

Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE AGRONOMÍA



TESIS PARA ASPIRAR AL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO

Título: Efecto alelopático de especies de la familia Asteraceae sobre nemátodos fitopatógenos en híbridos de pimiento bajo cultivo protegido

Autor: Raynol Ricardo Ruiz Cruz

Tutor: Dr.C. Ray Espinosa Ruiz

Dr.C. Maykel Hernández Aro

“Año 50 de la Revolución”

Resumen

Entre los principales problemas fitosanitarios del pimiento en casas de cultivo se encuentran los ataques por nematodos fitopatógenos. Las plantas de la familia *Asteraceae*, pueden ser una alternativa biológica para su control. El objetivo del trabajo fue: determinar el efecto alelopático de extractos acuosos de *Tithonia diversifolia*, *Tagetes erecta* y *Sphagneticola trilobata* sobre nematodos fitopatógenos asociados al pimiento, así como su fitotoxicidad sobre los híbridos "Grandísimo y "LPD – 5". Se realizó la identificación de los nematodos asociados según claves taxonómicas. Se probaron, sobre los nematodos, las concentraciones del 5%, 10%, 15%, 20%, 50, 75% y 100% de extractos acuosos de cada una de las plantas, así como sus efectos sobre la germinación y desarrollo de plántulas de híbridos comerciales. Como resultados se obtuvo que *Meloidogyne incognita* fue el único nematodo que afecto al pimiento en las casas de cultivo estudiadas. El extracto de *T. diversifolia* y *T. erecta* alcanzaron la concentración letal media al 6% y 7% respectivamente, sin embargo *S. trilobata* lo obtuvo al 10%. La planta que produjo mayor porcentaje de mortalidad fue *T. diversifolia*. En cada concentración sus efectos fueron superiores que el de las otras dos plantas, hasta el punto donde estos se igualan (20%). Las plantas estudiadas provocaron estimulaciones en la germinación y crecimiento radicular de los híbridos las concentraciones más bajas (5% y 10%) e inhibiciones a partir del 50%, con excepción de *T. erecta*. El desarrollo del tallo estuvo inhibido por los extractos de las tres plantas en todas las concentraciones probadas.

Índice

| | |
|---|-----------|
| 1 Introducción: | 1 |
| Capítulo 2. Revisión Bibliográfica | 5 |
| 2.1 El Pimiento (<i>Capsicum annum</i> L.) | 5 |
| 2.1.1 Origen, descripción botánica y clasificación taxonómica del pimiento | 6 |
| 2.2 Los nematodos fitopatógenos | 8 |
| 2.2.1 Características generales de los nematodos fitopatógenos | 9 |
| 2.2.2. Principales especies que afectan al pimiento en casas de cultivo | 10 |
| 2.3 La alelopatía. Conceptos básicos y generalidades | 13 |
| 2.3.1 Plantas alelopáticas con efectos nematocidas | 16 |
| 2.4 Descripción botánica y taxonómica de las pantas en estudio | 17 |
| 2.4.1. <i>Tithonia diversifolia</i> | 17 |
| 2.4.2. <i>Tagetes erecta</i> L | 18 |
| 2.4.3 <i>Sphagneticola trilobata</i> (L.) Pruski | 19 |
| Capítulo 3. Materiales y Métodos | 21 |
| 3.1 Identificación de nematodos en el cultivo de pimiento en casas de cultivo | 21 |
| 3.2 Efecto alelopático de <i>Tithonia diversifolia</i> , <i>Tagetes erecta</i> L y <i>Sphagneticola trilobata</i> (L.) Pruski sobre nematodos fitopatógenos | 23 |
| 3.3. Fitotoxicidad de extractos de <i>T. diversifolia</i> , <i>T. erecta</i> y <i>S. trilobata</i> sobre la germinación y desarrollo de plántulas de pimiento | 26 |
| Capítulo 4. Resultados y Discusión | 28 |
| 4.1 Identificación de nematodos en el cultivo de pimiento en casas de cultivo | 28 |
| 4.2 Efecto alelopático de <i>Tithonia diversifolia</i> , <i>Tagetes erecta</i> L y <i>Sphagneticola trilobata</i> (L.) Pruski sobre nematodos fitopatógenos | 32 |
| 4.3 Fitotoxicidad de extracto de <i>Tithonia diversifolia</i> , <i>Tagetes erecta</i> L y <i>Sphagneticola trilobata</i> (L.) Pruski sobre germinación y desarrollo de híbridos de pimiento. | 37 |
| 5 Conclusiones | 48 |
| 6 Recomendaciones | 49 |
| 7 Bibliografía | 50 |
| 8 Anexos | 56 |

1 Introducción:

El cultivo del pimiento (*Capsicum annum* L), presenta frutos que se usan en distintas formas, tanto frescos como procesados; son muy valiosos como fuentes de sustancias nutritivas y vitaminas, especialmente C la cual se encuentra en un rango de 170-400 mg/100 g. Dadas estas características es de vital importancia en la dieta diaria, razón por la cual se ha convertido en un producto de alta demanda en el mercado, el turismo y siempre presente en el arte culinario, por tanto, de interés económico (Huerres and Caraballo, 1996).

Es una planta de la familia de las solanáceas, oriundo de América, principalmente de la zona tropical, se cultiva en la mayoría de los países del mundo donde las condiciones ambientales son favorables a su desarrollo.

En Cuba se ha establecido en todas las provincias como cultivo para consumo interno; las principales provincias productoras son: Pinar del Río, La Habana, Villa Clara, Camagüey, Granma y Guantánamo (Huerres and Caraballo, 1996).

Para satisfacer las crecientes necesidades en el mercado su producción se realiza bajo condiciones de cultivo protegido o invernaderos. Esta tecnología es una de las técnicas más modernas que se utiliza actualmente en la producción agrícola. La ventaja del sistema de invernadero sobre el método tradicional a cielo abierto, es que, se establece una barrera entre el medio ambiente externo y el cultivo, esta protección permite al agricultor controlar la temperatura, la cantidad de luz y realizar un manejo apropiado para protegerlo.

La modificación de los parámetros climáticos dentro de las casas de cultivo permite un metabolismo adecuado para el crecimiento y desarrollo del vegetal, por tanto, expresan el máximo potencial genético. Ello se refleja en las altas producciones que se obtiene en este sistema, además de su alta calidad (Casanova, 2004).

Una de las limitantes que se presentan en las casas de cultivo es la aparición de gran cantidad de enfermedades que afectan las plantas.

Las condiciones de alta humedad relativa debido al riego, conjugado con las elevadas temperaturas que se generan por el efecto invernadero propician la proliferación de numerosos agentes patógenos. Entre los muchos problemas de índole sanitario que presenta este tipo de agricultura intensiva se encuentran los daños producidos por nematodos fitopatógenos (Sarduy *et al.*, 2016).

En este sentido, se han estudiado y aplicado prácticas de manejo de estos nematodos con vistas a lograr disminuir sus poblaciones por debajo del umbral de daño con resultados satisfactorios tanto para campo abierto como en la producción protegida de hortalizas (Casanova *et al.*, 2003).

Entre estas tácticas se destacan la aplicación de materia orgánica (Mcguire, 2004) la biofumigación (Gómez *et al.*, 2006) y solarización del suelo, uso de rotaciones de cultivos donde se introducen variedades no susceptibles, tolerantes y porta injertos resistentes (Migue, 2004) aplicación de control biológico (Ferry, 2000) y cultivos de ciclo corto, tales como el rabanito (*Raphanus sativus* L.) y lechuga (*Lactuca sativa* L.) como plantas trampas (Cuadra *et al.*, 2000) entre otras.

Sin embargo, en los sistemas de producción protegidas de hortalizas de nuestro país, no se emplean de forma correcta muchas de estas prácticas. En estos prevalece el método químico para el control de las plagas (Casanova *et al.*, 2003). El Basamid es uno de los productos que se emplean para el disminuir la afectación de plagas edáficas, formulada y producida por la firma Bayer, a pesar de poseer una alta efectividad encarece el costo de producción de las instalaciones, unido a su efecto tóxico (Cuadra *et al.*, 2000).

La utilización de plantas como alternativa para disminuir las poblaciones de nematodos ha sido una de las prácticas que se suman en manejo integrado de estos organismos, tanto en sistemas de producción de campo a cielo abierto como en cultivo protegido.

Esta posibilidad se basa en la producción de uno o más compuestos bioquímicos que influyen en el crecimiento, supervivencia o reproducción de otros organismos (el fenómeno alelopático). Además, estos compuestos conocidos como

aleloquímicos y pueden inducir efectos benéficos sobre la planta (alelopatía positiva) o perjudiciales (alelopatía negativa). Este es el fenómeno que implica la inhibición directa de una especie por otra ya sea vegetal o animal, usando sustancias tóxicas o disuasivas (Espinosa, 2012).

Entre las familias de plantas más empleadas con efectos nemátocidas se encuentran las asteraceae, dentro de ellas se puede mencionar la Flor de muerto (*Tagetes erecta* L), Piretro de Dalmacia (*Tanacetum inerariifolium* L.), Piretro del Cáucaso (*T. coccineum* (Willd.) Grierson), Raíz de piretro (*Anacyclus pyrethrum* DC.), Artemisa (*Artemisa vulgaris* L.) *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray, *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski entre otras. Todas estas presentan sustancias del tipo piretroides, tagetones, occimenes u occimenonas que son responsables de diferentes efectos, entre los que se encuentra el nemátocida (Razzaghi and Rai, 2013).

Problemática

- En las casas de cultivo de la empresa Agropecuaria “Valle del Yabú” se encuentran afectaciones por nematodos en el cultivo del pimiento. Hasta el momento no se emplean alternativas biológicas o de origen natural para disminuir estos daños. Las producciones se encarecen por las constantes aplicaciones y dosis cada vez más elevadas de productos químicos con acción nemátocida.

Hipótesis

- En condiciones in vitro los extractos acuosos de *Tithonia diversifolia*, *Tagetes erecta* L y *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski pueden provocar la mortalidad de nematodos asociados al pimiento debido a la acción nemátocida de las sustancias que presentan.

Objetivo General

Determinar el efecto alelopático de extractos acuosos de *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray, *Tagetes erecta* L y *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski sobre nematodos fitopatógenos en híbridos de pimiento, así como su fitotoxicidad sobre los híbridos “Grandísimo y “LPD – 5”.

Objetivos Específicos:

1. Determinar la especie de nematodos con mayor incidencia en el cultivo del pimiento bajo las condiciones de casa de cultivo la empresa Agropecuaria “Valle del Yabú”.
2. Evaluar en condiciones in vitro el efecto alelopático del extracto acuoso de *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray, *Tagetes erecta* L y *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski sobre la especie de nematodo de mayor insidencia asociados a híbridos de pimiento bajo condiciones de casa de cultivo.
3. Determinar, en condiciones in vitro, la fitotoxicidad del extracto acuoso de *Tithonia diversifolia*, *Tagetes erecta* L y *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski sobre la germinación y desarrollo de los híbridos de pimiento “Grandísimo y “LPD – 5”.

Capítulo 2. Revisión Bibliográfica

2.1 El Pimiento (*Capsicum annum* L.)

El pimiento es el fruto de una planta herbácea del mismo nombre que pertenece a la familia de las *Solanáceas* al igual que el jitomate (*Solanum lycopersicum*) y la berenjena (*Solanum melongena*), solo que este pertenece al género *Capsicum*, donde se ubican todo tipo de chiles, guindillas y ajíes, que son los principales nombres regionales alrededor del mundo.

Este género fue establecido por *Carlos Lineo* en 1753 y su nombre deriva de las palabras latinas cápsula (caja) y kopto (picar), esto para hacer alusión a que las semillas se encuentran en una baya, que es una especie de caja que las resguarda. En la actualidad se conocen aproximadamente 27 especies de este género (Olmo 2012).

Durante muchos años, para la producción de pimientos en Cuba se utilizó fundamentalmente variedades e híbridos, la mayoría de ellos, introducidos desde los Estados Unidos. Al triunfo de la Revolución se mantuvieron las más adaptadas a nuestras condiciones edafoclimáticas y se continuaron importando semillas desde Bulgaria, URSS, Hungría, Francia, España y Japón.

Con el desarrollo de las ciencias biológicas y agronómicas en el país se crearon gran cantidad de instituciones y Centros investigativos. Ellos han aportado a la producción nuevas variedades que, no solo alcanzan un alto nivel productivo, sino además resistencia a enfermedades, virosis, altas temperaturas y salinidad entre otros factores limitantes. Este potencial posibilita la disminución de importación de semillas en el exterior.

2.1.1 Origen, descripción botánica y clasificación taxonómica del pimiento

El pimiento es originario de las regiones tropicales y subtropicales de Centro y Sur América. Se considera a México y Guatemala como las primeras áreas de desarrollo de la variedad. Posteriormente fue dispersado por todo el continente americano por las migraciones pre-colombinas. De estudios botánicos realizados, se ha establecido que el origen y domesticación de esta importante solanácea es el Nuevo Mundo, ya que en ninguna otra parte del planeta se encuentran evidencias de la existencia de este género. A la llegada de los españoles a América, lo encontraron creciendo en tierras fértiles y además presenciaron cómo lo consumían los habitantes del nuevo continente (Jaramillo *et al.*, 2012).

Esta planta pertenece a la familia de las Solanáceas, dada su complejidad botánica y amplia gama de frutos como consecuencia de una variabilidad genética, existen diferentes denominaciones para este cultivo, pero el nombre más generalizado es el de *Capsicum annuum* L. Esta denominación se debe a la capsicina un alcaloide que le confiere una amargura característica a su carne. A pesar de la gran cantidad de especies en este género la más extendida es precisamente *Capsicum annuum* (Uroz, 2012).

La planta presenta un sistema radical pivotante y profundo, en dependencia de las características del suelo, con un número elevado de raíces adventicias que tanto horizontalmente como verticalmente pueden alcanzar una longitud comprendida entre 0.5 m a 1 m (Uroz, 2012).

El tallo es de crecimiento limitado, erecto y se lignifica ligeramente, cuando la planta adquiere cierta edad, se ramifica entre los 10 cm y 40 cm en dos o tres ramas "cruz", emite 2 o 3 ramificaciones (dependiendo de la variedad) que a su vez se bifurcan en forma dicotómica, hasta el final de su ciclo (los tallos secundarios se bifurcan después de brotar varias hojas y así sucesivamente). De las axilas de las hojas se originan tallos secundarios sobre los cuales se forman frutos; más tardíos que los que se forman sobre el tallo principal (Flor *et al.*, 2007).

Las hojas son enteras, lampiñas y lanceoladas, con un ápice muy pronunciado (acuminado) y un pecíolo largo y poco aparente. El haz es glabro (liso y suave al tacto) y de color verde más o menos intenso (dependiendo de la variedad) y brillante. El nervio principal parte de la base de la hoja, como una prolongación del pecíolo, del mismo modo que las nerviaciones secundarias que son pronunciadas y llegan casi al borde de la hoja. La inserción de las hojas en el tallo tiene lugar de forma alterna y su tamaño es variable en función de la variedad, existiendo cierta correlación entre el tamaño de la hoja adulta y el peso medio del fruto.

Las flores aparecen solitarias en cada nudo del tallo con inserción en las axilas de las hojas. Son pequeñas y constan de una corola blanca. La polinización es autogama, aunque puede presentarse un porcentaje de alogamia que no supera el 10%.

Su Fruto es una baya hueca, semicartilaginosa y deprimida, de color variable (verde, rojo, amarillo, naranja, violeta o blanco); algunas variedades van pasando del verde al naranja y luego al rojo según el grado de maduración. Su tamaño es variable, pudiendo pesar desde escasos gramos hasta más de 500 gramos (Flor *et al.*, 2007).

La semilla tiene una forma aplastada lenticular u oval de superficie relativamente lisa, sin aspecto pubescente o tormentoso. En su mayoría son de color amarillento y se sitúan en la región de la placenta central (corazón), en la cual están insertadas y que al separarse presentan una cicatriz en la zona del funículo (Staller, 2012).

Desde el punto de vista agronómico las variedades de pimiento pueden dividirse en dos grupos (Parcero, 2014).

1. Variedades dulces: frutos de buen tamaño, son las que se cultivan en invernaderos y al aire libre para su consumo en fresco y la industria de conserva. Dentro de estas variedades hay diferentes tipos de clasificaciones en función de las dimensiones del fruto.

Tipo A: sección longitudinal cuadrangular y largo aproximadamente igual al ancho.

Tipo B: sección longitudinal rectangular y largo mayor ancho.

Tipo C: sección longitudinal triangular.

2. Variedades picantes: frutos largos y delgados. Se utilizan para encurtidos.

Según Carlos Linneo su ubicación taxonómica es:

| | |
|---------------|------------------------|
| Reino: | Plantae |
| División: | Magnoliophyta |
| Clase: | Magnoliopsida |
| Orden: | Solanales |
| Familia: | Solanaceae |
| Género: | <i>Capsicum</i> |
| Especie: | <i>Capsicum annuum</i> |

2.2 Los nematodos fitopatógenos

El estudio y conocimiento de los nematodos fitopatógenos es de vital importancia para la agricultura, sus efectos perjudiciales sobre los cultivos se subestiman frecuentemente por los agricultores y técnicos agrícolas.

Debido a los síntomas inespecíficos que producen, suelen confundirse con desordenes nutricionales, estrés hídrico, problemas de fertilidad del suelo, así como con otras infecciones causadas por hongos y bacterias. No obstante, diversas fuentes han estimado que los nematodos reducen entre un 12% y 20% la producción agrícola mundial lo que representa aproximadamente unos 135.000 millones de euros anuales (Hassan *et al.*, 2013).

Entre los muchos problemas de índole fitopatológico que presenta este tipo de agricultura intensiva se encuentran los daños producidos por nematodos

fitopatógeno (Staller, 2012). Las mayores afectaciones económicas encontradas son por nematodos “formadores de agallas en raíces” o especies del género *Meloidogyne*. Estos son los que más limitan la producción hortícola, las pérdidas causadas han sido estimadas en torno al 12,0%, pero en el caso de *Meloidogyne spp.* varían entre 15,0% y el 60% de la cosecha. Dentro de los invernaderos, el promedio de la superficie infestada por los nematodos está sobre el 20% y las mermas de producción cercanas al 33% (Flor *et al.*, 2012). Esta estimación de pérdidas probablemente sería aún mayor si no se usaran medidas de control nematológico.

2.2.1 Características generales de los nematodos fitopatógenos

Los nematodos son los organismos pluricelulares más numerosos en los agroecosistemas; se conocen unas 20.000 especies y se pueden encontrar en densidades de hasta 30 millones por metro cuadrado. Se encuentran como organismos de vida libre y se alimentan de hongos, bacterias, protozoarios u otros nematodos, o como parásitos de plantas y animales; además, forman parte importante de las cadenas tróficas del suelo (Piedra, 2008).

También son organismos invertebrados evolutivamente exitosos, diversos y abundantes en sistemas acuáticos y edáficos. Son quizás los animales multicelulares más numerosos. Pueden ser encontrados en casi todos los ambientes, desde el cálido trópico hasta el helado ártico y antártico, muchos son parásitos patógenos de las plantas y animales; incluyendo los humanos. Otros pueden cumplir funciones benéficas muy importantes en los suelos de actividad agrícola, muchos y varios géneros de nematodos son antagonistas y ayudan al control de organismos que causan importantes enfermedades a las plantas (Agrios, 2005).

Estos causan enfermedades en las plantas de diversas formas. En primer lugar, dañan directamente a las células y tejidos, se alimentan de ellos o los perforan. Dependiendo de la planta huésped y del nematodo implicado pueden ocasionar, abultamiento de las raíces, agallas, lesiones o raíces acortadas y atrofiadas.

Estos daños pueden alterar la extracción de nutrientes y agua. Los síntomas en la parte aérea son muy variados, desde marchitez a enanismo, pasando por amarillamiento más o menos intensos. El sistema radical de las plantas afectadas se muestra de tamaño reducido. Las larvas tras desarrollarse parcialmente dentro del huevo, salen del mismo y se mueven en el suelo hasta alcanzar una raíz susceptible, sobre la cual comienza a alimentarse. Las larvas machos emigran de las raíces, mientras que las hembras permanecen en ella y fecundadas o no por los machos, comienzan a producir huevos dentro o fuera de estas (Agrios, 1996).

Dos o tres días después de la penetración y establecimiento de la larva en la raíz, algunas de las células vegetales alrededor de la cabeza comienzan a agrandarse y dividirse. De esta forma dan lugar a células gigantes (Agrios, 1996).

2.2.2. Principales especies que afectan al pimiento en casas de cultivo

Existen numerosas familias de nematodos que afectan las plantas cultivadas, cada una de ellas presenta un rango más o menos amplio de plantas hospedantes.

Entre ellas podemos citar a: *Hoplolaimidae*, *Dolichodoridae*, *Paratylenchidae*, *Heteroderidae* y *Meloidogynidae* (Coyne *et al.*, 2009).

Los hoplolaimidos son nematodos generalmente grandes y los detalles estructurales son claramente visibles. Después de la fijación con calor (80 °C) el cuerpo de los hoplolaimidos toma forma de espiral razón por la cual son denominados “nematodos espirales”. La boca contiene un estilete robusto y entre las características distintivas están: área labial sobresaliente, región cefálica fuertemente esclerotizada, hembras con dos gónadas y una glándula del esófago la cual traslapa el intestino.

Algunos géneros comunes de esta familia son: *Hoplolaimus*, *Helicotylenchus*, *Scutellonema* y *Paratylenchus*. Este último es muy similar a *Rotylenchus*, sin embargo, una de sus principales características es que las glándulas del esófago no traslapan el intestino (Bongers, 2011).

Entre las características distintivas de la familia *Dolichodoridae*, se pueden mencionar las siguientes: estructura cefálica usualmente poco desarrollada,

estilete corto y la cutícula es generalmente anillada. La región labial es baja, las glándulas del esófago raramente traslapan el intestino y la hembra usualmente tiene dos gónadas.

Tylenchorhynchus annulatus y *T. brassicae* son los nematodos fitoparásitos, dentro de esta familia, de mayor importancia en regiones tropicales y subtropicales. Una característica muy importante a nivel de género es el número de incisuras longitudinales en el campo lateral (Bongers, 2011).

Con relación a la familia *Paratylenchidae* se ha reportado que son organismos pequeños, su tamaño no supera los 0.5 mm de largo. Vivos presentan un movimiento característico y adquieren forma de C cuando están relajados. Uno de los miembros más comunes es *Paratylenchus*, sus especies tienen un estilete mayor a 36 μm y se conocen también como *Gracilacus*. Esta familia incluye nematodos endoparásitos, esto quiere decir que el ciclo de vida (reproducción, alimentación y crecimiento) se lleva a cabo dentro de las raíces de las plantas.

Una familia cercanamente relacionada es *Tylenchulidae* que incluye a *Tylenchulus semipenetrans*, fitoparásito muy importante en los trópicos y subtrópicos.

Otro género de importancia económica de esta familia es *Radopholus similis*, responsable de la destrucción de plantaciones de banano. Costa Rica invierte anualmente miles de dólares en nematicidas para combatir a este nematodo.

A nivel mundial adquiere gran significación la familia *Heteroderidae*. Así por ejemplo en 1990 en los países bajos, se utilizó un total de 22.000 toneladas de nematicidas, de los cuáles el 60% fue para combatir el nematodo quiste de la papa (*Globodera rostochiensis*) (Coyne *et al.*, 2009).

Globodera se identifica fácilmente por la forma del quiste. Para la identificación de especies, se realizan cortes de la región ano-genital, los cuáles se montan en un portaobjetos y se estudian al microscopio. También es posible lograr la identificación de especies estudiando machos y juveniles (Nickle, 1990).

La familia *Meloidogynidae* está estrechamente relacionada con la *Heteroderidae*. Uno de los géneros más importantes es *Meloidogyne* el cual contiene alrededor de

80 especies, la mayoría restringidas a regiones cálidas. Las hembras se identifican también por el patrón de marcas cuticulares alrededor de la abertura vulvar. Este patrón de marcas se denomina diseño perineal y a diferencia de *Globodera* que tiene una proyección en forma de cono, en el caso de *Meloidogyne* la abertura vulvar es plana (Cantuña, 2013).

El nombre de nematodos noduladores de la raíz se refiere a los nódulos característicos asociados con este tipo de nematodos. Este género es especialmente importante en la agricultura tropical (Da Mata Dos Santos, 2016). El primer estadio ocurre dentro del huevo (J1), posteriormente los juveniles del segundo estadio (J2), eclosionan. Estos pueden vivir durante un mes libre en el suelo, tienen energía suficiente para moverse hasta localizar y penetrar la raíz, donde establecen su sitio de alimentación, usualmente dentro del periciclo y el tejido vascular (Cruz, 2013). Se reproducen y se alimentan de células vivas dentro de las raíces de las plantas en los que inducen agallas pequeñas y grandes, o nudos en la raíz (Cantuña, 2013).

Los nematodos pueden producir pérdidas en los cultivos mediante tres vías diferentes: i) como patógenos por sí mismos (*Meloidogyne*, *Globodera*, *Pratylenchus* y otros), ii) como vectores de otros patógenos (*Xiphinema*) y iii) mediante interacciones con otros patógenos, (*Mesocriconema* y *Pseudomonas*), como es el caso de nematodo Nodulador (*Meloidogyne spp.*) es favorecida por la siembra continuada de cultivos altamente susceptibles como las solanáceas (pimentón, ají, papa, tomate) y la ausencia de rotación con cereales. Existen también innumerables malezas que son hospedantes de nematodos conservando las poblaciones de estos organismos en raíces y suelo (Jaramillo *et al.*, 2007).

Actualmente se recomienda la implementación de procesos de un manejo integrado basados en los principios de prevención, reducción del inóculo del patógeno o de las densidades de sus poblaciones y aumentar el uso de plantas tolerantes o resistentes. Ello trae como consecuencias mejoras productivas favorables, lo cual se traduce en un incremento positivo en el aspecto económico y amigable desde el punto de vista medioambiental.

2.3 La alelopatía. Conceptos básicos y generalidades

El fenómeno de la alelopatía ha sido plasmado en documentos que datan unos cuantos siglos A.C. Un documento tan antiguo como del año 300 A.C. relata que muchas plantas cosechadas (chícharo, cebada, frijol forrajero) destruyeron malas hierbas e inhibieron el crecimiento de otras cosechas (Silva, 2008).

Alelopatía se refiere a cualquier proceso donde haya metabolitos secundarios producidos por plantas, microorganismos, virus y hongos que influyen en el desarrollo de la agricultura y los sistemas biológicos (Narwal, 2001). Las estrategias alelopáticas apuntan a la reducción de la contaminación ambiental y a mantener un balance ecológico en la flora y la fauna, con la disminución en el uso de pesticidas (insecticidas, fungicidas, nematocidas y herbicidas) sustituyendo estos por compuestos naturales (plantas y microorganismos); los aleloquímicos y fitoquímicos están libres de todos estos problemas asociados con la presencia de pesticidas.

Es un fenómeno biológico por el cual un organismo produce uno o más compuestos que influyen en el crecimiento, supervivencia o reproducción de otros organismos. Estos compuestos son conocidos como aleloquímico y pueden conllevar a efectos benéficos (alelopatía positiva) o efectos perjudiciales (alelopatía negativa) a los organismos receptores (Sampietro, 2003).

El empleo de plantas alelopáticas resulta ser unas de las alternativas agroecológicas para combatir las plagas, enfermedades y elevar el rendimiento de cultivos. Esta se define como el efecto perjudicial o estimulador que pueden ejercer microorganismo y plantas sobre otras, mediante la liberación al medio de sustancias químicas, llamadas alelo químicos (Sampietro, 2001, Bruneton, 2001, Razzaghi and Rai, 2013).

Los aleloquímicos no son más que compuestos derivados del metabolismo secundario sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es letal para el organismo, al contrario que los metabolitos primarios. Los metabolitos secundarios intervienen en las

interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente (Tharayil, 2009). Además participan en la defensa contra predadores y patógenos, para atraer a los polinizadores o a los dispersores de las semillas (Lorenzo and González, 2010). Poseen una distribución restringida en el reino de las plantas, y algunos solo se encuentran en una especie o grupo, por lo que a menudo son útiles en la Botánica Sistemática.

Las Asteraceae son muy ricas en productos metabólicos, la mayoría de estos son producidos y almacenados en sistemas secretorios especiales. Entre estos se encuentran, terpenos, diterpenos, triterpenos, sesquiterpenos, ácidos grasos, aminoácidos, alcaloides, flavonoides, cumarinas, y otros (Danos, 1988).

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden ser divididos en 3 grandes grupos, con base en sus orígenes biosintéticos:

- 1. Terpenoides.** Todos los terpenoides, tanto los que participan del metabolismo primario como los más de 25.000 metabolitos secundarios, son derivados del Isopentenildifosfato o 5-carbono isopentenildifosfato (IPP) que se forman en la vía del ácido mevalónico. Es un grupo grande de metabolitos con actividad biológica importante (Choling, 2006).

Están distribuidos ampliamente en las plantas y muchos de ellos tienen funciones fisiológicas primarias. Unos pocos, como los que forman los aceites esenciales, están restringidos a solo algunas.

- 2. Compuestos fenólicos y sus derivados.** Los más de 8.000 compuestos fenólicos que se conocen están formados o por la vía del ácido shikímico o por la vía del malonato/acetato. Entre ellos se encuentran gran cantidad de compuestos alelopáticos. Los fenoles simples con el cumárico, caféico y felúrico presentan diferentes acciones desde la inhibición de la germinación de semillas (Hernández, 2015) hasta la mortalidad de nemátodos (El-Rokiek and El-Nagdi, 2011). Otros de mayor complejidad como los taninos y flavonoides se encuentran en gran cantidad de plantas sus efectos

alelopáticos son muy variables, dependen de la concentración y tolerancia del organismo receptor (Hassan and Mathesius, 2011, Reiner *et al.*, 2016).

3. Alcaloides y compuestos nitrogenados. Los alrededores de 12.000 alcaloides que se conocen, que contienen uno o más átomos de nitrógeno, son biosintetizados principalmente a partir de aminoácidos. Los alcaloides poseen una gran diversidad de estructuras químicas (Espinosa, 2012). Son fisiológicamente activos en los animales, aún en bajas concentraciones, por lo que son muy usados en medicina. Ejemplos conocidos son la cocaína, la morfina, la atropina, la colchicina, la quinina, y la estricnina.

En un sin número de plantas se han identificado muchos de estos metabolitos. Sus propiedades insecticidas, acaricidas y nematocidas, las convierten en herramientas útiles para el manejo de plagas agrícolas (Taiz *et al.*, 2006). La mejor forma de aprovechar estos compuestos es mediante su extracción con el uso de diferentes solventes como agua, alcohol, éter etílico, aceites, cetonas y benceno. La maceración y decocción de los tejido vegetales son una de los mejores métodos para preparar los extractos (Arboleda *et al.*, 2012).

El reconocimiento de propiedades biológicas de muchos metabolitos secundarios ha alentado el desarrollo de este campo, por ejemplo, en la búsqueda de nuevas drogas, antibióticos, insecticidas y herbicidas. Además, la creciente apreciación de los altamente diversos efectos biológicos de los metabolitos secundarios ha llevado a reevaluar los diferentes roles que poseen en las plantas, especialmente en el contexto de las interacciones ecológicas (Lorenzo and González, 2010).

Las investigaciones en alelopatía en algunos casos permiten plantear estrategias orientadas a una mayor sustentabilidad de los sistemas de producción agrícola, con un menor consumo en insumos contaminantes. Para lograr un mejor aprovechamiento de los agentes alelopáticos es necesario ampliar el conocimiento de los mismos en relación a la rotación de cultivos, manejo de residuos, prácticas de labranza y la implementación de control biológico de malezas (Hernández, 2015).

2.3.2 Plantas alelopáticas con efectos nematocidas

Los efectos alelopáticos de las plantas han sido reportados por varios autores, sus estudios demuestran que pueden ser una vía de disminución de las poblaciones de nematodos en el suelo.

Algunas investigaciones realizadas en Venezuela con extractos acuosos y abono verde de: *Cyperus rotundus* L. (cyperaceae), *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (apocinaceae) y *Leucaena leucocephala* L. (fabaceae) señalan el efectivo control sobre *M. incognita*. Para el caso de *C. procera* su efecto fue comparable con el control logrado con el nematocida carbofuran (González *et al.*, 2001).

El carácter nematocida del extracto acuoso de las hojas de esta planta produjo una mortalidad de 97,5% en los juveniles de segundo estadio (J₂) de *M. incognita* y *M. exigua*; 87,5% en los J₂ de *Tylenchulus semipenetrans* Cobb y 57,5% en hembras jóvenes de *Rotylenchulus reniformis* (Reina *et al.*, 2002).

Algunas plantas aromáticas y medicinales se han probado sobre diferentes géneros de nematodos fitopatógenos. Sus aceites esenciales mostraron la disminución significativa de poblaciones de estos organismos en el suelo. Entre ellas *Ruta graveolens* L. (rutceae), *Datura stramonium* L. (solanaceae), *Leucaena leucocephala* L. (fabaceae) y *Tridax procumbens* L. (asteraceae) causaron altos porcentajes de mortalidad sobre *M. incognita* (Steling *et al.*, 2004).

Otros aceites esenciales como el geraniol (en *Pelargonium graveolens* L'Hér., geraniaceae) y Timol presentes resultaron ser de alta efectividad sobre *M. arenaria*, *Heterodera glycines* Ichinohe y *Paratrichodorus minor* Colbran (Siddiqi) (Leela *et al.*, 1992, Soler-Serratosa *et al.*, 1995).

El método de tratamiento a las plantas susceptibles varía según las características de los compuestos alelopáticos. Al tratar las raíces del pimentón (*Capsicum annum* L.) con el aceite esencial de tártago (*Ricinus communis* L.) se reduce la incidencia de *M. incognita* (Akhtar and Mahmood, 1996). De igual forma, las raíces de este cultivo, previo al trasplante, sumergidas en la solución acuosa al 0,5% de las plantas *Ocimum sanctus* L., *O. basilicum* L., *Cymbopogon winterianus* Jowitt.,

Eucaliptus sp., y *Vitex negundon* son capaces de causar 100% de mortalidad en *M. incognita* (Gill *et al.*, 2001).

Plantas antagónicas o alelopáticas a nemátodos, también producen o secretan sustancias como polifenilos, glucosinolatos, glucósidos, alcaloides, lípidos, terpenoides, esteroides, fenoles, triterpenoides a los cuales se les atribuyen propiedades nematicidas, (Bôhm *et al.*, 2009, Akhtar *et al.*, 2015). Así, especies como *Sesamun indicum* L (ajonjolí), *Origanum vulgare* L (orégano), *Chrysanthemum morifolium* (crisantemo), *Raphanus sativus* (rábano), *Brassica oleracea* var. capitata (repollo), *Tagetes* sp. (tagete), *Brassica napus* (canola), y *Brassica nigra* (mostaza) secretan durante su desarrollo o en su desintegración en el suelo algunas de estas sustancias. En este sentido, la presencia de glucosinolatos, en algunas *brassicaceas*, durante su descomposición produce compuestos conocidos como iso-tiocianatos y nitrilos, los cuales suprimen las poblaciones de nemátodos (Avila *et al.*, 2008).

2.4 Descripción botánica y taxonómica de las plantas en estudio

2.4.1. *Tithonia diversifolia*

Es una especie de plantas con flores de la familia de Asteraceae que comúnmente es conocida como árbol maravilla, falso girasol, quil amargo, tornasol mexicano, girasol mexicano, margaritona, árnica de la tierra, girasol japonés o crisantemo de Nitobe.



Son hierbas perennes, erectas, 1–4 m de alto; tallos evidentemente acostillados y canaliculados, casi glabros. Hojas superiores reducidas y sin lobos, las restantes 3-lobadas, 15 (–20) cm de largo y hasta 12 cm de ancho; pecíolos inferiores auriculado-abrazadores

en la base, los superiores cortos y poco definidos. Pedúnculos 10–15 cm de largo; filarias en 4 series, todas o la mayoría ampliamente redondeadas, estriadas, casi completamente glabras; páleas 10–13 mm de largo, ápice terminando en una punta fuerte, no conspicuamente exertas; flósculos del radio 7–14, las lígulas lineares, 40 (69) mm de largo, amarillas; flósculos del disco 80–120. Aquenios 5–6 mm de largo, puberulentos; vilano de escamitas fimbriadas fusionadas y 2 escamas aristadas en los ángulos marginales.

| | |
|--------------------|-------------------------------|
| Reino: | Plantae |
| División: | Magnoliophyta |
| Clase: | Eudicotyledoneae |
| Orden: | Asterales |
| Familia: | Asteraceae |
| Subfamilia: | Asteroideae |
| Tribu: | Heliantheae |
| Subtribu: | Helianthinae |
| Género: | <i>Tithonia</i> |
| Especie: | <i>T. diversifolia</i> |

2.4.2. *Tagetes erecta* L

Son hierbas anuales o perennes o arbustos, glabros o pubescentes, generalmente con olor fuerte; tallos delgados o robustos, frondosos, frecuentemente muy ramificados. Hojas opuestas en la parte inferior, opuestas o alternas en la superior, simples y enteras a pinnatidividas o compuestas, márgenes enteros a serrados, variadamente punteado-glandulares.



Capitulescencias cimosas o solitarias, pedúnculos cortos a alargados, delgados a marcadamente fistulosos; capítulos radiados o raramente discoides, pequeños a grandes; involucros cilíndricos, fusiformes o campanulados; filarias en 1 serie, connadas casi hasta los ápices, variadamente punteadas; receptáculos planos a convexos, desnudos; flósculos del radio pocos a muchos, fértiles, las lígulas pequeñas a grandes, blancas, amarillas, a veces con manchas cafés, el tubo delgado; flósculos del disco perfectos, fértiles, pocos a muchos, las corolas amarillas o anaranjadas, igual o desigualmente 4–5-lobadas; ramas del estilo largas, delgadas. Aquenios alargados, delgados, con varios ángulos, cortamente pubescentes o glabros; vilano de cerdas y/o escamas (Martínez *et al.*, 2001).

| | |
|-------------------|------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Asterales |
| Familia | Asteraceae |
| Subfamilia | Asteroideae |
| Tribu | Tageteae |
| Género | <i>Tagetes</i> |
| Especie | <i>T. erecta</i> |

2.4.3 *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski

Es una planta herbácea perenne que alcanza 30-70 cm de altura. Raíz gruesa que anualmente emite varios tallos erectos y redondos. Las hojas son palmeadas y con fuertes divisiones, en su mayoría brotan directamente de la raíz. Las flores de color amarillo brillante tienen cinco pétalos y gran cantidad de estambres. Estas plantas contienen anemonina, una sustancia muy tóxica para los animales y los seres humanos. De hecho, los



herbívoros pastan las hojas de estas plantas con gran dificultad, y sólo después de un buen secado que evapora las sustancias más peligrosas. Incluso las abejas evitan libar su néctar. En la piel humana estas plantas pueden crear ampollas (dermatitis), mientras que en la boca pueden causar dolor intenso y ardiente de las membranas mucosas.

2.7.1 Clasificación taxonómica de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski

| | |
|-------------------|----------------------------|
| Reino | Plantae |
| Subreino | Tracheobionta |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Subclase | Asteridae |
| Orden | Asterales |
| Familia | Asteraceae |
| Subfamilia | Asteroideae |
| Tribu | Heliantheae |
| Género | <i>Sphagneticola</i> |
| Especie | <i>S. trilobata</i> |

Capítulo 3. Materiales y Métodos

El estudio se realizó en la Unidad de Casas de Cultivos Protegido perteneciente a la empresa agropecuaria Valle del Yabú, ubicada en dirección noroeste a 7 km del municipio de Santa Clara en la provincia Villa Clara.

3.1 Identificación de nematodos en el cultivo de pimiento en casas de cultivo

➤ **Colecta del material (suelo y planta-raíz)**

Para identificar y determinar la cantidad de nematodos en el suelo se tomaron diez muestras de 100 g (aproximadamente) en cada uno de los cinco puntos de las casas de cultivo.

Estas se colectaron en un sistema de círculos concéntricos 5 cm y 15 cm del tronco de la planta. Se tomaron 5 muestras equidistantes en el círculo interior y cinco en el exterior a una profundidad de 10 – 20 cm. Posteriormente se unificaron y colocaron en bolsas de papel para su traslado al laboratorio. Su almacenamiento se hizo a 4°C hasta su uso (Martínez *et al.*, 2014).

Para el caso de las muestras vegetales se identificaron plantas con síntomas de infección por nematodos (Anexo 1) y se tomaron las raíces hasta 30 cm de profundidad. Se trasladaron hasta el laboratorio de forma similar a las de suelo.

➤ **Extracción de nematodos en muestras de suelo.**

De la muestra de suelo unificada se tomaron tres sub-muestra de 300 ml. Por separado a cada una se le agregaron dos litros de agua corriente, se agitó fuertemente durante 1 min para lograr su hidratación completa y ruptura de agregados en componentes más finos. Posteriormente se deja sedimentar en reposo por 10 minutos. Esta suspensión se pasa a través de tamices de luz de malla de 40 y 60 (250 y 350 μm , respectivamente).

El material colectado en estos tamices se desecha. La solución de suelo se vuelve a pasar por un tamiz de 400 mallas (37 μm) (Castilla, 2015).

Los nematodos se colectaron mediante el método de flotación en sacarosa (Jenkins, 1964). Para ello se centrifugó, en tubos de 50 ml, la totalidad de la suspensión acuosa a 3500 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se descarta. Posteriormente, los sedimentos dentro de los tubos se re suspendieron en una solución de sacarosa (456g L⁻¹) y se centrifugó nuevamente a 1000 rpm durante un minuto. Los nematodos se colectaron a partir del sobrenadante.

➤ **Extracción de nematodos de muestras vegetales**

Primeramente, se realizó un examen directo en el estereoscopio a baja magnificación. Para ello se tomaron diferentes muestras de las raíces colectadas, se lavaron con agua para eliminar restos de suelo. Esta agua se conservó para su observación a fin de encontrar nematodos en las zonas peri-radicales.

Las raíces, una vez limpias, se colocaron en una capsula de petri con 5 ml de agua, con ayuda de pinzas y agujas de disección bajo estereoscopio se separó la corteza de las zonas dañadas. Los nematodos se colectaron en el agua con ayuda de una micropipeta para su observación al microscopio.

Por otro lado, se empleó el método de Castilla (2015) para extraer los nematodos del tejido vegetal. Para ello cinco muestras de 10g de las raíces se cortaron en pequeñas porciones (2 cm), se llevaron a una licuadora con 50 ml de agua corriente y se batieron por un minuto.

La extracción de los nematodos del jugo resultante de cada muestra se tamizó por cribas de luz de maya 40, 60 y 400 para eliminar los restos vegetales. Posteriormente la solución se procesó de igual forma a la extracción en suelo mediante centrifugación con solución de sacarosa.

➤ **Identificación y conteo de nematodos**

Para la identificación de nematodos se tomaron diez muestras de cada una de las extracciones del área vegetal y de suelo. Estas se seleccionaron bajo estereó con ayuda de una micropipeta y luego se colocaron en portaobjeto debidamente identificadas. Para esta selección se tomaron zonas de alta concentración de nematodos a fin de encontrar una posible elevada diversidad del parásito.

Posteriormente se hicieron las observaciones en microscopio óptico a 40X y 100X.

De forma similar se examinó el tejido vegetal bajo estereoscopio en zonas con evidentes daños de nematodos (agallas y otros) en busca del posible organismo causal.

La identificación se realizó con ayuda de claves taxónómicas y manuales de identificación de nematología vegetal (Bongers, 2011).

3.2 Efecto alelopático de *Tithonia diversifolia*, *Tagetes erecta* L y *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski sobre nematodos fitopatógenos

➤ **Colecta y secado del material vegetal**

Se realizó una colecta de material vegetal en diferentes zonas urbanas en el municipio de Santa Clara de la Provincia de Villa Clara. Se colectaron las partes aéreas (hojas, tallos e inflorescencias); de cinco plantas expuestas al sol, en horario entre las 12:00 pm y 4:00 pm, previendo que tuvieran el menor contenido de agua posible, en los meses de noviembre y diciembre de 2016. Las muestras de los diferentes sitios se unificaron para formar el lote del material vegetal en estudio.

El material vegetal fue secado a la sombra, en condiciones controladas a 25 °C, escasa iluminación y humedad relativa del 40 %, en un periodo de 6 días. Luego se molinaron en un molino de cuchillas (Nossen-8255, RDA) con un tamaño de

tamiz de 0,5 mm. Su almacenamiento hasta el momento de uso fue en frascos plásticos herméticos con tapas, bajo condiciones de oscuridad y baja humedad.

➤ **Obtención de extractos**

Para el estudio se empleó extracción por maceración en reposo durante 48 h. Según estudios anteriores (Martínez, 2016) este método es eficaz para obtener elevada concentración de metabolitos secundarios.

Los extractos se obtuvieron en disolvente de agua destilada. Por lo que se obtuvieron extractos acuosos (alta polaridad). Para ello se tomaron 50g de cada material vegetal, se le añadió 1000 ml del disolvente y se sometió al proceso de extracción por maceración.

Después de este proceso el extracto acuoso solo se redujo el volumen hasta 50 ml. De esta forma se obtuvo un extracto inicial con una concentración de 1 g ml^{-1} , a partir de este se conformarán las concentraciones de trabajo.

➤ **Determinación del Total de Sólidos Disueltos**

Para conocer la concentración real de las sustancias extraídas de cada uno de los extractos se determinó el Total de Sólidos Disueltos. Para ello se tomaron 5 alícuotas de un mililitro del extracto inicial y se diluyeron, cada una, en 19 ml de agua destilada. La medición se realizó con un electrodo acoplado a un pHmetro (InoLab, Alemania) por triplicado para cada una de las muestras.

➤ **Ensayo biológico**

Los nematodos empleados en el ensayo se extrajeron de muestras vegetales. Las zonas afectadas, cortadas a razón de 3 cm, se colocaron en capsulas de petri ($\varnothing=10 \text{ cm}$) estériles con 5 ml de agua destilada, fueron selladas con papel de parafina y encubadas en oscuridad a $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Pasadas 48 h se tomaron muestras de 1ml y se diluyeron en 10 ml de agua destilada. Esto fue necesario dada la elevada densidad poblacional que imposibilita el conteo de los nematodos.

Posteriormente de estas diluciones se tomó 1 ml y colocaron en capsulas de petri estériles de 3 cm de diámetro y se realizó el conteo de nematodos de cada una bajo estereo. Se tomaron datos de estos a fin de realizar cálculos en base al número individual de cada una de las placas. El estudio se realizó por triplicado.

A estas placas se agregó la cantidad correspondiente de extracto para obtener las concentraciones del 5%, 10%, 15%, 20%, 50%, 75% y 100% (Tabla 1).

Tabla 1 Composición de los extractos

| C(%-MS) | V ext (ml) | V H ₂ O (ml) | Vol nem(ml) | Vf(ml) |
|---------|------------|-------------------------|-------------|--------|
| 5 | 0,15 | 1,85 | 1,00 | 3,00 |
| 10 | 0,30 | 1,70 | 1,00 | 3,00 |
| 15 | 0,45 | 1,55 | 1,00 | 3,00 |
| 20 | 0,60 | 1,40 | 1,00 | 3,00 |
| 50 | 1,50 | 0,50 | 1,00 | 3,00 |
| 75 | 2,25 | 0,75 | - | 3,00 |
| 100 | 3,00 | 0,00 | - | 3,00 |

Para el caso de las concentraciones del 75% y 100% no se agregaron los nematodos contenidos en un mililitro del agua de extracción sino se tomaron directamente y se colocaron en la capsula de petri correspondiente. Su número estaba acorde con el promedio de nematodos contados anteriormente para cada placa. Esta variación experimental se debe a la posibilidad de mantener la concentración deseada para estos tratamientos.

El diseño experimental fue completamente al azar con tres réplicas por tratamiento. Para definir estos tratamientos se tuvieron en cuenta los factores:

- 1- Diferentes especies de la familia Asteraceae (*Tithonia diversifolia*, *Tagetes erecta* L y *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski)
- 2- Concentración de cada extracto (5%, 10%, 15%, 20%, 50%, 75%, 100%)
- 3- Híbridos de pimiento (LPD- 5 y Grandísimo)

Los testigos solamente contenían los nematodos.

Las placas se mantuvieron en oscuridad a 27 ± 1 °C por 72h. Cada 24h se realizaron observaciones en el estereoscopio para contar la cantidad de nematodos muertos. Se tomó como evidencia de muerte aquellos nematodos que se mantenían inmóviles cuando se les estimuló la región cefálica (Gamboa *et al.*, 2016). Para el conteo se dividió la capsula de Petri en cuatro secciones y se realizó en recuento de cada una por separado. Posteriormente se sumó el número de nematodos vivos y muertos por cada uno de los tratamientos en los días de evaluación.

A partir de los resultados obtenidos se determinó la CL₅₀ y CL₉₅ por interpolación en una curva de mortalidad con la concentración y la prueba PROBIT del paquete estadístico Stat Graphics v 5 para Windows. Además, se determinó el porcentaje de mortalidad producida en cada uno de los tratamientos. Para detectar las diferencias significativas entre las concentraciones y de los extractos en las diferentes zonas geográficas se realizó un análisis multifactorial en el paquete estadístico Stat Graphics v 5 para Windows.

3.3. Fitotoxicidad de extractos de *T. diversifolia*, *T. erecta* y *S. trilobata* sobre la germinación y desarrollo de plántulas de pimiento

Para el estudio del efecto alelopático de los extractos acuosos de *T. diversifolia*, *T. erecta* y *S. trilobata* sobre la germinación y desarrollo de las plántulas de pimiento se empleó el mismo lote del material vegetal usado para determinar su efecto nematicida.

Para el montaje del experimento se esterilizaron en autoclave por 30 minutos (121°C y 1,2 atm de presión) capsulas de petri (Ø=10 cm) con un papel de filtro en su interior que cubría la placa. Las semillas de los híbridos LPD-5 y Grandísimo fueron esterilizadas con hipoclorito de sodio 1% durante 2 min posteriormente se lavaron cinco veces con suficiente agua estéril para eliminar el desinfectante. (Hernández, 2015).

En cada una de las placas se colocaron 10 semillas del híbrido, posteriormente se adicionó el extracto según en tratamiento correspondiente. (Anexo 2)

Las concentraciones en este ensayo fueron las mismas que en el experimento anterior y se prepararon según indica la tabla 2.

Las placas se encubaron en cámara de germinación con un período de 12 h de luz y $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Cada 24 horas se centraron las semillas germinadas en cada tratamiento.

Pasados 15 días de inicio del tratamiento se determinaron las longitudes de los tallos y raíces de cada una de las plantas germinadas (Hernández, 2015). Se empleó una regla graduada para cuantificar las dimensiones.

Tabla 2 Concentraciones de los extractos para ensayo de fitotoxicidad

| Conc (%-MS) | V _{Ext.} (ml) | V _{aguadest} (ml) |
|----------------|---------------------------|-------------------------------|
| 5 | 0,25 | 4,75 |
| 10 | 0,50 | 4,50 |
| 15 | 0,75 | 4,25 |
| 20 | 1,00 | 4,00 |
| 50 | 2,50 | 2,50 |
| 75 | 3,75 | 1,25 |
| 100 | 5,00 | 0,00 |

Con los datos obtenidos se determinó el Índice de Respuesta Alelopática para la germinación (IRA-G), crecimiento del tallo (IRA-T) y raíz principal (IRA-R) (Hu and Zhang, 2013).

$$\text{Si: } T > M \quad \text{IRA} = \left(\frac{M}{T}\right) - 1$$

$$\text{Si: } T = 0 \quad \text{IRA} = 0$$

$$\text{Si: } T < M \quad \text{IRA} = 1 - \left(\frac{T}{M}\right)$$

Donde T = Testigo; M =Muestra

Capítulo 4. Resultados y Discusión

4.1 Identificación de nematodos en el cultivo de pimiento en casas de cultivo

Las muestras de raíces colectadas en cada uno de los puntos de la casa de cultivo fueron seleccionadas a partir de la observación de los síntomas de posibles afectaciones por nematodos (Figura 1-A).



Figura 1 plantas afectadas por nematodos. A-Síntomas foliares, B-Síntoma radicales.

Los nematodos son parásitos que, en su etapa larvaria, localizan las raíces de las plantas hospedantes y la penetran, en ella clavan su estilete y perforan el tejido, a continuación, ocurre la absorción del contenido celular. La actividad alimenticia produce daños en el sistema radical a nivel de los vasos conductores, estos pueden llegar a deformarse o hipertrofiarse dando pasó a la formación de agallas. Esta acción mecánica sobre la raíz se traduce en su ineficiencia funcional debido a la interrupción del flujo y asimilación de agua y nutrientes (Da Mata Dos Santos, 2016).

Como consecuencia de lo anterior aparece una sintomatología no muy característica, sino más bien un reflejo de la carencia de agua y nutrientes. A pesar de ello, en las condiciones de las casas del cultivo, donde se garantizan los niveles adecuados de desarrollo mediante fertiriego es muy fácil distinguir las plantas afectadas por nematodos.

Los síntomas observados coinciden con los descritos por Urbina (2009), inicialmente ocurre la formación de protuberancias pequeñas, nódulos o agallas en las raíces secundarias, las cuales restringen el movimiento de agua y nutrientes a la planta, y como consecuencia se reduce la capacidad productiva de esta.

Los síntomas secundarios son: retraso en el desarrollo de la planta, debilitamiento generalizado, amarillamiento en las hojas más viejas y una reducción severa de la producción, tanto en cantidad como en calidad. Ocasionalmente, las plantas afectadas por el nematodo pueden presentar marchitamiento foliar temporal en días calurosos o temporadas secas y cuando el ataque del nematodo es muy severo la planta muere (Urbina, 2009).

La simple observación de estas raíces reveló gran cantidad de nodulaciones, consistentes con los producidos por *Meloidogyne spp* (Figura 1-B). Bajo estereoscopio, una vez diseccionadas, se observó la presencia de este nematodo dada sus características morfológicas, nematodos de forma globosa, insertados en las raíces formando nodulaciones con la zona bucal más estrecha (Bongers, 2011).

En las muestras de suelo obtenidas de la rizofera de estas plantas se observaron gran cantidad de nematodos en estados larvario, su identificación a nivel de género resultó de difícil definición, particularmente debido al escaso desarrollo de estructuras que permitieran su caracterización. La más importante de estas es el sistema genital. El nematodo juvenil alcanza el estado adulto después de cuatro mudas, únicamente así tiene un sistema genital totalmente desarrollado (Cardona-Piedrahita, 2014).

A pesar de ello se realizó una prueba exploratoria para inferir una aproximación al género de estos organismos. La fijación de nematodos con calor puede provocar una deformación en sus cuerpos con rasgos identificativos (Coyne *et al.*, 2009), específicamente para los géneros *Rotylenchus* y *Helicotylenchus* los cuales adquieren una estructura forma de espiral (Bongers, 2011). En las muestras analizadas bajo este supuesto no se observó dicha característica (Figura 2).

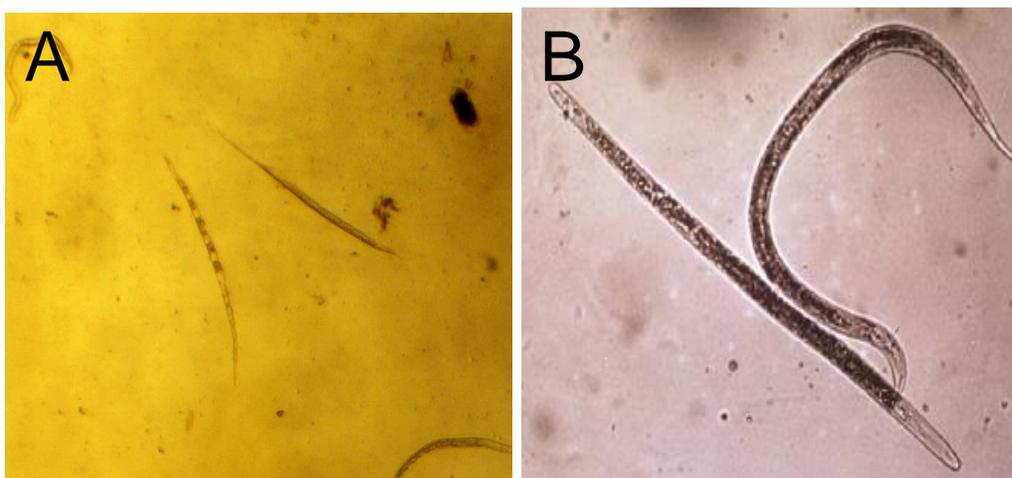


Figura 2 Nematodos fijados en láminas por calor. A. *Meloidogyne* sp B *Helicotylenchus* sp (Coyne *et al.*, 2009).

Una observación minuciosa, a nivel microscópico (100x), de la zona vulvar de las hembras adultas de *Meloidogyne* permitió discernir entre cuál de las cuatro especies (*M. arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* y *M. javanica*) de mayor incidencia en la zona tropical se encontraban en las muestras colectadas (Sasser, 1979).

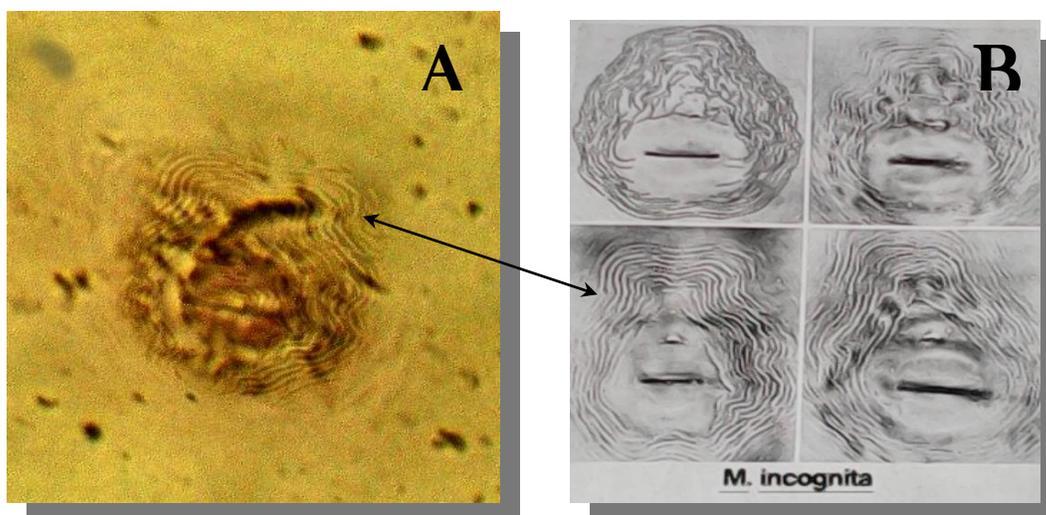
En el estudio se determinó que, de los 20 patrones perineales evaluados, el 82% presentó forma elongada con arco dorsal elevado y cuadrado, campo lateral

ausente, señalado por estrías lisas a onduladas con algunas bifurcaciones en las líneas laterales, estrías en la cola más onduladas que en la región de la vulva y a veces en forma de zig-zag, y con estrías gruesas. Estas características coinciden con las descripciones de *Meloidogyne incognita*. Estas corresponden con las claves taxonómicas de (Bongers, 2011, Nickle, 1990).

Aunque se ha reportado la coexistencia de *M. incognita* con otros nematodos en el suelo como *Pratylenchus* y *Rotylenchus* en las muestras analizadas solamente se encontró *Meloidogyne*.

Figura 3. A-Observación de zona vulvar de *Meloidogyne* obtenida de raíces de pimientos en estudio. B – Modelos perineales de *M. incognita* según Coyne *et al.* (2007)

La reproducción de *M. incognita* es de forma logarítmica durante la época de crecimiento, cada hembra puede depositar hasta 500 huevecillos, de los cuales se estima que el 5% vive para reproducirse. La cifra a esperar después de una cuarta generación puede estar cercana a 15 625 individuos. La población se puede multiplicar por 100 o más cada mes. Este hecho es indicativo de una alta tasa de reproducción y por ende crecimiento poblacional (Frapolli, 2000).



Además, si se suma como factores decisivos: la competencia interespecífica por el espacio vital dentro de las raíces de la planta hospedante (Jaramillo *et al.*, 2007), la susceptibilidad del cultivar ante el parásito (Cardona-Piedrahita *et al.*, 2016) y la

forma intensiva bajo régimen de monocultivo que se emplean en estas casas de cultivo protegido, la severidad del nemátodo nodulador se ve favorecida y por tanto, se eleva la probabilidad de que *M. incognita* sea el único nematodo fitopatógeno que afecta el cultivo del tomate en las casa de cultivo de la Empresa Agropecuaria "Valle del Yabú".

Esta especie es de elevada importancia, puede causar hasta un 90% pérdidas en el cultivo del tomate (Agrios, 2005). Adicionalmente, se ha reportado que es el principal nematodo fitoparásito asociado a este cultivo durante sus diferentes etapas fenológicas. Su importancia se basa en la alta capacidad para dañar las raíces secundarias, reduce así su capacidad de alimentación y desarrollo (Tzortzakakis *et al.*, 2005).

M. incognita habita en climas tropicales y es posiblemente el parásito más dañino de los cultivos en el mundo (Gamboa *et al.*, 2016). Se presenta en la actualidad como principal plaga del tomate bajo sistemas de cultivos protegidos, hidropónicos, huertos intensivos, invernaderos y organopónicos (Cuadra *et al.*, 2008).

4.2 Efecto alelopático de *Tithonia diversifolia*, *Tagetes erecta* L y *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski sobre nematodos fitopatógenos

El Total de Solidos Disueltos (TDS) es el contenido combinado de todas las sustancias inorgánicas y orgánicas contenidas en los extractos. Las mediciones en cada una de las muestras (figura 4) revelaron diferencias significativas entre ellas.

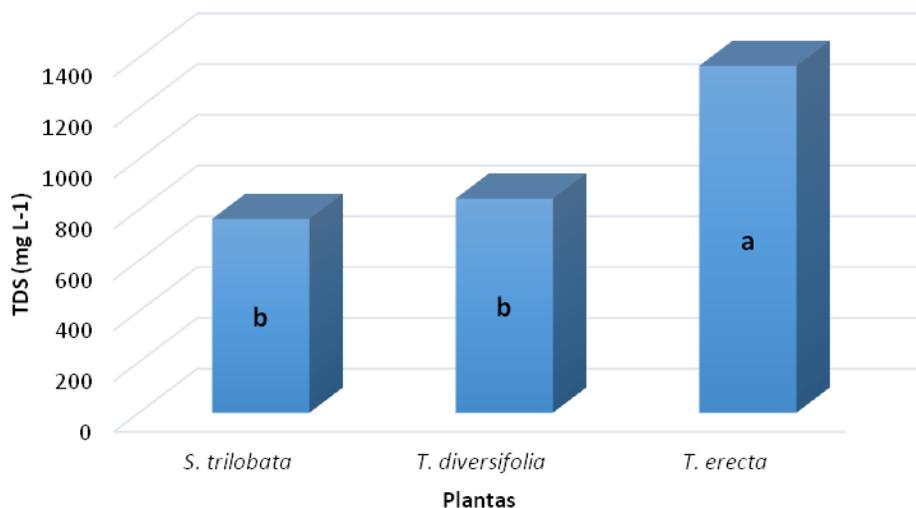


Figura 4. Total, de Sólidos Disueltos de las plantas después de 48 h de maceración

El extracto acuoso de *S. trilobata* no presentó diferencias significativas con el de *T. diversifolia* pero ambos si difirieron con el de *T. erecta*. Este último, con niveles de TDS superiores a los dos primeros.

Cada planta posee un metabolismo secundario específico que permite su desarrollo y mantenimiento, por tanto, mejor adaptación a un habitat determinado (Akhtar *et al.*, 2015). En estudios sobre “ecología química” (Takken and Dicke, 2006) la concentración de estos metabolitos está íntimamente relacionada con factores bióticos y abióticos que circundan la planta, pues el metabolismo secundario puede ser más o menos activo en función de estos.

Bajo esta afirmación, las diferencias entre los TDS de cada planta pueden estar relacionada con las características ecológicas del lugar de crecimiento, así como el aspecto genético involucrado en este metabolismo.

Por otro lado, teniendo en cuenta la variación de los factores bióticos que afectan a estas plantas, las incidencias de plagas definen los grupos químicos que se generan durante este metabolismo. Mediante la activación de rutas específicas se da respuesta a diferentes situaciones. Muchos de estas sustancias alelopáticas

tienen como objetivo la defensa en las plantas, por esta razón la composición química de los vegetales fluctúa en coordinación con las afectaciones que experimenta durante su ciclo de vida (Carrasco and Simbaña, 2016).

Las características tóxicas de estos extractos en función de su concentración provocaron diferentes niveles de mortalidad sobre *M. incognita* (Figura 5).

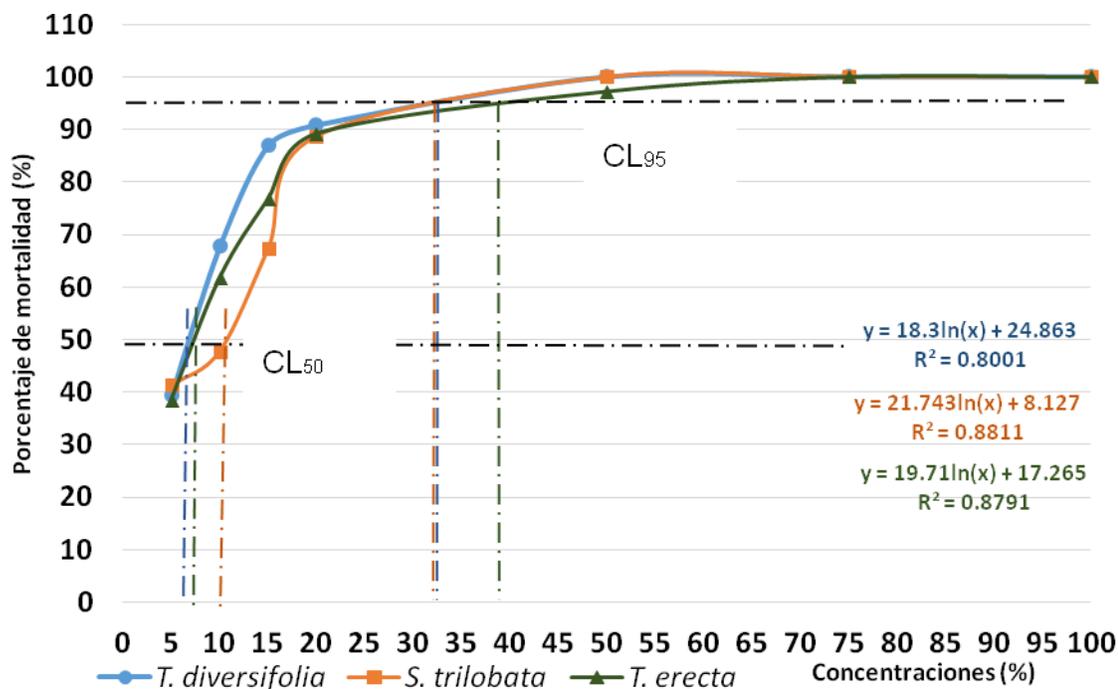


Figura 5. Concentración letal media y máxima (CL₅₀ y CL₉₅) de los extractos sobre *M. incognita*

El extracto de *T. diversifolia* y *T. erecta* alcanzaron la concentración letal media a las concentraciones de 6% y 7% respectivamente, sin embargo *S. trilobata* provocó igual porcentaje mortalidad al 10%.

Para obtener una mortalidad superior al 95 %, las concentraciones de los extractos de *S. trilobata* y *T. diversifolia* fueron similares (32% y 33% respectivamente). Sin embargo, el de *T. erecta* precisó mayor cantidad de sólidos disueltos para ejercer dicha acción, su CL₉₅ fue del 39%.

Es de destacar que *T. diversifolia* fue capaz de disminuir a la mitad de la población de nematodos a una concentración menor que la de los otros extractos, Además de conjunto con *S. trilobata*, lograron una mortalidad máxima a menor

concentración que la de *T. erecta*. Esta característica ubica a *T. diversifolia* como la de mejores resultados en este aspecto.

Existen reportes sobre el efecto nematicida de las plantas de la familia *Asteraceae*. Según los estudios con especies de esta familia indican que los porcentajes de mortalidad sobre nematodos pueden variar entre el 6% y 20%, incluso poseen acción sobre el nivel de eclosión de huevecillos (Bharadwaj and Sharma, 2007). Resultados semejantes fueron obtenidos en este trabajo con condiciones de experimentación y obtención de extractos similares.

Por otro lado, el metabolismo secundario que, de forma general, presentan estas plantas sintetizan una serie de compuestos con reconocida acción alelopática, entre ellos los compuestos fenólicos de alta solubilidad tienen gran importancia (Reiner *et al.*, 2016) Su acción nematicida ha sido reconocida por varios autores.

Al analizarse los resultados de mortalidad para cada una de las tres plantas en las concentraciones en estudio (Figura 6) se evidenció que las tres plantas en estudio alcanzaron un 40% de mortalidad a la concentración del 5% sin diferencias significativas entre ellas.

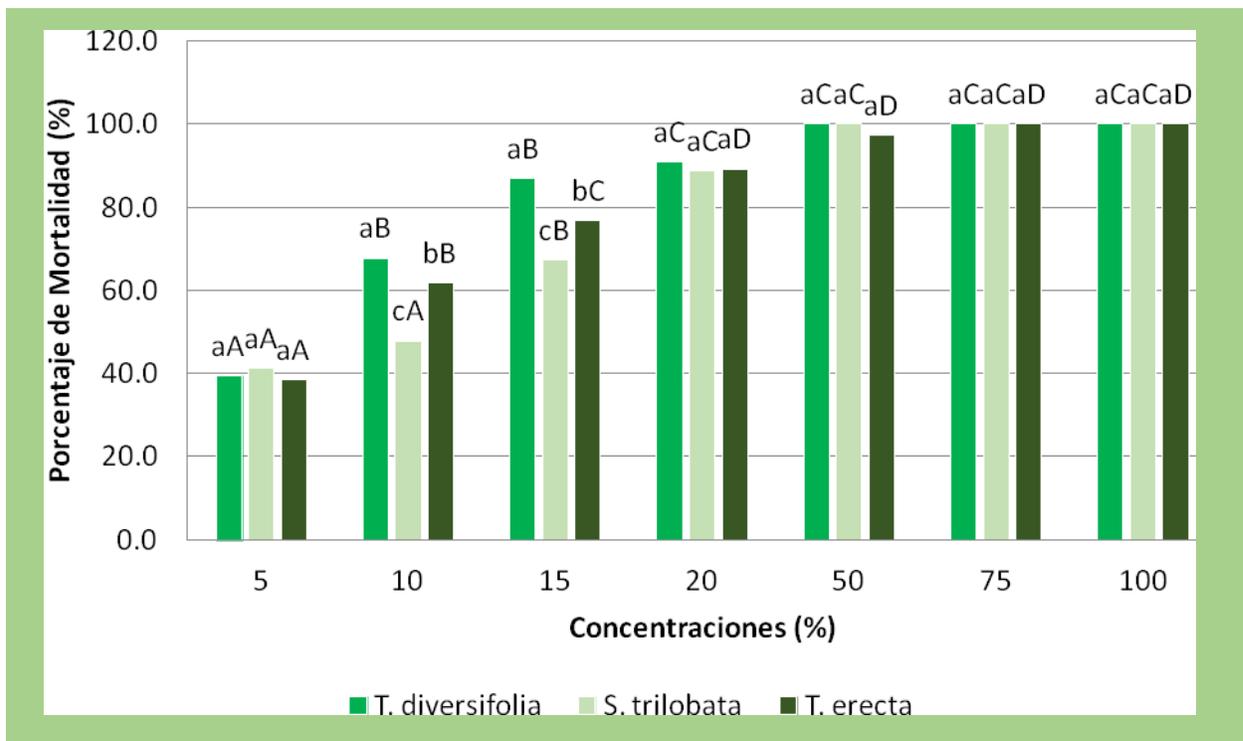


Figura 6. Efecto alelopático de *T. diversifolia*, *T. erecta* y *S. trilobata* sobre J_2 *M. incognita*. Letras minúsculas desiguales indican diferencias significativas entre las plantas para una misma concentración. Letras mayúsculas desiguales indican diferencias significativas entre las concentraciones en una misma planta.

Al 10% los mejores efectos se produjeron con el extracto de *T. diversifolia*, su índice porcentual de mortalidad fue superior al 60%, asimismo, al 15 % de concentración su valor se incrementó hasta más del 80%. El resto de las plantas a estas concentraciones difirieron estadísticamente entre sí y la de menores valores de mortalidad fue *S. trilobata*. A partir del 20 % de concentración se obtuvieron en las tres plantas los porcentajes de mortalidad máximos.

En el estudio se evidenció que existe una dependencia entre el efecto nematicida y la concentración del extracto. En las investigaciones alelopáticas esta condición es bastante frecuente, pues el fenómeno se basa, entre otros aspectos, en la inhibición enzimática competitiva de rutas específicas.

Otro aspecto de significación revelado en el ensayo fue el nivel de tolerancia de *M. incognita* ante la aplicación de los extractos. La planta que produjo los resultados más elevados fue *T. diversifolia*. En cada concentración sus efectos fueron superiores que el de las otras dos plantas, hasta el punto donde se equiparan las tres. Ello indica que sus compuestos resultaron ser de mayor toxicidad que las del resto.

A pesar de reportarse grupos químicos similares para esta familia, cada planta presenta especificidades que le permiten su protección ante cambios ambientales (Carrasco and Simbaña, 2016), por esta razón se pueden presentar diferentes efectos entre las plantas.

La tolerancia de los individuos de una población depende en gran medida de las características genéticas acumuladas generación tras generación. Asimismo, en población de una misma especie pueden existir organismos con capacidad de tolerar condiciones de vida adversas, bajo las cuales otros del mismo grupo no sobrevivirían. Este fenómeno remonta el proceso evolutivo de la especie, así como la transmisión de caracteres genéticos adquiridos mediante mutaciones, los cuales

les permite un rango de vida mayor, por tanto, una norma de adaptación más amplia (Bálint, 1981).

Adicionalmente, la familia *Asteraceae* muestran la existencia de compuestos que inhiben el desarrollo del nematodo del nudo de la raíz (*M. incognita*); a concentraciones de más de un 50% de extractos en su forma acuosos (Aballay and Insunza, 2002).

Los estudios de plantas con efectos nematocidas son numerosos. Varios autores reportan la existencia de compuestos orgánicos producidos por las plantas capaces de disminuir sustancialmente las poblaciones de nematodos, entre ellos *M. incognita*.

Entre ellos los flavonoides y taninos son compuestos polifenólicos de importancia dentro de la composición química de las plantas en estudio (Marahatta *et al.*, 2012). Estos son generados por el metabolismo secundario para la defensa de la planta y pueden ser extraídos posteriormente mediante solventes de alta y mediana polaridad (Espejo, 2010). De forma general, su acción nematocida ha sido corroborada sobre nemátodos de diferentes generos dentro de los cuales se encuentra *M. incognita* (Mbaveng *et al.*, 2014).

En este sentido, se ha estudiado la incorporación al sustrato de tejido foliar de diversas Asteráceas (cosmos, tagetes, gaillardia y zinnia, entre otras). Los resultados evidencian la disminución del agallamiento radical de *M. incognita* en *Ipomoea reptans* (Tsay *et al.*, 2004). De igual forma algunos extractos de plantas de esta familia inhiben el agallamiento producido por este nematodo y por tanto sus afectaciones.

4.3 Fitotoxicidad de extracto de *Tithonia diversifolia*, *Tagetes erecta* L y *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski sobre germinación y desarrollo de híbridos de pimiento.

El efecto biológico de los extractos de las plantas en estudio revela su importancia sobre la mortalidad de *M. incognita*. Sin embargo, es preciso analizar el efecto

fitotóxico que pudiera encontrarse sobre híbridos comerciales utilizados en nuestro país a fin de discernir su posible uso para el control de este nematodo.

En este sentido el Índice de Respuesta Alelopática para la germinación (IRA – G) de los híbridos LPD-5 y Grandísimo inducido por el extracto acuoso de *S. trilobata* (figura 7) evidencia resultados efectivos a bajas concentraciones.

Al 5% se observa un valor positivo del índice de respuesta alelopática en ambos híbridos; indicativo de una estimulación en el proceso. Entre ellos existieron diferencias significativas, LPD – 5 presentó el mayor valor del IRA. De forma similar, en la concentración del 10% el número de semillas germinadas fue mayor a las encontradas en los testigos, pero en este caso las diferencias se mostraron con valores superiores para el F1-Grandísimo. En la concentración siguiente (15%) las semillas de este híbrido no experimentaron diferencias significativas con la anterior. En contraste, para LPD – 5 comenzó a observarse el retardo en la germinación y por tanto una inhibición.

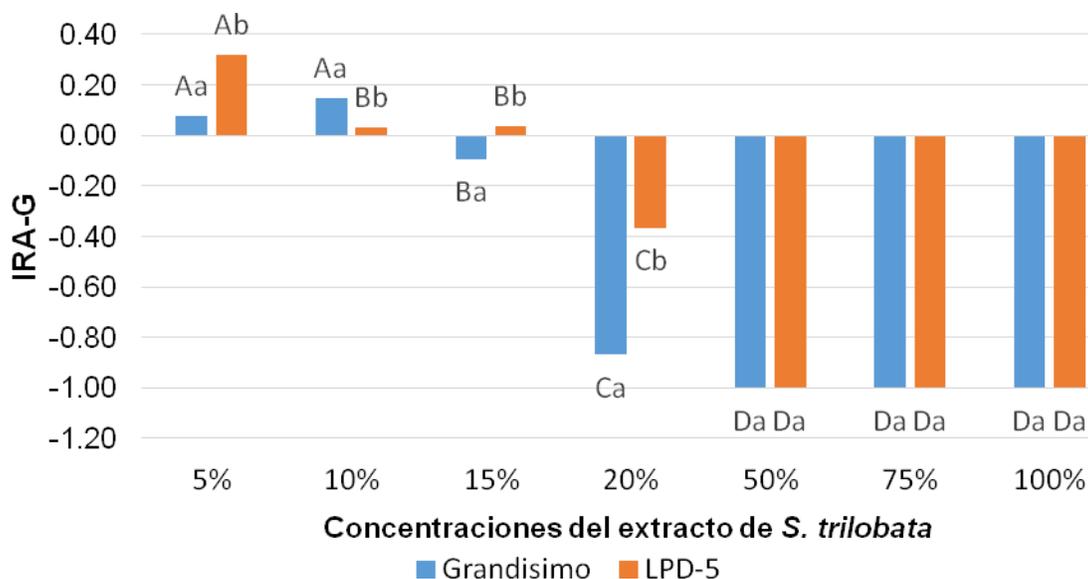


Figura. 7 Germinación de los híbridos de Grandísimo y LPD-5 en las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *S. trilobata*. Letras minúsculas desiguales indican diferencias significativas entre las plantas para una misma concentración.

Letras mayúsculas desiguales indican diferencias significativas entre las concentraciones en una misma planta.

Para ambos casos el extracto acuoso de *S. trilobata* a la concentración del 20% provoca inhibiciones significativas. Pero en Grandísimo se hacen más fuertes, su valor sobrepasa el índice negativo de 0.8. En las siguientes concentraciones no se observaron indicios de emergencia de la radícula; el IRA – G llega a su máximo valor negativo (100%) lo cual muestra se ha inhibido completamente la germinación de las semillas. El efecto de cada una de las concentraciones para un mismo híbrido muestra que existe una dependencia del efecto biológico y la concentración. Similares resultados fueron obtenidos con el extracto acuoso de *T. diversifolia* (Figura 8).

Esta planta a la concentración del 5% no produjo efectos sobre la germinación de Grandísimo, en cambio en PLD – 5 se vieron estimuladas en más de 0.3. Este valor disminuyó sustancialmente a medida que aumentó la concentración llegando a valores negativos a partir del 15% y máximos después del 50%.

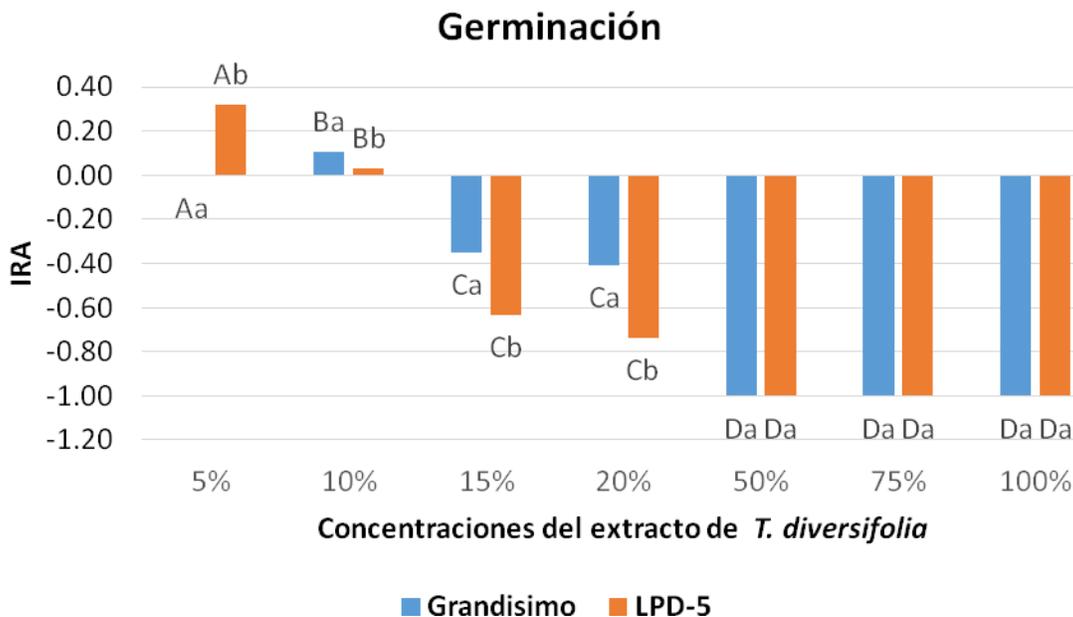


Figura. 8 Germinación de los híbridos de Grandísimo y LPD-5 en las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *T. diversifolia*. Letras minúsculas

desiguales indican diferencias significativas entre las plantas para una misma concentración. Letras mayúsculas desiguales indican diferencias significativas entre las concentraciones en una misma planta.

El híbrido Grandísimo, en la concentración del 10%, experimentó una estimulación del proceso germinativo cercana a 0.15 según el IRA – G, pero igual que para LPD – 5 las inhibiciones se hicieron evidentes a partir de la concentración del 15% y máximas por encima del 50%.

El extracto de *T. erecta* indujo resultados contrastantes entre sí y con los obtenidos hasta el momento para este proceso fisiológico (Figura 9).

La germinación de las semillas del híbrido LPD – 5 experimentó una fuerte inhibición desde la concentración más baja. En contraste su homólogo fue estimulado en las dos primeras concentraciones probadas sin diferencias significativas entre ellas. Sin embargo, es de destacar que a partir del 15% experimentó su máximo valor negativo del IRA – G. Para el caso de LPD – 5 este ocurrió a partir del 20%.

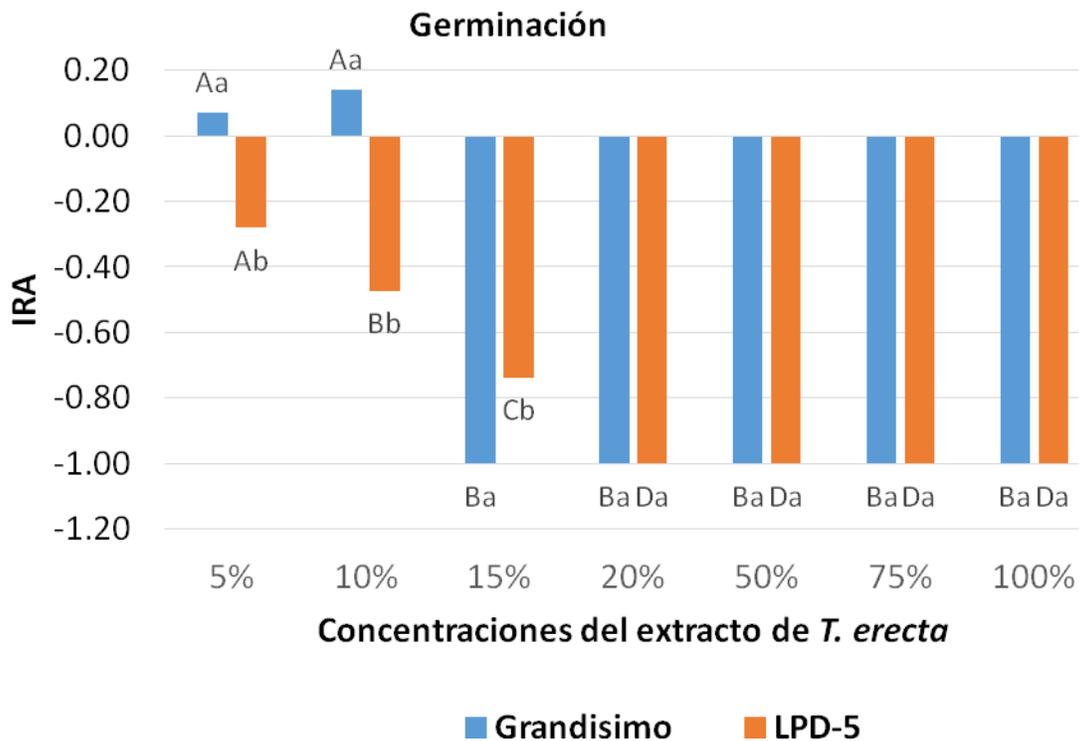


Figura. 9 Germinación de los híbridos de Grandísimo y LPD-5 en las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *T. erecta*. Letras minúsculas desiguales indican diferencias significativas entre las plantas para una misma concentración. Letras mayúsculas desiguales indican diferencias significativas entre las concentraciones en una misma planta.

De forma general las tres plantas provocaron estimulaciones en las concentraciones más bajas (5% y 10%) e inhibiciones a partir de 50%. Entre las tres se diferencia *T. erecta* con los efectos más negativos sobre ambos tipos de semillas, en ese caso las inhibiciones máximas se observaron en los tratamientos bajo la concentración del 15%.

El proceso de germinación de la semilla es un proceso fisiológico que involucra, además, rutas bioquímicas con el objetivo de obtener energía para formación de las estructuras vegetativas. La síntesis y acción de fitohormonas permite la coordinación de estos procesos y por tanto la germinación en el momento adecuado según las condiciones externas (Tierra, 2009).

En muchos casos, la acción de los compuestos alelopáticos va encaminada a estimular la síntesis de inhibidores de la germinación o simplemente el bloqueo del proceso en sí (Leicach, 2005). Desde el punto de vista ecológico esta acción es producida por sustancias sintetizadas en las plantas donadoras mediante las cuales puede regular la competencia inter e intraespecifica que se puede establecer entre plantas adyacentes o vecinas (Tharayil, 2009).

Entre los efectos de los compuestos alelopáticos se encuentra la afectación de la respiración a nivel celular. Esta cadena de transportadores electrónicos que se encuentra en la membrana interna de la mitocondria es la encargada de llevar los electrones y protones de hidrógeno desde los metabolitos en rutas degradativas hasta su aceptor final, el oxígeno, para formación de agua. Su acople con la Fosforilación Oxidativa permite la obtención de ATP (Lehninger, 2005, Stryer, 2004). En el caso de la germinación de vital importancia para la formación de las estructuras radiculares.

Varios estudios han demostrado que flavonoides como la quercetina, naringenina y umbeliferona inhiben la producción de ATP en la mitocondria (Vivanco *et al.*, 2005, Madhu *et al.*, 2011). Ellos se han reportado, dentro de la composición química de las plantas estudiadas (Marahatta *et al.*, 2012). Sin embargo, la concentración de estos induce diferentes efectos; cuando estos se encuentran en valores bajos pueden actuar como antioxidantes, lo cual permite mejorar el funcionamiento metabólico general. Si estos se encuentran en valores elevados pueden ser prooxidantes y su efecto es contrario (Valdameri, 2008).

Bajo los referentes anteriormente citados se puede dar una posible explicación ante el efecto de las plantas en estudio sobre la germinación de los híbridos probados. En el caso de las bajas concentraciones (5% 10% y en algunos casos 15%) las acciones antioxidantes de los compuestos alelopáticos permitieron el desarrollo acelerado del sistema radicular (estimulación), al aumentarse el valor del TDS por unidad de volumen su condición prooxidante se hizo más fuerte inhibiendo la germinación de las semillas.

Al analizar el desarrollo de las plántulas de las semillas germinadas para cada híbrido se constató, una variedad de efectos (Figura 10).

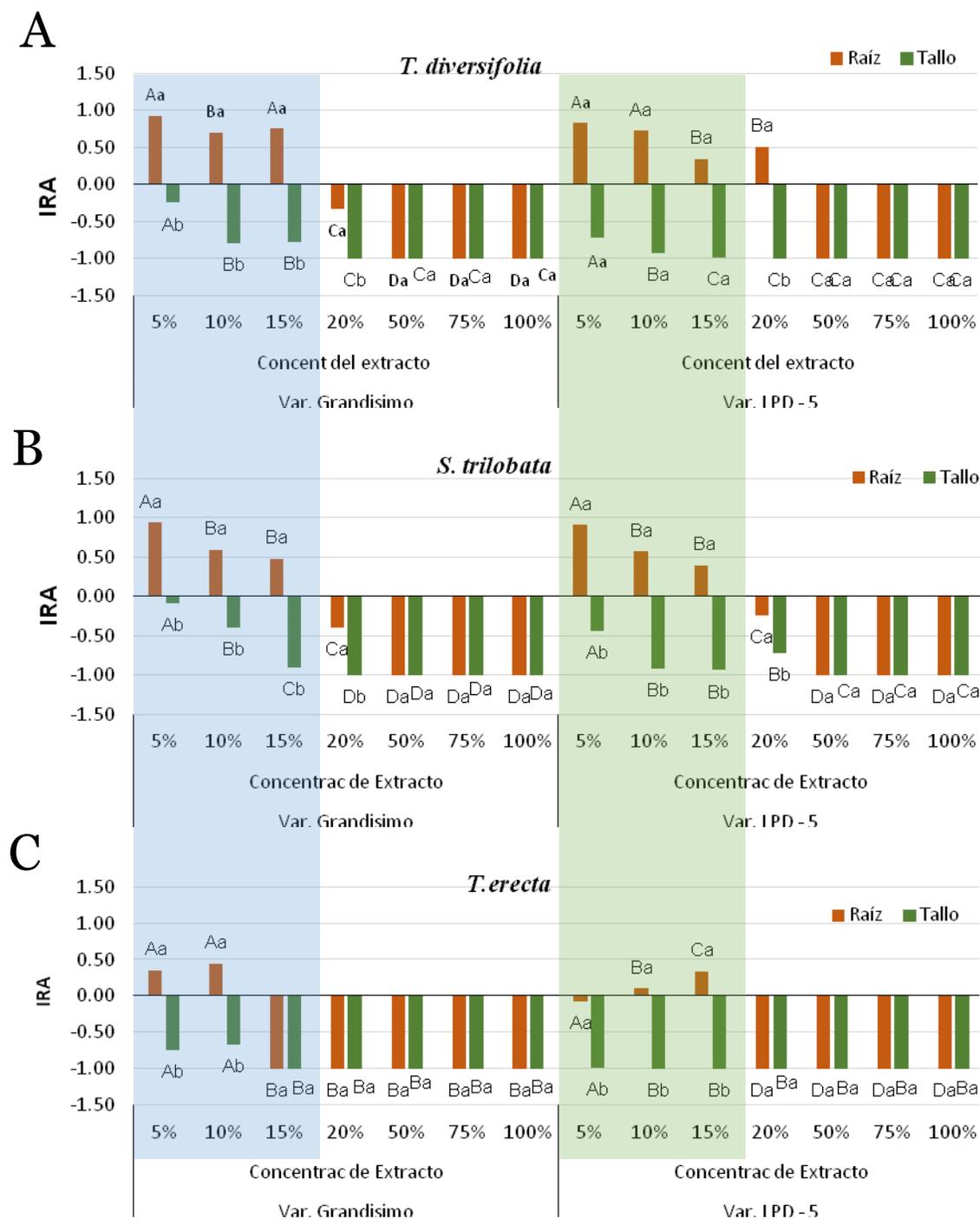


Figura. 10 Medición del desarrollo de tallo y raíz de la variedad de Grandísimo y LPD-5 en las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *T. diversifolia* (A), *S. trilobata* (B) y *T. erecta* (B). Letras minúsculas desiguales indican diferencias significativas entre los híbridos para una misma concentración. Letras mayúsculas desiguales indican diferencias significativas entre las concentraciones en un mismo híbrido.

Las tres plantas indujeron estimulaciones en el crecimiento radicular en las concentraciones más bajas (5% al 15%). Para el caso de *T. diversifolia* y *S. trilobata* (Figura 10 A y B respectivamente) los resultados fueron similares para cada uno de los híbridos. Sin embargo, el extracto acuoso de *T. erecta* (figura 10 C) los resultados fueron de menor cuantía según el IRA. Es de destacar que esta planta provocó efectos contrarios, a los observados anteriormente, en el híbrido LPD – 5.

Al 5% el largo de la raíz era inferior al del testigo, pero mientras que se incrementó la concentración hasta el 15% el efecto estimulante se aumentó. En este órgano, a partir del 20%, comenzaron a observarse efectos inhibitorios. Los más fuertes fueron producidos por *T. erecta* donde el crecimiento radicular se inhibió completamente, para las otras dos plantas este fenómeno se hizo evidente a partir del 50%.

De forma contraria a los resultados en las raíces y similar para las tres plantas, el crecimiento del tallo estuvo inhibido en ambos híbridos. Nuevamente *T. erecta* indujo los efectos más significativos, se destaca LPD – 5 con inhibición total del órgano desde la concentración más baja.

Por un lado, el experimento demostró la variabilidad genética de ambos tipos de pimiento ante cambios externos. Para el caso de LPD – 5 se apreció una mayor susceptibilidad, en comparación con Grandísimo, al estar en contacto con cada uno de los extractos durante el período experimental.

La composición genética de estas plantas, a pesar de encontrarse taxonómicamente en una misma especie difiere grandemente dado el proceso de mejora que han sufrido. Para obtener este tipo de híbrido se transcurre por un proceso de hibridación comercial donde se emplean progenitores con características cualitativas y cuantitativas diferentes en función del objetivo de mejora. Durante el mismo, pueden ocurrir alteraciones genéticas debido a la introducción sucesiva de genes de interés, procedentes de las líneas paternas, al unísono, pueden pasar a estados inactivos (recesivos o silenciados) secuencias de polinucleótidos que expresan la condición tolerante ante ciertos cambios.

Mientras que no sea esta pérdida una situación que afecte los objetivos del mejoramiento carecen de relevancia y por tanto se pierde el interés por recuperar estos genes a partir de variedades silvestres (Rodríguez *et al.*, 2008).

En otro sentido se constató la diferencia de respuesta de órganos iniciales de la planta ante la aplicación de los extractos. El crecimiento de la raíz se vio menos afectado, incluso estimulado, en comparación con el del tallo.

Durante el proceso de diferenciación de estos órganos a partir del tejido meristemático ocurre la especialización en cada una de sus funciones, asimismo pueden expresar una serie de mecanismos adaptativos según los nichos ecológicos en los cuales se desarrolla. Las raíces al estar en contacto con gran cantidad de sustancias solubles en agua pueden tener la capacidad de transformarlas al punto, que no afecten su metabolismo. En tanto, el tallo, dada su función de sostén y circulación a través de él, no precisa directamente tener un mecanismo de respuesta ante el contacto sucesivo de otras sustancias de alta polaridad como las extraídas en el extracto acuoso de las plantas en estudio. Por esta razón el crecimiento del tallo, aún en concentraciones bajas fue inhibido por la acción alelopática de los extractos.

Por otro lado, los compuestos obtenidos durante la conformación de los extractos pueden incidir negativamente en el crecimiento de las plantas, principalmente si se encuentran en altas concentraciones. Esta familia se caracteriza por tener una amplia variedad de compuestos fenólicos, desde los más simples hasta polifenoles de compleja estructura. Los efectos negativos de estos están ligados íntimamente a la producción de energía metabólica y acción hormonal.

En concordancia, varios estudios demuestran que el Kaempferol y Quercetina, flavonoides presentes en las hojas del girasol (*Helianthus annuum* L.) actúan como inhibidores de los transportadores de la cadena respiratoria, específicamente en el complejo de la Citocromo Oxidasa, lo cual provoca la aparición de especies reactivas del oxígeno y por tanto la afectación celular (Macías *et al.*, 1999).

Este mismo grupo químico es bien conocidos por su acción antioxidante, sin embargo se reporta que cuando se encuentran en altas concentraciones actúan como prooxidantes al reducir de forma temporal el Cu^{2+} a Cu^{1+} e incluirlo en su estructura (Michels, 2005, Pérez, 2003, Valdameri, 2008). Este metal con grado de oxidación 1^+ potencia la acción del metabolito como agente oxidante. Significativamente otros estudios realizados (Carlile *et al.*, 2000) muestran que esta especie química con tales características tiene la capacidad de polarizar las membranas celulares en estados iniciales de crecimiento. En relación con este efecto se ha identificado que los flavonoides que se encuentran en *Eupatorium littorale* provocan cambios en las propiedades de las membranas biológicas al interactuar con sus componentes; la despolarización de las membranas es la causa de dichas interacción y, en consecuencia, este tipo de metabolito se convierte en fuerte agente citotóxico (Herreira, 2007).

Además, los flavonoides pueden establecer enlaces con los componentes de la membrana citoplasmática, de esta manera provoca su ruptura. La lisis de las membranas conlleva una alteración enzimática, ocasionando así la degradación de numerosos sustratos (Espinosa, 2012) esto en consecuencia puede alterar el crecimiento normal de órganos vegetales.

Finalmente, el análisis contrastante de los resultados obtenidos durante la exposición de los nematodos ante los extractos y su respectivo efecto sobre el cultivo permiten afirmar que *T. diversifolia* presentó los mejores resultados al inducir elevados niveles de mortalidad para los nematodos a bajas concentraciones y a su vez estimulaciones en el proceso de germinación y crecimiento radicular del híbrido LPD – 5. El extracto acuoso de *S. trilobata* no presentó mejores indicadores de mortalidad que la planta anterior, pero sus efectos en la germinación fueron significativos. En el caso de *T. erecta* se presentaron resultados negativos más fuertes que los observados con las dos plantas anteriores en las concentraciones bajas. Sin embargo de los tres extractos este fue el de mayor TDS, ello puede sugerir que concentraciones por debajo del 5% pueden provocar efectos similares a los obtenidos en *T. diversifolia* y *S. trilobata*.

Todos los extractos provocaron inhibición del desarrollo del tallo. No obstante, si se tiene en cuenta el momento de aplicación a escala de campo, así como el modo de vida terrestre y lugar de afectaciones del nematodo, es posible que los efectos sobre este órgano se minimicen o sean inocuos.

5 Conclusiones

1. En las muestras vegetales y de suelo obtenidas de las casas de cultivos de la empresa Valle del Yabú solamente se encontró el nematodo *Meloidogine incognita* asociado al cultivo de pimiento.
2. El TDS de *T. erecta* fue de 1400 mg L⁻¹, superior a los obtenidos en los extractos de *T. divesifolia* y *S. trilobata*. Estos últimos sin diferencias significativas entre ellos.
3. Los extracto de *T. diversifolia* y *T. erecta* presentaron una CL₅₀ de 6% y 7% respectivamente. *S. trilobata* provocó igual porcentaje mortalidad al 10%. *Tagetes erecta* requirió mayor concentración (40%) para llegar a la CL₉₅.
4. El extracto acuoso de *T. divesifolia* provocó un porcentaje de mortalidad mayor en todas las concentraciones probadas con respecto al resto de las plantas en estudio.
5. Los tres extractos probados estimularon el crecimiento radicular de los dos híbridos a bajas concentraciones con excepción del de *T. erecta* al 5% para LPD -5.
6. El desarrollo del tallo de ambos híbridos fue inhibido por las tres plantas en todas sus concentraciones.

6 Recomendaciones

1. Probar los efectos nematocidas de otras plantas del género Asteraceae.
2. Determinar posible sinergia o efecto nematocida individual de metabolitos secundarios.
3. Llevar a condiciones semicontroladas los resultados obtenidos en el estudio. Específicamente los extractos de *T. divesifolia* y *S. trilobata* a bajas concentraciones.

7 Bibliografía.

- ABALLAY, E. & INSUNZA, V. 2002. Evaluación de plantas con propiedades nematocidas en el control de *Xiphinema index* en vid de mesa cv. Thompson seedles en la zona central de Chile. *Agricultura Técnica*, 62, 357-365.
- AGRIOS, G. 1996. *Fitopatología*, México, Limusa.
- AGRIOS, G. N. 2005. *Plant Pathology*, USA. Florida, Elsevier. Academic Press, Inc.
- AKHTAR, M. & MAHMOOD, I. 1996. Effect of a plant baed product- 'nimin' and some plant oils on nematodes. *Nematol. medit.*, 24, 3-5.
- AKHTAR, S., ISMAIL, T., FRATERNALE, D. & SESTILI, P. 2015. Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food Chemistry*, 174, 417-425.
- AVILA, J., MARTINEZ, H., AVILA, J. & AVILA, M. 2008. *Innovaciones en el Control de nemátodos fitoparásitos, como alternativas al control químico* [Online]. Órgano informativo del Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora. Available: <http://www.dagus.uson.mx/publicaciones/INNOV.CONTROL%20NEM.pdf>.
- BÁLINT, A. 1981. *Principios de genética y evolución. Tomo II*, Budapest, Hungría, Gödöllo.
- BHARADWAJ, A. & SHARMA, S. 2007. Effect of some plant extracts on the hatch of *Meloidogyne incognita* eggs. *International Journal of Botany*, 3, 312-316.
- BÔHM, L., ARISMENDI, N. & CIAMPI, L. 2009. Nematicidal activity of leaves of common shrub and tree species from Southern Chile against *Meloidogyne hapla*. *Ciencia e Investigación Agraria (Chile)*, 36, 249-258.
- BONGERS, T. 2011. *Morfología de los nemátodos*, Universidad Nacional de Costa Rica.
- BRUNETON, J. 2001. *Farmacognosia. Fitoquímica Plantas Medicinales*, Segunda Edición. Acribia.
- CARDONA-PIEDRAHITA, L. F. 2014. *Alternativas para el manejo ecológico de Meloidogyne spp. en agroecosistemas de tomate de la Provincia de Loja, Ecuador*. Tesis en opción al grado de Doctorado en Ciencias Agrícolas, Universidad Agraria de la Habana.
- CARDONA-PIEDRAHITA, L. F., CASTAÑO-ZAPATA, J. & CEBALLOS-AGUIRRE, N. 2016. Respuesta de quince introducciones de tomate cherry (*Solanum lycopersicum* L.) al nematodo Nodulador (*Meloidogyne spp.* Goeldi) e identificación de las especies. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.*, 40, 450-460.
- CARLILE, M. J., GOODAY, G. W. & WATKINSON, S. C. 2000. *The Fungi*, U.S.A., Academic Press, Inc.
- CARRASCO, O. A. & SIMBAÑA, M. A. 2016. *Variación de la composición química del aceite esencial de hojas de Ishpink (Ocotea quixos) en función del tipo de suelo área geográfica y de factores ambientales dentro de la zona de cultivos de la especie vegetal, en la región oriental de Ecuador*. Tesis para optar por el título de Ingeniero en biotecnología de los recursos naturales, Universidad Politecnica Salesiana.

- CASANOVA, A. 2004. Invernaderos: La experiencia cubana. *Revista Centro Agrícola*, 43, 42-48.
- CASANOVA, F., GÓMEZ, O., HERNÁNDEZ, M. & CHAILLUX, M. 2003. *Manual para la producción protegida de hortalizas*, Instituto de Investigaciones Hortícola "Liliana Dimitrova" Ministerio de la Agricultura, La Habana.
- CASTILLA, E. E. 2015. *Influencia de factores edáficos sobre la diversidad y distribución espacial de nemátodos de vida libre*. Modalidad trabajo investigativo para obtener título de Biólogo, Universidad de Sucre. Venezuela.
- COYNE, D., NICOL, J. & CLAUDIUS-COLE, B. 2009. *Nematología práctica*, Quito: International Institute of Tropical Agriculture.
- CUADRA, R., CRUZ, X., ORTEGA, R. & FAJARDO, L. 2000. Los cultivos de ciclo corto como plantas trampa de nematodos de las agallas. *Nematropica*, 30, 241-246.
- CUADRA, R. J., MORFI, O. L., SOTO, L., ZAYAS, M. A. & PERERA, E. 2008. Efecto de los productos biológicos Trifisol y Nematicid sobre los nematodos de las agallas en la producción protegida de hortalizas. *Rev. Protección Vegetal*, 23 59-62.
- DA MATA DOS SANTOS, J. 2016. *Caracterização morfológica, enzimática e molecular de populações brasileiras de meloidogyne spp.: Identificação e sinonimização de espécies*. Tese apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Fitopatologia, Universidade de Brasília.
- DANOS, B. 1988. The secretory systems of the Asteraceae family their significance in cosmetics and aromatherapy. *Herba Hungarica*, 27, 127-136.
- EL-ROKIEK, G. K. & EL-NAGDI, M. W. 2011. Dual effects of leaf extracts of *Eucalyptus citriodora* on controlling purslane and root-knot nematode in sunflower. *J. Plant Prot. Res*, 51, 121-129.
- ESPEJO, F. 2010. *Efecto de extractos acuosos de Terminalia catappa L., Tagetes erecta L. y Tectona grandis L. sobre Rhizoctonia solani Kühn y Sclerotium rolfsii Sacc.*. Tesis en opción al título académico de Máster emn Agricultura Sostenible, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
- ESPINOSA, R. 2012. *Efecto alelopático de Terminalia catappa L. sobre los hongos fitopatógenos del suelo Rhizoctonia solani Kühn. y Sclerotium rolfsii Sacc.* Tesis en opción al título de Doctor en Ciencias Agrícolas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
- FERRY, B. R. 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Ann Rev Phytopathol*, 38:, 423-441.
- FLOR, C. F., RUÍZ, W. A., TOBAR, J. M., GALLO, J. A. & RENGIFO, E. 2007. Evaluación agronómica de ocho variedades de ají en la vereda villanueva municipio de popayán. *Rev. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Popayán Colombia*, 5 126-136.
- FLOR, P., E, TALAVERA, M., SAYADI, S., CHIROSA-RÍOS, M., SALMERÓN, T. & VERDEJO-LUCAS, S. 2012. Las enfermedades causadas por nemátodos (*Meloidogyne spp.*) en los cultivos bajo abrigo de Almería: Visión de los Asesores Técnicos. *Agrícola Vergel* 359, 290-294.

- FRAPOLLI, E. 2000. *Los nemátodos Fitoparásitos*, Málaga, España, Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca.
- GAMBOA, M., MORENO, J. A., HERRERA, E., PÉREZ, J., CRISTÓBAL, J. & HEREDIA, G. 2016. Toxicidad in vitro de Micromicetos del Trópico Mexicano en Juveniles Infeccivos de *Meloidogyne incognita*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34, 100-109.
- GILL, K., MEHTA, S., MALIK, S., MALIK, O. & WALIA, R. 2001. Toxicity of methanolic leaf extracts and essential oils from various plants to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Nematol. medit.*, 29, 219-222.
- GÓMEZ, L., RODRÍGUEZ, M., DÍAZ-VIRULICHE, L., GONZÁLEZ, R. & WOGN, F. 2006. Evaluación de materiales orgánicos para la biofumigación en instalaciones de cultivos protegidos para el manejo de *Meloidogyne incognita*. *Rev. Protección Veg.*, 21, 178-185.
- GONZÁLEZ, K., CROZZOLI, R. & GRECO, N. 2001. Utilización de enmiendas orgánicas en el control de *Meloidogyne incognita*. *Nematol. medit.*, 29, 41-45.
- HASSAN, M. A., PHAM, T. H., SHI, H. & ZHENG, J. 2013. Nematodes threats to global food security. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B Soil & Plant Science*, 63, 420-425.
- HASSAN, S. & MATHESIUS, U. 2011. The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions.
- HERNÁNDEZ, M. 2015. *Potencial alelopático de Phyla strigulosa, Sphagneticola trilobata e Ipomoea batatas sobre malezas y cultivos*. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, Universidad Central "Marta Agru" de Las Villas.
- HERREIRA, T. 2007. Eupafolin: effects on mitochondrial energetic metabolism. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12, 123-126.
- HU, G. & ZHANG, Z. 2013. Allelopathic effects of *Chromolaena odorata* native and non-native invasive herbs. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 11, 878-882.
- HUERRES, C. & CARABALLO, N. 1996. *Horticultura*, Editorial Pueblo y Educación. La Habana.
- JARAMILLO, J., RODRÍGUEZ, V., GIL, L., GARCÍA, M., HÍO, J., QUEVEDO, D., SÁNCHEZ, G., AGUILAR, P., PINZÓN, L., ZAPATA, M., RESTREPO, J. & GUZMÁN, M. 2012. *Tecnología para el cultivo de tomate bajo condiciones protegidas.*, Bogotá, CORPOICA.
- JARAMILLO, J., RODRIGUEZ, V. P., GUZMÁN, M., ZAPATA, M. & RENGIFO, T. 2007. Manejo fitosanitario. Protección de Cultivos. In: JARAMILLO, J., RODRIGUEZ, V. P., GUZMÁN, M., ZAPATA, M. & RENGIFO, T. (eds.) *Manual Técnico Buenas Prácticas Agrícolas -BPA En la producción de Tomate Bajo Condiciones Protegidas*. Gobernación de Antioquia - Centro de Investigación "La Selva". FAO: CORPOICA.
- JENKINS, W. R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter*, 48, 692.
- LEELA, N., KHAN, R., REDDY, P. & NIDIRY, S. 1992. Nematicidal activity of essential oil of *Pelargonium graveolens* against the root- knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Nematol. medit.*, 20, 57-58.

- LEHNINGER, A. 2005. *Principios de Bioquímica*, John Wiley & Sons, Inc.
- LEICACH, S. 2005. Alelopatía, estrategias defensivas de las plantas. 15. Available: <http://www.cienciahoy.org.ar/ln/hoy89/alelopatia.htm>.
- LORENZO, P. & GONZÁLEZ, L. 2010. Alelopatía: una característica ecofisiológica que favorece la capacidad invasora de las especies vegetales. *Ecosistemas*, 19, 79 - 91.
- MACÍAS, A., F., MOLINILLO, G. J. M., VARELA, R. M., TORRES, A. & GALINDO, C. G. 1999. Bioactive compounds from the genus *Hellianthus*. In: MACÍAS, A., F., MOLINILLO, G. J. M. & CUTLER, H. G. (eds.) *Recent advances in allelopathy*. Cádiz: Servicios de publicaciones de la Universidad de Cádiz.
- MADHU, D., REKHA, H. S., SHYLAJA, M. D., PRAKASH, H. S. & SHEKAR SHETTY, H. 2011. Biochemical events involved in downy mildew disease resistance in pearl millet in relation to H⁺-ATPase. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 44 17-27.
- MARAHATTA, S. P., WANG, K. H., SIPES, B. S. & HOOKS, C. R. R. 2012. Effects of *Tagetes patula* on active and inactive stages of root-knot nematodes. *Journal of Nematology*, 44, 26-30.
- MARTÍNEZ, C. A. 2016. *Efecto alelopático de Anamú (Petiveria alliacea L.) sobre Rhizoctonia solani Kühn y Sclerotium rolfsii Sacc.* Tesis para aspirar al título de Ingeniero Agrónomo, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
- MARTÍNEZ, E. M., SOUSA, M. & RAMOS, C. H. 2001. Región de Calakmul, Campeche. *Listados Floríst. México*, 22, 1-55.
- MARTÍNEZ, J. A., DÍAZ, T., ALLENDE, R., ORTIZ, J. A., GARCÍA, R. S. & CARRILLO, J. A. 2014. Nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de papaya (*Carica papaya* L.) en Colima, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5, 317-323.
- MBAVENG, T. A., Q, Z. & V, K. 2014. Harmful and protective effects of phenolic compounds from African medicinal plants. In: KUETE, V. (ed.) *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*. Elsevier.
- MCGUIRE, A. M. 2004. Mustar green manure crops replace fumigation and improve infiltration in potato cropping system. *Agropoindustria*, 3, 331-333.
- MICHELS, G. 2005. Pro-apoptotic effects of the flavonoids luteolin in rat H4IIE cells. *Toxicology*, 206, 337-348.
- MIGUE, A. Contribución de la técnica del injerto en hortalizas para eliminación del bromuro de metilo. V Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal, 2004 Ciudad de La Habana, Cuba.
- NARWAL, S. 2001. *Hans Molish. The Influence of One Plant on Other*, Joudpur. India, Scientific Publisher.
- NICKLE, W. 1990. *Manual of Agricultural Nematology*, Baltsville Agricultural Research Cente. USA, Marcel Dekker, Inc.
- OLMO, A. 2012. *Horticultura Efectiva*. [Online]. Available: <http://www.horticulturaefectiva.net/2012/03/origen-del-pimiento.html>. [Accessed 16 de Noviembre de 2015].
- PARCERO, R. 2014. *Callidad y potencial antioxidante del pimiento morrón desarrollado con abono orgánico y arena en invernaderos*. Tesis para obtener el título de Ingeniero Agrónomo, Universidad Autónoma dAgraria.
- PÉREZ, G. 2003. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22.

- PIEDRA, N. R. 2008. Manejo biológico de nematodos fitoparásitos con hongos y bacterias. *Tecnología en Marcha*, 21, 123-132.
- RAZZAGHI, A. M. & RAI, M. 2013. *Antifungal Metabolites from Plants*, Springer Heidelberg New York Dordrecht London.
- REINA, Y., CROZZOLI, R. & GRECO, N. 2002. Efecto nematocida del extracto de hojas de algodón de seda (*Calotropis procera*) sobre diferentes especies de nematodos fitoparasíticos. *Fitopatol. Venez*, 15.
- REINER, D. A., DALLEMOLE-GIARETTA, R., DOS SANTOS, I., CADORIN, T. L., LOPES, E. A. & CHIARANI, A. 2016. Efeito nematocida de um subproduto da indústria vinícola em *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. *Ciência Téc. Vitiv*, 31, 24-30.
- RODRÍGUEZ, C., PÉREZ, J. & FUCHS, A. 2008. *Genética y mejoramiento de Plantas* Editorial Félix Varela.
- SAMPIETRO, D. 2001. *Alelopatía: Conceptos. Características. Metodología de Estudio e importancia* [Online]. Available: http://www.pwp.007mundo.com/futuroverde/documentos_485.htm [Accessed 16 de noviembre 2003].
- SAMPIETRO, D. A. 2003. *Definición de alelopatía* [Online]. Available: http://www.pwp.007mundo.com/futuroverde/documentos_658.htm [Accessed 10 de noviembre 2003].
- SARDUY, M., DÍAZ, I., CASTELLANOS, L., SOTO, R. & PÉREZ, Y. 2016. Sustratos y soluciones nutritivas para la obtención de plántulas de pimiento y su influencia en la producción en cultivos protegido. *Centro Agrícola*, 43 42-48.
- SASSER, J. N. 1979. Economic importance of *Meloidogyne* in tropical countries. In: LAMBERTI, F. & TAYLOR, C. E. (eds.) *Root-Knot Nematodes (Meloidogyne Species) Systematics, Biology and Control*. London: Academic Press.
- SILVA, P. 2008. Efecto Aleopático de los Rastrojos. *Ciencias Agronómicas* [Online]. Available: <http://www.sap.uchile.cl/descargas/cero/Efecto%20alelopatico%20de%20los%20rastros.PDF> [Accessed 12 de mar. 2009].
- SOLER-SERRATOSA, A., KOKALIS-BURELLE, R., WEAVER, C. & KING, P. 1995. Allelochemicals for control of plant- parasitic nematodes. In vivo nematocidal efficacy of Thymol and Thymol/ Benzaldehyde combinations. *Nematropica*, 26, 57-70.
- STALLER, M. A. 2012. *Caracterización morfológica, agronómica y de calidad del pimiento y pimentón de la variedad tap de cortí*. Tesis en opción al título en Ingeniería Técnica Agrícola, Universidad de las Islas Baleares.
- STELING, J., CORREA, V., VIERA, J. D., CORDOBA, D., CROZZOLI, R., PERICHI, G. & GRECO, N. 2004. Uso de la Ruda (*Ruta graveolens*) para el control del nematodo agallador, *Meloidogyne incognita*, en pepino. *Fitopatol. Venez*, 17, 26-28.
- STRYER, L. 2004. *Biochemistry*, New York, Ed. W. H. Freeman and Company.
- TAKKEN, W. & DICKE, M. 2006. Chemical ecology. In: DICKE, M. & TAKKEN, W. (eds.) *Chemical ecology: from gene to ecosystem*. Springer. Netherlands
- THARAYIL, N. 2009. To survive or to slay. *Plant Signaling and Behavior*, 4, 580-583.

- TIERRA, L. E. 2009. *Evaluación de diferentes niveles de fitohormonas (citoquininas, giberelinas y etileno) en la producción de forraje y semillas de la Poa palaustris (Pasto poa)*. Tesis de Diploma, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- TSAY, T., WU, S. & LIN, Y. 2004. Evaluation of Asteraceae Plants for Control of *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, 36, 36–41.
- TZORTZAKAKIS, E. A., ADAM, M., BLOK, V. C., PARASKEVOPOULOS, C. & BOURTZI, K. 2005. Occurrence of resistance-breaking populations of root-knot nematodes on tomato in Greece. *European Journal of Plant Pathology*, 113, 101-105.
- URBINA, C. 2009. Manejo integrado de las principales plagas y enfermedades. In: ESCALONA, V., ALVARADO, P., MONARDES, H., URBINA, C. & MARTIN, A. (eds.) *Manual de Cultivo de Tomate (Lycopersicon esculentum Mill.)*. Facultad de Ciencias Agronómicas Universidad de Chile.
- UROZ, S. 2012. *Caracterización de variedades locales de solanáceas: cuatro de tomate y tres de pimiento*. Tesis en opción al título de Máster de Agricultura Ecológica.
- VALDAMERI, G. 2008. *Efeitos da flavonas sobre o metabolismo celular*. Mestre em Ciências-Bioquímicas, Universidade Federal do Paraná.
- VIVANCO, J. M., COSIO, E., LOYOLA-VARGAS, V. M. & FLORES, H. E. 2005. *Mecanismos químicos de defensa en las plantas* [Online]. Available: <http://crb.colostate.edu/home/Design/Assets/papers/Investigacion2005.pdf> [Accessed 8 de enero 2008].

8 Anexos

Anexo 1 Afectación de nematodos en raíces de pimiento



Anexo 2

Montaje del experimento de fitotoxicidad

