

Efecto de extractos de *Tagetes* spp. y *Melia azedarach* L. sobre el nematodo *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood

Effect of *Tagetes* spp. y *Melia azedarach* L. extracts on the nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood

Tulio F. Solano Castillo^{1*} Guido B. Agurto Córdova¹, Cristian R. Quezada Zapata¹, Jeamel Ruiz Toledo¹, Elio M. Del Pozo Núñez²

¹Universidad Nacional de Loja, Ciudad Universitaria Guillermo Falconí Espinosa, Loja, Ecuador, PBX: 072547252

²Universidad Agraria de la Habana, Autopista Nacional km 23½, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

E-mail: tulio_solano@yahoo.es

RESUMEN. Los nematodos del género *Meloidogyne* constituyen un serio problema para la producción de tomate en la provincia de Loja Ecuador, por ello es necesario buscar alternativas dada las limitantes que plantea el uso de nematicidas químicos. En ese sentido se desarrolló el presente trabajo con el objetivo de evaluar el efecto de extractos acuosos de hojas de *Tagetes ternifolia* Kunth, *Tagetes erecta* L. y extractos etanólicos de semillas de *Melia azedarach* L. en el control de *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood, "in vitro" y en condiciones de invernadero, sobre tomate cultivado en bolsas. Los extractos provocaron una mortalidad significativa "in vitro" sobre los juveniles del nematodo, el efecto dependió no solo de la especie vegetal sino también de la concentración. Además fue evidenciada una apreciable reducción en el índice de agallamiento y de las poblaciones del nematodo en el sustrato, efecto dependiente de la concentración de los extractos.

Palabras clave: extractos nematicidas, *Tagetes*, *Melia azedarach*, *Meloidogyne*.

ABSTRACT. Nematodes of *Meloidogyne* genus are a serious problem for tomato production in the province of Loja, Ecuador. Because of the negative side effects of chemical nematicides, to solve this problem it is necessary look for alternatives. This work aimed to study the effect of aqueous leave extracts from *Tagetes ternifolia* Kunth, *Tagetes erecta* L. and ethanolic seed extract from *Melia azedarach* L. in *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood control "in vitro" and glasshouse conditions, on tomato plants. The extracts induced a significant mortality "in vitro" on juveniles. This effect was related with the plant species and the concentrations used. In tomato growing in glasshouse, it was observed an appreciable reduction in the gall index and the nematode populations in soil, related with the plant species and the concentration used.

Key words: Nematicidal plant extracts, *Tagetes*, *Melia azedarach*, *Meloidogyne*.

INTRODUCCIÓN

Los nematodos formadores de agallas en las raíces, pertenecientes al género *Meloidogyne* Göldi, están ampliamente distribuidos en los países tropicales y subtropicales. Ellos ocasionan severas pérdidas económicas en muchos cultivos, entre ellos, el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) (Gómez *et al.*, 2010; Collange *et al.*, 2011). La creciente preocupación de los agricultores por los nematodos agalladores y las limitaciones de los nematicidas químicos debido a sus efectos negativos en los agroecosistemas, han traído consigo de que se requieran desarrollar alternativas para resolver esta problemática (Collange *et al.*, 2011; Kayani *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2012).

En los últimos años, el uso de sustancias bioactivas obtenidas de plantas en el control de nematodos ha sido estudiado por diversos autores (Ipsilantis *et al.*, 2012; Kayani *et al.*, 2012, Mukhtar *et al.*, 2013; Gakuy *et al.*, 2013). Varias especies del género *Tagetes*, familia Asteraceae, han demostrado poseer un buen efecto nematicida al ser evaluadas para el control de *Meloidogyne* spp., efecto que ha sido atribuido a la producción de tiofenos, compuestos poliacetilénicos que poseen una fuerte actividad biocida (Tsay *et al.*, 2004; Murga, 2007; Marotti *et al.*, 2010; Hooks *et al.*, 2010).

Por otro lado, representantes de la familia *Meliaceae*

también han demostrado poseer propiedades nematocidas. *Azadirachta indica* A. Juss ha sido evaluada con buenos resultados contra *Meloidogyne* spp., mientras que los extractos de frutos de *Melia azedarach* L. han despertado un gran interés para su uso en la protección contra nematodos fitoparásitos (Cavoski et al., 2012).

En las condiciones de la provincia de Loja, Ecuador,

MATERIALES Y MÉTODOS

Para los extractos se recolectaron hojas de *T. ternifolia* y *T. erecta*, además de semillas de *M. azedarach*, teniendo en cuenta los resultados informados por Solano (2009). Se tomaron y sometieron a un proceso de destilación simple 2 kg de hojas frescas con 1500 mL de agua destilada. Al producto de la destilación se le adicionó 30 mL de cloroformo y posteriormente fue colocado en un agitador magnético durante 1 h para facilitar la separación de los aceites. Consecutivamente, la mezcla obtenida se sometió a un proceso de rotoevaporación al vacío, a una temperatura de 45 °C, donde fue eliminado el cloroformo y mediante un embudo separador se logró obtener el extracto crudo.

Las semillas de *M. azedarach* primeramente fueron secadas en una estufa a 40 °C durante 72 h y se trituraron en un molino eléctrico de uso doméstico. Posteriormente, a 200 g del material se le adicionó 500 mL de etanol al 70 %, en un recipiente cubierto con papel aluminio y se dejó en reposo por 72 h a temperatura ambiente. Después fue filtrado con papel de filtrado rápido, para desechar el tejido vegetal y se eliminó el solvente mediante rotoevaporación al vacío a 45 °C.

Para la obtención de los nematodos se recolectaron plantas de tomate con síntomas de agallamiento. Las raíces fueron lavadas y secadas al aire. Posteriormente se seleccionaron los nódulos que fueron desmenuzados en una licuadora y por tamizado, se obtuvo la suspensión de los nematodos en agua. Mediante la técnica de los cortes perineales y las claves y descripciones de Taylor y Sasser (1978) fue comprobado que el nematodo correspondía a la especie *M. incognita*.

aún son insuficientes los conocimientos relativos a la acción de extractos vegetales para el control de *Meloidogyne* spp. en tomate por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de extractos acuosos de hojas de *Tagetes ternifolia* Kunth, *Tagetes erecta* L. y extractos etanólicos de semillas de *Melia azedarach* L. en el control de *M. incognita*, en el cultivo del tomate.

Efecto de extractos vegetales sobre *M. incognita*, “in vitro”

Se evaluó el efecto de cinco concentraciones de los extractos: 0,01, 0,03, 0,06, 0,08 y 0,10% (p/v). Con una balanza analítica Sartorius (precisión= 0,00001 g) en su preparación fue pesada la cantidad requerida de los aceites, para un volumen de mezcla de 100 mL. Posteriormente, se adicionó 0,5 mL de etanol 96 % y el emulsionante Lauryl éter sulfato de sodio en una proporción 1:1 con relación al extracto, se agregó agua destilada estéril hasta enrasar a 100 mL. Como control se utilizaron los mismos componentes, excepto el extracto, y el emulsionante a la mayor concentración (0,10%).

Para el bioensayo fueron colocados 25 especímenes (J_2) de *M. incognita* en cápsulas Petri estériles con 25 mL de medio de cultivo sólido Zanahoria-Dextrosa-Agar (jugo de zanahoria, 50 mL; 15 g de dextrosa y 12 g agar, en 1 L de agua, suplementado con 50 mg de estreptomina, cloranfenicol y clortetraciclina más 40 mg de carbendazim y 0,1 mL de tiabendazol).

Una vez depositados los nematodos en las cápsulas Petri, se procedió a asperjar 0,24 mL de los extractos con la ayuda de un microaspersor manual de 10 mL de capacidad. Después, las cápsulas fueron colocadas en incubadora a 25 °C, en oscuridad constante. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 16 tratamientos (cinco concentraciones de cada uno de los tres extractos más el tratamiento control) y cuatro repeticiones. Cada cápsula Petri con 25 J_2 constituyó una repetición.

Se evaluó la mortalidad de los nematodos a las 72 h,

con el auxilio de un microscopio estereoscópico Olympus, con un aumento de 40X, asumiendo como muerto aquel individuo carente de movilidad absoluta o con deformaciones (Quevedo *et al.*, 2010). Los datos del porcentaje de mortalidad fueron transformados mediante la expresión $\text{aseno}(p)^{1/2}$ y sometidos a un análisis de varianza de clasificación simple, para la comparación de las medias se utilizó la Prueba de Tukey (SAS Institute, 2004).

Efecto de extractos vegetales sobre *M. incognita*, en invernadero

El ensayo se desarrolló en el invernadero de la Universidad Nacional de Loja. En bolsas de polietileno de 3 kg con un sustrato a base de suelo, arena y humus de lombriz (relación 1:1:1), se trasplantaron las plántulas de tomate de la variedad "Acerado", de 30 días de edad. Después del trasplante, en las semanas dos y cuatro el sustrato fue inoculado con 1 000 juveniles (J_2) de *M. incognita* (2 000 en total). Los extractos fueron aplicados en las semanas cuatro y siete a concentraciones de 0,06, 0,08 y 0,10 % (100 mL de la mezcla) en la zona de la rizosfera de las plantas.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de extractos vegetales sobre *M. incognita*, "in vitro"

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos. Como se aprecia en la Tabla 1 todas las variantes provocaron una mortalidad superior al 40 %, y dependió no solo de la especie vegetal utilizada, sino también de la concentración, ya que a medida que esta aumentó, se obtuvo una mayor mortalidad del nematodo.

Los valores más altos, similares estadísticamente, correspondieron a las concentraciones mayores de *T. terniflora* y *M. azedarach*; mientras que los más bajos, igualmente sin diferencia estadística entre ellos, se obtuvieron a las concentraciones menores de las dos especies del género *Tagetes*.

Los resultados obtenidos en el ensayo corroboran los informes de diversos autores sobre el efecto

10 tratamientos y cuatro repeticiones. A las 13 semanas se determinó el índice de agallamiento, con la escala de 10 grados de Bridge y Page (1980), así como la población del nematodo (juveniles/100 cm³ de sustrato y juveniles/10 g de raíces). La determinación de la población en el sustrato se realizó mediante la técnica de platos calados, modificación del método de Baerman (Duncan y Phillips, 2009).

Para la población de nematodos en las raíces fueron lavadas y troceadas las mismas en segmentos de aproximadamente 1 cm, después de lo cual se tomaron 10 g que fueron desmenuzados en una licuadora doméstica, con la que se alternaron tres ciclos de licuado-reposo de 5 s. El material finamente dividido se hizo pasar por tres tamices superpuestos de 250, 125 y 38 μm , haciendo un lavado con una ducha a baja presión durante 1 min en cada tamiz. La suspensión obtenida del último tamiz se colectó en un vaso de precipitación y se enrasó hasta 40 mL para la cuantificación.

El conteo se realizó con el auxilio de un microscopio Olympus a un aumento de 100 X. Los datos de población se transformaron según la expresión $(x+1)^{1/2}$ y posteriormente, sometidos a un análisis de varianza de clasificación simple. En la comparación de las medias se utilizó la Prueba de Tukey (SAS Institute, 2004).

nematicida de plantas del género *Tagetes* sobre *Meloidogyne* spp. (Tsay *et al.*, 2004; Murga, 2007). Estas plantas producen tiofenos, compuestos poliactilénicos que poseen una fuerte actividad biocida, por lo que son muy eficaces para la supresión de poblaciones de nematodos en el suelo (Marotti *et al.*, 2010).

Estos resultados justifican el creciente interés que en los últimos años ha despertado la especie *M. azedarach* para su uso en la protección vegetal contra los nematodos fitoparásitos. Sus extractos, ricos en aldehídos, alcoholes y ácidos carboxílicos mostraron actividad nematicida sobre *M. incognita*. Además, los extractos de esta especie estimula las defensas de las plantas, ayudando al hospedante a combatir la infestación por el nematodo en forma indirecta (Cavoski *et al.*, 2012).

Igualmente, el efecto de la concentración en la mortalidad de *Meloidogyne spp.* observado en este ensayo, ratifica lo señalado por otros autores para

diversos extractos vegetales (Arboleda et al., 2010; Quevedo et al., 2010).

Tabla 1. Mortalidad de *M. incognita*, tratado con los tres extractos en estudio, en condiciones "in vitro" (72 h)

Tratamientos		Mortalidad (%)	
Especie	Concentración (%)	Medias originales	Medias transformadas
<i>T. erecta</i>	0,01	43,33	0,3786 hi
	0,03	48,33	0,3929 fgh
	0,06	56,67	0,4160 bcd
	0,08	58,33	0,4203 bc
	0,10	61,67	0,4294 b
<i>T. terniflora</i>	0,01	40,00	0,3686 i
	0,03	45,00	0,3834 gh
	0,06	50,00	0,3976 efg
	0,08	58,33	0,4205 bc
	0,10	68,33	0,4467 a
<i>M. azedarach</i>	0,01	48,33	0,3929 fgh
	0,03	51,67	0,4023 def
	0,06	55,00	0,4115 cde
	0,08	58,33	0,4205 bc
	0,10	71,67	0,4552 a
Control		0,00	0,2255 j
ESx			0,0054*
C.V. (%)			2,61

Medias con letras iguales no difieren significativamente según Tukey (p= 0.05)

Efecto de extractos vegetales sobre *M. incognita spp.* en invernadero

Los resultados de la evaluación del índice de agallamiento se muestran en la Figura 1. Como puede apreciarse, en los tratamientos con los extractos a las tres concentraciones ensayadas se lograron índices de agallamiento inferiores a los obtenidos en el control.

En concordancia con los ensayos anteriores, también se observó un efecto de la concentración sobre los valores del índice de agallamiento. Siempre los índices más bajos correspondieron a los tratamientos donde se utilizó una mayor concentración de los extractos. En ese sentido, es de destacar que en la mayor concentración de todos los extractos, los índices de agallamiento obtenidos fueron inferiores a los

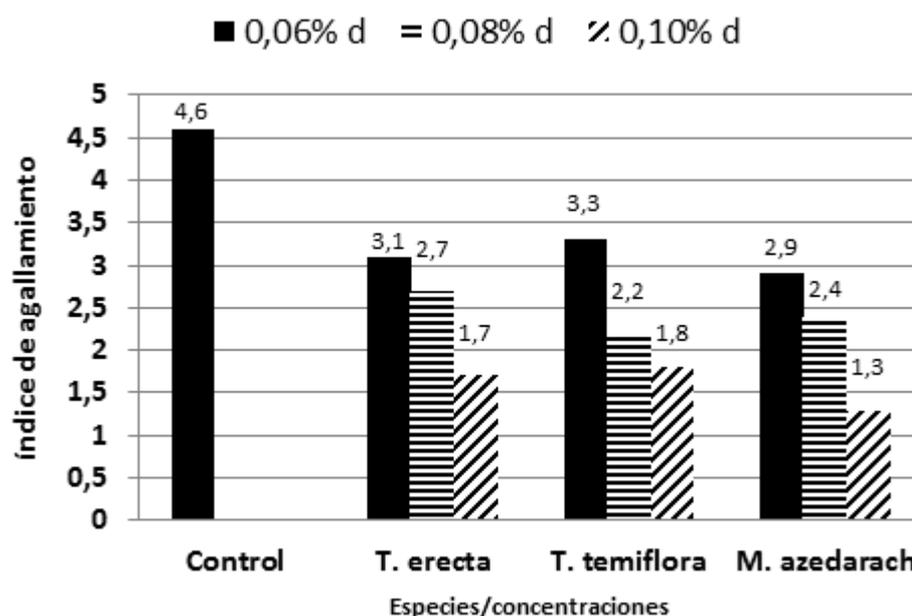


Figura 1. Efecto de los extractos vegetales sobre el agallamiento en raíces de tomate por *M. incognita*, en condiciones de invernadero

Los análisis estadísticos realizados con los datos de población mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. En relación con la población de nematodos en el suelo (Tabla 2) puede observarse que en todos los tratamientos con extractos, los valores obtenidos difirieron estadísticamente de los del control. Igualmente, las poblaciones dependen no solo de la especie de planta, sino también de la concentración utilizada, lo cual corrobora los resultados obtenidos *in vitro*. Sólo en el caso de la especie *T. erecta* no se presentaron diferencias significativas entre las poblaciones de las tres concentraciones.

Es de significar que las poblaciones más bajas se obtuvieron con la especie *T. terniflora*, aunque el valor obtenido a la menor fue similar al de la

concentración más alta de *M. azedarach*. En todos los casos, aunque la reducción de la población con relación al control fue apreciable, la población de juveniles del nematodo fue superior a lo indicado por Ornat y Sorribas (2008) como límite de tolerancia para esta especie de nematodo en tomate, 0,55 J₂/g de suelo.

Con relación a la población en las raíces, en la misma puede apreciarse que también en este caso todos los tratamientos con extractos difirieron estadísticamente del control, en el cual hubo una población más elevada. En el caso de *M. azedarach* los tres valores obtenidos fueron similares y solo superados por el logrado con la mayor concentración de la *T. terniflora*.

Tabla 2. Efecto de los extractos vegetales en estudio sobre la población de *M. incognita*, en bolsas con plantas de tomate

Especies	Concentración (%)	Nematodos/100 cm ³ de suelo		Nematodos/10 g de raíces	
		Medias originales	Medias transformadas	Medias originales	Medias transformadas
Control		1535,00	39,12 a	1676,67	40,84 a
<i>T. erecta</i>	0,06	677,67	26,03 cd	788,00	28,08 b
	0,08	615,00	24,81 cd	573,33	23,90 c
	0,10	561,67	23,72 d	332,00	18,25 d
<i>T. terniflora</i>	0,06	395,00	19,90 ef	715,00	26,64 bc
	0,08	320,00	17,87 fg	619,33	24,86 c
	0,10	235,00	15,34 g	116,00	10,77 e
<i>M. azedarach</i>	0,06	983,33	31,30 b	406,67	20,14 d
	0,08	707,33	26,61 c	356,00	18,89 d
	0,10	430,00	20,76 e	331,33	18,21 d
ESx			0,86*		1,04*
C.V. (%)			6,09		7,78

Medias con letras iguales no difieren significativamente según Tukey (p= 0.05)

Relacionado a las especies del género *Tagetes*, existen diversos informes previos sobre la reducción que provocan en el índice de agallamiento y la población de los nematodos en el suelo, sin manifestarse efectos fitotóxicos en el cultivo del tomate. Estas especies imposibilitan completar el ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. y su capacidad de producir huevos es nula o escasa (Murga, 2007).

CONCLUSIONES

1. Los extractos acuosos de hojas de *T. ternifolia* y *T. erecta*, y extractos etanólicos de semillas de *M. azedarach* provocaron una alta mortalidad sobre los juveniles (J₂) de *M. incognita*, en condiciones “*in vitro*”, efecto que dependió no solo de la especie

Los resultados obtenidos constituyen el primer informe de la acción nematicida de las tres especies en estudio sobre el fitonematodo *M. incognita* en el Ecuador, y representan un aporte a la fundamentación del conocimiento ancestral sobre los usos de estas plantas en la región (Solano, 2009), a la vez que pueden contribuir al diseño de estrategias de manejo más eficientes y menos agresivas al medio ambiente (Collange *et al.*, 2011).

vegetal sino también de la concentración utilizada.

2. Los extractos de *T. ternifolia*, *T. erecta* y de *M. azedarach* provocaron una reducción, dependiente de la concentración, en el índice de

agallamiento y de las poblaciones de los juveniles (J₂) de *M. incognita*, en los suelos y raíces del tomate

cultivado en bolsas, en condiciones de invernadero.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arboleda, F.; O. Guzmán; J. Restrepo: Efecto *in vitro* de extractos acuosos de higuerilla (*Ricinus communis* Linneo) sobre el nematodo barrenador [*Radopholus similis* (Cobb) Thorne]. *Agronomía* 18(2):25-36, 2010.
2. Bridge, J.; S.L.J. Page: Estimation of root-knot nematode infestation levels on roots using a rating chart. *Tropical Pest Management* 26:296–298, 1980.
3. Cavoski, I.; Z. A. Chami.; F. Bouzebboudja; N. Sasanelli; V. Simeone; D. Mondelli; T. Miano; G. Sarais; N. G. Ntalli; P. Caboni: *Melia azedarach* controls *Meloidogyne incognita* and triggers plant defense mechanisms on cucumber. *Crop Protection* 31(1):85-90, 2012.
4. Collange, B.; M. Navarrete; G. Peyre; T. Mateille; M. Tchamitchian: Root-knot nematode (*Meloidogyne*) management in vegetable crop production: The challenge of an agronomic system analysis. *Crop Protection* 30(10):1251-1262, 2011.
5. Dong, L.; C. Huang; L. Huang; X. Li; Y. Zuo: Screening plants resistant against *Meloidogyne incognita* and integrated management of plant resources for nematode control. *Crop Protection* 33(1): 34-39, 2012.
6. Duncan, L.W.; M.S. Phillips: Sampling Root-knot Nematodes. En: Perry, R.N.; M. Moens; J.L. Starr (Eds.) "Root-knot Nematodes" CAB International, Wallingford, U.K., 2009, pp 275-300.
7. Gakuy, D.W.; S.M. Itonga; J.M. Mbaria; J.K. Muthee; J.K. Musau: Ethnobotanical survey of biopesticides and other medicinal plants traditionally used in Meru central district of Kenya. *Journal of Ethnopharmacology* 145(2): 547-553, 2013.
8. Gómez, Lucila; E. González; R. Enrique; M.A. Hernández; Mayra Rodríguez: Uso de la biofumigación para el manejo de *Meloidogyne* spp., en la producción protegida de hortalizas. *Rev. Protección Veg.* 25(2):119-123, 2010.
9. Hooks, C.; K. Wang; A. Ploeg; R. McSorley: Using marigold (*Tagetes* spp.) as a cover crop to protect crops from plant-parasitic nematodes. *Applied Soil Ecology* 46(3): 307-320, 2010.
10. Ipsilantis, I.; C. Samourelis; D. Karpouzas: The impact of biological pesticides on arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 45(1):147-155, 2012.
11. Kayani, M.Z.; T.H. Mukhtar; A. Muhammad: Evaluation of nematicidal effects of *Cannabis sativa* L. and *Zanthoxylum alatum* Roxb. against root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*. *Crop Protection* 39(1):52-56, 2012.
12. Marotti, I; M. Marotti; R. Piccaglia; A. Nastri; S. Grandi; G. Dinelli: Thiophene occurrence in different *Tagetes* species: agricultural biomasses as sources of biocide substances. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(7):1210-1217, 2010.
13. Mukhtar, T.; M.Z. Kayani; M.A. Hussain: Nematicidal activities of *Cannabis sativa* L. and *Zanthoxylum alatum* Roxb. against *Meloidogyne incognita*. *Industrial Crops and Products* 42(3):447-453, 2013.
14. Murga, S.N.: Nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de *T. erecta* en el distrito Virú, La Libertad, Perú. *Neotropical Helminthology* 1 (1):15-20, 2007.
15. Omat, C.; F. Sorribas: Integrated Management of Root-Knot Nematodes in Mediterranean Horticultural Crops. En: Ciancio, A y K.J. Mukerji. (Eds.). "Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes" Springer Dordrecht Heidelberg, London New York, 2008, pp. 295-319.
16. Quevedo, O.; R. Crozzoli; G. Perichi: Uso de

extractos acuosos y etanólicos de plantas para el control de *Meloidogyne enterolobii* (Nematoda: Tylenchida). *Fitopatología Venezolana* 23(2):45-53, 2010.

17. SAS Institute: SAS/STAT 9.1 User's Guide. SAS Institute Inc., Cary, N.C., 2004.

18. Solano, T.: Plantas Nativas con Propiedades Plaguicidas en la Región Sur de Ecuador. Imprenta Pixeles, Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador, 2009, 127 pp. ISBN: 978-9978-355-04-6.

19. Taylor A.L.; J.B. Sasser: Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Dept. Plant. Pathol. N.C. State Univ., Raleigh, 1978, 111pp.

20. Tsay, T.T.; S.T. Wu; Y.Y. Lin: Evaluation of *Asteraceae* plants for control of *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology* 36(1):36-41, 2004.

Recibido: 15/05/2013

Aceptado: 20/08/2013