRODUCCIÓN

Algunos cultivos agrícolas son susceptibles al ataque de nematodos fitoparásitos, que provocan pérdidas en la producción y el rendimiento. Un ejemplo de cultivo susceptible al ataque por plagas de nematodos, específicamente *Meloidogyne*, es el tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Cuadra, Cruz, Ortega, Shagarodsky, & González, 2005). La producción de tomate es de gran importancia a nivel mundial debido a su alta comercialización tanto para consumo directo como para materia prima en la industria alimenticia. En Ecuador este cultivo tiene alta demanda en el mercado, tal es así que pequeños como grandes productores en la región Sierra han impulsado su producción bajo invernadero (Lanchimba & Augusto, 2016).

Los nematodos son organismos multicelulares, algunos parasitan animales y personas, otros pueden clasificarse en saprófitos, omnívoros, depredadores, y fitoparásitos. A pesar de que todos en conjunto, pueden ocasionar afectación a los cultivos, son los fitoparásitos los que por su acción patogénica generan pérdidas anuales de producción estimada de 100 mil millones de dólares a nivel mundial (Andrés, 2003; Baños et al., 2017). Los nematodos generalmente interrumpen el desarrollo de la planta y facilitan el ataque de otros microorganismos como bacterias y hongos lo que repercute en pérdidas de producción y perjuicio económico para los agricultores (Subercaseaux, 2011).

Entre los nematicidas químicos más usados se encuentran los organofosforados, que son potencialmente tóxicos para los mamíferos y causan afectaciones a nivel del sistema nervioso central provocando muerte por paro respiratorio. Asimismo, los carbamatos aunque con menor agresividad que los organofosforados. En cuanto al bromuro de metilo, aunque su uso se ha prohibido en varios países por su toxicidad e impacto ambiental, es común su aplicación como biocida debido a su amplio espectro (Bello, López-Pérez, & Díaz-Viruliche, 2000; Cárdenas, Silva, Morales, & Ortiz, 2005; Canchignia et al., 2015).

Si bien existen algunos productos naturales como extractos de plantas con actividad nematicida, los aceites esenciales han demostrado poseer interesantes propiedades biológicas debido no solo a su carácter hidrofóbico, volatilidad y aroma característico sino porque se encuentran conformados en su mayor parte por terpenos

y sesquiterpenos, fenilpropanoides, derivados de hidrocarburos parafínicos, alcoholes, cetonas, ácidos grasos y compuestos que contienen azufre y nitrógeno, que les confiere actividad nematicida (Grassmann & Elstner, 2003).

Con base en lo anterior y de acuerdo con la composición de los aceites esenciales (AE) y la necesidad de buscar alternativas al uso de plaguicidas químicos para el control de nematodos, que en muchos casos son tóxicos, en el presente estudio se propone evaluar la actividad nematicida *in vitro* de los AE de romero (*Rosmarinus officinalis* L), tomillo (*Thymus vulgaris* L), eucalipto (*Eucalyptus globulus*) y orégano (*Origanum vulgare*), frente al nematodo *Meloidogyne* aislado a partir de raíces de tomate (*Lycopersicon esculentum*).

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema de investigación

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA *IN VITRO* DE ACEITES ESENCIALES FRENTE A *MELOIDOGYNE*

1.2 Justificación

Aunque el control de nematodos es complejo, en la actualidad el método más empleado es la aplicación de agroquímicos. Si bien la mayoría de estos compuestos son tóxicos, persistentes en el ambiente y causantes indirectos de graves enfermedades en las personas, su aplicación es cada vez más común. Por este motivo es importante identificar alternativas naturales, que controlen plagas de forma eficiente evitando el uso indiscriminado de compuestos químicos sintéticos (González & Aristizábal, 2014).

Los nematodos limitan el desarrollo de las plantas al penetrar en el tejido vegetal, donde forman quistes o agallas que obstruyen el paso de nutrientes. Al dañar el tejido provocan que la planta se vuelva susceptible al ataque de otros organismos patógenos como hongos y bacterias (Armendáriz-González, Quiña-Cepeda, Ríos-Salgado, & Landázuri-Abarca, 2015). El cultivo de tomate riñón (*Lycopersicon esculentum*) comúnmente se ve afectado por enfermedades provocadas por nematodos agalladores de raíces del género *Meloidogyne*, los cuales se dispersan y proliferan de manera incontrolable en el suelo generando bajos rendimientos y cuantiosas pérdidas económicas (Trivino, 2004).

Al ser el tomate un producto de consumo masivo resulta interesante identificar una alternativa al control de nematodos mediante el uso de productos naturales. Las investigaciones en aceites esenciales para el control de plagas han mostrado resultados fiables gracias a sus diversos componentes con acción biocida (Andrade, 2009). El propósito del presente estudio fue evaluar el efecto nematicida *in vitro* de cuatro AE a 3 concentraciones diferentes, frente a nematodos del género *Meloidogyne* presentes en cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum*).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- Evaluar la actividad nematocida *in vitro* de los aceites esenciales frente a *Meloidogyne*.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración óptima de los aceites esenciales *Rosmarinus officinalis* L (romero), *Thymus vulgaris* L (tomillo), *Eucaliptus globulus* L'Hér (eucalipto) y *Origanum vulgare* L (orégano), para el control de *Meloidogyne*.
- Obtener curvas de porcentaje de mortalidad de nematodos como función del tiempo de exposición.
- Identificar los daños producidos por los aceites esenciales en los nematodos mediante microscopía.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos

2.1.1 Tomate *Lycopersicon esculentum* en el Ecuador

En el Ecuador el cultivo de invernadero más importante es el de tomate riñón (*Lycopersicon esculentum*), su fruto posee nutrientes como fibra, potasio, fósforo, vitaminas C y E, provitamina A y vitaminas del grupo B, en especial B1 y niacina o B3, licopeno (un antioxidante natural que ayuda en la prevención del cáncer), por lo cual su consumo es alto. Por otra parte, las zonas de producción son muy amplias y abarcan desde el nivel del mar hasta los 3200 msnm, la temperatura adecuada para su desarrollo va desde los 18 a 25 °C lo cual se logra efectivamente en condiciones de invernadero y se puede cultivar en cualquier época del año (Caguana, 2003; Llerena B. & Llerena S., 2010).

En Ecuador, las provincias con la máxima concentración de cultivo de tomate son Imbabura, Cotopaxi, Chimborazo, Tungurahua, Azuay y Loja. Desde el año 2006 se ha incrementado considerablemente su producción (incluso se exporta), alcanzando 29,14 toneladas por hectárea hasta el año 2015 (MAGAP, 2015). Sin embargo, existen pérdidas por la presencia de plagas tales como ácaros, nematodos fitoparásitos, malezas, pájaros, roedores entre otros, que afectan directamente a la economía tanto de agricultores como del país (Caguana, 2003).

2.1.2 Nematodos Fitoparásitos

Los nematodos fitoparásitos son organismos pluricelulares cuya estructura es vermiforme o forma de gusanos cilíndricos, con una longitud de 0,25 mm a 5 mm y un ancho de 15 μm a 50 μm , en su estadio juvenil y adulto. Los endoparásitos hembras, por su vida sedentaria, adquieren una forma engrosada. Poseen órganos internos digestivos, excretores y reproductores bien diferenciados, los fitoparásitos se distinguen por poseer una estructura similar a una lanza en su cavidad bucal denominada estilete utilizada para perforar e introducirse en las estructuras celulares del huésped (Cavallini, 1998).

Los nematodos fitoparásitos se clasifican en tres órdenes: Aphelenchida, Tylenchida y Dorylaimida. En el orden Tylenchida se encuentran los 10 géneros de nematodos fitoparásitos de mayor importancia económica (Tabla 1) entre ellos *Meloidogyne* (Cañizares 2003).

Tabla 1. Características de los nematodos fitoparásitos del orden Tylenchida (Cavallini, 1998).

Superfamilia	Familia	Género	Longitud aprox. (mm)	Hábito*
Tylenchoidea	Tylenchidae	<i>Ditylenchus</i>	4.0	Endo, Migratorio, Flores
	Pratylenchidae	<i>Pratylenchus</i>	0.5	Endo, Migratorio, Raíces
		<i>Radopholus</i>	0.6	Endo, Migratorio, Raíces
	Hoplolaimidae	<i>Helicotylenchus</i>	1.0	Ecto-Endo, Migratorio, Raíces
Heteroderoidea	Heteroderidae	<i>Heterodera</i>	0.5-1.0	Endo, Sedentario, Raíces
		<i>Globodera</i>	0.5-1.0	Endo, Sedentario, Raíces
		<i>Meloidogyne</i>	0.5-0.8	Endo, Sedentario, Raíces
	Nacobbidae	<i>Rotylenchulus</i>	0.5	Endo, Sedentario, Raíces
		<i>Nacobbus</i>	1.0-1.5	Endo, Sedentario, Raíces
Criconematoidea	Tylenchulidae	<i>Tylenchulus</i>	0.4	Endo, Sedentario, Raíces

*Endo= Endoparásito; Ecto=Ectoparásito

En particular los nematodos del género *Meloidogyne* son los más importantes, atacan a las plantas por sus raíces en donde forman agallas, son endoparásitos sedentarios. En su ciclo de vida (Figura 1) pasan por seis etapas: huevo, cuatro estadios juveniles y finalmente adultos. Los nematodos del segundo estadio J2 son los más infectivos, ingresan a la raíz de la planta donde se vuelven sedentarios, si hallan condiciones ambientales adecuadas pasarán a J3 luego a J4, etapa en la que se diferenciarán en

hembras y machos. Las hembras se queda dentro de la raíz si hallan condiciones favorables y los machos migran fuera de la raíz donde se convertirán en adultos (Castilo-Marroqui, 2014). Su capacidad infectiva es muy alta debido a que las hembras pueden producir hasta 3000 huevos y al tener condiciones favorables de temperatura pueden completar su ciclo de vida en un mes (Balarezo, 2015).

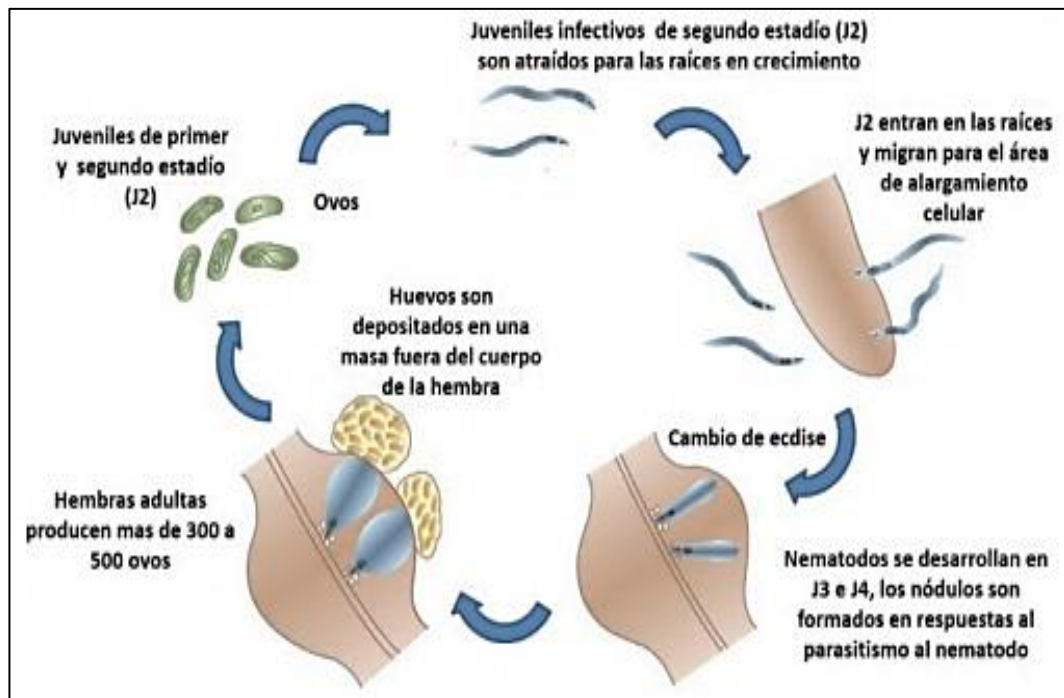


Figura 1. Ciclo biológico de *Meloidogyne* (Flores, 2017).

Del género *Meloidogyne* se puede destacar la extensa gama de hospederos que parasita, su diseminación se da de forma pasiva por agua, restos vegetales, viento suelo infestado adherido a la superficie de herramientas agrícolas. Adicionalmente, la susceptibilidad de la planta huésped y la competitividad entre organismos del suelo condicionan el número de juveniles que logren infestar las raíces de la planta (Subercaseaux, 2011).

La forma de infestación de las larvas de *Meloidogyne* J2 (Figura 2), se da por medio de la secreción de enzimas digestivas para debilitar las células vegetales, al poseer un estilete débil buscan estructuras más delgadas de la raíz como son los pelos absorbentes, cuando llegan al cilindro vascular en desarrollo se reconocen con una

célula vegetal precursora que les proveerá de alimentación y agua necesaria para completar su ciclo (Suárez-Díaz, 2015).

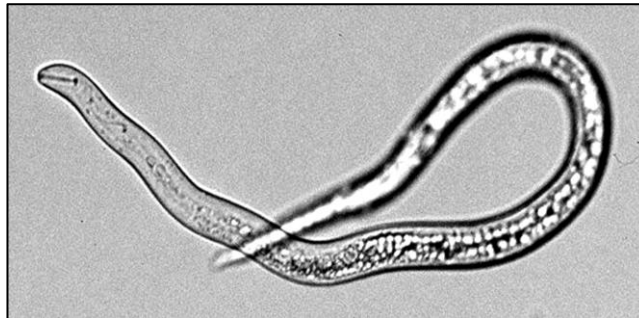


Figura 2. Vista al microscopio óptico del nematodo *Meloidogyne* (J2) (Verdejo-Lucas, 2009).

Como resultado de la infestación de *Meloidogyne* en la planta, se forman protuberancias en la raíz denominadas nódulos o agallas (Figura 3) por exceso de producción de auxinas y otros reguladores de crecimiento. Además, estimula la síntesis de ARN y proteínas, lo cual sugiere que el nematodo tiene relación directa en cambios en el genoma de la planta infectada y provoca dificultades al paso de agua y nutrientes con visibles cambios físicos como marchitamiento de hojas, bajo desarrollo y disminución de la productividad de la planta en calidad y cantidad, en casos extremos la planta puede morir (Cardona-Piedrahíta, Castaño-Zapata, & Aguirre, 2016; Llerena B. & Llerena S., 2010).

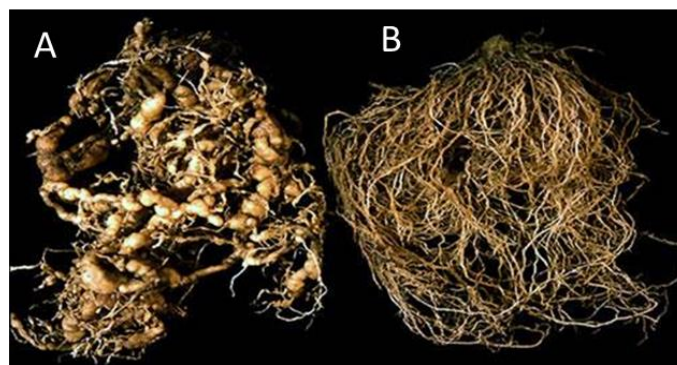


Figura 3: Raíces de tomate *Lycopersicon esculentum*, A. Presencia de agallas provocadas por nematodo *Meloidogyne*, B. raíces normales (Chaves, Marcillo, González, & García, 2011).

En su trabajo Cardona-Piedrahíta et al. (2016), identificaron hembras y juveniles J2 del género *Meloidogyne* mediante microscopía óptica. Para la diferenciación de hembras se basó en mediciones morfométricas de patrones perineales tomando como características arco dorsal, líneas de campo lateral y estrías y en el caso de los juveniles J2 realizó mediciones de la longitud del cuerpo, de la cola, de la región hialina de la cola, y del estilete; los resultados obtenidos los comparó con claves taxonómicas.

2.1.3 Manejo de nematodos fitoparásitos

En la agricultura es necesario diferenciar entre control y manejo, el término control se refiere a la eliminación de la población de la plaga con el uso de técnicas específicas en un tiempo limitado, en cambio el manejo tiene como objetivo principal reducir la densidad de la plaga para disminuir la afectación en el cultivo durante cierto periodo de tiempo (Andrés, 2002).

Dentro de un programa de manejo integrado de plagas y enfermedades (MIPE), la última opción para el control de plagas es el uso de agroquímicos; a pesar de ello, el agricultor en la actualidad está entrenado social y económicamente para utilizar productos químicos como único recurso para el control, pese a los efectos desfavorables que éstos ocasionan (Caguana, 2003).

Control químico

Es el método más empleado, en este grupo entran los plaguicidas elaborados a base de compuestos químicos sintetizados como son los carbamatos y organofosforados, los cuales incrementan costos de producción, afectan la dinámica del suelo y ocasionan afecciones a la salud humana y al medioambiente. Los nematicidas químicos ingresan por la cutícula del nematodo inhibiendo la acetilcolinesterasa con lo cual ocasionan desorientación y parálisis además de reducción en la eclosión de huevos y movimiento, lo que conduce a alteraciones en la alimentación y reproducción (Álvarez, Botina J., Ortiz, Jarminton, & Botina L., 2016; López, s.f).

Control biológico

El manejo biológico de fitonematodos por medio de bacterias se conoce desde 1906 aunque no fue sino hasta mediados de los ochenta que se identificó con el nombre de *Pasteuria* a la bacteria Gram negativa, mesófila, micelial, endospórica, parasitaria de nematodos misma que posee una extensa gama de hospedantes, como por ejemplo *Pasteuria penetrans* que ataca principalmente a nematodos de nudo radical, su modo de acción comprende la adhesión, penetración y crecimiento vegetativo en el individuo parasitado lo que ocasiona su muerte (Hoyos Carvajal, 2012).

Otro método de manejo biológico es la aplicación del hongo *Paecilomyces lilacinus* actualmente *Purpureocillium lilacinum*, debido a la actividad antagónica que posee frente a huevos y hembras de nematodos fitoparásitos, especialmente los que generan agallas en la raíz como son *Meloidogyne* y *Nacobbus* (Gortari & Hours, 2015).

Control orgánico

Se trata de la aplicación de pesticidas en base a compuestos de origen biológico sintetizados por organismos vivos como el alcaloide nicotina extraído de la planta del tabaco utilizado como insecticida, se puede decir que todo componente utilizado para control de plagas que no sea de origen sintético entra en este gran grupo de biopesticidas (Hinojosa, 2011).

Un ejemplo de este tipo de control de plagas es el nematicida comercial Nemaplus formulado a base de extracto de gluten (50%) y extracto de quillaja (50%) con alto contenido de saponinas las cuales ocasionan toxicidad en los nematodos impidiendo que se alimenten y reproduzcan, debido a la afectación en el sistema neurotransmisor y aparato digestivo (Hinojosa, 2011).

De igual forma el producto comercial NEMACID® formulado con metabolitos y enzimas extraídos a partir del hongo *Lecanicillium lecanii* contra juveniles de *Meloidogyne incognita*, provoca desordenes en sus órganos internos, además de vacuolas y zonas oscuras en su estructura (Guevara et al., 2013).

2.1.4 Aceites esenciales

Los AE son compuestos líquidos volátiles extraídos generalmente por arrastre de vapor a partir de plantas aromáticas, al ser mezclas complejas pueden llegar a estar constituidos por más de 100 componentes de tipo: monoterpenos, sesquiterpenos, compuestos alifáticos y fenilpropanos, su distribución es tan amplia que pueden ser sintetizados por más de 60 familias de plantas, pueden ser extraídos de hojas, flores, tallos, raíces, frutos y semillas (Martínez, 1996).

Por sus características los AE poseen un alto espectro de aplicaciones que van desde la industria farmacéutica, cosmetología, perfumería hasta la industria alimenticia como aromatizantes, además empieza a tomar importancia en el control plagas y en ese sentido se los considera como alternativas a los químicos que actualmente se emplean para tal fin (Regnault-Roger, 2013).

Acción biocida de los aceites esenciales

El mecanismo de acción de los AE frente a hongos, bacterias y otros microorganismos ocurre a nivel celular, cuando el esqueleto carbonado de los aceites esenciales se inserta en la membrana celular volviéndola permeable y susceptible a otros componentes más tóxicos, además dependiendo de la dosis de exposición los aceites esenciales interfieren en la respiración celular hasta el punto de provocar lisis celular (Pérez, 2012).

2.1.5 Aceites esenciales con actividad nematicida

Las propiedades nematicidas de algunos AE se atribuyen específicamente a sus componentes mayoritarios (Tabla 2) los cuales pueden estar en los siguientes grupos de compuestos alcaloides, fenoles, sesquiterpenos, diterpenos, poliacetilenos y derivados de tienilo (Oka et al., 2000). Al ser mezclas complejas los AE contienen sustancias traza que de forma conjunta evitan resistencia en las plagas lo cual no sucede con plaguicidas químicos de acción pesticida individual (Espitia, 2011).

Tabla 2. Principales componentes de los aceites esenciales con actividad nematocida (Ibrahim, Traboulsi, & El-Haj, 2006; Oka et al., 2000)

Componentes
Cetona
(+)-Carvona
Limoneno
Carvacrol
Geranial, neral
<i>t</i> -Anetol
Isómeros de 1,2-epoximentil acetato
Timol
Pulegona
Piperitona
Eugenol
Linalool

Aceite esencial de eucalipto

El aceite esencial de eucalipto ha demostrado buena actividad nematocida en diferentes concentraciones ensayadas a menores tiempos de exposición en comparación con otros aceites, contiene una mezcla compleja de fenoles, óxidos, aldehídos, cetonas, alcoholes, y éteres, siendo 1,8-cineol (55,49%) y α -pineno (18,18%) sus componentes mayoritarios, su toxicidad puede deberse al comportamiento sinérgico entre dichos componentes (González-Guiñez, Silva-Aguayo, Urbina-Parra, & Gerding-González, 2016; Gupta, Sharma, & Naik, 2011).

Aceite esencial de romero

En la investigación realizada por Cetintas & Yarba (2010) evaluaron 5 aceites esenciales entre ellos el de romero, el cual presentó baja actividad nematocida reduciendo en aproximadamente un 50% la presencia de nematodos, en comparación con los aceites de tomillo y ajo que tuvieron mejor actividad. Resultado que puede deberse a que el aceite esencial de romero contiene limoneno (3,7%) como único componente con probada actividad nematocida pero en baja cantidad comparada con

sus componentes mayoritarios 1,8-cineol (21,5%), alcanfor (18,0%) y alfa pineno (15,3%) (Oka et al., 2000; Romeu, Botta, & Díaz, 2007).

Aceite esencial de orégano

El aceite esencial de orégano posee altas concentraciones de los componentes timol (60%) y carvacrol (80%) los que han demostrado actividad nematicida, provocando inmovilidad en estadio juvenil de nematodos agalladores de raíz (Oka et al., 2000). Como citan en su trabajo Ibrahim et al. (2006) el timol, carvacrol y linalool resultan más tóxicos contra huevos y J2 de *Meloidogyne incognita*.

Aceite esencial de tomillo

Según Hinojosa (2011), el aceite de tomillo ha demostrado actividad nematicida al igual que antifúngica debido a su composición (saponinas y polifenoles), por lo cual ha sido usado para tratar enfermedades en las raíces de plantas obteniendo resultados favorables. Los componentes presentes en mayor cantidad en el aceite esencial de tomillo son timol (77,07%), linalool (7,01%) y carvacrol (4,78%) (Andrés et al., 2017).

Los trabajos citados avalan que los aceites esenciales son útiles en el control de nematodos fitoparásitos, al depender directamente de los componentes que individualmente posean actividad nematicida y de su cantidad presente en el aceite esencial investigado. Además describen la manera en que los nematodos son afectados al entrar en contacto con los aceites esenciales. Por lo anterior, se busca el aceite esencial con mayor actividad nematicida *in vitro* a menor concentración, con miras a su posible aplicación como alternativa al uso de agroquímicos.

2.2 Hipótesis

2.2.1 Hipótesis nula

Los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis* L), tomillo (*Thymus vulgaris* L), eucalipto (*Eucalyptus globulus* L'Hér) y orégano (*Origanum vulgare* L) no poseen actividad nematocida frente a *Meloidogyne*.

2.2.2 Hipótesis alternativa

Los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis* L), tomillo (*Thymus vulgaris* L), eucalipto (*Eucalyptus globulus* L'Hér) y orégano (*Origanum vulgare* L) poseen actividad nematocida frente a *Meloidogyne*.

Señalamiento de variables

2.2.3 Variable independiente

Tipo y concentración de aceite esencial.

2.2.4 Variable dependiente

Porcentaje de mortalidad en *Meloidogyne* J2 expuestos a los aceites esenciales.

CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Aceites esenciales

Se utilizaron aceites esenciales puros, de romero (*Rosmarinus officinalis* L), tomillo (*Thymus vulgaris* L), eucalipto (*Eucalyptus globulus* L'Hér) y orégano (*Origanum vulgare* L), gentilmente donados por Isabrubotanik S.A (Ambato-Ecuador), los cuales fueron extraídos mediante el proceso de destilación con arrastre de vapor.

3.2 Extracción e identificación de nematodos.

Los nematodos se extrajeron de raíces de tomate *Lycopersicon esculentum* con presencia de agallas, recolectadas de un invernadero ubicado en el barrio Patatin en la ciudad de Salcedo (Cotopaxi-Ecuador).

Para extraer los nematodos se utilizó el método modificado de Ramírez, Grijalva, Navarrete, & Guerrero (2016), el cual consistió en pesar 10 g de raíces que presenten agallas, lavarlas en una solución de hipoclorito de sodio (0,5%) durante 2 min, las raíces se cortaron en trozos pequeños y se licuaron con 200 ml de agua de llave estéril por 20 segundos. La suspensión se pasó a través de un tamiz N°60 (250µm) donde quedaron los residuos vegetales más grandes mientras que los nematodos J2 se recuperaron del tamiz N°325 (45µm). Posteriormente fueron lavados con agua destilada y la suspensión recuperada con los nematodos se hizo pasar por un papel filtro, se desechó el agua, y el material vegetal contenido en el papel filtro se depositó en una malla metálica dentro de un embudo de vidrio conectado en su parte inferior a una manguera de plástico doblada y sujeta con una pinza. En el embudo se colocó agua de tal manera que se encuentre ligeramente en contacto con la malla y humedezca la parte inferior del papel filtro (técnica embudo Baermann) y se dejó en reposo durante 48 horas (González, 2013).

Pasadas las 48 horas se recolectaron volúmenes de 30 ml de agua del embudo, bajo el estereoscopio se concentró la suspensión de nematodos quitando el exceso de agua hasta lograr una concentración aproximada de 400 nematodos/ml.

Para la identificación de nematodos J2 del género *Meloidogyne spp* se utilizó un microscopio de contraste de fases (Leica DM2000 LED, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) en el cual se obtuvieron fotografías con mediciones morfométricas de los nematodos J2 extraídos. Los parámetros medidos fueron: longitud del cuerpo del nematodo, longitud del estilete y de la región hialina de la cola (Eisenback, 2002; Eisenback & Hirsehmann, 1991).

3.3 Preparación de las suspensiones de aceites esenciales.

Se prepararon tres suspensiones iniciales en agua diferentes para cada AE 0,5%; 1,0%; 1,5% (v/v). Para facilitar la homogenización del AE (compuesto hidrofóbico) en agua se utilizó Tween-20 al 0,5% (v/v) (Gupta et al., 2011). La muestra control se preparó con agua y Tween-20 y el blanco fue únicamente agua.

3.4 Evaluación de la actividad nematocida.

Para llevar a cabo los ensayos se colocó una suspensión de nematodos (400 µl) en tubos de centrifugación de 1.5 ml (Eppendorf, Alemania), acto seguido se adicionó 400 µl de la disolución de AE (con una concentración final de 0,25%, 0,5 y 0,75% v/v), control o blanco respectivamente. En todos los casos se agitó manualmente. A intervalos de tiempo de 2, 4, 6, 8, 24, y 48 horas se tomaron alícuotas de 100 µl (aproximadamente con 18-20 nematodos en cada alícuota), y se observaron en un estereoscopio (MOTIC, CHINA) para contabilizar el número de nematodos totales y nematodos muertos. Para verificar la inmovilidad de nematodos, considerados muertos, se utilizó una aguja de disección. Se realizaron 4 réplicas para cada tratamiento.

Para el cálculo de porcentaje de mortalidad se aplicó la siguiente fórmula:

$$\%Mortalidad = \frac{\text{número de nematodos muertos}}{\text{número total de nematodos}} \times 100$$

Y para el porcentaje de mortalidad corregido se empleó la fórmula de Abbott (Rosado-Aguilar et al., 2008).

$$\% Mortalidad\ corregida = \frac{\%MT - \%MC}{100 - \%MC} \times 100$$

Dónde:

MT= Mortalidad tratados

MC= Mortalidad control

3.5 Daños producidos por los aceites esenciales en los nematodos

Microscopía óptica

Se observaron los daños en la estructura de los nematodos, ocasionados por los AE, mediante microscopía óptica. Para ello se colocaron alícuotas de 10 µl en un portaobjetos (evitando la formación de burbujas) y se llevaron para su visualización a un microscopio de contraste de fases (Leica DM2000 LED, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

Microscopio electrónico de barrido

Para la visualización de daños en la estructura de los nematodos, las muestras biológicas de nematodos fueron fijadas con 3% de formaldehído y 2% de trietanolamina para neutralizar el ácido fórmico, para el proceso de secado se aplicó 5% glicerol en acetona con lo cual se evitó el daño de tejido, una vez secas, las muestras se colocaron en cintas adhesivas de carbono soportadas en un portamuestras para microscopio SEM (Green, Stone, Turner, & Clark, 1975). Una vez montados los nematodos se sometieron a un baño de oro en un metalizador a presión de 2 atm, finalmente se visualizaron en el microscopio electrónico de barrido (TESCAN VEGA3, EE.UU).

3.6 Diseño experimental

Para la tabulación de datos experimentales se utilizó el programa Microsoft Excel.

Se aplicó el diseño experimental factorial completamente al azar para el cual se utilizó el software GraphPad Prism 5. (EE.UU). Las variables independientes fueron los 4 tipos de aceites esenciales y las tres concentraciones diferentes, en cuanto a la variable dependiente o de respuesta, fueron los porcentajes de mortalidad corregidos de los nematodos *Meloidogyne* expuestos a los tratamientos con los aceites esenciales.

En la Tabla 3 se muestran los factores y niveles del diseño experimental:

Tabla.3 Factores y niveles para diseño experimental

FACTORES	NIVELES
A. Aceites esenciales	AE = A. E. Eucalipto AT = A. E. Tomillo AR = A. E. Romero AO = A. E. Orégano
B. Concentraciones de aceites	0,25 = 0,25% A.E 0,50 = 0,50% A.E 0,75 = 0,75% A.E

3.6.1 Cálculo de la concentración efectiva 50 (CE₅₀)

Con los porcentajes de mortalidad corregidos para cada concentración de AE evaluada se calculó la concentración efectiva (CE₅₀), para cada AE el software GraphPad Prism 5. (EE.UU).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis y discusión de los resultados

4.1.1 Identificación del género *Meloidogyne spp*

En la Tabla 4 se presenta los resultados de las medidas obtenidas de los nematodos juveniles extraídos experimentalmente y los valores observados por Eisenback & Hirsehmann (1991). A la vista de los resultados, las dimensiones de los nematodos se encuentran dentro de los valores bibliográficos lo que permite establecer que se trata de *Meloidogyne J2*. Además, se comparó las imágenes experimentales (Figura 4B) con una imagen bibliográfica (Figura 4A) y en ambos casos se observó que los nematodos *Meloidogyne J2* son de cuerpo corto y delgado su estilete es corto y débil, el esófago se superpone al intestino ventral, la cola es puntiaguda y estrecha con terminación transparente.

Tabla 4. Comparación de medidas de estructuras de nematodos experimentales con valores bibliográficos (Eisenback & Hirsehmann, 1991)

Valores	Cuerpo (μm)	Estilete (μm)	Cola (μm)
Experimentales	300,80 \pm 20,90	10,79 \pm 0,71	13,52 \pm 1,02
Bibliográficos	290 - 912	8 – 18	10 - 15



Figura 4: Nematodo *Meloidogyne* segundo estadio visto en Microscopio óptico; A. imagen bibliográfica (Eisenback, 2002) , B. imagen experimental.

4.1.2 Actividad nematocida de aceites esenciales

Se obtuvieron las tres curvas de porcentajes de mortalidad corregida de *Meloidogyne* J2 vs tiempo de exposición (Figura 5). Para este ensayo se utilizó Tween-20 como control. El Tween-20 ayudó a la disolución de los AE en agua y además provocó baja toxicidad en las larvas (Rosado-Aguilar et al., 2008). El porcentaje de mortalidad aumentó a medida que aumentó el tiempo de exposición al AE en todos los casos. Si bien, los AE de orégano y tomillo son significativamente más efectivos que los de eucalipto y romero, estos últimos también presentaron actividad nematocida frente a *Meloidogyne* J2 aunque muy por debajo de la esperada.

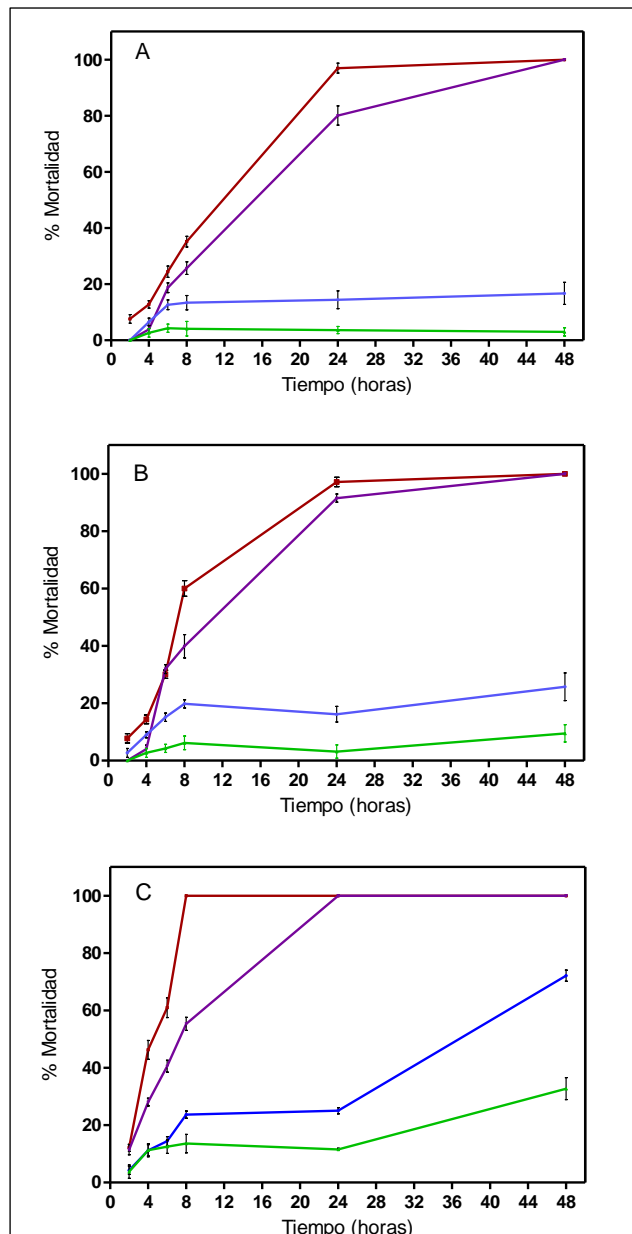


Figura 5. Porcentajes de mortalidad corregida de *Meloidogyne J2* a diferentes tiempos, durante 48 horas de exposición a la concentración de 0,25%(A), 0,50%(B), 0,75%(C). Aceite esencial de orégano (rojo), tomillo (morado), eucalipto (azul), romero (verde). Líneas negras verticales representan las barras de error.

En la Tabla 5 se presentan los porcentajes de mortalidad para cada AE a las 8, 24 y 48 horas de exposición. Los nematodos expuestos al tratamiento control (Tween-20 al 0,5%) se inmovilizaron a las 8 horas sin embargo, los resultados más altos alcanzados y en menor tiempo de exposición se alcanzaron con el AE de orégano ($36,96 \pm 2,56\%$ de mortalidad a 0,25% de AE). La concentración de 0,75% de AE de

orégano al cabo de 8 horas de exposición logró una mortalidad de nematodos de 100%. Los porcentajes de mortalidad más elevados, para todos los AE, se consiguieron a la concentración de 0,75% y a las 48 horas de exposición (Tabla 5).

El AE de orégano posee timol (60%) y carvacrol (80%) (fenólicos) como componentes mayoritarios además de otros componentes en menores cantidades como γ -terpineno y r -cimeno (monoterpenoides) (Arcila-Lozano, Loarca-Piña, Lecona-Uribe, & González de Mejía, 2004; Ibrahim et al., 2006) a los cuales se puede atribuir en el presente estudio su alta actividad frente a *Meloidogyne* J2, Echeverrigaray, Zacaria, & Beltrão (2010) evaluaron monoterpenoides contra *Meloidogyne incognita* obteniendo que 20 de los 22 estudiados evitaron eclosión de huevos e inmovilizaron J2, entonces es válido mencionar que los AE con alto contenido de dichos monoterpenoides tales como 1,8-cineol, terpineno, limoneno, mentona, alfa y beta pineno entre otros evaluados pueden ser eficaces en el control de nematodos del género *Meloidogyne*. Asimismo, cuando un AE posee mayor cantidad de compuestos con actividad nematicida, se eleva su actividad biológica y además evita resistencia en plagas gracias a la acción en conjunto de sus componentes (Espitia, 2011; Oka et al., 2000).

De igual manera los resultados obtenidos con el AE de tomillo demostraron su potencial aplicación en el control de *Meloidogyne* J2 al igual que el orégano alcanzó un 100% de mortalidad a la concentración de 0,75% luego de 24 horas. Los componentes mayoritarios que posee y que han sido estudiados individualmente por su efecto nematicida son terpineno, timol y carvacrol responsables directos de su eficacia en el control de nematodos agalladores de raíz (Acosta, Castro, Roque, & Felix, 2000; Oka et al., 2000).

La actividad obtenida con el AE de eucalipto ($77,24 \pm 1,83\%$ a las 48 horas de exposición) estuvo muy por debajo de la obtenida por Gupta et al. (2011) quienes describieron un 100% de mortalidad a las 6 horas de exposición tomando en cuenta que sus concentraciones fueron incluso menores que las ensayadas en este trabajo. Esta diferencia se puede atribuir a factores como condiciones de extracción, exposición a la luz, almacenamiento del material vegetal, condiciones geobotánicas de crecimiento, fechas de recolección, alteraciones climáticas, que pueden provocar

variabilidad en cuanto a la composición química de plantas de la misma especie (Ruiz, Tunarosa, Martínez, & Stashenko, 2007).

En cuanto a la baja actividad obtenida con el AE de romero, cuyo mayor porcentaje de mortalidad fue de $45,39 \pm 1,97\%$ a las 24 horas, coincide con el trabajo de Cetintas & Yarba (2010) , quienes reportan que la efectividad del AE romero fue baja en comparación con el tomillo y ajo frente a *Meloidogyne incognita*, por tanto su baja actividad se puede relacionar a la baja concentración de compuestos con actividad nematocida como el limoneno (3,7%) y 1,8-cineol (21,5%). Según los rangos de actividad presentados por Silva et al. (2016) la actividad del AE de romero contra *Meloidogyne* se describiría como moderada, del AE de eucalipto como fuerte y tanto del tomillo como del orégano muy fuerte (Echeverrigaray et al., 2010; Romeu et al., 2007).

Tabla 5. Porcentajes de mortalidad obtenidos por exposición de *Meloidogyne* J2 a 4 aceites esenciales.

Aceite Esencial	Concentración (%v/v)	% de Mortalidad a tres tiempos de exposición					
		8 horas		24 horas		48 horas	
Orégano	0,25	36,96 ± 2,56	Aa	97,21 ± 1,61	Ba	100,00 ± 0,00	Ba
	0,50	61,21 ± 2,48	Ab	97,36 ± 1,53	Ba	100,00 ± 0,00	Ba
	0,75	100,00 ± 0,00	Ac	100,00 ± 0,00	Aa	100,00 ± 0,00	Aa
Tomillo	0,25	27,90 ± 1,70	Aa	82,03 ± 2,96	Ba	100,00 ± 0,00	Ca
	0,50	41,78 ± 3,12	Ab	92,30 ± 1,33	Bb	100,00 ± 0,00	Ba
	0,75	56,66 ± 1,83	Ac	100,00 ± 0,00	Bc	100,00 ± 0,00	Bb
Eucalipto	0,25	15,96 ± 2,05	Aa	22,41 ± 2,78	Aa	32,39 ± 1,72	Ba
	0,50	22,10 ± 1,59	Aab	24,08 ± 1,62	Aab	39,68 ± 3,20	Ba
	0,75	25,83 ± 1,99	Ab	31,10 ± 1,60	Bb	77,24 ± 1,83	Cb
Romero	0,25	6,97 ± 1,39	Aa	12,63 ± 1,10	Aa	21,08 ± 1,14	Ba
	0,50	8,98 ± 1,05	Aa	11,97 ± 1,07	Aa	26,43 ± 1,54	Bb
	0,75	16,20 ± 2,10	Ab	19,77 ± 1,40	Ab	45,39 ± 1,97	Bc
Control	-	2,86 ± 1,65		9,30 ± 1,27		18,56 ± 1,86	

Los valores corresponden a la media ± la desviación estándar.

Las letras mayúsculas indican para cada concentración, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos. Las letras minúsculas indican para cada tiempo, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las concentraciones evaluadas para cada AE.

4.1.3 Daños en los nematodos producidos por los aceites esenciales.

Microscopio óptico de contraste

El daño estructural interno ocasionado en *Meloidogyne* J2 expuestos al AE de orégano se ilustra en la Figura 6B en la misma es imposible diferenciar los órganos internos característicos como el estilete y la apariencia hialina de la cola, rasgos que son fácilmente observados en el nematodo expuesto al blanco (agua) (Figura 6A). El AE de orégano, cuyos componentes principales como el carvacrol y el timol, actúan sobre las células de intestino causando destrucción de las mismas (Abattouy et al., 2010). Con base en lo anterior, se podría concluir que los desórdenes en órganos internos y presencia de vacuolas oscuras en el cuerpo del nematodo describe alteraciones en la región esofágica y en la cutícula de larvas expuestas al AE (Figura 6B). El mecanismo de acción del AE en insectos, bacterias y hongos está relacionado con lesiones y porosidad en la membrana celular producto de la inserción del esqueleto carbonado de las moléculas que lo conforman haciendo más susceptible a otros compuestos de mayor toxicidad lo que provoca lisis celular (Pérez, 2012).

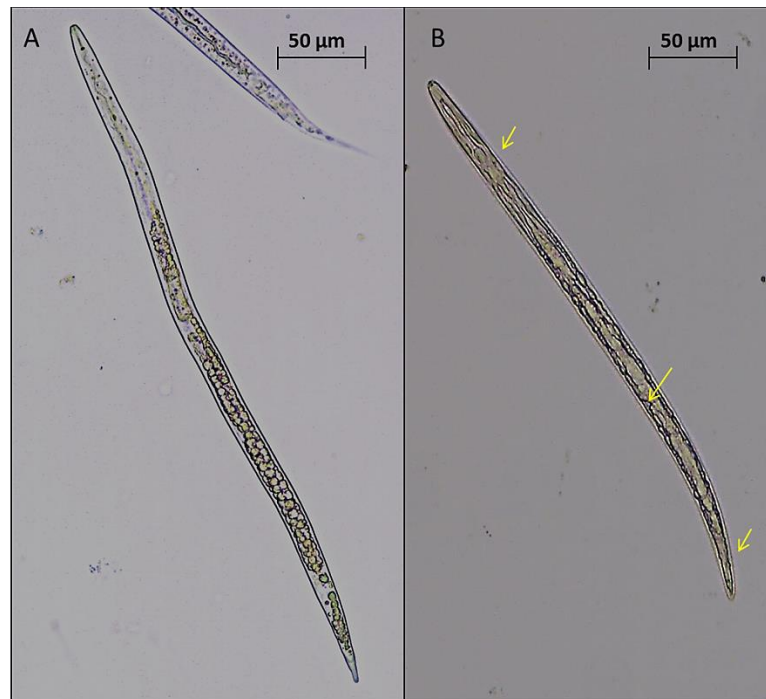


Figura 6. Estructura de nematodos *Meloidogyne* J2 observados en el Microscopio óptico de contraste de fases; A. expuesto al blanco y B. al AE de orégano. Las flechas indican la ubicación del daño ocasionado por AE.

Microscopio electrónico de barrido

Al evaluar los efectos producidos por el AE en el nematodo del género *Meloidogyne* mediante imágenes obtenidas por microscopia electrónica de barrido es visible la diferencia entre los nematodos expuestos al blanco (Figura 7 A, B) y los expuestos al AE de orégano (Figura 7 C, D), en éstas últimas se puede observar un considerable número de porosidades en su cutícula, tal como fue observado por Aissani (2014), mismo que además describe daños visibles en los pliegues de la cutícula y fracturas en el cuerpo de los nematodos juveniles de *Meloidogyne incognita* expuestos a compuestos orgánicos.

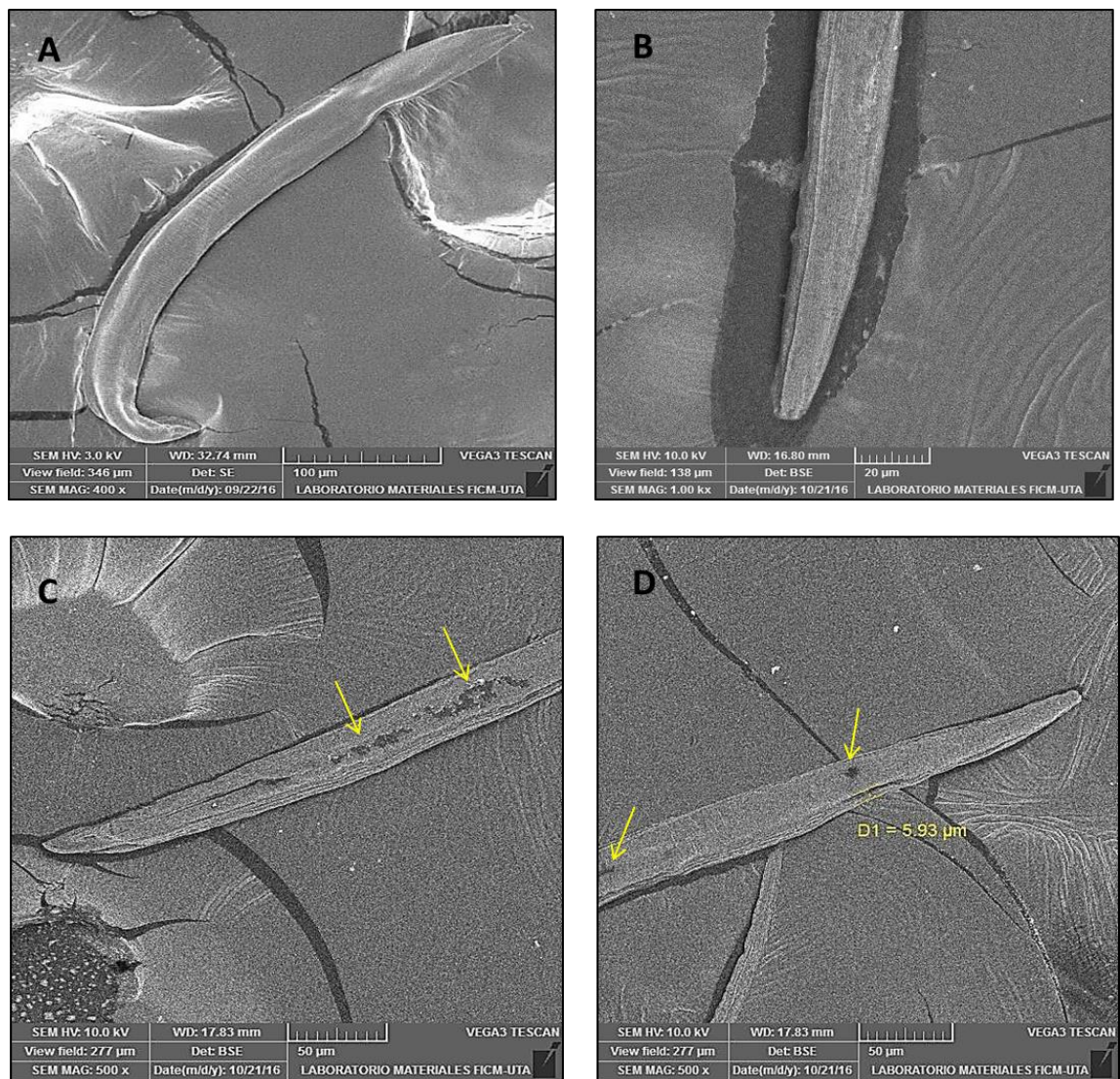


Figura 7. Nematodos *Meloidogyne* J2 observados en el Microscopio electrónico de barrido; A y B expuestos al blanco, C y D expuestos a AE de orégano. Las flechas indican la ubicación del daño por AE.

4.1.4 Cálculo de la concentración efectiva 50 (CE₅₀)

En la Tabla 6 se presenta los valores de CE₅₀ a 8 y 24 horas para los AE de orégano y tomillo. Para el caso del orégano la concentración más baja con la mayor actividad fue de 0,008% (v/v), mostrando con ello incluso mejor actividad que otros compuestos orgánicos ((E,E)-2,4-decadienal y (E)-2-decenal) evaluados por otros investigadores (Aissani, 2014), El valor de CE₅₀ de 0,008% abre la posibilidad a la aplicación de AE en la industria agrícola debido a que con esa mínima concentración se alcanzaría una actividad nematicida en el 50% de nematodos expuestos.

Tabla 6. Concentración efectiva de aceites esenciales frente a *Meloidogyne* a diferentes tiempos de exposición

Aceites esenciales	CE ₅₀ (%v/v)		
	8 horas	24 horas	48 horas
Orégano	0,35	0,008	N/A
Tomillo	0,66	0,123	N/A
Eucalipto	>0,75%	>0,75%	0,61
Romero	>0,75%	>0,75%	>0,75%

N/A valores no aplicables por tender a cero.

(>0,75%) Los superiores a la mayor concentración probada.

4.2 Verificación de hipótesis

De acuerdo a los resultados obtenidos se acepta la hipótesis alternativa indicando que los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* L (romero), *Thymus vulgaris* L (tomillo), *Eucaliptus globulus* L'Hér (eucalipto) y *Origanum vulgare* L (orégano) si poseen actividad nematicida frente a *Meloidogyne* spp.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

El uso de aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* L (romero), *Thymus vulgaris* L (tomillo), *Eucalyptus globulus* L'Hér (eucalipto) y *Origanum vulgare* L (orégano) mostraron diferente capacidad nematicida frente a *Meloidogyne*.

Al utilizar los aceites esenciales de orégano y tomillo frente a *Meloidogyne* se logró un porcentaje de mortalidad del 100% a la concentración 0,75% v/v, en tan solo 24 horas. Los aceites esenciales de eucalipto y romero presentaron bajo porcentaje de mortalidad. Tal es así que la CE₅₀ más significativa se obtuvo con el aceite esencial de orégano a las 24 horas de exposición.

La mortalidad de *Meloidogyne* frente a cada aceite esencial presentó una relación directa entre la actividad nematicida y el tiempo de exposición. Además, a mayor concentración de aceite esencial, mayor la actividad nematicida.

Los aceites esenciales provocaron daños estructurales en nematodos *Meloidogyne* J2, además los aceites esenciales mantuvieron su actividad a partir de las 8 horas de exposición, por tanto resultan una alternativa natural al uso de nematicidas sintéticos.

5.2 Recomendaciones

Ensayar los aceites esenciales con mayor actividad frente a otras especies de nematodos endoparásitos como *Globodera*, *Nacobbus* y *Heterodera* que también provocan pérdidas económicas en cultivos.

Evaluar los aceites esenciales de orégano y tomillo que presentaron mayor actividad nematicida en rangos de concentración de 0,25%-0,75% v/v en campo, ensayando métodos de aplicación que impidan su dispersión en el ambiente y que permitan cubrir una mayor superficie de raíces.

Realizar un estudio de factibilidad económica sobre el empleo de aceites esenciales como nematicidas a nivel comercial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abattouy, N., Valero, A., Romero, M., Martín-Sánchez, J., González-Tejero, M. R., Lozano, J., & Navarro, M. C. (2010). Actividad *in vivo* del aceite esencial de *Origanum elongatum* frente a larvas L3 de *Anisakis pegreffii*.
- Acosta, O., Castro, A., Roque, M., & Felix, L. (2000). Determinación de la composición química del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.*" Tomillo", determinada por cromatografía de fase gaseosa, espectrometría de masa GCIMS y análisis de su actividad antimicrobiana. *Ciencia e Investigación*, 3(2), 69-78.
- Aissani, N. (2014). *Nematicidal, antimicrobial and acaricidal activity of plant secondary metabolites*. Universita'degli Studi di Cagliari.
- Álvarez, D. E., Botina, J. A., Ortiz, C., Jarminton, A., & Botina, L. L. (2016). Nematicide evaluation of the essential oil from *Tagetes zypaquirensis* in the control of the nematode *Meloidogyne* spp. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 33(1), 22-33.
- Andrade, V. (2009). *Evaluación de las propiedades nematocidas de residuos foliares de ocho especies leñosas y semileñosas comunes del sur de Chile*. Universidad Austral de Chile, Valdivia-Chile.
- Andrés, M. F. (2002). Estrategias en el control y manejo de nematodos fitoparasitarios. *Ciencia y Medio Ambiente*.
- Andrés, M. F. (2003). Nematodos parásitos de plantas en suelos agrícolas. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (149), 33-42. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=631474>
- Andrés, M. F., González-Coloma, A., Muñoz, R., De la Peña, F., Julio, L. F., & Burillo, J. (2017). Nematicidal potential of hydrolates from the semi industrial vapor-pressure extraction of Spanish aromatic plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-7.

- Arcila-Lozano, C. C., Loarca-Piña, G., Lecona-Uribe, S., & González de Mejía, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1), 100-111.
- Armendáriz-González, I., Quiña-Cepeda, D. M., Ríos-Salgado, M. E., & Landázuri-Abarca, P. (2015). Nematodos fitopatógenos.
- Balarezo, D. L. (2015). *Evaluación de dos productos orgánicos para el control de nematodos en el cultivo establecido de tomate de árbol (Solanum betaceum L.)*.
- Baños, Y. S., del Busto Concepción, A., Torres, I. P., González, I. A., Sanchez, M. R., Izquierdo, E. M., . . . Guanche, L. H. (2017). Biostimulant and Nematicidal Effect of *Trichoderma harzianum* Rifai and Aqueous Extract of *Azadirachta indica* A. Juss. in *Solanum lycopersicum* L.
- Bello, A., López-Pérez, J., & Díaz-Viruliche, L. (2000). Biofumigación y solarización como alternativas al bromuro de metilo. *Memorias del Simposium Internacional de la Fresa Zamora, México*, 24-50.
- Caguana, M. (2003). El cultivo de tomate riñón en invernadero (*Lycopersicon esculentum*): Asociación de Agrónomos Indígenas de Cañar: Abya-Yala.
- Canchignia, H. F., Cruz, N., Barrera, A. E., Morante, J., Canchignia, G., & Peñafiel, M. (2015). Aplicación de rizobacterias que promueven el crecimiento en plantas (PGPR) del género *Pseudomonas* spp como controladores biológicos de insectos y nematodos-plagas. *Revista Ciencia y Tecnología*, 8(1), 25-30.
- Cañizares, C. (2003). Estudio sobre poblaciones de hongos endofíticos provenientes de suelos supresivos al nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorne en plantaciones comerciales de plátano en la zona de Talamanca, Costa Rica.
- Cárdenas, O., Silva, E., Morales, L., & Ortiz, J. (2005). Estudio epidemiológico de exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos en siete departamentos colombianos, 1998-2001. *Biomédica*, 25(2), 170-180.

- Cardona-Piedrahíta, L. F., Castaño-Zapata, J., & Aguirre, N. C. (2016). Respuesta de quince introducciones de tomate cherry (*Solanum lycopersicum* L.) al nematodo Nodulador (*Meloidogyne* spp. GOELDI) e identificación de las especies. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 40(156), 450-460.
- Castilo-Marroqui, J. H. (2014). *IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE Meloidogyne spp. PRESENTES EN EL MUNICIPIO DE PATZICÍA*. (Ingeniero Agrónomo), Universidad Rafael Landívar.
- Cavallini, L. F. (1998). *Fitopatología: un enfoque agroecológico*: Editorial Universidad de Costa Rica.
- Cetintas, R., & Yarba, M. M. (2010). Nematicidal effects of five plant essential oils on the southern root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* race 2. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(2), 222-225.
- Cuadra, R., Cruz, X., Ortega, J., Shagarodsky, T., & González, M. (2005). Respuesta de *Lycopersicon* spp. frente al ataque del nematodo de las agallas (*Meloidogyne incognita*).
- Chaves, C. G., Marcillo, E. M., González, C. S., & Garcia, C. B. (2011). Susceptibilidad de genotipos de *Solanum* spp. al nematodo causante del nudo radical *Meloidogyne* spp.(chitwood) *Acta agronómica* (Vol. 60, pp. 50-67).
- Echeverrigaray, S., Zacaria, J., & Beltrão, R. (2010). Nematicidal activity of monoterpenoids against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology*, 100(2), 199-203.
- Eisenback, J. (2002). *Identification guides for the most common genera of plant-parasitic nematodes*: Mactode Publications.
- Eisenback, J., & Hirsehmann. (1991). Root-Knot nematodes: *Meloidogyne* especies and races. In W. R. Nickle (Ed.), *Manual of Agricultural nematology* (pp. 191-274): MARCEL DEKKER, INC.
- Espitia, C. R. (2011). *Evaluación de la actividad repelente e insecticida de aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas utilizados contra Tribolium*

- castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). Universidad Nacional de Colombia.
- Flores, Y. F. (2017). Caracterización del nematodo del nódulo de la raíz (*Meloidogyne* spp.) en cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) de la región Puno.
- González, U. (2013). *Diversidad de nemátodos fitoparásitos asociados al cultivo de maíz en el municipio de Guasave, Sinaloa*. (Maestría en Recursos Naturales y Medioambiente), Instituto Politécnico Nacional.
- González-Guiñez, R., Silva-Aguayo, G., Urbina-Parra, A., & Gerding-González, M. (2016). ACEITE ESENCIAL DE *Eucalyptus globulus* Labill Y *Eucalyptus nitens* H. Deane & Maiden (MYRTACEAE) PARA EL CONTROL DE *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 32(3), 204-216.
- González, C., & Aristizábal, M. (2014). Evaluación de un producto nematicida sobre nematodos fitoparásitos del plátano Dominic Hartón (*Musa* AAB). *Acta agronómica*, 63(1), 71-79.
- Gortari, M. C., & Hours, R. A. (2015). *Producción del hongo nematofago Purpureocillium lilacinum LPSC# 876 en fermentación sobre sustrato sólido*. Paper presented at the V Congreso Latinoamericano de Agroecología-SOCLA (7 al 9 de octubre de 2015, La Plata).
- Grassmann, J., & Elstner, E. (2003). Essential oils, properties and uses *Encyclopedia of Food Science and Nutrition* (pp. 2177-2184): Elsevier.
- Green, C., Stone, A., Turner, R., & Clark, S. (1975). Preparation of nematodes for scanning electron microscopy. *Journal of microscopy*, 103(1), 89-99.
- Guevara, Y., Gómez, E., Pino, O., Rodríguez, Y., Miranda, I., Enrique, R., & Rodríguez, M. G. (2013). Efecto *in vitro* de concentraciones del NEMACID® sobre huevos y juveniles de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 74-76.

- Gupta, A., Sharma, S., & Naik, S. (2011). Biopesticidal value of selected essential oils against pathogenic fungus, termites, and nematodes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(5), 703-707.
- Hinojosa, W. P. (2011). *Eficiencia de cinco productos orgánicos para el control de nemátodos fitoparásitos en el cultivo de hypéricum (Hypericum inodorum)*. SANGOLQUÍ/ESPE-IASA I/2011.
- Hoyos Carvajal, L. M. (2012). Enfermedades de plantas: control biológico.
- Ibrahim, S. K., Traboulsi, A., & El-Haj, S. (2006). Effects of Essential Oils and Plant Extracts on Hatching, Migration and Mortality of *Meloidogyne incognita*. *Phytopathologia Mediterranea*, 45(3), 238-246.
- Lanchimba, M., & Augusto, K. (2016). *Evaluación de dos formulaciones de fertirriego a dos profundidades con fertilización foliar complementaria en la producción de tomate riñón (Lycopersicum esculentum Mill.), Var. Micaela bajo invernadero. Tumbaco-Pichincha*. Quito: UCE.
- López, L. (Sin fecha). EFICIENCIA DE PRODUCTOS ORGÁNICOS EN LA REDUCCIÓN DE LA POBLACIÓN DE *Meloidogyne* sp. EN ROSAS (*Rosae* sp). Retrieved 20 Febrero del 2017 [https://www.soiltechcorp.com/images/uploads/product_PDFs/Control_de_Nematodos\(Espanol\).pdf](https://www.soiltechcorp.com/images/uploads/product_PDFs/Control_de_Nematodos(Espanol).pdf)
- Llerena, B. S., & Llerena, S. P. (2010). *Control de nematodo meloidogyne sp. en tomate riñón (Lycopersicon Esculentum) híbrido nemoneta con tres dosis de intercept y nemasol en la parroquia Yaruquí, provincia Pichincha*. Universidad Estatal de Bolívar. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Facultad de Ingeniería Agronómica.
- MAGAP, M. d. A., Ganadería y Pesca. (2015). *Boletín situaciónl tomate riñón*. Ministerio de Agricultura , Ganadería y Pesca Retrieved from http://sinagap.agricultura.gob.ec/phocadownloadpap/cultivo/2016/boletin_situacional_tomate_rinon_2015.pdf.
- Martínez, A. (1996). Aceites esenciales. *J. Nat. Prod*, 59(1), 77-79.

- Oka, Y., Nacar, S., Putievsky, E., Ravid, U., Yaniv, Z., & Spiegel, Y. (2000). Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology*, *90*(7), 710-715.
- Pérez, E. (2012). Plaguicidas botánicos: Una alternativa a tener en cuenta. *Fitosanidad*, *16*(1), 51-59.
- Ramírez, F., Grijalva, R., Navarrete, X., & Guerrero, R. (2016). NEMATODOS FITOPARÁSITOS ASOCIADOS CON TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum* Cav.) EN LAS PROVINCIAS DE IMBABURA, PICHINCHA Y TUNGURAHUA, ECUADOR. *ECUADOR ES CALIDAD-Revista Científica Ecuatoriana*, *2*(1).
- Regnault-Roger, C. (2013). Essential oils in insect control *Natural Products* (pp. 4087-4107): Springer.
- Romeu, R., Botta, F., & Díaz, Y. (2007). Caracterización fitoquímica del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y evaluación *in vitro* de su actividad acaricida. *Fitosanidad*, *11*(2), 75-78.
- Rosado-Aguilar, J., Aguilar-Caballero, A., Rodríguez-Vivas, R., García-Vázquez, Z., Méndez-González, M., Cáceres-Farfán, M., & Dorantes-Euán, A. (2008). Actividad ixodicida de extractos crudos de *Diospyros anisandra* contra larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae) *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, *8*, 297-301.
- Ruiz, C., Tunarosa, F., Martínez, J., & Stashenko, E. (2007). Estudio comparativo por GC-MS de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *Lippia organoides* HBK, obtenidos por diferentes técnicas de extracción. *Scientia et Technica*, *13*(33).
- Silva, J. M., Sena, I., Ribeiro, B., Rodrigues, A. M., Nobre, C. M., Abrantes, I., . . . da Silva, A. C. (2016). First report on *Meloidogyne chitwoodi* hatching inhibition activity of essential oils and essential oils fractions. *Journal of pest science*, *89*(1), 207-217.
- Suárez-Díaz, J. A. (2015). *Evaluación de la eficiencia de productos orgánicos y biológicos en el control del nematodo agallador (meloidogyne sp) en tomate*

riñón (licopersicum sculentum) bajo invernadero en la zona de Natabuela provincia de Imbabura. Babahoyo: UTB, 2015.

Subercaseaux, M. P. (2011). *Efecto nematicida sobre Meloidogyne hapla Chitwood 1949, del tejido foliar de especies arbóreas.*

Trivino, C. (2004). Control biológico de *Meloidogyne* spp. con la bacteria *Pasteuria penetrans* en campos de producción. *Boletín Técnico.*

Verdejo-Lucas, S. (2009). Manejo integrado de nematodos. *HORTICULTURA*, 10, 213.

ANEXOS

ANEXO A. EVIDENCIA FOTOGRÁFICA

Parte experimental.



Figura 8. Tamizado de suspensión de raíces licuadas.



Figura 9. Montaje de materia vegetal tamizada en embudo Baermann

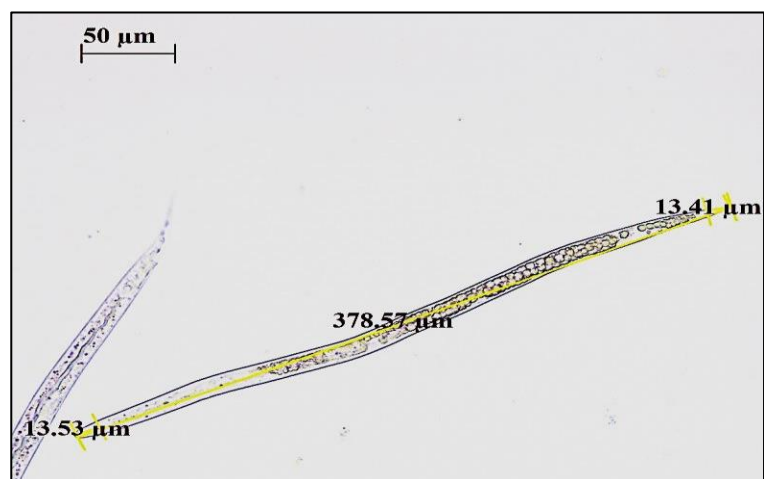


Figura 10. Medidas morfométricas de *Meloidogyne spp* en microscopio óptico de contraste.

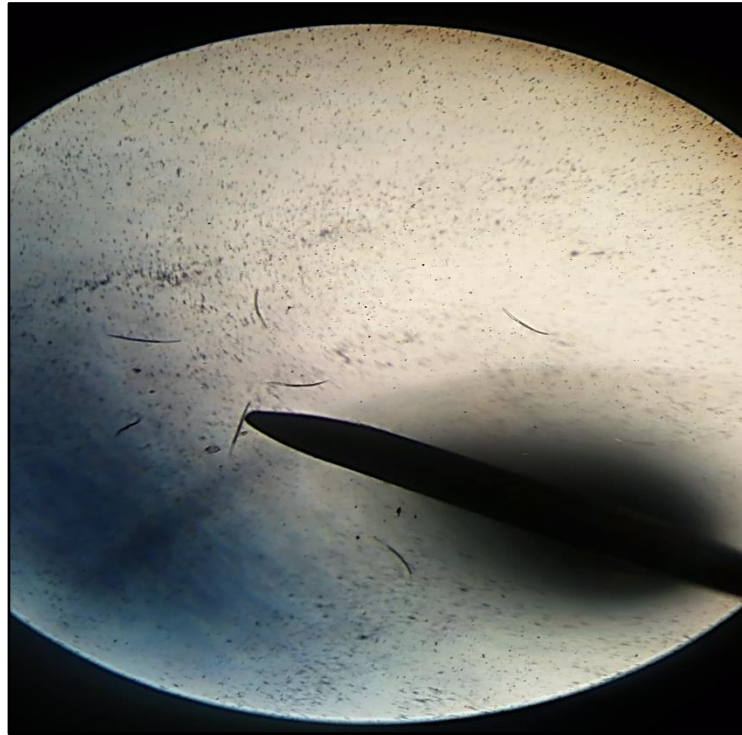


Figura 11. Conteo de nematodos vivos y muertos expuestos a los aceites esenciales, con la ayuda de una aguja de disección.

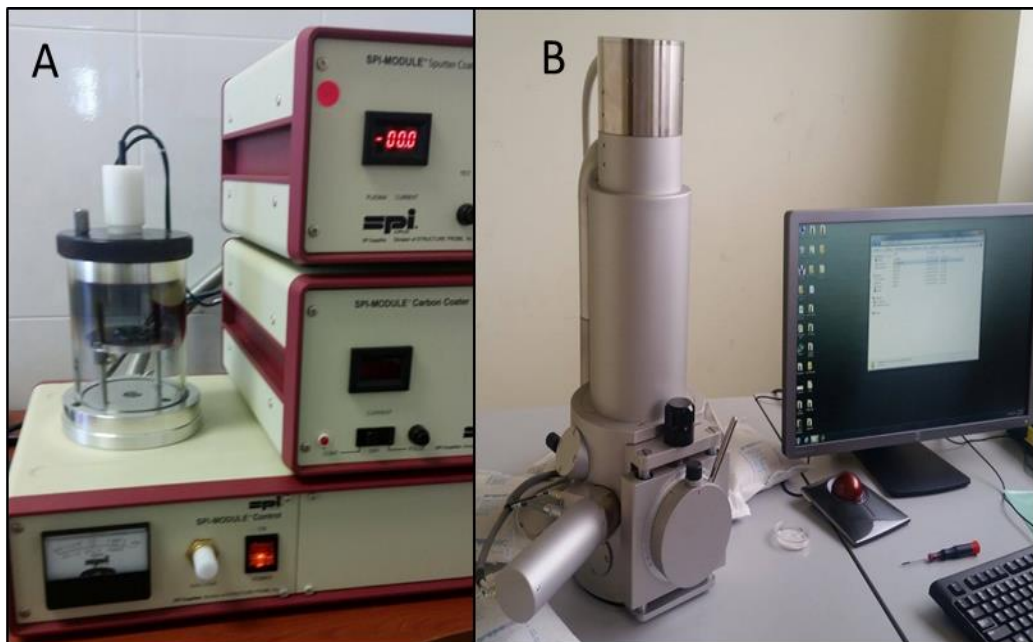


Figura 12. A Metalizador para recubrimiento de oro a las muestras de nematodos, B observación de nematodos en el microscopio electrónico de barrido.