

ALELOPATÍA Y SUSTANCIAS BIOACTIVAS

Efecto de extractos de tres especies vegetales sobre el nematodo *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood

Effect of extracts from three plant species on nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood

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

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

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

²Universidad Agraria de la Habana, Autopista Nacional km 23^{1/2}, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

E-mail: tulio_solano@yahoo.es

RESUMEN. Los nematodos del género *Meloidogyne* constituyen un serio problema para la producción de tomate de la provincia de Loja Ecuador, para cuya solución es necesario buscar alternativas, debido a las limitantes que plantea el uso de nematicidas químicos. En ese sentido se desarrolló el presente trabajo para evaluar el efecto de extractos etanólicos de *Lonchocarpus nicou* (Aubl.), *Piscidia carthagenensis* Jacq. y *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum., en el control de *Meloidogyne incognita*, "in vitro", y en condiciones de invernadero sobre tomate cultivado en bolsas. Los extractos provocaron una mortalidad significativa "in vitro" sobre los juveniles (J₂) del nematodo, el efecto dependió no solo de la especie vegetal sino también de la concentración. Asimismo, se evidenció una apreciable reducción en el índice de agallamiento en las raíces y de las poblaciones del nematodo en el sustrato, efecto dependiente de la concentración de los extractos.

Palabras clave: Extractos nematicidas, *Lonchocarpus nicou*, *Meloidogyne*, *Piscidia carthagenensis*, *Thevetia peruviana*.

ABSTRACT. Nematodes of *Meloidogyne* genus are a serious problem for tomato production in the province of Loja, Ecuador. Because of the negative side effects of chemical nematicides, to solve this problem it is necessary look for alternatives. This work aimed to study the effect of ethanolic extracts from *Lonchocarpus nicou* (Aubl.), *Piscidia carthagenensis* Jacq. and *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum., in *Meloidogyne incognita* control, "in vitro" and glasshouse conditions, on tomato plants. The extracts induced a significant mortality, "in vitro", on juveniles. This effect was related with the source and concentrations of the extracts. In tomato growing in glasshouse, it was observed an appreciable reduction in the root gall index and in the nematode populations in soil, related with the plant species and the concentration used, too.

Key words: Nematicidal plant extracts, *Lonchocarpus nicou*, *Meloidogyne*, *Piscidia carthagenensis*, *Thevetia peruviana*.

INTRODUCCIÓN

Los nematodos formadores de agallas en las raíces, pertenecientes al género *Meloidogyne*, se encuentran ampliamente distribuidos en los países tropicales y subtropicales, y ocasionan severas pérdidas económicas, fundamentalmente en los cultivos hortícolas, entre ellos, el tomate. (Gómez *et al.*, 2010; Collange *et al.*, 2011)

La creciente preocupación de los agricultores por los nematodos agalladores y las limitaciones de los nematicidas químicos debido a sus efectos negativos

en los agroecosistemas, requieren desarrollar alternativas para resolver esta problemática. (Nyczepir and Thomas, 2009; Collange *et al.*, 2011; Kayani *et al.*, 2012)

En los últimos años, el uso de sustancias bioactivas obtenidas de plantas para el control de nematodos ha sido estudiado por diversos autores (Ipsilantis *et al.*, 2012; Kayani *et al.*, 2012, Mukhtar *et al.*, 2013). Especies de las familias Fabaceae y Apocynaceae han sido evaluadas por su acción

biocida y en algunos casos se ha informado sobre su uso como bioplaguicidas. En la primera familia se destacan *Lonchocarpus nicou* (Aubl.) y *Piscidia carthagenensis* Jacq., y en la segunda, *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. (Ravikumar et al., 2012; Gakuy et al., 2013)

La acción tóxica de estas plantas es atribuida a la presencia de diversos metabolitos secundarios en hojas, corteza de los tallos, raíces y semillas. (Lawson et al., 2010; Kohls et al., 2012; Ravikumar et al., 2012; Bora et al., 2014)

MATERIALES Y MÉTODOS

Para los extractos, se recolectaron raíces de *L. nicou*, hojas de *P. carthagenensis* y semillas de *T. peruviana*, teniendo en cuenta los resultados informados por Solano (2009). Las hojas se secaron a temperatura ambiente en el laboratorio durante 72 h, y las semillas y raíces, durante ese mismo tiempo, a 40°C en una estufa.

El material seco fue triturado en un molino eléctrico de uso doméstico. Posteriormente, a 200 g del material se le adicionó 500 mL de etanol al 70%, en un recipiente cubierto con papel aluminio, y se dejó en reposo por 72 h, a temperatura ambiente. Se filtró con papel de filtrado rápido, para eliminar el tejido vegetal, y se eliminó el solvente mediante rotoevaporación al vacío a 45°C.

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

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

Se evaluó el efecto de cinco concentraciones de los extractos vegetales: 0,01, 0,03, 0,06, 0,08 y 0,10 % (p/v). Para su preparación se pesó, en vasos de precipitación, la cantidad requerida de los aceites, para un volumen de mezcla de 100 mL, en una

No obstante, aún son insuficientes los conocimientos relativos a la acción de extractos vegetales para el control de *Meloidogyne* spp. en tomate en las condiciones de la provincia de Loja, Ecuador, por lo que el objetivo del presente trabajo fue: evaluar el efecto de extractos etanólicos de *Lonchocarpus nicou* (Aubl.), *Piscidia carthagenensis* Jacq. y *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. en el control de *M. incognita* en el cultivo del tomate.

balanza analítica Sartorius (precisión=0,00001 g). A continuación, se adicionó 0,5 mL de etanol 96%, y el emulsionante Lauryl éter sulfato de sodio en una proporción 1:1 con relación al extracto, y se agregó agua destilada estéril hasta enrasar a 100 mL. Como testigo se utilizaron los mismos componentes, excepto el extracto, y el emulsionante se utilizó a la mayor concentración (0,10%). Las mezclas preparadas se conservaron en frascos ámbar, en refrigeración, hasta su utilización.

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

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

Se evaluó la mortalidad de los nematodos a las 72 h, con el auxilio de un microscopio estereoscópico Olympus, con un aumento de 40X, asumiendo como muerto aquel individuo carente de movilidad absoluta o con deformaciones (Quevedo et al., 2010). Los datos de porcentaje de mortalidad fueron

transformados mediante la expresión $aseno(p)^{1/2}$ y sometidos a un análisis de varianza de clasificación simple, y para la comparación de las medias se utilizó la Prueba de Tukey. (SAS Institute, 2004)

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

El ensayo se desarrolló en el invernadero de la Universidad Nacional de Loja, en bolsas de polietileno de 3 kg, con un sustrato a base de suelo, arena y humus de lombriz (relación 1:1:1), en las cuales se trasplantaron plántulas de tomate (*L. sculentum* Mill.) de la variedad "Acerado" de 30 días de edad. En las semanas 2 y 4 después del trasplante el sustrato fue inoculado con 1 000 juveniles (J_2) de *M. incognita*. Los extractos fueron aplicados en las semanas 4 y 7, en concentraciones de 0,01, 0,06 y 0,10%, depositando 100 mL de la mezcla en la zona de la rizosfera de las plantas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos. Como se aprecia en la tabla 1 todos los extractos provocaron una alta mortalidad, en una magnitud que dependió no solo de la especie utilizada, sino también de la concentración, pues, a medida que esta aumentó, se obtuvo una mayor mortalidad del nematodo.

Los valores más altos, similares estadísticamente, se obtuvieron en los tratamientos con las tres concentraciones mayores de *L. nicou*, mientras que los más bajos, sin diferencia entre ellos, correspondieron a las dos concentraciones inferiores de *T. peruviana*, los dos únicos tratamientos con valores por debajo del 80%. Es de destacar que en todos los tratamientos con *L. nicou* la mortalidad obtenida sobre los juveniles del fitonematodo fue superior al 90%, llegando a alcanzar el 100% en las dos concentraciones superiores. Por otro lado, con las dos restantes especies evaluadas, solo se alcanzó una mortalidad superior al 90%, en la mayor concentración.

Los resultados anteriores muestran que los extractos de las tres especies evaluadas tienen un apreciable

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 10 tratamientos y cuatro repeticiones. Cada unidad experimental estuvo constituida por tres plantas. A las 13 semanas se determinó el índice de agallamiento, con la escala de 10 grados de Bridge and Page (1980), así como la población del nematodo (juveniles/100 cm³ de sustrato), mediante la técnica de platos calados, una modificación del método de Baerman. (Duncan y Phillips, 2009)

El conteo se realizó a las 72 h, con el auxilio de un microscopio Olympus con un aumento de 100X. Los datos de población se transformaron según la expresión $(x+1)^{1/2}$ y sometidos a un análisis de varianza de clasificación simple, y para la comparación de las medias se utilizó la Prueba de Tukey. (SAS Institute, 2004)

efecto de mortalidad "in vitro" sobre *M. incognita*., y que la magnitud de ese efecto está directamente relacionado con la concentración utilizada, lo cual corrobora lo informado por Vinueza *et al.* (2006) y Quevedo *et al.* (2010). Esta acción tóxica pudiera deberse a la presencia de diversos metabolitos secundarios, como alcaloides, glucósidos, rotenoides y otros, que pueden estar presentes en diversas partes de estas plantas. (Lawson *et al.*, 2010; Kohls *et al.*, 2012; Ravikumar *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2013)

Los habitantes de la región sur de Ecuador reconocen a estas tres especies como muy frecuentes y utilizadas por su acción plaguicida. (Solano, 2009)

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

En los tratamientos con los extractos se registraron índices de agallamiento inferiores a los obtenidos en el testigo (Fig. 1). En concordancia con los resultados del ensayo "in vitro", se observó un efecto de la concentración de los extractos de las tres especies vegetales sobre el índice de agallamiento. Se destaca el valor obtenido con *L. nicou* a la mayor concentración, que fue nueve veces inferior al testigo.

El análisis estadístico con los datos de la población de nematodos en el sustrato mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos. En todos los extractos, los valores difirieron de los del

testigo (Tabla 2). Igualmente, se aprecia que los mismos dependen no solo de la especie, sino también de la concentración, lo cual corrobora los resultados “*in vitro*”.

Tabla 1. Mortalidad de *M. incognita*, tratado con los tres extractos en estudio, en condiciones “*in vitro*”

Especie	Concentración (%)	Medias originales	Medias transformadas
<i>L. nicou</i>	0,01	90,00	0,5001 bcde
	0,03	93,00	0,5072 bc
	0,06	95,00	0,5119 ab
	0,08	100,00	0,5236 a
	0,10	100,00	0,5236 a
<i>P. carthagenensis</i>	0,01	86,50	0,4918 de
	0,03	87,00	0,4928 cde
	0,06	87,00	0,4929 cde
	0,08	89,00	0,4976 bcde
	0,10	91,00	0,5025 bcde
<i>T. peruviana</i>	0,01	76,00	0,4661 g
	0,03	79,00	0,4735 fg
	0,06	85,00	0,4882 ef
	0,08	88,00	0,4953 cde
	0,10	92,00	0,5049 bcd
Testigo		0,00	0,2255 h
ESx			0,0052**
C.V. (%)			2,18

** - Altamente significativa

Medias con letras iguales no difieren significativamente, según Tukey ($p \leq .05$)

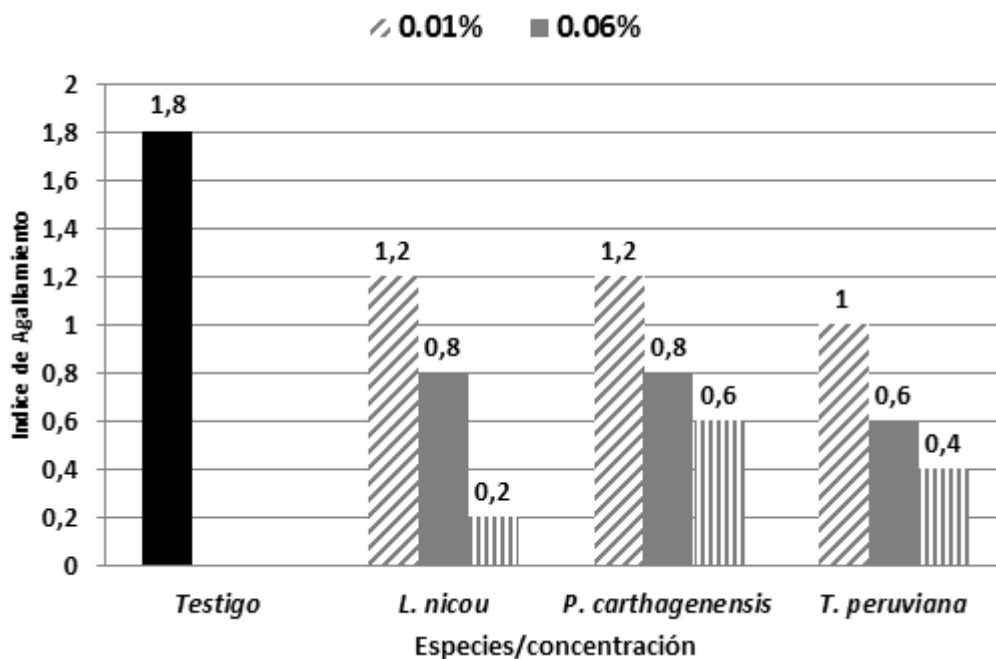


Figura. Efecto de los extractos vegetales sobre el agallamiento en raíces de tomate por *M. incognita*, en condiciones de invernadero

Es de significar que las poblaciones más bajas de juveniles de *M. incognita*, correspondieron a tratamientos con extractos de *L. nicou* y *P.*

carthagenensis, con las dos concentraciones mayores en el primer caso, y la mayor, en el segundo, con valores estadísticamente semejantes,

inferiores a lo informado por Ornat y Sorribas (2008) como límite de tolerancia para esta especie de nematodo en tomate, 0,55 J₂/g de suelo.

En general, los resultados corroboran los informes de diversos autores sobre la acción biocida de las especies estudiadas (Ravikumar *et al.*, 2012; Gakuy *et al.*, 2013). Igualmente, el efecto de la concentración de los extractos en la mortalidad de *M. incognita*., ratifica lo indicado para diversos extractos vegetales. (Vinueza *et al.*, 2006; Quevedo *et al.*, 2010)

Los resultados obtenidos en el trabajo constituyen el primer informe de la acción nematicida de las tres especies en estudio sobre el fitonematodo *M. incognita* en el Ecuador, y representan un aporte a la fundamentación del conocimiento ancestral sobre los usos de estas plantas en la región (Solano, 2009). Por otro lado, abren el camino para la obtención de bionematicidas, que podrían constituir una significativa contribución a la asistencia de los agricultores de bajos recursos, en su continua batalla contra el nematodo. (Coyne *et al.*, 2009)

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

Tratamientos		Población del nematodo (J ₂ /100 cm ³ de sustrato)	
Especie	Concentración (%)	Medias originales	Medias transformadas
Testigo	-	218,00	14,80a
<i>L. nicou</i>	0,01	81,50	9,08b
	0,06	50,25	7,07cd
	0,10	41,75	6,51d
<i>P. carthagenensis</i>	0,01	84,00	9,21b
	0,06	60,75	7,82c
	0,10	49,75	7,12cd
<i>T. peruviana</i>	0,01	90,00	9,53b
	0,06	77,50	8,84b
	0,10	58,25	7,69c
ESx			0,32**
C.V. (%)			7,35

Medias con letras iguales, en una misma columna, no difieren significativamente, según Tukey (p ≤ 0.05)

CONCLUSIONES

1. Los extractos etanólicos de raíces de *L. nicou*, de hojas de *P. carthagenensis* y semillas de *T. peruviana*, provocaron una alta mortalidad sobre los juveniles (J₂) de *M. incognita*, en condiciones “*in vitro*”, efecto que dependió no solo de la especie vegetal sino también de la concentración utilizada.
2. Los extractos etanólicos de raíces de *L. nicou*, de hojas de *P. carthagenensis* y semillas de *T. peruviana* provocaron una apreciable reducción, dependiente de la concentración, en el índice de agallamiento y de las poblaciones de los juveniles (J₂) de *M. incognita* en tomate cultivado en bolsas, en condiciones de invernadero.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bora, M.M.; Noguei, P.; Deka, D.C.; Kakati, D.K. Synthesis and characterization of yellow oleander (*Thevetia peruviana*) seed oil-based alkyd resin. *Industrial Crops and Products* 52: 721-728. 2014.
2. Bridge, J. and Page S., L.J., Estimation of root-knot nematode infestation levels on roots using a rating chart. *Tropical Pest Management* 26: 296–298. 1980.
3. Collange, B.; Navarrete, M.; Peyre, G.; Mateille, T.; Tchamitchian, M. Root-knot nematode (*Meloidogyne*) management in vegetable crop production: The challenge of an agronomic system analysis. *Crop Protection* 30(10): 1251-1262, 2011.
4. Coyne, D.L.; Fourie, H.H.; Moens, M. Current and Future Management Strategies in Resource-poor Farming. En: Perry, R.N; M, Moens; J.L, Starr (Eds.)

- “Root-Knot Nematodes” CAB International, Wallingford, U.K., pp. 444-475, 2009.
5. Duncan, L.W.; Phillips, M.S. Sampling Root-knot Nematodes. En: Perry, R.N.; M, Moens; J.L, Starr (Eds.) “Root-knot Nematodes” CAB International, Wallingford, U.K. pp 275-300, 2009.
6. Gakuy, D.W; Itonga, S.M.; Mbaria, J.M.; Muthee, J.K.; Musau, J.K. Ethnobotanical survey of biopesticides and other medicinal plants traditionally used in Meru central district of Kenya. *Journal of Ethnopharmacology* 145(2): 547-553, 2013.
7. Gómez, Lucila; González, E.; Enrique, R.; Hernández, M.A.; Rodríguez, Mayra. Uso de la biofumigación para el manejo de *Meloidogyne* spp., en la producción protegida de hortalizas. *Rev. Protección Veg.* 25(2): 119-123, 2010.
8. Ipsilantis, I.; Samourelis, C.; Karpouzas, D. The impact of biological pesticides on arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 45(1): 147-155, 2012.
9. Kayani, M.Z.; Mukhtar, T.H.; Muhammad, A. Evaluation of nematicidal effects of *Cannabis sativa* L. and *Zanthoxylum alatum* Roxb. against root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*. *Crop Protection* 39(1): 52-56, 2012.
10. Kohls, S.; Scholz-Böttcher, B.M.; Teske, J.; Zark, P.; Rullkötter J. Cardiac glycosides from Yellow Oleander (*Thevetia peruviana*) seeds. *Phytochemistry* 75: 114-127, 2012.
11. Lawson, M.A.; Kaouadjib, M.; Chuliaa, A.J. A single chalcone and additional rotenoids from *Lonchocarpus nicou*. *Tetrahedron Letters* 51(47): 6116-6119, 2010.
12. Mukhtar, T.; Kayani, M.Z.; Hussain, M.A. Nematicidal activities of *Cannabis sativa* L. and *Zanthoxylum alatum* Roxb. against *Meloidogyne incognita*. *Industrial Crops and Products* 42(3): 447-453, 2013.
13. Nyczepir, A.P. and Thomas, S.H. Current and Future Management Strategies in Intensive Crop Production Systems. En: Perry, R.N.; M, Moens; J.L, Starr (Eds.) “Root-knot Nematodes”. CAB International, Wallingford, UK, pp. 412-443, 2009.
14. Ornat, C and Sorribas, F. Integrated Management of Root-Knot Nematodes in Mediterranean Horticultural Crops. En: Ciancio, A y K.J. Mukerji. (Eds.). “Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes” Springer Dordrecht Heidelberg, London New York, pp. 295-319. 2008.
15. Quevedo, O.; Crozzoli, R.; Perichi, G. Uso de extractos acuosos y etanólicos de plantas para el control de *Meloidogyne enterolobii* (Nematoda: Tylenchida). *Fitopatología Venezolana* 23(2): 45-53, 2010.
16. Ravikumar, S.; Inbaneson, S.J.; Suganthi, P. *In vitro* antiplasmodial activity of ethanolic extracts of South Indian medicinal plants against *Plasmodium falciparum*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2(3): 180-183, 2012.
17. SAS Institute. SAS/STAT 9.1 User’s Guide. SAS Institute Inc., Cary, N.C., 2004.
18. Solano, T. Plantas Nativas con Propiedades Plaguicidas en la Región Sur de Ecuador. Imprenta Píxeles, Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador, 127 pp. ISBN: 978-9978-355-04-6, 2009.
19. Taylor A.L. and Sasser, J.B. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Dept. Plant. Pathol. N.C. State Univ., Raleigh, 111pp, 1978.
20. Torres, Deisy; Orea, U.; Brito, María; Cordero, Elena. Estudio de la extracción del follaje de Barbasco (*Lonchocarpus nicou*) como fuente biocida en condiciones de la Amazonía en Ecuador. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias* 22(4): 41-49, 2013.
21. Vinueza, S.; Crozzoli, R.; Perichi, G. Evaluación “*in vitro*” de extractos acuosos de plantas para el control del nematodo agallador *Meloidogyne incognita*. *Fitopatología Venezolana* 19(2): 26-31, 2006.

Recibido: 09/09 /2013

Aceptado: 24/12 /2013