

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



CARRERA INGENIERÍA AGRÓNOMICA

“EVALUACIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE *Brassica carinata* Braun, *Nicotiana glauca* Graham Y *Ricinus communis* L. EN NEMÁTODOS BAJO CONDICIONES CONTROLADAS”

DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE INGENIERO AGRÓNOMO.

AUTOR

JEREMY ALEXANDER JARAMILLO ORELLANA

TUTOR

Ing. Mg. SEGUNDO EUCLIDES CURAY QUISPE

CEVALLOS – 2018

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

El suscrito, JEREMY ALEXANDER JARAMILLO ORELLANA, portador de cédula de identidad número: 050240514-5, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de Investigación Titulado: “EVALUACIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE *Brassica carinata* Braun, *Nicotiana glauca* Graham Y *Ricinus communis* L. EN NEMÁTODOS BAJO CONDICIONES CONTROLADAS” es original, autentico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indica las fuentes de información consultadas.

JEREMY ALEXANDER JARAMILLO ORELLANA

DERECHO DEL AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación Titulado “EVALUACIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE *Brassica carinata* Braun, *Nicotiana glauca* Graham Y *Ricinus communis* L. EN NEMÁTODOS BAJO CONDICIONES CONTROLADAS” como uno de los requisitos previos para la obtención del Título de grado de Ingeniero Agrónomo en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.

JEREMY ALEXANDER JARAMILLO ORELLANA

“EVALUACIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE *Brassica carinata* Braun,
Nicotiana glauca Graham Y *Ricinus communis* L. EN NEMÁTODOS BAJO
CONDICIONES CONTROLADAS”

REVISADO POR:

Ing. Mg. Segundo Curay Quispe
TUTOR

Ing. Mg. Marco Pérez Salinas
ASESOR DE BIOMETRÍA

APROBADO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

FECHA

Ing. Mg. Hernán Zurita Vásquez
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

Ing. Mg. Marco Pérez Salinas
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

Ph.D. Carlos Vásquez Freytez
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

AGRADECIMIENTO

La vida es otorgada por gracia de Dios la cual está llena de pruebas que día a día debemos ir superando con el apoyo que nos brindan nuestros seres queridos guiándonos en el transcurso del camino de nuestras vida, mediante el agradecimiento de tesis quiero exaltar el esfuerzo de mis padres Iván y María del Carmen por darme la oportunidad de lograr esta meta, a mi sobrino por ser el motivo de superación diaria, a mi hermana por sus consejos en la realización de esta investigación y a Karla la persona incondicional que me dedicó todo su apoyo y paciencia a lo largo de este logro.

A la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias por darme la oportunidad de adquirir nuevos conocimientos y ser quien me formo como profesional.

De manera muy especial quiero resaltar a la persona que motivo la culminación de la carrera siendo parte fundamental en lo académico y personal, a través de sus consejos y enseñanzas diarias Ing. Segundo Curay y a mi tío Sidney por su constante motivación, paciencia y atención al desarrollo de este proyecto A todos aquellos que aportaron de una u otra forma en el desarrollo y finalización de este proyecto.

JERE.

INDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II	3
MARCO TEÓRICO	3
2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	3
2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES.....	6
2.2.1. Variable Independiente	6
Aceites esenciales de mostaza (<i>Brassica carinata</i> Braun.), palo bobo (<i>Nicotiana glauca</i> Graham) e higuierilla (<i>Ricinus communis</i> L.).....	6
2.2.2. Variable Dependiente	10
Porcentaje de mortalidad de nemátodos	10
2.2.3. Unidad de Análisis	14
Condiciones controladas para los nemátodos.	14
CÁPITULO III.....	15
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	15
3.1. HIPÓTESIS	15
3.2. OBJETIVOS.....	15
3.2.1. Objetivo General	15
3.2.2. Objetivos Específicos	15
CAPÍTULO IV	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO	16
4.2. CARÁCTERÍSTICAS DEL LUGAR.....	16
4.3. EQUIPOS Y MATERIALES	16
4.3.1. Equipos.....	16
4.3.2. Materiales.....	17
4.4. FACTORES DE ESTUDIO.....	17
4.5. TRATAMIENTOS	18
4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL	18
4.6.1. Esquema del ensayo	19
4.7. MANEJO DEL EXPERIMENTO	19
4.7.1. Recolección de semillas de Palo Bobo, Higuierilla y Mostaza.....	19
4.7.2. Extracción de aceites esenciales	20

4.7.3.	Preparación de la disolución de los aceites esenciales	21
4.7.4.	Recolección de muestras de raíz	21
4.7.5.	Extracción de nemátodos.....	21
4.7.6.	Aislamiento de los nemátodos y colocación de las dosis del aceite esencial	22
4.8.	VARIABLES RESPUESTA	23
4.8.1.	Identificación de los nemátodos	23
4.8.2.	Porcentaje de mortalidad de los nemátodos	24
4.9.	PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN	24
CAPÍTULO V	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
5.1.	IDENTIFICACIÓN DE LOS NEMÁTODOS.....	25
5.2.	PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE LOS NEMÁTODOS	27
5.3.	ACTIVIDAD NEMATICIDA DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	28
CAPÍTULO VI	32
CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS	32
6.1.	CONCLUSIONES	32
6.2.	BIBLIOGRAFÍA	33
6.3.	ANEXOS	37
CAPÍTULO VII	43
PROPUESTA	43
7.1.	DATOS INFORMATIVOS	43
7.2.	ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA	43
7.3.	JUSTIFICACIÓN	43
7.4.	OBJETIVOS	44
7.5.	ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD	44
7.6.	FUNDAMENTACIÓN.....	44
7.7.	METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO	44
7.7.1.	Recolección de semillas de Palo Bobo.....	44
7.7.2.	Extracción de aceites esenciales	45
7.7.3.	Preparación de la disolución del aceite esencial.....	45
7.7.4.	Aplicación del aceite esencial	45
7.8.	ADMINISTRACIÓN	45
7.9.	PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos.....	18
Tabla 2. Tratamientos investigados.....	19
Tabla 3. Comparación de raíces afectadas por agallas del nemátodo <i>Meloidogyne</i> .	26
Tabla 4. Comparación de morfología del nemátodo <i>Meloidogyne</i>	27
Tabla 5. Porcentajes de mortalidad de nemátodos <i>Meloidogyne</i> frente a 3 aceites esenciales.....	30

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Embudo de Baermann	22
Figura 2. Porcentajes de mortalidad observada y corregida	28
Figura 3. Correlación de las dosis con la mortalidad (Mostaza).....	30
Figura 4. Correlación de las dosis con la mortalidad (Palo bobo).	31
Figura 5. Correlación de las dosis con la mortalidad (Higuerilla).	31

RESUMEN

En el Ecuador los cultivos de solanáceas especialmente el tomate de riñón (*Lycopersicon esculentum* M.), se ve afectado por el ataque de nemátodos fitoparásitos provocando que los agricultores incrementen el uso de nematicidas en concentraciones altas lo cual ocasiona resistencia a esta plaga, ineficiencia de los productos químicos y afectación en la salud tanto del agricultor como del consumidor. Por esta razón en la actualidad se busca nuevos métodos de control ya sean mecánicos, químicos, biológicos o botánicos, originando la presente investigación que tiene como finalidad evaluar la actividad biocida in vitro de tres aceites esenciales al 1% de concentración (*Brassica carinata*, *Nicotiana glauca* y *Ricinus communis*.) con tres dosis (300, 400 y 500µl) frente a nemátodos *Meloidogyne*, durante 48 horas en diferentes periodos de tiempo. Obteniendo mejores resultados con la aplicación de la dosis de 500µl en los tres aceites esenciales, sin embargo tuvo mayor eficacia el aceite esencial de *Nicotiana glauca* el cual generó el 77,33% de mortalidad a las 48 horas de exposición. Debido a los resultados obtenidos la utilización del aceite esencial de *Nicotiana glauca* ofrece una posibilidad alentadora de ser una nueva herramienta de control para disminuir el uso indiscriminado de nematicidas químicos siendo un método de control agradable al medio ambiente y a la salud humana.

Palabras clave: Nemátodos Fito parásitos, aceites esenciales, actividad biocida, *Meloidogyne*.

SUMMARY

In Ecuador, solanaceous crops, especially tomato (*Lycopersicon esculentum* M.), is affected by the attack of phytoparasite nematodes, causing farmers to increase the use of nematicides in high concentrations, thus causing resistance to this pest, inefficiency of the chemical products and impact on the health of both the farmer and the consumer. For this reason, new methods of control are currently being sought whether mechanical, chemical, biological or botanical, originating the present research that aims to evaluate the in vitro biocidal activity of three essential oils at 1% concentration (*Brassica carinata*, *Nicotiana glauca* y *Ricinus communis*.) with three doses (300, 400 and 500µl) against *Meloidogyne* nematodes, for 48 hours in different periods of time. The best results were obtained by the application of the 500µl dose in three essential oils, however, the essential oil of *Nicotiana glauca* was the most effective by generating 77.33% mortality at 48 hours of exposure. Due to the results obtained, the use of the essential oil of *Nicotiana glauca* offers an encouraging possibility of being a new control tool to reduce the indiscriminate use of chemical nematicides, being a method of control that is pleasant to the environment and to human health.

KEY WORDS: Phytoparasitic nematodes, essential oils, biocidal activity, *Meloidogyne*.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador, la mayor producción de tomate riñón (*Lycopersium esculentum* Mill.) es conseguida a lo largo del callejón interandino donde la producción alcanza unas 53 518 TM al año en un área de alrededor de 2 837 ha, la cual ha tendido a incrementar debido a su valor nutricional al consumir en fresco y por sus propiedades preventivas anticancerígenas. A pesar del aumento en la superficie sembrada, los rendimientos han mostrado una tendencia a disminuir debido a diferentes factores tales como: variedades, prácticas de manejo inadecuadas y ataque de plagas y enfermedades, entre otros (INEC, 2010). Entre las principales plagas que afectan al cultivo se incluyen mosca blanca, minador de hoja y nematodos, que se caracterizan por ser vermiformes con tamaños microscópicos que oscilan entre 0,25 a >1 mm de longitud (Ruiz, Ruiz, Guzmán y Pérez, 2011).

Existe una gran variedad de estos, pero el principal que afecta la productividad del cultivo de tomate hortícola es *Meloidogyne* spp. Caracterizado por tener un hábito alimenticio polífago con un amplio rango de hospederos, esto ha hecho que sea considerado el fitoparásito de mayor importancia económica. Los síntomas característicos de este nemátodo provocan falta de vigor, deficiencias nutricionales y marchitamiento bajo condiciones de estrés (Salazar, 2013).

El género *Meloidogyne* está distribuido alrededor de todos los estratos geográficos del Ecuador, siendo *M. incognita* la especie más abundante con el 80 % de incidencia; las poblacionales más altas se encuentran en zonas de clima cálido incluyendo los Valles de la Sierra, atacando alrededor de 800 plantas hospedantes incluyendo malezas (Taípe, 2018).

En vista de la afectación que causan los nemátodos a los cultivos de solanáceas, especialmente *L. esculentum*, se aplican dosis altas de nematocidas como Benfuracarb, Fluopyram, Cadusafos, entre otros (Vademécum agrícola, 2017). Sin embargo, los niveles de control son bajos y los problemas de salud son altos, de acuerdo a esto se busca nuevos métodos de control sean estos mecánicos, biológicos o botánicos,

principalmente obtenidos por destilación en corriente de vapor de agua (Salazar y Alzate, 2011).

Los compuestos activos de los aceites esenciales tienen un efecto biopesticida, estos por ser de origen natural, las dosis no tienen restricciones en su uso y no poseen residualidad en los alimentos, por lo cual es una metodología afín con el medio ambiente, consumidor, agricultor y manejo de plagas y enfermedades (Chandler et al., 2011).

Las plantas de mostaza (*Brassica carinata*) contienen metabolitos secundarios llamados glucosinolatos, estos son inactivos contra microorganismos, ya que necesitan de la enzima mirosinasa para producir hidrólisis dando lugar a los isotiocianatos, los cuales son biocidas eficaces contra nemátodos, bacterias, hongos, insectos y germinación de semillas (Armendáris et al, 2015). Por otra parte, el palo bobo (*Nicotiana glauca*) contiene metabolitos secundarios alcaloides entre ellos la anabasina, anabaseina, anatabina, nicotina, entre otros, que son componentes bioinsecticidas y biofungicidas. Con relación a la higuera (*Ricinus communis*), se han conseguido compuestos tóxicos y dos lectinas, la ricina y la ricinusaglutinina, ambas con capacidad para adherirse fuertemente a los anfidios de los nemátodos fitoparásitos como los formadores de nudos o agallas en el sistema radical y modificar así su comportamiento quimiotáctico (Bruneton, 2001).

Dada la incidencia de especies de *Meloidogyne* en cultivos de tomate riñón en sistemas bajo cubierta, en la presente investigación está enfocada al control de nemátodos usando aceites esenciales de mostaza, higuera y palo bobo, como un método natural lo cual disminuye la toxicidad en los productos hortícolas de consumo humano, con el fin de ofrecer alternativas sustentables a los productores en la provincia de Tungurahua.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Chango (2015), en su trabajo de investigación titulado “Efecto de la mostaza caliente en suelo hortícola infestado por nemátodos”, obtuvieron como resultado que la incorporación de mostaza antes de la floración y sembrada al voleo, redujo la población de nemátodos eliminados en 68,69 %, a diferencia del tratamiento con mostaza incorporada durante la floración y sembrada a chorro continuo, se redujo la población de nemátodos eliminados 36,61 %. Los glucosinolatos contenidos en la mostaza son hidrolizados por acción de la enzima mirosinasa dando lugar a isotiocianatos que son capaces de controlar efectivamente la cantidad de nemátodos presentes en el suelo.

Martínez et al. (2010), en su investigación titulada “Uso de brassicas verdes y pellets de *Brassica carinata* para la desinfección de suelos de pimiento”, presentan los resultados de la evaluación de las brassicas en el momento del triturado y enterrado de las enmiendas verdes. En ensayos realizados en condiciones controladas, exponiendo las brassicas a las poblaciones de *Meloidogyne incognita* durante 4 meses a 25°C y fotoperiodo 14:10 luz: oscuridad, se encontraron índices de nodulación medios de 5,95 para *R. sativus* cv. *Eexta*, 7,0 para *B. juncea* cv. *Scala* y 0,75 para *S. alba* cv. *Ludique*, encontrando masa de huevos maduros en las dos primeras e inmaduros en *S. alba*.

Según Solano (2015), evaluó la acción nematóxica de extractos acuosos de albahaca, higuierilla, paico e hidroetanólicos de frutos de higuierilla en diferentes concentraciones sobre *M. incognita*. Los ensayos *in vitro* se realizaron bajo un diseño completamente aleatorizado con 20 tratamientos más un testigo y 4 réplicas (cajas con 50 larvas J2) utilizando concentraciones de 0,01; 0,03; 0,06; 0,08 y 0,10 g de extracto/100 ml de agua destilada estéril. La mortalidad a las 72 h demostró que los mejores extractos en condiciones *in vitro* fueron albahaca 0,10 g, hojas de higuierilla 0,10 g, frutos de higuierilla 0,10 g y paico 0,10 g de extracto/100 ml de agua, con mortalidades superiores al 50%.

Iler (2017), en la investigación titulada “Evaluación de la actividad nematicida *in vitro* de aceites esenciales frente a *Meloidogyne*” 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 las fases juveniles (J2) de *Meloidogyne*, 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.

Alvarez et al. (2015), estudiaron la actividad nematicida del aceite esencial de *Tagetes zypaquirensis* sobre *Meloidogyne* spp. bajo condiciones de invernadero se evaluaron cuatro concentraciones del aceite esencial (100, 200, 400, 800 mg/kg de suelo) las cuales fueron aplicadas a un suelo con juveniles de segundo estadio del nematodo (\pm 400 J2/100g). El uso de 800 mg/kg de aceite mostró resultados similares al tratamiento donde el suelo fue tratado con carbofuran.

Vinueza et al. (2006), en su trabajo nombrado “Evaluación *in vitro* de extractos acuosos de plantas para el control del nematodo agallador *Meloidogyne incognita*”, realizaron extractos en agua destilada por 24 horas de hojas, inflorescencias, espigas, bulbos, semillas y frutos de nueve especies, logrando una solución estándar al 100% para formar disoluciones de diferentes concentraciones. Teniendo como mejor resultado los extractos de fruto verde de *R. communis*, a concentraciones de 32, 64 y 100% lo que resultó en 98,9, 98,9 y 100% de mortalidad, respectivamente, después de 72 h.

Chango (2018), en su investigación titulada “Aplicación de extractos vegetales de palo bobo (*Nicotiana glauca*), clavel chino (*Tagetes patula*) y mostaza (*Sinapis alba*) para el control de nemátodos en el cultivo de tomate riñón (*Lycopersicum esculentum*)” observaron que los mejores resultados fueron obtenidos con la aplicación de mostaza y palo bobo con una frecuencia 20 días.

Salazar y Guzmán (2014), en el trabajo que realizaron “Efecto nematocida de extractos de *Quassia amara* y *Brugmansia suaveolens* sobre *Meloidogyne* sp. asociado al tomate en Nicaragua.”, realizaron la evaluación *in vitro* de la mortalidad de los juveniles J2 de *Meloidogyne* sp. después de 12, 24 y 48 horas de exposición a los extractos. Los más altos porcentajes de mortalidad fueron observados al aplicar extractos de *Q. amara* y *B. suaveolens* al 10% presentaron después de 48 horas, alcanzando 89 y 78% de juveniles muertos, respectivamente.

Cepeda et al. (2017), en la investigación titulada “Toxicidad de extractos de *Carya illinoensis* (Fagales: *Juglandaceae*) contra *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Heteroderidae) en tomate” evaluaron los extractos vegetales de ruezno y cáscara de nogal pecanero y encontraron que los extractos de ruezno acuoso a concentraciones 1:50 y 1:75 redujeron las poblaciones de *M. incognita* en 99 y 97%, respectivamente; seguido del extracto de ruezno etanólico con 87% en la concentración 1:50 y 71% en la concentración 1:75.

Arboleda et al. (2010), evaluaron el efecto de extractos acuosos de raíces, tallos, hojas y frutos de higuera (*Ricinus communis*) *in vitro* sobre *Radopholus similis* con concentraciones de 25, 50 y 100%, y los testigos agua y Carbofuran en dosis de 330 ppm. La mayor acción nematocida se encontró aplicando extractos acuosos de frutos, raíces y hojas en la concentración del 100%, los cuales produjeron tasas de mortalidad que oscilaron entre 67 y 73%. Estos valores fueron estadísticamente diferentes a los testigos agua y químico que presentaron una mortalidad de 3 y 98%. Se concluyó que, los extractos acuosos de los tejidos de higuera en las concentraciones evaluadas ejercieron efecto nematocida sobre *R. similis* en condiciones *in vitro* después de 48 h de aplicados.

Pérez et al. (2016), en la investigación titulada “Efectividad biológica *in vitro* de *Tagetes lucida* Cav, *Ricinus communis* L., *Nicotiana glauca* Graham, *Amphipterygium adstringens* Schltldl y el hongo *Ganoderma lucidum* Curtis en larvas de *Copaxa multifenestrata* Herrich-Schaffe en aguacate”, el cual consistió en la aplicación de cinco tratamientos, a dos concentraciones (7.5 y 12.5 %). Con evaluaciones (24 y 48 horas) después de la aplicación de los tratamientos. Realizaron con los datos obtenidos un análisis de varianza a la evaluación de mortalidad de larvas (ANOVA) y

comparación de medias con la prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. Los mejores tratamientos fueron *N. glauca* y *R. communis* con mortalidades de 91.25 y 87.50 %, respectivamente, con la aplicación de la dosis más baja.

2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES

2.2.1. Variable Independiente

Aceites esenciales de mostaza (*Brassica carinata* Braun.), palo bobo (*Nicotiana glauca* Graham) e higuera (*Ricinus communis* L.)

Definición de aceites esenciales

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes). Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser:

- Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos),
- Monoterpenos,
- Sesquiterpenos y
- Fenilpropanos.

En su gran mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los del ajo y la cebolla, los cuales contienen compuestos azufrados (Martinez, 2001).

Clasificación

Los aceites esenciales se clasifican con diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios. De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las

esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los bálsamos son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización. Las oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho, gutapercha, chicle, balata, oleorresina de paprika, de pimienta negra, de clavel, etc.) (Díaz y Martínez, 2013).

De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín enriquecidas con linalool, o la esencia de anís enriquecida con anetol. Los aceites esenciales sintéticos como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, etc.) (Van Ginkel, 2003).

Desde el punto de vista químico y a pesar de su composición compleja con diferentes tipos de sustancias, los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de sustancias de acuerdo a los componentes mayoritarios. Según esto los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales monoterpenoides (p.ej. hierbabuena, albahaca, salvia, etc.). Los ricos en sesquiterpenos son los aceites esenciales sesquiterpenoides (p.ej. copaiba, pino, junípero, etc.). Los ricos en fenilpropanos son los aceites esenciales fenilpropanoides (p.ej. clavo, canela, anís, etc.) (Salazar y Alzate, 2011).

Distribución y estado natural

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las Compuestas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas, etc. Se les puede encontrar en diferentes partes de la planta: en las hojas (ajenjo, albahaca, buchú, cidrón, eucalipto, hierbabuena,

limoncillo, mejorana, menta, pachulí, quenopodio, romero, salvia, toronjil, etc.), en las raíces (angélica, asaro, azafrán, cálamo, cúrcuma, galanga, jengibre, sándalo, sasafrás, valeriana, vetiver, etc.), en el pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.), en las semillas (anís, cardamomo, eneldo, hinojo, comino, etc.), en el tallo (canela, caparrapí, etc.), en las flores (arnica, lavanda, manzanilla, piretro, tomillo, clavo de olor, rosa, etc.) y en los frutos (alcaravea, cilantro, laurel, nuez moscada, perejil, pimienta, etc.). Los monoterpenoides se encuentran principalmente en plantas de los órdenes Ranunculales, Violales y Primulales, mientras que son escasos en Rutales, Cornales, Lamiales y Asterales. Por el contrario, los sesquiterpenoides abundan en Magnoliales, Rutales, Cornales y Asterales (Díaz y Martínez, 2013).

Extracción y aislamiento de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, enfleurage y con fluidos supercríticos. En la expresión el material vegetal es exprimido para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para el caso de las esencia de cítricos (Van Ginkel, 2003).

En la destilación por arrastre con vapor de agua, la muestra vegetal generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, es encerrada en una cámara inerte y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluidas, especialmente las utilizadas para perfumería. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada (Martinez, 2001).

Aceite de Mostaza (*Brassica carinata*)

Es una planta anual original de África del Norte (Etiopía) puede llegar a alcanzar un metro de altura. *B. carinata* se vale de antófilos para polinizar sus flores de color amarillo dotadas de unidades reproductivas hermafroditas (Mnzava y Schippers, 2007).

Es una hierba erecta, anual u ocasionalmente bienal o perenne hasta 150 cm de altura, normalmente ramificada. Hojas alternas, generalmente simples, inferiores a veces con 1 par de pequeños lóbulos laterales en la base; Estipulaciones ausentes; la inflorescencia es bastante parecida a un racimo de tipo umbela. Flores bisexuales, regulares, 4-merous; Pedicelo ascendente, 5-12 mm de largo; Sépalos oblongos, 4-6 mm de largo, verdes; Pétalos obovados, 6-10 mm de largo, agarrados, pálidos a amarillo brillante. Fruto un silique lineal 2.5-6 cm × 2-3.5 mm, a menudo un poco constreñido entre las semillas, con un pico cónico 2-6 mm de largo, dehiscente, hasta 20 semillas. Semillas globosas, de 1-1,5 mm de diámetro, finamente reticuladas, pálidas a marrón oscuro (Mnzava y Schippers, 2007).

Las brasicáceas contienen metabolitos secundarios llamados glucosinolatos, que son inactivos contra microorganismos, ya que cuando se hidrolizan por acción de la enzima mirosinasa dan lugar a los isotiocianatos. Estos productos de la hidrólisis son biosidas muy eficaces contra nemátodos, bacterias, hongos, insectos y germinación de semillas. Los isotiocianatos son compuestos muy similares a ciertos fumigantes, como el metil isotiocianato que es el compuesto activo del Metam Sodio. Este último producto empleado como nematocida tiene un amplio espectro de actividad, no sólo sobre los organismos causantes de plagas y enfermedades, sino también sobre muchos organismos beneficiosos (López et al, 2003).

Aceite de Palo bobo (*Nicotiana glauca*)

Es una planta arbustiva o árbol pequeño de hasta 4 m de altura con hojas ovaladas o lanceolado-oblongas de 4 a 18 cm de largo y 2 a 8 cm de ancho, de color verde azulado; flores tubulares de unos 4 cm, con coloración amarillenta con 5 dientes; fruto una capsula de 1-1.5 cm. Los metabolitos secundarios que presenta esta planta son alcaloides como: anabasina, anabaseina, anatabina, anatabina n-methyl-, anatallina, myosmina, nicotinea, nicotinea iso-, nicotellina, nicotina, nicotina nor-, nicotyrina, pyrrolodina, pyrrolidina n-methyl (Llerena y Llerena, 2010).

Aceite de Higuera (*Ricinus communis*)

Es conocida desde la antigüedad, no sólo por la alta toxicidad de sus semillas sino, además, porque su aceite ha sido siempre muy valorado para distintas funciones. El ricino es una planta herbácea en los países de clima templado, arborescente, y hasta de 8-10 m de altura en los intertropicales y subtropicales. En condiciones climáticas favorables, con un alto grado de humedad ambiental y calor adecuado (en el trópico), puede alcanzar varios metros de altura, así en estado silvestre es un árbol que alcanza los 10 metros de altura (Curimilma, 2015).

La higuera o castor (*R. communis*) produce metabolitos secundarios como albúminas (ricina) y alcaloides (ricinina). Los tejidos de higuera liberan compuestos tóxicos y dos lectinas, la ricina y la ricinusaglutinina, ambas con capacidad para adherirse fuertemente a los anfidios de los nemátodos fitoparásitos como los formadores de nudos o agallas en el sistema radical y modificar así su comportamiento quimiotáctico. Las semillas y cáscaras de higuera contienen elementos tóxicos. El principal elemento tóxico es la ricina en el cual se encuentra un triglicérido timirstina, que es una proteína, pero también está presente un potente alérgeno, que es más difícil de inactivar que la ricina (Curimilma, 2015).

2.2.2. Variable Dependiente

Porcentaje de mortalidad de nemátodos

Cualquier estrategia de control para nemátodos fitoparásitos debe tener en cuenta sus características biológicas. Hay muchos aspectos importantes en la biología de los nemátodos en cuanto a su manejo pero algunos son especialmente importantes, y estos incluyen la precisa identificación y caracterización taxonómica de la especie, la duración de su ciclo, número de generaciones por año, respuesta a factores de temperatura y humedad, rango de hospedadores y mecanismos de supervivencia (Andrés, 2002)

Apariencia

Los nemátodos fitoparásitos son vermiformes (forma de gusano) semejantes a hilos con un tamaño que oscila entre 0.25 mm a >1 mm de longitud, si bien algunos alcanzan hasta 4 mm. Aunque el cuerpo de los nemátodos suele estrecharse hacia la cabeza y cola. Las hembras de algunas especies pierden su forma de verse conforme maduran, se ensanchan y adoptan forma de pera, limón, riñón o esférica cuando alcanzan el estadio adulto. Los nemátodos fitoparásitos se diferencian de otros nemátodos que se alimentan de bacterias y hongos en que tienen una estructura especializada para su alimentación llamada estilete con forma de lanza (Coyne, 2007).

Morfología general

Cuerpo

El cuerpo de los nemátodos está formado por 2 tubos, el tubo externo o pared del cuerpo está formado por la cutícula, hipodermis, músculos y nervios, mientras que el tubo interno está formado por el tracto digestivo (el canal alimenticio se extiende desde la boca en el extremo anterior, hasta el ano localizado cerca de la cola. Entre ambos tubos se encuentra la cavidad del cuerpo o pseudoceloma (Bongers, 2011).

Pared del cuerpo

Está conformada por dos capas: la cutícula cuyo componente principal es el colágeno, y es secretada por la hipodermis, siendo la más externa reemplazada durante el proceso de muda. Puede ser lisa o anillada superficialmente. Debajo está la hipodermis con cuatro cordones hipodermiales donde se localizan los cordones nerviosos. La última capa es muscular y los músculos se unen longitudinalmente a la hipodermis, permitiéndole moverse en dirección dorso ventral (Bongers, 2011).

Cavidad del cuerpo o pseudoceloma

Es el espacio que se encuentra entre la pared del cuerpo y el tubo digestivo, que se encuentra lleno de un líquido que contiene: agua, sales minerales, monosacáridos, aminoácidos y gases disueltos, y la función principal es actuar como esqueleto hidrostático y servir como medio de transporte de nutrientes y gases (Nahabedian, 2016).

Estilete

Es una estructura hueca y dura, que es accionado hacia afuera del cuerpo mediante músculos y con el que perforan las células de las plantas e inyectan enzimas digestivas que provienen de las glándulas del bulbo basal del esófago, luego succionan los nutrientes de las células dañadas (Talavera, 2003).

Sistema digestivo

Formado por:

- Boca
- Esófago (Faringe)
- Intestino
- Recto
- Ano (Nahabedian, 2016).

Esófago

También denominado faringe, es de naturaleza muscular y tiene tres glándulas. Está dividido en: parte anterior se denomina procorpus y el bulbo medio o metacorpus se localiza a la mitad del esófago y tiene un aparato valvular que funciona como una bomba, impulsando los alimentos hacia el intestino (Crozzoli, 2014).

El istmus es la parte delgada entre metacarpus y el bulbo basal. La parte final del esófago se llama bulbo basal y es donde se ubican tres glándulas salivales (Talavera, 2003).

Intestino

El intestino es tubular, grueso y sirve para el almacenamiento de alimento. Durante el trayecto por el intestino el alimento es digerido y finalmente excretado vía recto y abertura anal (Crozzoli, 2014).

El alimento pasa a través del esófago y entra al intestino. Para evitar que el contenido del intestino se devuelva al esófago, se desarrolló una estructura entre el esófago y el intestino denominada cardias (Talavera, 2003).

Sistema reproductor

Casi todas las especies poseen sexos separados. El sistema reproductor de la hembra está formado por:

- Uno o dos ovarios
- Oviducto que emerge de los ovarios y paulatinamente se va transformando en útero
- Puede haber un receptáculo seminal
- Después del útero se encuentra la vagina, que desemboca al exterior a través de la vulva
- El sistema reproductor de un nematodo macho está formado por:
- Uno o dos testículos de los cuales sale un espermiducto, que en su parte distal forma una vesícula seminal con glándula eyaculadora
- La glándula eyaculadora se une a la parte terminal del recto y forma la cloaca, en la que hay espículas
- Pueden presentar bursa (aleta caudal) que son extensiones de la cutícula alrededor del poro cloacal. Los machos se distinguen por la presencia de un aparato copulador en la cola, compuesto por espículas y aletas caudales (Bongers, 2011).

Sistema nervioso

Tienen un sistema nervioso sofisticado y órganos sensoriales que les permiten encontrar a la planta hospedadora y aparearse y reproducirse. Está constituido generalmente por un anillo nervioso alrededor del esófago, a nivel del istmus, cuatro cordones nerviosos longitudinales que recorren todo el cuerpo del nematodo, 16 papilas (seis papilas labiales internas, seis papilas labiales externas y cuatro papilas cefálicas) y los anfidios (Bongers, 2011).

Sistema excretor

Es tubular y/o glandular y su función es primordialmente osmorreguladora (Frápolti, 2013).

Taxonomía

Reino: Animalia

Phylum: Nematoda

Orden: Tylenchida

Familia: Heteroderidae

Género: *Meloidogyne* (Frápolti, 2013).

2.2.3. Unidad de Análisis

Condiciones controladas para los nemátodos.

Los niveles poblacionales y duración del ciclo de vida de los nemátodos dependen de su adaptación al ambiente físico, químico y biológico del suelo, su compatibilidad con la planta hospedante y el acceso a fuentes de nutrientes. Las condiciones favorables deben ser: suelos ligeros (arenosos) con niveles de humedad del 40-60% y temperatura óptima de 25 a 30°C son ideales para el crecimiento y desarrollo de los nemátodos de igual manera se manejan los parámetros en condiciones bajo laboratorio. (Nicol, 2007)

CÁPITULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

La aplicación de aceites esenciales de mostaza (*Brassica carinata* Braun.), palo bobo (*Nicotiana glauca* Graham) e higuera (*Ricinus communis* L.) actuarán sobre la población de nemátodos fitoparásitos en condiciones controladas.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Objetivo General

Evaluar el comportamiento de nemátodos fitoparásitos bajo la aplicación de aceites esenciales de mostaza (*Brassica carinata* Braun.), palo bobo (*Nicotiana glauca* Graham.) e higuera (*Ricinus communis* L.).

3.2.2. Objetivos Específicos

- Identificar el nemátodo fitoparásito predominante en las raíces de tomate de riñón (*Lycopersicon esculentum* Mill.).
- Determinar el aceite esencial más eficiente para reducir la población de nemátodos bajo condiciones controladas de laboratorio.
- Determinar la dosis más eficiente del aceite esencial con mayor efecto en la mortalidad de nemátodos en condiciones controladas de laboratorio.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

El trabajo de investigación se realizó en la Granja Experimental Docente “Querochaca”, Facultad de Ciencias Agropecuarias (Universidad Técnica de Ambato), ubicada en el cantón Cevallos, provincia de Tungurahua (01° 21’S; 78° 36’O), con una altitud de 2865 m.s.n.m.; datos tomados con GPS.

4.2. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR

Según los datos registrados en la estación meteorológica de primer orden de la Granja Experimental Docente Querochaca, el clima está clasificado como templado frío semiseco, con una temperatura media de 14,5°C y la humedad relativa media de 77,25%.

4.3. EQUIPOS Y MATERIALES

4.3.1. Equipos

- Equipo de Soxhlet
- Estereoscopio
- Microscopio
- Equipo de Baermann
- Balanza analítica
- Licuadora
- Cámara de germinación
- Estufa

4.3.2. Materiales

- Raíces parasitadas de nemátodos en tomate de riñón.
- Semillas de Mostaza (*B. carinata*), Palo bobo (*N. glauca*) e Higuierilla (*R. communis*)
- Cajas Petri de 55 mm ø
- Tamices de 0,149 y 0,037mm
- Cloro al 5%

4.4. FACTORES DE ESTUDIO

Aceites esenciales

- A1: Aceite de Mostaza (*B. carinata*)
- A2: Aceite de Palo bobo (*N. glauca*)
- A3: Aceite de Higuierilla (*R. communis*)

Dosis de aceites esenciales

- D1: 300 µl.
- D2: 400 µl.
- D3: 500 µl.

4.5. TRATAMIENTOS

Los tratamientos son la combinación de los factores de estudio los que se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1. Tratamientos.

N°	Tratamientos	Descripción
1	A1D1	300 μ l. de aceite de mostaza
2	A1D2	400 μ l. de aceite de mostaza
3	A1D3	500 μ l. de aceite de mostaza
4	A2D1	300 μ l. de aceite de palo bobo
5	A2D2	400 μ l. de aceite de palo bobo
6	A2D3	500 μ l. de aceite de palo bobo
7	A3D1	300 μ l. de aceite de higuera
8	A3D2	400 μ l. de aceite de higuera
9	A3D3	500 μ l. de aceite de higuera
10	Testigo	Sin aplicación de aceite esencial

4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

El ensayo fue conducido en un Diseño Completamente al Azar (DCA) con un arreglo de tratamientos dispuestos en Parcelas sub divididas dispuesto con cinco repeticiones, siendo la parcela principal el tipo de aceite y las subparcelas conformadas por las tres dosis. Las variables que mostraron diferencias significativas fueron sometidas a la prueba de Tukey al 5%.

4.6.1. Esquema del ensayo

Tabla 2. Tratamientos investigados.

TRATAMIENTO	REPETICIÓN				
	I	II	III	IV	V
1	T	A2D1	A3D1	A2D2	A3D3
2	A1D1	A2D2	A1D1	A1D1	A2D2
3	A1D2	T	A2D1	A3D3	A1D3
4	A1D3	A2D3	A1D2	A1D2	A3D2
5	A2D1	A1D1	A3D2	A2D1	A2D1
6	A2D2	A1D2	T	A3D2	A3D1
7	A2D3	A1D3	A2D2	A3D1	A1D1
8	A3D1	A3D1	A3D3	T	A2D3
9	A3D2	A3D2	A2D3	A2D3	A1D2
10	A3D3	A3D3	A1D3	A1D3	T

4.7. MANEJO DEL EXPERIMENTO

4.7.1. Recolección de semillas de Palo Bobo, Higuierilla y Mostaza

Palo bobo

Las semillas se obtuvieron en el Cantón Patate de la provincia de Tungurahua. Recogiendo flores maduras en bolsas plásticas, las cuales fueron transportadas al Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato las mismas que fueron sometidas a secado en estufa a 40°C durante 48 horas como preparación antes de pasar al proceso de extracción del aceite.

Higuerilla

Las semillas se obtuvieron en el cantón Cevallos de la provincia de Tungurahua. Para esto se recolectaron bayas maduras, consecutivamente se realizó un proceso de secado dentro de la estufa a 40°C durante 48 horas. Posterior a esto con la ayuda de un mortero se extrajo la semilla del fruto, logrando la ruptura de la cápsula donde se encontró la semilla de color negra jaspeado. Luego de este procedimiento se realizó la extracción del aceite esencial

Mostaza

Se obtuvo un kilogramo de semillas de la empresa AGRIPAC S.A. En este caso las semillas no fueron sometidas al proceso de secado previo a la extracción del aceite esencial debido a que estas se encontraban sin ninguna forma recubrimiento.

4.7.2. Extracción de aceites esenciales

Los extractos fueron obtenidos en el laboratorio de Suelos y Termoquímica de la Facultad de Ciencias Agropecuarias que está bajo el cargo de la Doctora Marcia Buenaño. El proceso utilizado para la extracción fue con el equipo de Soxhlet mencionado por Núñez (2008) el cual consiste en cinco etapas:

- 1) Preparación de la muestra: en este paso se utilizó un molino Fristch con una malla de 0,5 mm hasta que el 90% de la muestra aproximadamente quede molida, este procedimiento se repitió para la semilla de higuerilla y mostaza.
- 2) Se elaboraron cartuchos de papel filtro con 250 g. de muestra (semilla molida) para ser colocados en el extractor. El solvente que se utilizó fue hexano, colocándolo en un balón de 500 ml. la cantidad necesaria para que el cartucho sea cubierto durante toda la extracción.
- 3) La ebullición del solvente se logró con la utilización de una plancha caliente a 72 ± 2 °C para que se evapore y llegue al condensador. El condensado cae sobre un recipiente que contiene un cartucho poroso con la muestra de semilla en su interior.

- 4) A continuación se revisó que el método de refrigeración del equipo esté funcionando en perfectas condiciones para continuar con la extracción.
- 5) Ascenso del nivel del solvente cubriendo el cartucho hasta un punto en que se produce el reflujo que vuelve el solvente con el material extraído al balón
- 6) Se vuelve a producir este proceso las veces que sean necesarias hasta agotar la muestra.
- 7) Del cartucho de 250 g. de semilla luego de la extracción se logró 50 ml. de aceite
- 8) Se purifico el aceite obtenido mediante un rotavapor recuperándose el solvente.

4.7.3. Preparación de la disolución de los aceites esenciales

Se prepararon los tres aceites a una concentración del 1%. Para facilitar la homogenización de la disolución se utilizó Tween-20 al 0,5% (v/v) (Iler, 2017). El testigo se preparó con agua y Tween-20.

4.7.4. Recolección de muestras de raíz

Se recolectaron muestras de raíces de cultivares bajo cubierta de tomate de riñón de la provincia de Cotopaxi, Cantón Salcedo, Parroquia San Miguel sector Rumipamba de Navas. De cada mil metros de invernadero se tomaron al azar 10 plantas afectadas, a continuación se empacaron las raíces con mayor presencia de agallas en fundas plásticas de color negras para el traslado de las mismas al Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

4.7.5. Extracción de nemátodos

Para la extracción de nemátodos se utilizó el método mencionado por Esquivel (2013), el cual consiste en la maceración de tejidos con ayuda de una licuadora para obtener nemátodos endoparásitos. Se tomaron aproximadamente 10 gr. de raíces, se cortaron en trozos de 2 a 3 cm de longitud y se colocaron dentro de una licuadora. Se incorporó agua necesaria para cubrir el material y dependiendo de la dureza del material, se licua a máxima velocidad de 20 a 60s la solución resultante se vierte sobre un juego de tamices de 0,149 y 0,037mm. Los nemátodos junto con los desechos vegetales

retenidos en el tamice más fina, se trasladó al embudo de Baermann así como se muestra en la figura 1 en donde se logró la separación final luego de 48 horas del proceso.



Figura 1. Embudo de Baermann

4.7.6. Aislamiento de los nemátodos y colocación de las dosis del aceite esencial

1. Se preparó una caja Petri con cinco ml de agua destilada por cada tratamiento, siendo 50 cajas Petri en todo el ensayo.
2. Visualizando en un estereoscopio se tomaron 10 nemátodos *Meloidogyne sp.* basándose en la morfología, con una micropipeta de la solución extraída, para colocarlos en las cajas Petri.
3. De la disolución realizada de los aceites esenciales se colocó las dosis 300, 400 y 500 μl en las cajas Petri según corresponda.

4. Se observó y tomo datos de la mortalidad de los nemátodos con la ayuda de un estereoscopio óptico a las 8-24-48 horas.

4.8. VARIABLES RESPUESTA

4.8.1. Identificación de los nemátodos

Para la identificación de los nemátodos se utilizó un microscopio óptico (Leica DM1000 LED, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), para esto se tomó en cuenta las características morfológicas y se realizaron fotografías de los nemátodos extraídos. Los parámetros por los cuales se identificó *Meloidogyne* fueron los siguientes:

- **Forma de agallas en las raíces**

Según Coyne, et al. (2010) las agallas pueden variar considerablemente dependiendo de las especies de *Meloidogyne*, el cultivo y cultivar, y si estas tienen lugar en las raíces o en los tubérculos. La apariencia típica de las agallas es la siguiente:

- Hinchamientos pequeños de forma redondeada
- Abultamientos masivos de tejido indiferenciado que confluyen entre sí.
- Puntas de la raíz hinchadas
- Abultamientos irregulares a lo largo de la raíz
- Puntas de raíz curvadas en forma de gancho
- No se aprecia ningún hinchamiento de forma definida, solamente la superficie levantada en donde se encuentra el nematodo embebido.

- **Morfología**

La morfología del segundo estadio larval (J2) son cilíndricos y vermiformes, la región cefálica sin anillos. El estilete tiene forma de cono y la columna del estilete es delgado y de tamaño similar; los nódulos son anchos y posteriormente redondeados. La cola es cónica con segmentos normales o irregulares en la parte terminal (Jaraba, et al. 2003).

4.8.2. Porcentaje de mortalidad de los nemátodos

Posterior a la aplicación de las dosis de los aceites esenciales, se contabilizó el número de nemátodos muertos a las 8-24-48 horas para establecer el porcentaje de mortalidad aplicando la fórmula de Abbott (Iler, 2017):

$$\% \text{ corregido} = \left(1 - \frac{\text{n en T después del tratamiento}}{\text{n en Co después del tratamineto}} \right) * 100$$

Dónde: n= Población, T= Tratado, Co= Control

4.9. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

Para la interpretación de los resultados se utilizó el ANÁLISIS DE VARIANZA (ADEVA) y la prueba de comparación de medias de Tukey al 5%, aplicando el Software Estadístico **STATISTICS versión 10.0**. Para el análisis comparativo del tipo de aceite, dosis y tiempo se transformaron los datos porcentuales de la mortalidad de nemátodos para obtener homogeneidad, aditividad y normalidad aplicando la fórmula:

$$Y = \text{arcoseno} \sqrt{\%mortalidad/100}.$$

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS NEMATODOS.

• Forma de agallas en las raíces

En la Tabla 3 se pueden observar los resultados de las características de las agallas de las raíces por su morfología coincidiendo con lo mencionado por Coyne, et al. (2010) las cuales son:

- Hinchamientos pequeños de forma redondeada
- Abultamientos masivos de tejido indiferenciado que confluyen entre sí.
- Puntas de la raíz hinchadas
- Abultamientos irregulares a lo largo de la raíz
- Puntas de raíz curvadas en forma de gancho
- No se aprecia ningún hinchamiento de forma definida, solamente la superficie levantada en donde se encuentra el nematodo embebido.

Por lo mencionado se pudo deducir que las raíces recolectadas poseen agallas de características similares a las agallas provocadas por el nemátodo fitoparásito *Meloidogyne* como se indica en las fotografías.

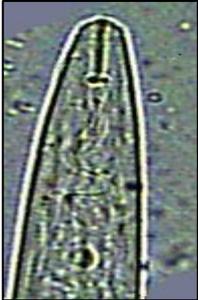
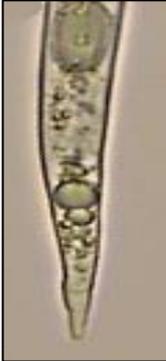
Tabla 3. Comparación de raíces afectadas por agallas del nemátodo *Meloidogyne*

BIBLIOGRÁFICA	EXPERIMENTAL
	
<p>Raíces afectadas por agallas del nemátodo <i>Meloidogyne</i> en hortalizas. (Coyne, et al. 2010)</p>	<p>Raíces de tomate de riñón en el Cantón Salcedo, Sector Rumipamba con presencia de agallas causada por <i>Meloidogyne</i>.</p>

- **Morfología**

Para la identificación de los nemátodos se utilizó un microscopio óptico, para esto se tomó en cuenta las características morfológicas del cuerpo, estilete y cola realizando fotografías de los nemátodos extraídos. Como se muestra en la tabla 2.

Tabla 4. Comparación de morfología del nemátodo *Meloidogyne*.

BIBLIOGRÁFICOS	EXPERIMENTALES
El cuerpo es cilíndricos y vermiforme, la región cefálica no posee anillos	
	
El estilete tiene forma de cono y la columna del estile es delgada con tamaño similar; los nódulos son anchos y posteriormente redondeados	
	
La cola es cónica con segmentos normales o irregulares en la parte terminal.	
	

Las características analizadas en la tabla 2 fueron detalladas por Jaraba, et al. (2003) por lo cual se identificó que los nemátodos extraídos fueron *Meloidogyne* cumpliendo con exactitud los parámetros mencionados por el mismo.

5.2. PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE LOS NEMÁTODOS

Se contabilizó el número de nemátodos muertos a las 8-24-48 horas para establecer el porcentaje de mortalidad final por cada tratamiento aplicando la fórmula de Abbott.

La cual menciona que si el control es igual al 100% la formula arrojará los mismos resultados observados (Iler, 2017):

$$\% \text{ corregido} = \left(1 - \frac{n \text{ en T después del tratamiento}}{n \text{ en Co después del tratamiento}} \right) * 100$$

Dónde: n= Población, T= Tratado, Co= Control

Se estableció la relación de la mortalidad observada a las 48 horas por cada tratamiento y la mortalidad corregida por la fórmula de Abbott comprobando que los datos son iguales debido a que el control o testigo tuvo 0% de mortalidad.

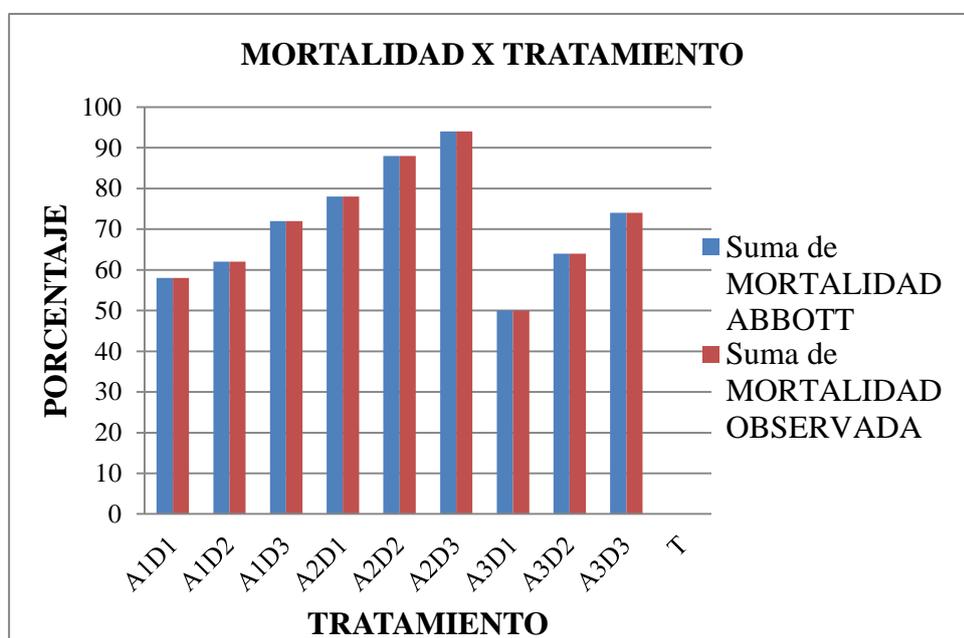


Figura 2. Porcentajes de mortalidad observada y corregida

5.3. ACTIVIDAD NEMATICIDA DE LOS ACEITES ESENCIALES

Se observó efecto del tipo de aceite, dosis y tiempo, así como se detectó efecto combinado de tipos de aceite x tiempo y aceite x dosis (Tabla 5).

Con relación al tipo de aceite, la utilización de aceite de palo bobo dio una mayor tasa de mortalidad (66,9%), lo cual fue 66,8 y 60,1 % mayor cuando se comparó con el aceite de mostaza e higuera, respectivamente.

Según el efecto combinado del aceite con el tiempo, se observó que a medida que el tiempo transcurre la mortalidad de los nemátodos aumenta siendo el aceite de palo bobo a las 48 horas el que presentó mayor efecto de inducir mortalidad con 86.67%, los resultados que le siguen tienen 71,33% a las 24 horas y 64% a las 48 horas son el aceite de palo bobo y mostaza respectivamente mientras que el aceite de higuierilla a las 8 horas fue el menos eficiente con 10,67%.

En relación al efecto combinado del tipo de aceite y la dosis, el mejor resultado se obtuvo con la aplicación de aceite de palo bobo con la dosis de 500 μL con un 77,33% de mortalidad, siendo más eficaz un 35,35% al aceite de mostaza con la dosis de 500 μL y un 60,33% al aceite de higuierilla con dosis de 300 μL siendo este el resultado menos eficiente. Según Chango (2018), en su trabajo de investigación argumenta que sus mejores resultados en la reducción de la población de nemátodos *Meloidogyne* fueron la aplicación de Mostaza y Palo bobo con frecuencia de 20 días en los dos casos. Para el caso de mostaza la presencia de los glucosinolatos podría ser el causante de la muerte de los nemátodos como lo menciona López et al. (2003), los glucosinolatos, al hidrolizarse en el suelo, por la acción de la enzima mirosinasa se transforman en isotiocianatos, permitiendo la reducción de la población de nemátodos mientras que el palo bobo se puede inferir que los alcaloides que posee disminuyó la población de los nemátodos comparando con lo que indica Díaz (2010), los alcaloides presentes en *N. glauca*, como son: nicotina, nornicotina y anabasina son sustancias neurotóxicas que inactivan a los nematodos, causando parálisis en el sistema nervioso y además actúa como insecticida de contacto, fumigante o veneno estomacal. Por lo mencionado se aduce que los glucosinalatos presentes en la composición de la mostaza y los alcaloides que se encuentran en el palo bobo pueden ser los causantes de la acción nematicida observada en la investigación concordando con los resultados obtenidos por Chango (2018).

Tabla 5. Porcentajes de mortalidad de nemátodos *Meloidogyne* frente a 3 aceites esenciales.

Dosis (µL)	Tiempo (h)	Control	<i>Brassica carinata</i>	<i>Nicotiana glauca</i>	<i>Ricinus communis</i>
300	8	0	20,00±7,071b	32,00±16,432b	6,00±5,477b
	24	0	48,00±17,889a	60,00±15,811ab	36,00±13,416 ^a
	48	0	58,00±16,432a	78,00±8,367a	50,00±7,071 ^a
400	8	0	18,00±10,954b	40,00±20,00b	14,00±8,944b
	24	0	56,00±13,416a	72,00±19,235ab	42,00±21,679ab
	48	0	62,00±8,367a	88,00±10,954a	64,00±15,166 ^a
500	8	0	12,00±16,432b	56,00±28,810b	12,00±13,038b
	24	0	56,00±13,416ab	82,00±17,889ab	64,00±13,416 ^a
	48	0	72,00±8,367a	94,00±5,4772a	74,00±8,944 ^a

Se pudo observar correlación de la dosis de los aceites con el número de nemátodos muertos para cada tipo de aceite como se muestra en las figuras 3, 4 y 5. Lo que se detectó fue que a mayor dosificación la mortalidad iba en ascenso.

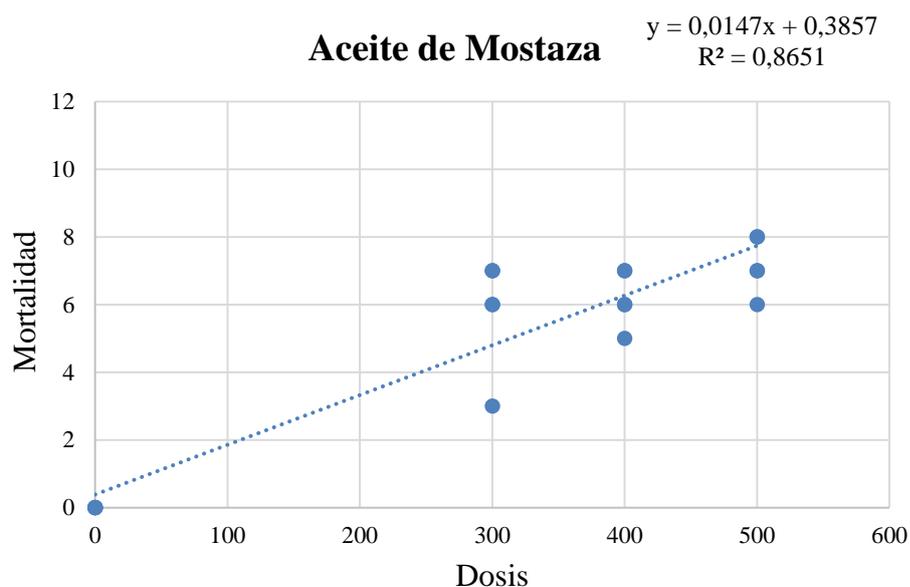


Figura 3. Correlación de las dosis con la mortalidad (Mostaza).

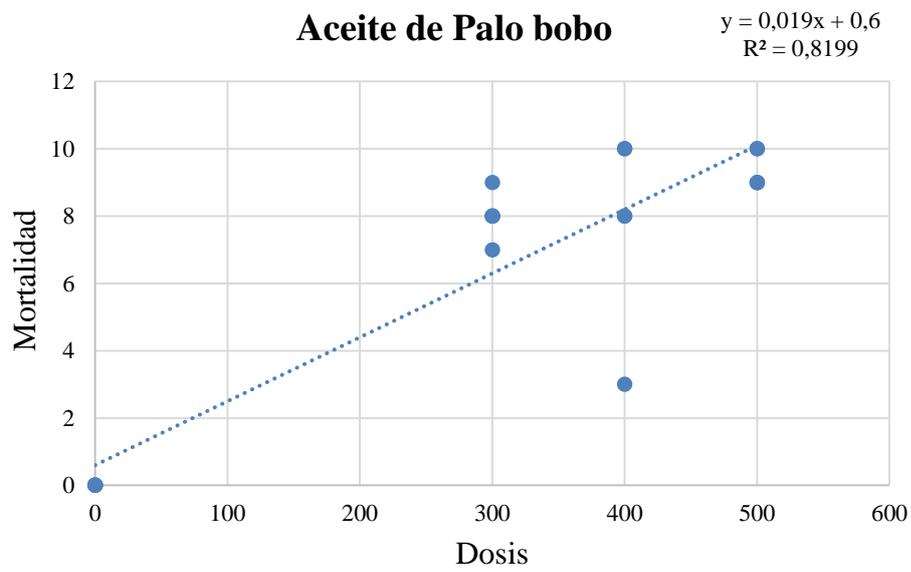


Figura 4. Correlación de las dosis con la mortalidad (Palo bobo).

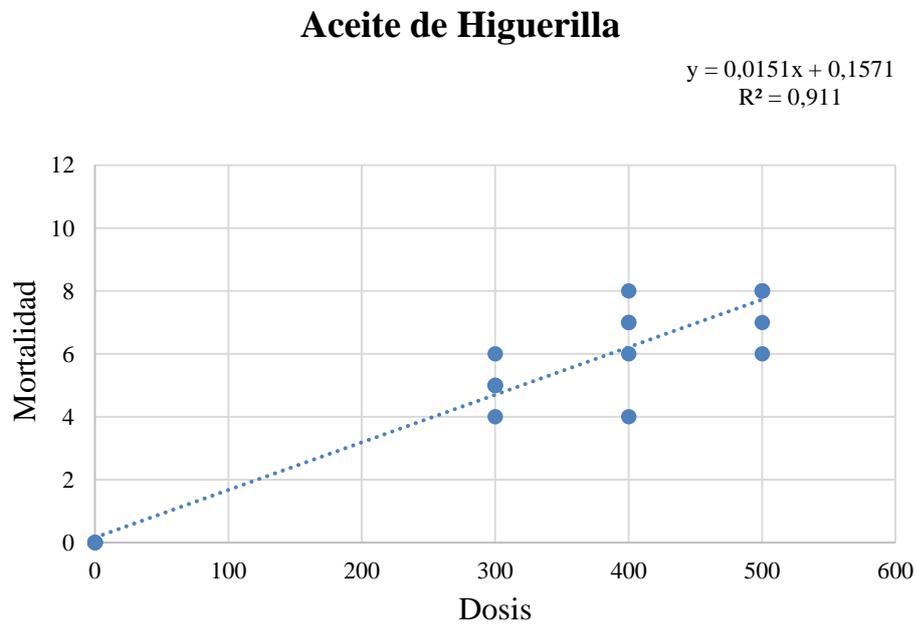


Figura 5. Correlación de las dosis con la mortalidad (Higuierilla).

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

6.1. CONCLUSIONES

- El nemátodo fitoparásito predominante en las raíces de tomate de riñón (*Lycopersicon esculentum* Mill.) tomadas del sector Rumipamba del Cantón Salcedo identificado por medio de su morfología las cuales son: la forma del cuerpo, cola y estilete las cuales coincidieron con las características morfológicas del nemátodo *Meloidogyne* sp.
- La aplicación de los aceites esenciales de mostaza (*B. carinata*), palo bobo (*N. glauca*) e higuerilla (*R. communis*) actuaron sobre la población de nemátodos provocando que estos en algunos caso se queden inmóviles o mueran directamente al ingerir el aceite esencial debido a que estos provocan daños en su organismo, con lo cual se afirma la hipótesis de la investigación.
- Según los datos analizados estadísticamente el aceite esencial de Palo bobo (A2) tiene una tasa del 67% de mortalidad a las 48 horas siendo el más eficaz de los tres aceites aplicados. Al igual que el mejor aceite y dosis fue el aceite de Palo bobo con la dosis más alta 500 μ l (A2D3) el cual tiene el mayor porcentaje de mortalidad a las 48 horas. Se puede deducir que el efecto nematicida obtenido del palo bobo es gracias a la presencia de los alcaloides que tiene en su composición siendo los de mayor porcentaje la nicotina y la anabasina.

6.2. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, D., Botina, J., Ortiz, A. y Botina, L. (2016). Evaluación nematocida del aceite esencial de *Tagetes zypaquirensis* en el manejo del nemátodo *Meloidogyne sp.* *Revista de Ciencias Agrícolas*, 33(1), 22-33.
- Andrés, M. (2002). Estrategias en el control y manejo de nematodos fitoparasitarios. *Ciencia y Medio Ambiente*, 221-227.
- Arboleda, F., Guzmán, O. y Restrepo, J. (2010). Efecto *in vitro* de extractos acuosos de higuera (*Ricinus communis* L.) sobre el nemátodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb). *Agronomía (Manizales)*, 18(2), 25-36.
- Armendáriz, I., Quiña, D., Ríos, M. y Landázuri, P. (2015). *Nemátodos fitopatógenos y sus estrategias de control*. Recuperado de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/10174/3/Nem%C3%A1todos%20Fitopat%C3%B3genos.pdf>
- Bongers, T. (2011). *Morfología de los nemátodos*. Costa Rica: UNA.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, Fitoquímica: Plantas Medicinales*. Zaragoza, España: Acribia S. A.
- Cepeda, M., García, M., Hernández, A., Ochoa, M., Garrido, F., Cerna, E. y Dávila, D. (2018). “Toxicidad de extractos de *Carya illinoensis* (Fagales: Juglandaceae) contra *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Heteroderidae) en tomate”. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 5(13), 143-148.
- Chandler, D., Bailey, S., Mark, G., Davidson, G., Greaves, J. y Grant, P. (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 366(1573), 1987-1998.

- Chango, E. (2015). “*Efecto de la mostaza caliente en suelo hortícola infestado por nemátodos*”. Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- Chango, L. (2018). “*Aplicación de extractos vegetales de palo bobo (Nicotiana glauca), clavel chino (Tagetes patula) y mostaza (Sinapis alba) para el control de nematodos en el cultivo de tomate riñón (Lycopersicum esculentum)*”. Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- Coyne, D. (2007). *Nematología práctica*. México DF, México: IITA.
- Coyne, M., Nicol, B. y Claudius, C. (2010). *Nematología práctica: Una guía de campo y laboratorio*. México DF, México: IITA.
- Crozzoli, R. (2014). *La nematología agrícola en Venezuela*. Universidad central de Venezuela. Maracay, Venezuela.
- Curimilma, S. (2015). *Control de nemátodos de las raíces del tomate de mesa*. Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador.
- Díaz, G. (2010). *Plantas tóxicas de importancia en salud y producción animal en Colombia*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Díaz, J. y Martínez, J. (2013). “*Cantidad y calidad de aceites esenciales en hojas de cuatro especies del género Eucalyptus - el mantaro*”. Universidad Nacional del Centro del Perú, Huancayo, Perú.
- Frápolti, E. (2013). *Los nemátodos fitoparásitos*. Málaga, España: CAP.
- Iler, D. (2017). *Evaluación de la actividad nematicida in vitro de aceites esenciales frente a Meloidogyne*. Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- Instituto Nacional de Estadística y Censo, EC. (2010). *III Censo Nacional Agropecuario 2010*. Ambato, Ecuador: INEC.

- Jaraba, J., Lozano, Z. y Suarez, I. (2003). *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919) Chitwood 1949 y *Meloidogyne arenaria* (Neal 1889) Chitwood 1949: nemátodos de las nudosidades radiculares en guayaba (*Psidium guajava* L.). *DIALNET*, 8(2), 40-67.
- Llerena, B. y Llerena, S. (2010). *Control de nematodo meloidogyne sp. en tomate riñón (Lycopersicon esculentum) híbrido memoneta con tres dosis de intercept y nemasol en la parroquia yaruquí, provincia Pichincha*. Universidad Estatal de Bolívar, Bolívar, Ecuador.
- López, J.; Aymerich, B. y González, S. (2003). Efecto de la biofumigación sobre la actividad deshidrogenasa y las poblaciones del nematodo fitoparásito *Globodera*. Su repercusión en la mejora del suelo. *Edafología*, 10(2), 255–260.
- Martínez V., Ros C., Guerrero M., Lacasa C., Fernández P., Beltrán C., Cano A. y Lacasa, A. (2010). Uso de brassicas verdes y pellets de *Brassica carinata* para la desinfección de suelos de pimiento. Recuperado de https://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicaciones-online/2010/ix-congreso/cd-actas/p8-sanidad-vegetal-ii-PDF/8-4-uso_de_brasicas-martinez.pdf
- Martínez, A. (2001). *Aceites esenciales*. Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Mnzava, N. y Schippers, R. (2007). *Brassica carinata* Braun. *Plant Resources of Tropical Africa*, 37(5), 48-59.
- Nahabedian, D. (2016). *Fitopatología: nemátodos*. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Pérez, et al. (2016), “Efectividad biológica *in vitro* de *Tagetes lucida* CAV, *Ricinus communis* L, *Nicotiana glauca* Graham, *Amphipterygium adstringens* Schldtl y el hongo *Ganoderma lucidum* Curtis en larvas de *Copaxa multifenestrata* Herrich-Schaffer. en aguacate”. *Entomología Mexicana*, 3, 255–261.

- Ruiz, R., Ruiz, J., Guzmán, S. y Pérez, E. (2011). Manejo y control de plagas del cultivo de tomate en Cintalapa. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 27(2), 129-137.
- Salazar, A. (2013). Nemátodos fitoparásitos asociados al tomate en la zona occidental de Nicaragua. *Agronomía Mesoamericana*, 24(1), 27-36.
- Salazar, I., y Alzate, C. (2011). Evaluación del proceso integral para la obtención de aceite esencial y pectina a partir de la cáscara de naranja. *Ingeniería y ciencia*, 7(13), 65-86.
- Solano, T. (2015). *Control del nemátodo agallador de las raíces del tomate Meloidogyne incognita con extractos estandarizados de tres plantas nativas con propiedades nematocidas*. Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador.
- Taipe, G. (2018). “*Caracterización morfológica de las especies de nemátodos fitoparásitos asociadas en el cultivo de tomate riñón (Lycopersicon esculentum Mill.) en la provincia de Cotopaxi cantón Salcedo*”. Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- Talavera, M. (2003). *Manual de nematología*. Madrid, España: INB.
- Vademécum agrícola. (2017). *Diccionario de productos agrícolas*. Quito, Ecuador: PLM.
- Van Ginkel, A. (2003). “*Plantas. Medicinales y Fitoterapia. Módulo 2. Cultivo de plantas medicinales. Tecnología y Producción*”. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España
- Vinueza, S., Crozzoli, R., & Perichi, G. (2006). Evaluación *in vitro* de extractos acuosos de plantas para el control del nematodo agallador *Meloidogyne incognita*. *Fitopatología de Venezuela*, 19, 26-31.

6.3. ANEXOS

Anexo 1: Obtención y extracción de semillas de Palo bobo (*N. glauca*).



Recolección de flores.



Secado de la flor.



Obtención de semilla.



Separación de semillas y material de desecho.

Anexo 2. Obtención y extracción de semillas de Higuierilla (*R. communis*)



Recolección de la panícula.



Extracción del fruto.



Secado del fruto.



Extracción de la semilla.

Anexo 3. Pre tratamiento de semillas para la extracción de aceites.



Molino Fitch.



Molido de semilla higuera.



Molido de semilla mostaza. Molido de semilla higuera



Indice de afectacion de nodulacion.

Anexo 4. Preparación de aceites esenciales. (Laboratorio de Termoquímica y suelos, UTA)



Cartuchos de semilla..



Equipo Soxhlet



Obtención de aceite



Recolección de aceites.

Anexo 5. Extracción de nemátodos



Picadar la raíz en trozos de 2 a 3cm.



Licuar por 60s los trozos de raíz con la solución de hipoclorito de sodio



Tamizar la solución de raíz.



Recolectar la solución de nemátodos.

Anexo 6. Manejo del experimento.



Identificación de nemátodos
Meloidogyne.



Colocación de nemátodos
Meloidogyne en cajas petri.



Aplicación de aceites esenciales.



Condiciones controladas para los
nematodos durante el ensayo.

CAPÍTULO VII

PROPUESTA

“Uso de aceite esencial de Palo bobo (*Nicotiana glauca* Graham) para el control de nemátodos *Meloidogyne*.”

7.1. DATOS INFORMATIVOS

Se realizará en la Granja Experimental Docente “Querochaca” propiedad de la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias, ubicada en el cantón Cevallos, provincia de Tungurahua. Las coordenadas geográficas son 01° 21´ de latitud Sur y 78° 36´ de longitud Oeste, con una altitud de 2865 m.s.n.m.; datos tomados con GPS.

7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA

De acuerdo a los resultados obtenidos en la investigación se recomienda utilizar el aceite esencial de palo bobo siendo el mejor para reducir la población de nemátodos *Meloidogyne*, sin embargo se debe realizar estudios de la aplicación del aceite en campo para llegar a determinar la mejor dosis debido a que los resultados pueden fluctuar de un experimento *in vitro* llevándolo a un experimento de campo.

7.3. JUSTIFICACIÓN

La alta demanda de productos químicos para el control de nematodos utilizados en cultivos de tomate riñón ha provocado el interés de investigaciones acerca de otro método para reducir las altas poblaciones de nematodos en el suelo. Una opción es la utilización de aceites esenciales de diferentes plantas siendo está más amigable con el medio ambiente y sin producir daños a los consumidores.

El presente trabajo demuestra un método de control botánico como es la aplicación del aceite esencial de Palo bobo para el control de nemátodos fitoparásitos como solución a la contaminación elevada de nematicidas químicos que son de uso cotidiano para el agricultor. Representando un cuidado a la salud tanto del productor como el consumidor.

7.4. OBJETIVOS

Fomentar el uso de aceite esencial de Palo bobo para el control de nematodos fitoparásitos.

7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD

La utilización del aceite esencial de Palo bobo para el control de nemátodos es una técnica fácil de realizar debido a la gran cantidad de plantas silvestres ubicadas alrededor del país sirviendo como materia prima para la elaboración del mismo. Es un método pensado en el agricultor para economizar los costos de producción de sus cultivos, evitando la contaminación ambiental y los daños ocasionados por la utilización indiscriminada de nematicidas químicos debido a que los aceites esenciales son productos orgánicos de la extracción de la planta.

7.6. FUNDAMENTACIÓN

La producción de tomate riñón libre de nematicidas químicos aplicando extractos vegetales, es por esto que se realiza esta propuesta a los agricultores. La aplicación de extractos vegetales, hoy en día es una alternativa para control de nematodos del suelo porque permite conservar la microbiología del suelo, además que no son tóxicos para la salud humana, ofreciendo así productos sanos a los productores (Chango, 2018). Por esta razón el aceite esencial de Palo bobo puede ser utilizado como nematicida en el manejo del cultivo, debido a que sus metabolitos secundarios son antagónicos a nemátodos produciéndoles daños en el organismo, logrando una agricultura más limpia sin producir daños al ambiente consiguiendo aumentar la microbiología del suelo.

7.7. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO

7.7.1. Recolección de semillas de Palo Bobo

Se recolectaran de la provincia de Tungurahua en el Cantón Patate flores maduras para en lo posterior secar en una estufa a 40°C durante 48 horas para obtener las semillas.

7.7.2. Extracción de aceites esenciales

Se utilizará el método de arrastre de vapor para la extracción de los aceites esenciales con la ayuda de un alambique industrial utilizando trozos de material vegetal juvenil y semilla tamizada previamente.

7.7.3. Preparación de la disolución del aceite esencial.

Se preparará el aceite esencial a una concentración del 1%, para facilitar la homogenización de la disolución se utilizará Tween - 20 al 0.5%

7.7.4. Aplicación del aceite esencial

Se aplicará en cultivos de tomate riñón de la provincia de Cotopaxi, Cantón Salcedo, Parroquia San Miguel Sector Rumipamba de Navas. Vía drench con la dosis más alta evaluada que fue 500µl. relacionando la dosis para aplicar en campo sería de 1cc/L.

7.8. ADMINISTRACIÓN

Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Ingeniería Agronómica.

Productores de tomate riñón (*L. esculentum*) en la provincia de Cotopaxi.

Técnicos de la zona de Cotopaxi.

7.9. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN

Al finalizar el cultivo de tomate riñón donde fue aplicado el aceite esencial de palo bobo se evaluará la afectación de las raíces y la población de nemátodos. Para lo cual se utilizara una escala visual del índice de modulación y se enviara a realizar un análisis nematológico.