



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Tema: Evaluación del contenido de Isotiocianatos de los extractos vegetales de Mashua (*Tropaeolum tuberosum*), Mostaza (*Raphanus raphanistrum* L.) y Mastuerzo (*Tropaeolum majus*) y su actividad nematocida *in vitro* para el control de *Meloidogyne*.

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

Autor: Luis Marcelo Lara Moya

Tutor: Ph.D. Pedro Pablo Pomboza Tamaquiza

Ambato – Ecuador

Diciembre – 2019

APROBACIÓN DEL TUTOR

Ph.D. Pedro Pablo Pomboza Tamaquiza

Certifica:

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

Ambato, 24 de octubre de 2019



Ph.D. Pedro Pablo Pomboza Tamaquiza

C.I.: 180234328-3

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Luis Marcelo Lara Moya, manifiesto que los resultados obtenidos en el proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Luis Marcelo Lara Moya

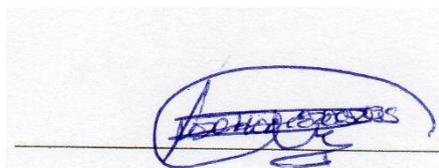
C.I.: 050348684-7

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia firman:

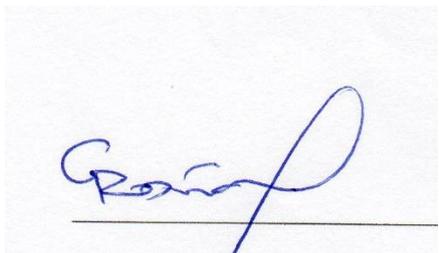
A handwritten signature in blue ink, appearing to be "A. S. S.", written over a horizontal line.

Presidente del Tribunal

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Mirari Yosune Arancibia Soria", written over a horizontal line.

Ing. MSc. Mirari Yosune Arancibia Soria, PhD.

C.I. 180214246-1

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Carlos Alberto Rodríguez Meza", written over a horizontal line.

Dr. Carlos Alberto Rodríguez Meza, PhD.

C.I. 180216650-2

Ambato, 6 de diciembre de 2019

DERECHOS DE AUTOR

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

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



Luis Marcelo Lara Moya

C.I.: 050348684-7

AUTOR

DEDICATORIA

*“Mereces lo que sueñas”
Gustavo Cerati*

*A mi madre que siempre me brindó su apoyo incondicional, mi ejemplo a seguir,
quien me inspira a ser mejor cada día.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por regalarme una familia llena de amor.

Sobre todo, a mi mami Mercy y a mis abuelitos Galo y Carlota, quienes siempre me apoyaron y gracias a ustedes nunca me faltó nada. A mi hermano Erick, a quien considero mi mejor amigo.

A mi tutor, el Doctor Pedro Pablo Pomboza por su paciencia y apoyo para la elaboración de este trabajo.

A la ingeniera Elena Villacrés del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), por brindarme sus conocimientos y permitirme el uso de sus equipos para los análisis de la investigación.

Al ingeniero Giovanni Freire, por enseñarme el verdadero valor de la amistad.

*A mis amigos y compañeros que hicieron de la universidad la mejor etapa de mi vida
Bibi, Santiago, Willy, Andrés, Bolo, Pao, Negrita, Peque, Mercy, Ely, Maju, Cris.*

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PAGINAS PRELIMINARES

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCIÓN	1

CAPITULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema de investigación.....	2
1.2 Justificación.....	2
1.3 Objetivos.....	3
1.3.1. Objetivo General.....	3
1.3.2. Objetivos Específicos	3

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos	4
2.1.1. Nematodos.....	4
2.1.2. Extractos naturales con efecto nematocida	7
2.1.3. Mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i>), Mostaza (<i>Raphanus raphanistrum</i> L.) y Mastuerzo (<i>Tropaeolum majus</i>).....	8
2.2 Hipótesis.....	11
2.3 Señalamiento de variables	11

CAPITULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.	Recolección y secado del material vegetal.....	12
3.2.	Preparación del material vegetal	12
3.3.	Extracción del material vegetal	12
3.4.	Concentración de los extractos.....	13
3.5.	Determinación de los sólidos totales solubles	13
3.6.	Cuantificación de isotiocianatos.....	14
3.7.	Aislamiento e identificación de nematodos.....	14
3.8.	Evaluación y muerte de nematodos.....	15
3.9.	Diseño Experimental	16

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Análisis de resultados	17
4.1.1	Cuantificación de isotiocianato.....	17
4.1.2	Porcentaje de rendimiento del extracto.....	18
4.1.3	Identificación del género <i>Meloidogyne</i>	19
4.1.4	Actividad nematocida del extracto	21
4.1.1	Daño provocado por el extracto en los nematodos	25
4.2	Verificación de hipótesis	27

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1	Conclusiones.....	28
5.2	Recomendaciones	29
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
	ANEXOS	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuantificación de isotiocianato en extractos vegetales.....	17
Tabla 2. Porcentaje de rendimiento de los extractos líquidos.....	19
Tabla 3. Morfología de <i>Meloidogyne</i> en el estadio (J2).....	20
Tabla 4. Porcentajes de mortalidad de <i>Meloidogyne</i> (J2) expuesto al extracto de <i>Raphanus raphanistrum</i> L. en condiciones in vitro.....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hidrólisis de glucosinolatos por la enzima mirosinasa para la formación de isotiocianatos (Wu et al., 2009).....	10
Figura 2. A. Nódulos en las muestras de raíces provocados por nematodos. B. Raíces visualizadas bajo el estereoscopio infestadas por nematodos. C. Huevos y juveniles de nematodo hembra abierta.	20
Figura 3. Imágenes de <i>Meloidogyne</i> (J2) reportados en bibliografía y nematodos utilizados en el experimento. A. Cuerpo entero de J2 (García & Sánchez-Puerta, 2012). B. Nematodo identificado. C. Cabeza de J2 (Coyne & Claudius-cole, 2007).	21
Figura 4. Efecto del extracto de mostaza (<i>Raphanus raphanistrum</i> L.) en la mortalidad de <i>Meloidogyne</i> (J2).....	22
Figura 5. Gráficas del análisis estadístico. A. Mortalidad en función a las concentraciones del extracto B. Mortalidad en función al tiempo de exposición del extracto.....	23
Figura 6. Evaluación de daño de <i>Meloidogyne</i> J2. Evaluación de daño de <i>Meloidogyne</i> J2. A. y B. Evaluación a las 2 y 48 horas de exposición al testigo absoluto (agua) respectivamente. C. y D. Evaluación a las 2 y 48 horas de exposición al testigo químico (Metam sodio).	25
Figura 7. Evaluación de daño de <i>Meloidogyne</i> J2 con extracto de mostaza al 100% de concentración. Evaluación de daño de <i>Meloidogyne</i> J2 con extracto de mostaza al 100% de concentración A. Nematodo aislado (48 horas de exposición). B. Adición de reactivo 1 (Kit de tinción). C. y D. Daños provocados. Flechas rojas indican daño en el interior, flechas negras el desprendimiento de la epidermis.	26
Figura 8. Daños provocados por las diferentes concentraciones del extracto en <i>Meloidogyne</i> . A. 75% B. 50% C. 25% D. 15% E. 10% F. 5%	27

RESUMEN

Se cuantificó la cantidad de isotiocianatos presentes en extractos vegetales alcohólicos y acuosos de Mashua (*Tropaeolum tuberosum*), Mostaza (*Raphanus raphanistrum* L.) y Mastuerzo (*Tropaeolum majus*). Los solventes utilizados para su extracción fueron etanol al 96% y agua destilada. El análisis estadístico utilizado fue un diseño factorial AXB. El extracto hidroalcohólico de *Raphanus raphanistrum* L. obtuvo la mayor concentración de isotiocianato (535,410 ug/ml) y porcentaje de rendimiento (30,67%). Luego se evaluó su capacidad nematicida *in vitro* frente a nematodos del género *Meloidogyne* en el estadio J2 a diferentes concentraciones (100, 50, 75, 50, 25, 15, 10, y 5% v/v), un testigo absoluto (agua destilada) y un testigo químico (Metam sodio 1µl/1L de agua destilada) por 48 horas. La concentración con mayor efecto y menor tiempo fue la del 100% que redujo la población en $93,33 \pm 2,89\%$ en las dos primeras horas de exposición y el 100% de mortalidad a las cuatro horas. La evaluación del daño provocado en los nematodos se realizó mediante microscopía óptica, observándose los daños internos (abultamientos de coloración negra) y externos (desprendimiento de su epidermis). Los resultados obtenidos de este experimento fueron satisfactorios, demuestran que existen nuevas alternativas para la creación de nematicidas de origen orgánico que no producen daños al ambiente y tiene el mismo efecto que un nematicida de origen sintético.

Palabras clave: Isotiocianatos, extractos vegetales, *Meloidogyne* J2, nematicida, *in vitro*

ABSTRACT

The amount of isothiocyanates present in alcoholic and aqueous plant extracts of Mashua (*Tropaeolum tuberosum*), Mustard (*Raphanus raphanistrum* L.) and Mastuerzo (*Tropaeolum majus*) was quantified. The solvents used for extraction were 96% ethanol and distilled water. The statistical analysis used was an AXB factorial design. The hydroalcoholic extract of *Raphanus raphanistrum* L. obtained the highest concentration of isothiocyanate (535,410 ug / ml) and percentage yield (30.67%). Same as its in vitro nematocidal capacity was assessed against nematodes of the genus *Meloidogyne* at stage J2 at different concentrations (100, 50, 75, 50, 25, 15, 10, and 5% v / v), an absolute control (water distilled) and a chemical control (Metam sodium 1µl / 1L of distilled water) for 48 hours. The concentration with the greatest effect and the shortest time was 100%, which reduced the population by $93.33 \pm 2.89\%$ in the first two hours of exposure and 100% mortality at four hours. The assessment of the damage caused to the nematodes was carried out by optical microscopy, observing the internal damages (black-colored bulges) and external damages (detachment of its epidermis). The results obtained in the experimentation were satisfactory, demonstrating that there are new alternatives for the creation of nematocides of organic origin that do not cause damage to the environment and have the same effect as a nematocidal of synthetic origin.

Keywords: Isothiocyanates, plant extracts, *Meloidogyne* J2, nematocidal, in vitro

INTRODUCCIÓN

La agricultura es la principal fuente de economía de un país. Proporciona alimentos, materias primas y genera empleos en la población. Las actividades agrícolas producen efectos positivos como la conservación del suelo y una gestión sostenible de los recursos naturales. Los cultivos producidos no están exentos de plagas o enfermedades. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos productos para combatirlos debe ser responsable y amigable con el ambiente (**Warwick, 2011**).

Los nematodos son organismos fitoparásitos, estos producen daños en las raíces de las plantas y causan alteraciones en su desarrollo. Las pérdidas en la producción agrícola mundial ocasionada por nematodos son de 115.000 millones de dólares anuales. Entre los cultivos afectados se encuentran las hortalizas, leguminosas y frutales. *Meloidogyne* es un nematodo abundante y perjudicial en la agricultura. En Ecuador, el 80% de la población de este género se encuentra distribuido en las tres regiones. Los agricultores controlan *Meloidogyne* con nematicidas y fumigantes. Sus costos son elevados y a su vez tóxicos para el ambiente (**Cantuña, 2013**).

En la agricultura orgánica se contrarresta las plagas (nematodos) con el uso de plantas, que tienen efectos nematicidas, bactericidas, fungicidas entre otros. Sus compuestos se extraen con diferentes solventes como agua y alcohol. Uno de los órdenes más utilizados es las Brassicales. En este orden se encuentran plantas como: Mashua (*Tropaeolum tuberosum*), Mostaza (*Raphanus raphanistrum* L.) y Mastuerzo (*Tropaeolum majus*). Estas especies contienen Isotiocianatos, compuesto principal que provoca la muerte en los nematodos. Este, es producido por la hidrólisis de los glucosinolatos que se encuentran en abundancia en los órganos y semillas de las plantas. El isotiocianato también es el compuesto principal de los nematicidas de origen sintético. A diferencia de los nematicidas comerciales los extractos de plantas no provocan daños al ambiente, sus costos de producción son bajos y el efecto en las plagas es similar (**Ramírez, Grijalva, Navarrete, & Guerrero, 2015**). Esta investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de extractos vegetales en la reducción de poblaciones del género *Meloidogyne*.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema de investigación

“Evaluación del contenido de Isotiocianatos de los extractos vegetales de Mashua (*Tropaeolum tuberosum*), Mostaza (*Raphanus raphanistrum* L.) y Mastuerzo (*Tropaeolum majus*) y su actividad nematocida *in vitro* para el control de *Meloidogyne*.”

1.2 Justificación

Los nematodos son invertebrados, con aspecto de gusano, causan enfermedades en seres humanos y animales. Estos, se encuentran ampliamente distribuidos en gran número y en varios hábitats, dependen del agua para su supervivencia (**Armendáriz, Quiña, Ríos, & Landázuri, 2015**). En las plantas, el ataque de los nematodos fitopatógenos provoca daños en las raíces y en los órganos aéreos. Los síntomas del ataque, en las raíces son agallas, ramificaciones excesivas y pudriciones, los mismos que afectan a la nutrición de las plantas y alteraciones de las funciones fisiológicas de las mismas (**Cantuña, 2013**). Los nematodos han provocado pérdidas de producción agrícola mundial de aproximadamente 115.000 millones de dólares anuales. En el Ecuador, se encuentran presentes en todas las regiones. Los cultivos con mayores pérdidas económicas son las hortalizas, leguminosas y frutales.

Los nematocidas son productos químicos utilizados para el control de nematodos, protegen e incrementan el rendimiento y calidad de la cosecha (**Llerena, 2010**). En el Ecuador, el uso de los nematocidas se incrementa constantemente, su costo es elevado, requiere la utilización de equipos adecuados y provocan daños al ambiente. El componente principal de estos productos es el isotiocianato, el mismo que se encuentra en las plantas del orden de las Brassicales, como la mashua, la mostaza y el mastuerzo. El precursor de este compuesto son los glucosinolatos (GL`s), inactivos contra los microorganismos, que al ser hidrolizados dan origen a los isotiocianatos (ITC`s).

Estos, son muy eficientes contra nematodos, bacterias, hongos e insectos. En Ecuador las pérdidas por nematodos en el cultivo de tomate de árbol son de aproximadamente un 90%. Los nematodos reducen la vida útil de la planta hasta un 50% (tres años a uno y medio) (**Ramírez, Grijalva, & Navarrete, 2015**). Según, estadísticas del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP), el consumo del tomate de árbol desde el año 2012 se incrementó notablemente. El fruto forma parte de los productos andinos más utilizados en la alimentación a nivel nacional.

Los extractos vegetales son utilizados en la agricultura ecológica, para contrarrestar plagas y enfermedades, entre sus beneficios se destacan: la baja toxicidad para el suelo, rápida biodegradación, bajos costos y fácil elaboración que son ventajas con respecto a los pesticidas sintéticos, y un factor importante de estudio (**Brown y Morra, 1997**).

1.3 Objetivos

1.3.1. Objetivo General

- Evaluar el contenido de Isotiocianatos de los extractos vegetales de Mashua (*Tropaeolum tuberosum*), Mostaza (*Raphanus raphanistrum* L.) y Mastuerzo (*Tropaeolum majus*) y su actividad nematocida *in vitro* para el control de *Meloidogyne*.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Cuantificar la concentración de isotiocianatos en los extractos vegetales de Mashua (*Tropaeolum tuberosum*), Mostaza (*Raphanus raphanistrum* L.) y Mastuerzo (*Tropaeolum majus*).
- Evaluar el efecto nematocida del extracto vegetal con mayor concentración de isotiocianatos para el control de *Meloidogyne*.
- Identificar los daños ocasionados por el extracto vegetal con mayor concentración de isotiocianatos en *Meloidogyne*.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos

2.1.1. Nematodos

2.1.1.1. Generalidades

Los nematodos son organismos pluricelulares, son el grupo más abundante de animales en la tierra ocupan hábitats acuáticos como terrestres, no presentan segmentación, sistema circulatorio ni respiratorio. Estos, se mueven lentamente a través de los espacios que se forman entre las partículas del suelo, aprovechan la humedad para desplazarse mediante movimientos ondulantes. Todos tienen alguna forma de estilete o arpón oral, que les permite perforar la pared de las células de la planta hospedera para poder alimentarse. No todos los nematodos del suelo son dañinos para la agricultura, también existen nematodos que regulan los ciclos de nutrientes, como los nematodos entomopatógenos que son agentes de control biológico de plagas (**Peregrín, 2013**).

Los nematodos fitoparásitos tienen un ciclo de vida similar de cuatro etapas o estadios (J). Estos, ponen huevecillos que se incuban y se desarrollan en larvas, las mismas que aumentan de tamaño hasta llegar a la etapa de diferenciación en hembras y machos adultos. En condiciones óptimas de temperatura, humedad y dependiendo de la planta hospedante el ciclo dura de 3 a 4 semanas. En algunas especies de nematodos la primera o segunda etapa no puede infectar a la planta. Sin embargo, *Meloidogyne*, empieza a infectar en su segundo estadio (J2), el daño que produce es de acción mecánica directa, al perforar la pared celular y secretar saliva con enzimas. Estas, producen abultamientos en las raíces denominadas agallas, alteran la producción de auxinas (reguladores de crecimiento) y modifican el genoma (**Hernández-Ochandía et al., 2012**).

La planta infectada disminuye su productividad, desarrollo y muere, en el caso que no reciba el tratamiento adecuado. También, queda expuesta al ataque de otros microorganismos patógenos como hongos, bacterias y virus que ingresan a través de las heridas. En la etapa adulta los machos son vermiformes de 1, a 1,5 mm de largo mientras que las hembras tienen forma de pera de 0,40 a 1,30 mm. Las hembras depositan 500 huevos aproximadamente recubiertos por una cubierta gelatinosa protectora que permite su incubación inmediata o la conservación del mismo por varios meses incluso años (Agrios, 2010; Hernández-Ochandía *et al.*, 2012).

2.1.1.2. Control de plaga

Los métodos de control utilizados para reducir las pérdidas por *Meloidogyne*, se basan en el uso de nematicidas y fumigantes cuyo uso en exceso, resulta costoso, e implica riesgos ambientales. Como afirma Cantuña (2013) los efectos de los nematodos fitoparásitos sobre los cultivos son subestimados por los agricultores. Los síntomas suelen confundirse con desordenes nutricionales, estrés hídrico, problemas de fertilidad del suelo, así como con otras infecciones secundarias causadas por hongos y bacterias, cuya entrada puede estar facilitada por un nematodo.

De acuerdo a Peregrín (2013) el control de nematodos se realiza mediante el uso de fumigantes químicos, como el bromuro de metilo y el 1,3-dicloropropeno + cloropicrina. Estos, a pesar de su efectividad para eliminar, son tóxicos para el ambiente y la biota, por estas razones están prohibidos en varios países. El objetivo principal de los agricultores es mantener poblaciones bajo el umbral de daño y minimizar las pérdidas de sus cultivos. El control de las enfermedades causadas, por *Meloidogyne*, es difícil debido al amplio rango de hospedadores, periodos cortos de generación y altas tasas de reproducción. A finales del siglo XX *Meloidogyne* no era tomado en consideración debido a la disponibilidad de fumigantes de amplio espectro, con la restricción de estos surge mayor preocupación ambiental y sanitaria. En este contexto se han desarrollado investigaciones que buscan nuevas alternativas de control, que no provoquen alteraciones ambientales.

Los nematocidas más comunes usados en la actualidad son:

- 1'2-dibromo-3-cloropropano. (DBCP, Nemagón, Nematán): Compuesto granulado, utilizado con máquinas distribuidoras de abonos, puede aplicarse pulverizando en el suelo con una solución concentrada, o mezclándolo con el agua de riego.
- Dicloropropano - dicloropropeno (D-D): Se inyecta el producto en la tierra arada a una profundidad de 25 cm y de 38 – 40 cm entre cada surco debe regarse el suelo ligeramente después de su aplicación y no removerlo durante tres semanas mínimo, luego de seis semanas está listo para sembrar.
- Metil ditiocarbamato de sodio (VAPAM): para la aplicación del producto la tierra debe estar preparada, rompiendo los terrones y dejándola bien suelta hasta la profundidad de 20 – 25 cm, la dosis es de 500 litros por hectárea.
- Cloropicrina: Regar la solución con suficiente agua para mojar la superficie deseada hasta una profundidad de 3-6 cm, puede ser sembrado a los 25 días de aplicación.
- Dibromuro de etileno (1-2 Dibromoetano): es un fumigante de suelo líquido, volátil generalmente diluido en disolventes hidrocarburos, y se aplica a una profundidad de 15 a 20 cm.

(Gil, 2000)

2.1.1.3. Problemática

Los nematodos agalladores de raíces son los más abundantes en los cultivos agrícolas a nivel mundial. El género *Meloidogyne* es considerado como uno de los más perjudiciales en la agricultura. Las pérdidas económicas anuales a nivel mundial son de alrededor de 1.000 billones de dólares. En Ecuador la densidad poblacional total de este género es del 80% y se encuentran distribuido en las tres regiones costa, sierra y oriente (0 - 2800 m.s.n.m). Estos, son hospederos en diversos cultivos de gran importancia alimenticia y económica del país (arveja, banano, café, fresa, haba, lenteja, maíz, tomate de árbol, tomate riñón, entre otros) (Triviño *et al.*, 2004).

Los nematodos se encuentran entre los principales responsables en pérdidas de los cultivos: provocan muerte en las raíces por alteraciones en el sistema de conducción (disminuye el transporte de fluidos y nutrientes), reducen el crecimiento y rendimiento de las plantas (**Rodríguez, 2007**). Los estudios realizados por: (**Ramírez, Grijalva, Navarrete, & Guerrero, 2015**) dan a conocer que en Tungurahua existe una amplia diversidad de géneros de nematodos. El amplio rango de temperaturas y la diversidad de climas de cada zona de producción influyen en el aumento de esta plaga, infestan a la mayoría de los cultivos, y dejan pérdidas económicas considerables para los agricultores.

2.1.2. Extractos naturales con efecto nematocida

En la evolución las plantas desarrollaron mecanismos naturales de protección contra las plagas, la mano del hombre no fue necesaria para su cuidado. Estas, tienen la capacidad de sintetizar metabolitos secundarios relacionados con los mecanismos de defensa. A partir de las plantas se obtienen extractos, aceites esenciales, resinas y polvos, para ello se utilizan disolventes que permiten conseguir compuestos de interés (**Hernández, 2007**). Según, **Talib & Mahasneh (2010)** las plantas son consideradas principales fuentes de productos químicos activos. De todas las especies de plantas del planeta (250.000-500.000), solo el 10% se ha estudiado química y farmacológicamente por su potencial y valor medicinal. Estudios han constatado que las plantas desarrollaron mecanismos de defensa contra el ataque de nematodos, bacterias, hongos, insectos y herbívoros o en la atracción de polinizadores y dispersores de semillas (**Giancarlo, Ventura, Esparza, Dean, & Villar, 1996**).

Los principales compuestos con efecto nematocida son los isotiocianatos, producidos por la hidrólisis de los glucosinolatos por acción de la enzima mirosinasa. Los glucosinolatos, se encuentran en las plantas del orden de las Brassicales. La extracción de estas sustancias es de vital importancia, para el desarrollo de nuevas alternativas de biofumigación. Estos, pueden sustituir a los productos químicos que no son amigables con el ambiente (**Armendáriz, Quiña, Ríos, & Landázuri, 2015**). **Por ejemplo, Hernández (2007)**, utilizó varios extractos vegetales, los mismos que inhibieron el crecimiento de hongos fitopatógenos y disminuyeron las pudriciones en frutos de

papaya. Los investigadores sugieren realizar más investigaciones sobre extractos vegetales, para identificar y aislar los compuestos activos que presentan los mismos.

2.1.3. Mashua (*Tropaeolum tuberosum*), Mostaza (*Raphanus raphanistrum* L.) y Mastuerzo (*Tropaeolum majus*)

2.1.3.1. Composición fitoquímica

La Mashua (*Tropaeolum tuberosum*), Mostaza (*Raphanus raphanistrum* L.) y el Mastuerzo (*Tropaeolum majus*) son plantas pertenecientes al orden Brassicales. Estas son portadoras de glucosinolatos, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y sulfúricos. La característica principal de las plantas de este orden es su eficiente sistema defensivo interno que utiliza contra patógenos de varios tipos. Estos son fuente de investigación para la creación de bioplaguicidas a partir de las mismas (**Giancarlo *et al.*, 1996; Lazzeri *et al.*, 2013**).

Tropaeolum tuberosum es cultivada en suelos de la región andina (Bolivia, Perú Ecuador, Colombia). Estas plantas crecen en suelos pobres de nutrientes, sin necesidad de fertilizantes y pesticidas para su desarrollo (**Orellano & Valverde, 2017**). Según, **Quispe, Mansilla, Chacón, & Blas (2015)** *Tropaeolum tuberosum* es tolerante a bajas y altas temperaturas. Su mecanismo de defensa la hace objeto de estudio por la capacidad nematicida, insecticida y fungicida. Además, posee un alto contenido de vitamina C (75mg/100g), proteínas (14-16g/100g) y glucosinolatos (0,27–50,74 µmol/g). Entre los principales glucosinolatos presentes se encuentran: metoxibencilglucosinolato, 4-hidroxibencilglucosinolato y bencilglucosinolato (Ramallo *et al.*, 2004). De acuerdo con **Cortes, (2011)** los glucosinolatos, los compuestos fenólicos y las antocianinas presentes en extractos de estas plantas inducen a la supresión de la proliferación de células cancerígenas. También recomienda el uso de estos en la agricultura y la medicina en varias concentraciones.

Raphanus raphanistrum L. es una planta silvestre que se desarrolla naturalmente en todo el mundo, con excepción de la Antártida, es considerado como maleza para los cultivos de trigo, crece en condiciones desfavorables como: suelos infértiles y

deficiencia de agua (**Dávila, Vásquez, & Pomboza, 2018; Wang et al., 2017**). En cada etapa de desarrollo de la planta el contenido de glucosinolatos (glucoiberina, glucorafanina, glucosamina, glucobrassicina), son variables. Por ejemplo, en la etapa de floración puede alcanzar 1942,4 μmol por planta. Los GL`s, se distribuyen en toda la planta desde las semillas hasta la parte aérea (tallos y hojas) (**Malik, Norsworthy, Culpepper, Riley, & Bridges, 2008; Ridley & Ellstrand, 2009**).

Tropaeolum majus tiene origen en los andes de Sudamérica. Actualmente se encuentra distribuida en todo el mundo, es utilizado en la medicina popular. El isotiocianato presente en sus hojas y flores le atribuye propiedades antiinflamatorias, antifúngicas antibacterianas y antisépticas (**Aguilar, Avalos, Rojas, Marquillo, & Ayala, 2017**). Además, de los isotiocianatos posee compuestos como: antocianinas, vitamina C, y compuestos fenólicos (flavonoides y taninos) los mismos que presentan acción antioxidante asociadas a características de color, sabor y astringencia (**Lino et al., 2015**). Según, **Silva, Quezada, Filio, Solano, & Ramos (2017)** el mastuerzo es muy investigado en la medicina. El glucotropaeolina presente en este, se hidroliza en bencil isotiocianato. El bencil isotiocianato induce a la muerte celular de células cancerígenas de mama y ovarios, sin dañar las células sanas.

2.1.3.2. Actividad nematocida

Los glucosinolatos son metabolitos secundarios aniónicos orgánicos. Se encuentran almacenados en las vacuolas de las plantas. Al sufrir daños se hidrolizan por acción de la enzima mirosinasa, dando lugar a compuestos como: isotiocianatos, nitrilos, tiocianatos y cianuros orgánicos (Figura 1). La formación de estos productos dependerá de factores como el pH, la temperatura y la presencia de agentes reductores. (**Bressan et al., 2009; León, Rincón, & Jiménez, 2016; Winde & Wittstock, 2011; Wu, Zhou, & Xu, 2009**). De acuerdo con **Clarke (2010)**, las concentraciones de glucosinolatos son variables, dependen de la especie y el órgano de la planta que se ha realizado la extracción. Además, afirma que en las semillas se encuentran la mayor cantidad de dicho compuesto y existen alrededor de 100 glucosinolatos diferentes clasificados en 4 grupos (alifático saturado, alifático insaturado, aromático e indolilo).

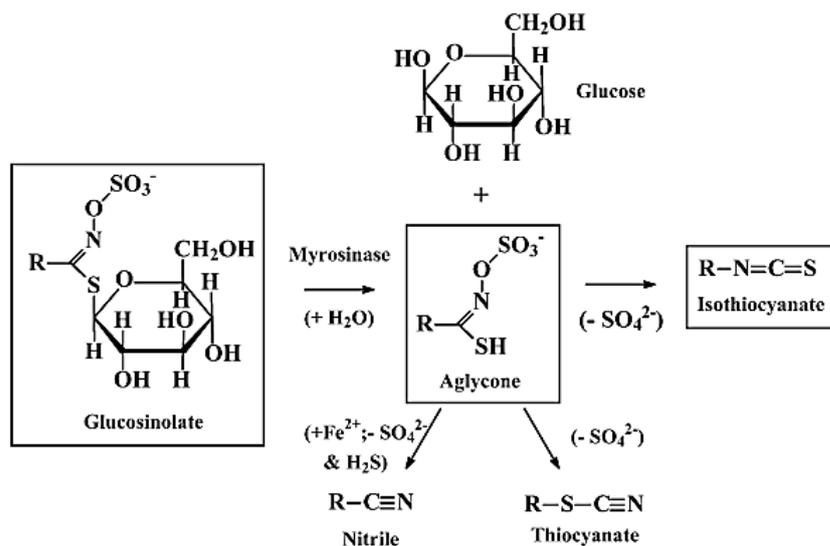


Figura 1. Hidrólisis de glucosinolatos por la enzima mirosinasa para la formación de isotiocianatos (**Wu *et al.*, 2009**).

El glucosinolato al ser hidrolizado por la mirosinasa da lugar a una aglicona inestable. Si las condiciones de pH son acidas forman derivados de nitrilo por el contrario al ser neutras darán origen a los isotiocianatos (**Rincón, 2014**). Los isotiocianatos son compuestos volátiles, se encuentran presentes en las plantas crucíferas y son el principal mecanismo de defensa por sus propiedades antibacterianas, antimicóticas, antivirales, anticancerígenas, quimiopreventivas y antiparasitarias sin generar resistencia a los microorganismos. Además, de aportar el sabor picante característico de estos compuestos (**Liu *et al.*, 2018; Nowicki, Rodzik, Herman-Antosiewicz, & Szalewska-Palasz, 2016; Wu *et al.*, 2009**). Existen también ITC`s de origen sintético utilizados en cultivos agrícolas como el Metam sodio, para el control de las plagas. Sin embargo, son contaminantes potenciales para el ambiente y al ser de amplio espectro eliminan organismos beneficiosos para el suelo (**Martínez *et al.*, 2014**). Según, **Nowicki *et al.* (2016)** los ITC`s de origen vegetal no son tóxicos para el ambiente y son una alternativa prometedora para el desarrollo de nuevos tratamientos contra enfermedades.

El mecanismo de acción del isotiocianato es poco conocido. Sin embargo, algunos autores reportan que interfiere por quelación las enzimas con radical metálico, e impide la absorción del oxígeno en la respiración celular provocando la muerte;

inactiva las enzimas intracelulares por la degradación oxidativa de los puentes disulfuro; desacopla la fosforilación oxidativa; e inhibe las enzimas metabólicas por acción del radical tiocianato (Nowicki *et al.*, 2016; Martínez *et al.*, 2014; Poma & Paz, 2017).

2.2 Hipótesis

2.2.1. Hipótesis nula

El extracto vegetal con mayor contenido de Isotiocianatos no posee actividad nematocida para el control de *Meloidogyne*.

2.2.2. Hipótesis alternativa

El extracto vegetal con mayor contenido de Isotiocianatos posee actividad nematocida para el control de *Meloidogyne*.

2.3 Señalamiento de variables

2.3.1. Variable dependiente

Concentración y tiempo de exposición del extracto.

2.3.2. Variable independiente

Porcentaje de mortalidad en nematodos del género *Meloidogyne* en el estadio J2 expuestos al extracto vegetal con mayor concentración de isotiocianatos.

CAPITULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Recolección y secado del material vegetal

De los campos de cultivo de la Universidad Técnica de Ambato, campus Querochaca, ubicado en el cantón Cevallos, perteneciente a la provincia de Tungurahua se colectó el material vegetal como: las hojas y flores de las especies de Mostaza (*Raphanus raphanistrum L.*) y Mastuerzo (*Tropaeolum majus*), mientras que para la Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) solamente se tomó los tubérculos para el estudio en cuestión. Las materia vegetal antes mencionada fue seleccionada en base a los estudios de (Manrique *et al.*, 2013; Vargas, Sánchez, & Jiménez, 2016) donde afirman que dichos órganos son los que poseen un alto contenido de glucosinolatos, mismos que serán transformados en isotiocianatos con efecto nematocida.

3.2. Preparación del material vegetal

El material vegetal se limpió y lavó con agua destilada para eliminar las impurezas como polvo e insectos, seguidamente se colocaron en un secador de bandejas (Grander, China) a 40 °C hasta secarlo totalmente, no se estableció un tiempo de secado fijo, debido a que cada material vegetal toma distintos lapsos de tiempo para completar el proceso, a continuación, el material seco fue triturado en un molino de martillos (Webwer Bros & White, Hamilton). Donde el peso de las muestras se registró y almacenaron en fundas plásticas herméticas con su respectivo etiquetado.

3.3. Extracción del material vegetal

Se realizaron dos tipos de extracto: hidroalcohólicos (1/20) y acuosos para cada muestra vegetal.

Para el extracto hidroalcohólico se utilizó una proporción 1/20 con relación al material vegetal – disolvente, es decir el peso del material vegetal es multiplicado por el factor de dilución (20), donde el valor obtenido señala la cantidad de etanol al 96% y agua

destilada dispuestos a añadir para la extracción, mientras que para la extracción acuosa el 100% del solvente fue con agua destilada.

Previo a los cálculos realizados el material vegetal fue pesado en la balanza analítica (OHASUS, PA214) y mezclado con el disolvente en un vaso de precipitados (PYREX $\pm 0,05$ ml) acorde al volumen a utilizar, llevándolo a la plancha de calentamiento (Super Nouva Multiplace, Thermo Scientific) a 100 °C, se mantuvo en agitación constante durante 30 min a partir de su ebullición. Finalmente, con un lienzo los extractos fueron filtrados y almacenados en botellas ámbar, para su posterior refrigeración a 4 °C, los sólidos resultantes producto del filtrado se desecharon.

3.4. Concentración de los extractos

El extracto fue agregado en el balón de vidrio del rotavapor (IKA RV8, USA), montando el equipo, para calentar el extracto a 65 °C con ayuda del baño María y una agitación constante de 200 rpm, hasta concentrar las muestras y disminuir la mayor cantidad de disolvente. Se repitió el ensayo con cada uno de los extractos.

3.5. Determinación de los sólidos totales solubles

En el porta muestras de la balanza de humedad (KERN MLS 50-3) se añadieron 3 g del extracto concentrado, a su término se registró el valor obtenido, mismo utilizado para la determinación de sólidos totales solubles aplicando la siguiente expresión:

$$SST = 100\% - \% H$$

Donde:

H=humedad

SST= sólidos totales solubles

3.6. Cuantificación de isotiocianatos

El isotiocianato contenido en el extracto se destiló con vapor de agua, recogiéndolo en una solución de nitrato de plata (AgNO₃), en exceso. Determinando el excedente de la solución de AgNO₃ por volumetría con el patrón de tiocianato amónico.

El contenido de isotiocianato se calculó con la siguiente fórmula matemática:

$$\text{Isotiocianato} \left(\frac{\text{g}}{\text{Kg}} \right) = 9,915 (V_0 - V_1) \times N \times 10/M$$

Donde:

V₀= volumen de solución patrón de tiocianato de amonio necesario para la determinación del blanco (ml); V₁= volumen de solución de tiocianato de amonio necesario para la titulación de la muestra en ml; N= normalidad de la solución patrón de tiocianato amónico y M= peso de la muestra.

3.7. Aislamiento e identificación de nematodos

Las muestras de suelos y raíces se recolectaron, de invernaderos con cultivos de tomate *Lycopersicon esculentum*, ubicados en el sector de Izamba en la ciudad de Ambato (Tungurahua – Ecuador) mismas que se homogenizaron y extrajeron por el método de Baermann utilizado por (Agrios, 2010) descrito a continuación:

Se coloca un embudo de vidrio de tamaño mediano suspendido con pinzas a un soporte universal, en la parte inferior se ajusta una manguera de hule, cerrándola en la parte inferior con una pinza de presión para impedir el paso del agua. En el interior del embudo se coloca una malla y sobre la misma una porción de papel filtro previamente amoldada al embudo. A continuación, se añade 100 g de la muestra de suelo incluyendo los restos de raíces, se agrega agua destilada hasta cubrir totalmente la muestra y tras 24 horas de reposo se recolecta el agua filtrada con los nematodos en la manguera de caucho aflojando previamente la pinza de presión.

Para la identificación de *Meloidogyne* en el estadio J2, se realizaron observaciones y mediciones con la ayuda de un microscopio (Leica DM2000 LED, Alemania), mismo

que cuenta con el software para realizar mediciones morfométricas de los nematodos, que luego fueron comparadas con ilustraciones y valores de varios autores basándose en parámetros estándares para identificación como son: características del estilete, longitud del cuerpo y región hialina de la cola (**Eisenback, Hirshmann, Sasser, & Triantaphyllov, 1983; Ratko, 2018**).

3.8. Evaluación y muerte de nematodos

El extracto con el mejor porcentaje de rendimiento y el mayor contenido isotiocianato fue seleccionado. Basado en la metodología experimental de (**Salazar & Gúzman, 2014**) el extracto se evaluó en 7 concentraciones diluidas en agua destilada (100%v/v, 75%v/v, 50%v/v, 25%v/v, 15%v/v, 10%v/v y 5%v/v), un testigo absoluto (agua destilada) y un testigo químico (Metam sodio 1µl/1L de agua destilada).

En tubos de centrifugación de 1,5ml (Eppendorff, Alemania) se añadieron 120 nematodos contenidos en 400µl de agua, y a su vez 400µl del extracto con las diluciones establecidas, repitiendo el proceso para el testigo absoluto como para el testigo químico por triplicado. Los nematodos mezclados con las soluciones fueron trasladados a 26°C en la incubadora (Memmert, Alemania) durante el tiempo de evaluación de su muerte, mismo que estuvieron 48 horas, simulando de esta forma sus condiciones de origen, como es la temperatura del suelo y la exposición lumínica, factores que pueden alterar los resultados según (**Salazar & Gúzman, 2014**).

Para la evaluación se extrajeron 20 nematodos al azar cada 2, 4, 6, 8, 24 y 48 horas, donde se observaron, y con la ayuda de una aguja de disección se verificó su muerte, considerando muertos a los que se encontraron inmóviles, este procedimiento se lo realizó en un estereoscopio (Leica DM1000, Alemania) contabilizando los individuos vivos y muertos para su posterior análisis del porcentaje de mortalidad. Seguidamente se evaluarán los daños producidos por el extracto en los nematodos muertos bajo el microscopio óptico (Leica DM2000 LED, Alemania), añadiendo a los mismos una gota del reactivo 1 del Kit de tinción de nematodos (PlantSphereLabs, Ecuador), que permitió la visualización del daño producido en la estructura.

Con base en (Rosado-Aguilar, 2008 & Iler, 2017) el porcentaje de mortalidad es evaluado con la siguiente expresión :

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

Además, se utilizó el porcentaje de mortalidad corregida de Abbott:

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

(Abbott, 1925)

3.9. Diseño Experimental

Para el análisis estadístico de los resultados se realizó un diseño factorial AXB, para observar las interacciones entre los factores, donde las variables son el mejor extracto vegetal a diferentes concentraciones, y el porcentaje de mortalidad de los nematodos *Meloidogyne* expuestos al extracto en diferentes tiempos. Se comparará el efecto que ejercen las diferentes concentraciones del extracto en cada uno de los ensayos mediante análisis de varianza en caso de existir diferencia significativa se realizará la prueba de comparación múltiple de Tukey.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis de resultados

4.1.1 Cuantificación de isotiocianato

Se cuantificó el isotiocianato presente en extractos acuosos e hidroalcohólicos en tres especies de plantas como son: *Tropaeolum tuberosum*, *Raphanus raphanistrum* L. y *Tropaeolum majus*. En la tabla 1 se presenta los resultados de los extractos con diferentes concentraciones expresados como isotiocianato de alilo en microgramos por mililitro (ug/ml). Además, se evidencia que el extracto hidroalcohólico de *Raphanus raphanistrum* L. contiene la concentración más elevada (535,410 ug/ml). Este, extracto fue seleccionado para evaluar el efecto sobre los nematodos. La familia Brassicaceae, es considerada como fuente importante de metabolitos, entre ellos los glucosinolatos que por el producto de la hidrólisis dan origen a los isotiocianatos, los cuales se han asociado con la eliminación de patógenos (**Molina-vargas & Bentura-castellanos, 2009**).

La cantidad de isotiocianatos depende de factores como: la especie, la edad de la planta, el órgano y el solvente utilizado en la extracción (**León et al., 2016**). Por ejemplo: el contenido de ITC`s en el extracto de flores de mastuerzo fue diferente del extracto de hojas (Tabla 1). Según, **Chirinos & Chota (2018)** las hojas y las flores son los órganos contiene la mayor cantidad de isotiocianato. También, el contenido de isotiocianatos es variable según la especie.

Tabla 1. Cuantificación de isotiocianato en extractos vegetales.

Muestra	Hidroalcohólicos	Acuosos
	ug/ml	ug/ml
Mastuerzo (flores)	153,683	89,235
Mastuerzo (hojas)	208,215	19,830
Mostaza (hojas)	535,410	0,00
Mashua (tubérculos)	123,938	69,405

Los extractos en etanol obtuvieron una mejor extracción de isotiocianatos, que se explicaría por la polaridad entre los compuestos químicos del solvente y el extracto. Mientras que, en los extractos acuosos las concentraciones son bajas (mastuerzo 19,8 ug/ml), incluso en la mostaza no existe concentración de isotiocianatos. En el proceso de extracción el solvente utilizado (agua) no tiene la misma capacidad del alcohol para contener las moléculas de isotiocianato. También, **Chirinos & Chota (2018)** realizaron extracciones similares con mastuerzo y encontraron que el extracto hidroalcohólico presentó mayor efecto en comparación con el extracto acuoso. Este, trabajo confirma que el alcohol es mejor solvente que el agua.

4.1.2 Porcentaje de rendimiento del extracto

Los extractos vegetales con mayor porcentaje de rendimiento fueron los hidroalcohólicos y entre ellos la mostaza obtuvo el mejor rendimiento (30,67%). Los extractos acuosos no presentaron un gran porcentaje de rendimiento (Tabla 2). La relación entre los sólidos solubles totales, la cantidad de material vegetal utilizado, y el volumen final de extracto líquido obtenido, son factores determinantes para el porcentaje de rendimiento de los extractos. Además, la extracción de los principios activos de las plantas depende de factores como la polaridad del solvente y el material vegetal (**Moya & Pérez, 2017**). El porcentaje de rendimiento en los extractos hidroalcohólicos es mayor en comparación con los acuosos, debido a que la mayoría de compuestos presentes en los extractos tiene mayor afinidad con el alcohol (**García & Sánchez, 2013**). Sin embargo **Arranz (2010)** menciona que a pesar de que se utilice cualquier tipo de disolvente, la extracción siempre será incompleta, ya que muchas de las moléculas bioactivas se quedan en los residuos de la extracción, siendo otro factor que influye en el rendimiento de los extractos.

Tabla 2. Porcentaje de rendimiento de los extractos líquidos.

Extractos	% Rendimiento De Sólidos Extraídos (p/v)	
	Extractos Hidroalcohólicos	Extractos Acuosos
Mastuerzo (flores)	21,70	3,76
Mastuerzo (hojas)	26,15	8,94
Mashua (tubérculos)	27,20	12,48
Mostaza (hojas)	30,67	6,77

4.1.3 Identificación del género *Meloidogyne*

La identificación de *Meloidogyne* en el estadio J2 se realizó en base a comparaciones de mediciones morfológicas como: longitud total, longitud de la porción hialina y tamaño del estilete. Los valores experimentales de las mediciones (Tabla 3) fueron comparadas con datos bibliográficos de Eisenback *et al.*, (1983) y Peraza-Padilla *et al.*, (2014). En los cultivos donde se colectaron las muestras se observó marchitez en la parte aérea de la planta (síntomas de nematodos), el desarrollo del fruto no se encontró afectado. También se observó la presencia de nódulos o agallas en las raíces (Figura 2A). Según, (Agrios, 2010; De Medeiros *et al.*, 2017; Hernández-Ochandía *et al.*, 2012) *Meloidogyne* en la etapa o estadio J2 tiene gran movilidad provocando el mayor daño en las plantas. La invasión ocurre desde el ingreso por la punta de la raíz, hasta las células vasculares en desarrollo, provocando las agallas. Este, es uno de los principales síntomas para detectar nematodos en los cultivos. En la experimentación las raíces se analizaron bajo el estereoscopio, observándose la presencia de estos individuos (Figura 2B y 2C). El aislamiento e identificación de este género fue facilitado por la abundancia de estos (Figura 3).

Tabla 3. Morfología de *Meloidogyne* en el estadio (J2).

Características morfológicas	Dimensiones (μm)		Observaciones**
	(Peraza-Padilla <i>et al.</i> , 2014)*	Eisenback <i>et al.</i> , 1983*	
Longitud del cuerpo	429,2 \pm 26,8 (405,0-480,0)	416,2 \pm 27,2 (372,0-462,0)	(250-400) 306,43 \pm 28,78
Longitud del estilete	14,4 \pm 0,8 (13,0-15,0)	14,5 \pm 0,5 (14,0-15,0)	(15-24) 12,53 \pm 1,72
Longitud de la porción hialina	10,6 \pm 1,4 (9,0-14,0)	11,0 \pm 2,0 (6,0-14,0)	(15-24) 11,04 \pm 1,90

Fuente: *Comparación bibliográfica.

**Observaciones en laboratorio

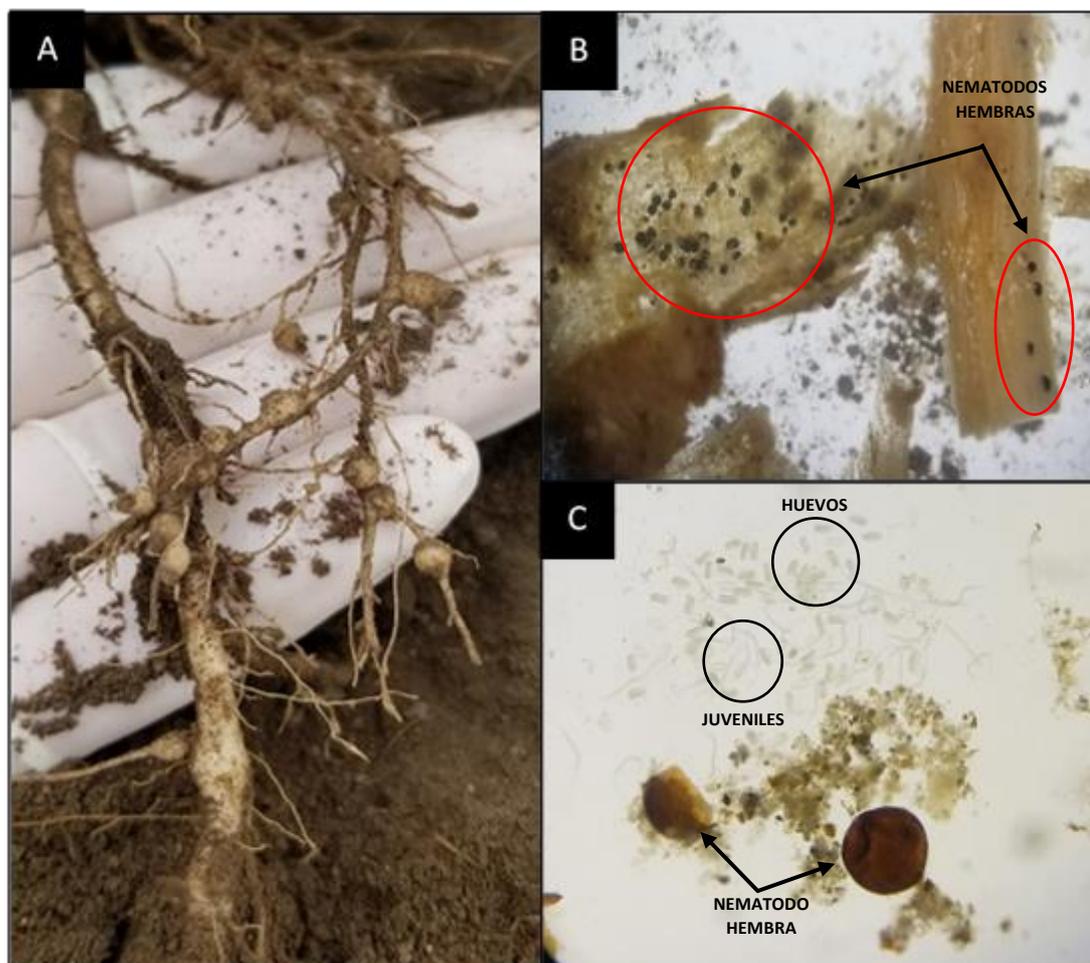


Figura 2. A. Nódulos en las muestras de raíces provocados por nematodos. **B.** Raíces visualizadas bajo el estereoscopio infestadas por nematodos. **C.** Huevos y juveniles de nematodo hembra abierta.



Figura 3. Imágenes de *Meloidogyne* (J2) reportados en bibliografía y nematodos utilizados en el experimento. **A.** Cuerpo entero de J2 (García & Sánchez-Puerta, 2012). **B.** Nematodo identificado. **C.** Cabeza de J2 (Coyne & Claudius-cole, 2007).

4.1.4 Actividad nematocida del extracto

La actividad nematocida fue evaluada al exponer a juveniles de *Meloidogyne* (J2) a diferentes concentraciones del extracto de mostaza por 48 horas (Figura 4). En todas las concentraciones se observó reducción del número nematodos a partir de las dos horas de exposición. Los individuos expuestos al testigo absoluto (agua) se mantuvieron con vida en todo el periodo de evaluación. El extracto al 100% de concentración provocó la reducción de la población, en un $93,33 \pm 2,89\%$ en las dos primeras horas de exposición. A las cuatro horas fueron eliminados por completo (Tabla 4). El porcentaje de mortalidad del extracto del 100% fue muy cercano al efecto del control químico (100% a las dos horas). En los extractos vegetales se encuentran

compuestos tóxicos para los nematodos. Entre ellos el compuesto con mayor efecto nematocida es el isotiocianato (Malik *et al.*, 2008). El isotiocianato, es utilizado en nematocidas comerciales como Metam sodio (isotiocianatos sintéticos) por su efectividad en cultivos agrícolas. Sin embargo, causan daños al ambiente y a la microfauna del suelo (Geng *et al.*, 2016).

El efecto del extracto de mostaza se evidenció hasta en la concentración más baja (5%). La actividad nematocida inició a partir de las dos horas de exposición ($1,70 \pm 2,89\%$). En el transcurso del tiempo el porcentaje de mortalidad incrementó, hasta provocar la muerte total de la población en las 48 horas de evaluación. En la investigación de Vilchis, López, Powers, & Belmont (2013) utilizaron extractos acuosos de *Raphanus raphanistrum* L. en huevos de *Meloidogyne*. El efecto se mantuvo hasta 12 días después de su aplicación, reduciendo la cantidad de estos en un 50%. Al parecer el efecto nematocida de los extractos no se pierde con el paso del tiempo.

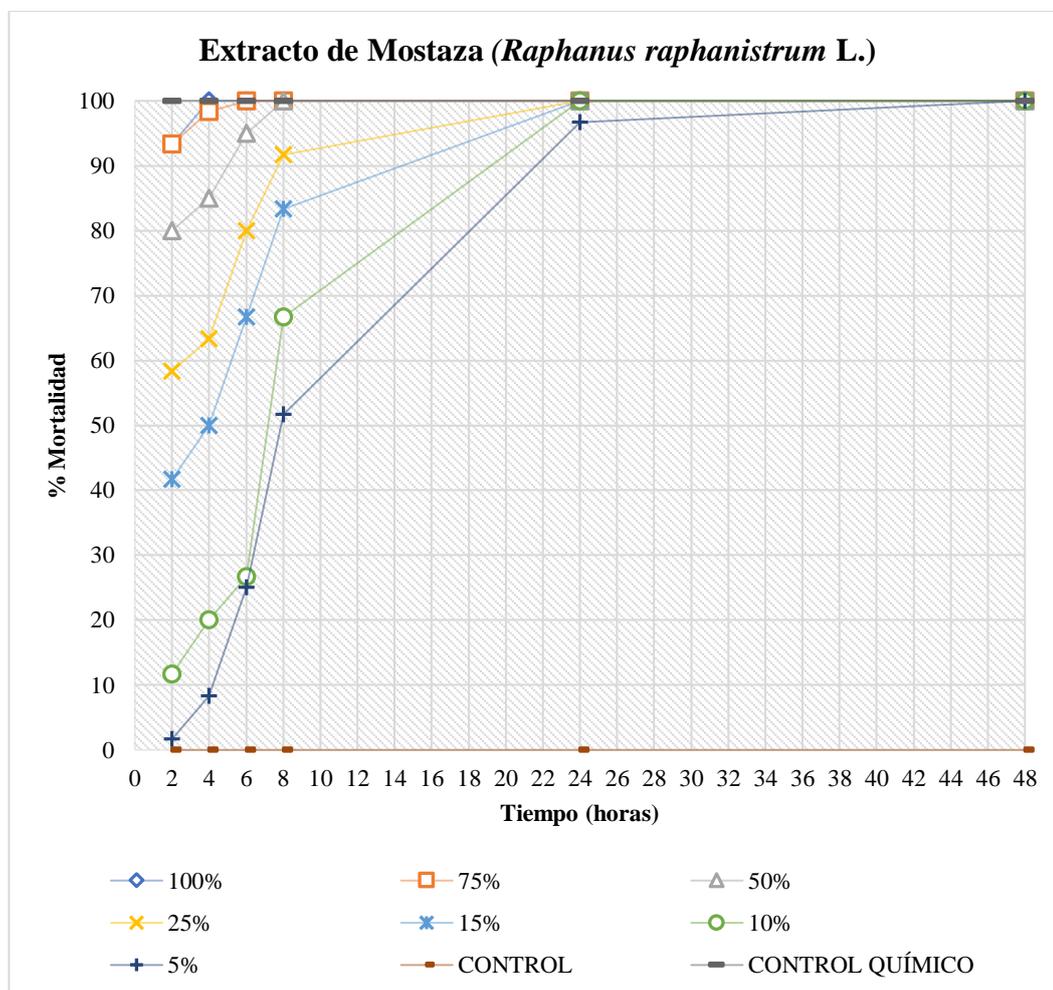


Figura 4. Efecto del extracto de mostaza (*Raphanus raphanistrum* L.) en la mortalidad de *Meloidogyne* (J2).

El efecto nematocida de los extractos vegetales también se reporta en otras investigaciones. Por ejemplo, **Salazar & Guzmán (2014)** señalan que los extractos hidroalcohólicos de *Quassia amara* y *Brugmansia suaveolens* eliminaron nematodos del genero *Meloidogyne*. Las concentraciones más altas de los extractos ocasionaron el 89% y 78% de mortalidad en 48 horas de exposición, respectivamente. Además **Chango (2015)**, incorporó en suelos biomasa de *Sinapsis alba* para el control de *Meloidogyne*, y disminuyó la población de nematodos en un 50,56%. Estos, resultados corroboran el efecto nematocida de las especies de este orden (Brassicales). También, **Iler (2017)** analizó la mortalidad de estos con aceites esenciales de diferentes plantas.

Los resultados obtenidos en la investigación y los trabajos citados confirman el efecto biocida de las plantas en la disminución de *Meloidogyne*. Con base en estos hallazgos se sugiere utilizar extractos de plantas para eliminar patógenos, por su alta eficacia, menor costo de producción y bajo impacto ambiental (**De Medeiros et al., 2017**).

En la Figura 5A, se muestra el efecto de las diferentes concentraciones en la mortalidad de los nematodos, donde las concentraciones de 50, 75 y 100 % estadísticamente son iguales. Mientras que, en la Figura 5B se indica el tiempo (promedio) que los extractos actúan y causan mortalidad en los nematodos. A las 24 y 48 horas ocasionan el mayor porcentaje de mortalidad y no hay diferencias estadísticamente significativas.

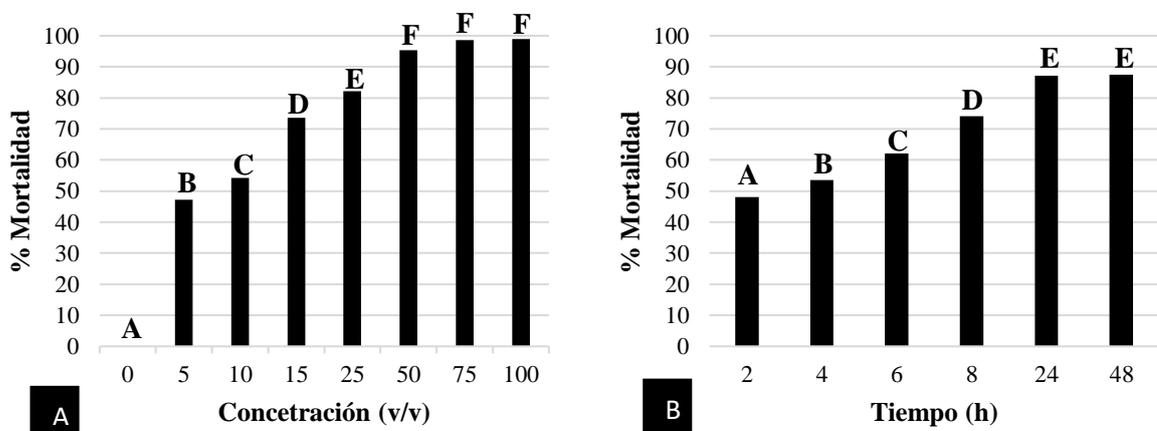


Figura 5. Gráficas del análisis estadístico. **A.** Mortalidad en función a las concentraciones del extracto **B.** Mortalidad en función al tiempo de exposición del extracto.

Tabla 4. Porcentajes de mortalidad de *Meloidogyne* (J2) expuesto al extracto de *Raphanus raphanistrum* L. en condiciones in vitro.

Concentración (v/v)	% de Mortalidad					
	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas	24 horas	48 horas
100	93,33 ± 2,89 Aa	100,00 ± 0,00 Ab	100,00 ± 0,00 Ac	100,00 ± 0,00 Ad	100,00 ± 0,00 Ae	100,00 ± 0,00 Af
75	93,33 ± 2,89 Ba	98,33 ± 2,89 Bb	100,00 ± 0,00 Bc	100,00 ± 0,00 Bd	100,00 ± 0,00 Be	100,00 ± 0,00 Bf
50	85,00 ± 5,00 Ca	88,33 ± 2,89 Cb	98,33 ± 2,89 Cc	100,00 ± 0,00 Ce	100,00 ± 0,00 Cf	100,00 ± 0,00 Cf
25	58,33 ± 5,77 Da	63,33 ± 10,41 Db	80,00 ± 13,23 Dc	91,67 ± 2,89 Dd	100,00 ± 0,00 De	100,00 ± 0,00 Df
15	41,67 ± 7,64 Fa	50,00 ± 5,00 Eb	66,67 ± 7,64 Ec	83,33 ± 7,64 Ed	100,00 ± 0,00 Ee	100,00 ± 0,00 Ef
10	11,67 ± 2,89 Fa	20,00 ± 5,00 Fb	26,67 ± 7,64 Fc	66,67 ± 10,41 Fd	100,00 ± 0,00 Fe	100,00 ± 0,00 Ff
5	1,70 ± 2,89 Ga	8,33 ± 5,77 Gb	25,00 ± 5,00 Gc	51,67 ± 5,77 Gd	96,67 ± 2,89 Ge	100,00 ± 0,00 Gf
Control Químico	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
Control	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Los valores corresponden a la media ± la desviación estándar.

Las letras mayúsculas indican para cada concentración, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos.

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

4.1.1 Daño provocado por el extracto en los nematodos

Meloidogyne (J2) fue expuesto a diferentes concentraciones del extracto de mostaza (100, 75, 50, 25, 15, 10, 5%), un testigo químico (Metam sodio) y un testigo absoluto (agua). Los nematodos del testigo absoluto no presentaron daños ni alteraciones en su estructura externa e interna (Figura 6 A y B). Además, la movilidad de estos continuó en el proceso de evaluación (indicador de vida). Sin embargo, los individuos sometidos al testigo químico presentaron daño en su estructura interior. Se presencié abultamientos de color negro en un lapso de dos horas de exposición (Figura 6C). Y a las 48 horas se observó el desprendimiento de su epidermis provocando desintegración del cuerpo (figura 6D). Según LAINCO (2017), el isotiocianato presente en Metam sodio es corrosivo. Este, se absorbe a través de la piel provoca daño del tejido y órganos internos durante su exposición.



Figura 6. Evaluación de daño de *Meloidogyne* J2. Evaluación de daño de *Meloidogyne* J2. **A.** y **B.** Evaluación a las 2 y 48 horas de exposición al testigo absoluto (agua) respectivamente. **C.** y **D.** Evaluación a las 2 y 48 horas de exposición al testigo químico (Metam sodio).

Con los antecedentes del testigo químico y absoluto, la evaluación con los extractos fue similar. Se realizaron comparaciones con los antes mencionados para comprobar la muerte y el daño producido en los nematodos (Figura 7). Además, se utilizó el Kit de tinción de nematodos proporcionado por el laboratorio PlantSphereLabs, Ecuador. Una gota del reactivo 1 permitió que el contraste y el daño provocado en los individuos sean más evidentes (Figura 7C y D).

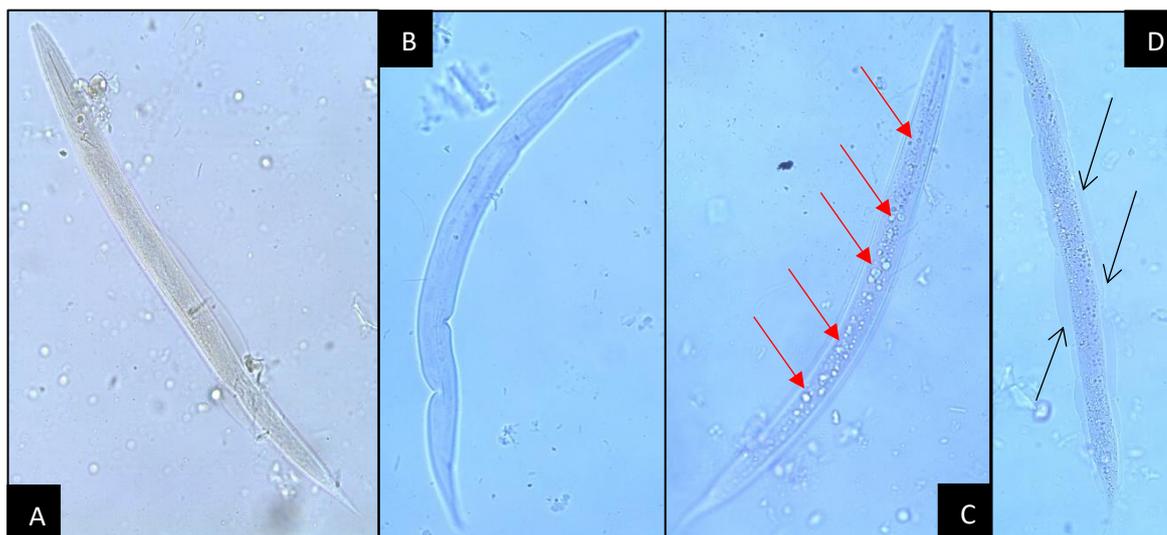


Figura 7. Evaluación de daño de *Meloidogyne* J2 con extracto de mostaza al 100% de concentración. Evaluación de daño de *Meloidogyne* J2 con extracto de mostaza al 100% de concentración **A.** Nematodo aislado (48 horas de exposición). **B.** Adición de reactivo 1 (Kit de tinción). **C. y D.** Daños provocados. Flechas rojas indican daño en el interior, flechas negras el desprendimiento de la epidermis.

El daño causado en *Meloidogyne* expuesto desde la mayor a la menor concentración del extracto fue similar al testigo químico (Figura 8). En su estructura interna presentaron los mismos abultamientos y en su parte externa el desprendimiento de la epidermis. *Raphanus raphanistrum* es una fuente amplia de glucosinolatos. El producto de su hidrólisis origina isotiocianatos con efecto nematocidas similar al de Metam sodio (Molina, 2013; & Martínez, et al., 2014). Aunque el mecanismo de acción no está bien definido varios autores llegan a la conclusión que los isotiocianatos impiden la absorción del oxígeno, por ende la respiración celular se dificulta y causa la muerte del individuo (Nowicki et al., 2016; Martínez et al., 2014; Poma & Paz, 2017).

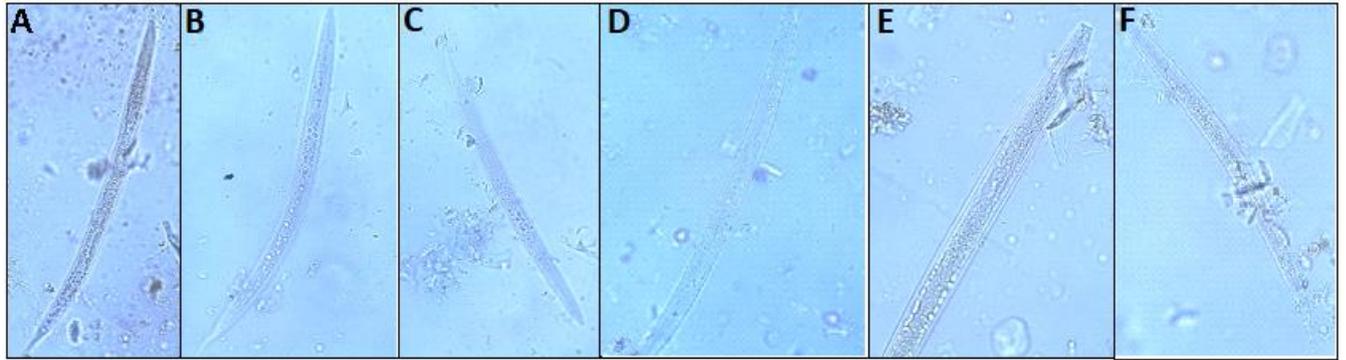


Figura 8. Daños provocados por las diferentes concentraciones del extracto en *Meloidogyne*.
A. 75% B. 50% C. 25% D. 15% E.10% F.5%

4.2 Verificación de hipótesis

Los análisis de resultados presentados permiten la afirmación de la hipótesis alternativa del proyecto. Donde se deduce que el extracto vegetal con mayor contenido de Isotiocianatos (*Raphanus raphanistrum* L.) posee actividad nematocida para el control de *Meloidogyne*.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- La evaluación de los extractos vegetales de Mashua (*Tropaeolum tuberosum*), Mostaza (*Raphanus raphanistrum* L.) y Mastuerzo (*Tropaeolum majus*) demostró el efecto nematicida para el control de *Meloidogyne* en condiciones in vitro.
- El mayor contenido de isotiocianatos se obtuvo en los extractos hidroalcohólicos. Los extractos acuosos no presentaron una cantidad considerable. El extracto de mostaza obtuvo la concentración más alta de isotiocianato (535,410 µg/ml).
- El extracto con mayor concentración de isotiocianatos (*Raphanus raphanistrum* L.) redujo la población de *Meloidogyne* J2. La concentración del extracto al 100% v/v obtuvo el mayor efecto en el menor tiempo de exposición ($93,33 \pm 2,89$), similares a los resultados del testigo químico ($100,00 \pm 0,00$). Sin embargo, todas las concentraciones presentaron resultados favorables al eliminar a los individuos en las 48 horas de evaluación.
- Se identificó los daños en el interior y exterior de *Meloidogyne* J2 por el extracto vegetal de mostaza comparándolos con los daños producidos con el testigo químico, observándose similitudes entre sí, en las imágenes expuestas se presencia el desprendimiento de su epidermis y abultamientos en el interior, efectos que son propios de los nematicidas, cabe recalcar que el blanco no tuvo ningún daño manteniéndose vivos en las 48 horas.

5.2 Recomendaciones

- Es importante mantener las condiciones del hábitat de origen de los nematodos como son: la temperatura, la exposición a la luz y el pH. Al ser evaluados en condiciones in vitro estos factores alteran los resultados en el porcentaje de mortalidad.
- La mayoría de las plantas contienen beneficios que aún no son evaluados, recomiendo realizar más estudios con extractos vegetales que permitan resolver problemas en todos los campos de investigación.
- Continuar con los estudios de plantas implementándolas en cultivos infestados por nematodos, no solo de la misma especie, además de utilizar otro tipo de órganos y solventes para la elaboración de nuevos extractos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, W. S. (1925). *A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide*. Journal of Economic Entomology, 18(2), 265–267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Agrios, G. (2010). *Fitopatología*. 25(1), 30–41. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Aguilar-Villanueva, D. A., Avalos-Murga, S. P., Rojas-Plasencia, P., Marquillo-Bartra, I., & Ayala-Ravelo, M. S. (2017). *Effect of the ethanol extract of Tropaeolum majus (cress) upon Trichophyton mentagrophytes-induced mycosis in Rattus norvegicus*. Acta Médica Peruana, 34(3), 196–202. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172017000300006&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.org.pe/pdf/amp/v34n3/a06v34n3.pdf
- Armendáriz, I., Quiña, D., Ríos, M., & Landázuri, P. (2015). *Nematodos fitopatógenos y sus estrategias de control*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1599.9446>
- Autónoma De Yucatán, U., Rosado-Aguilar, M., & Aguilar-Caballero, J. A. ; (2008). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 8(3), 297–301. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93911235009>
- Bressan, M., Roncato, M. A., Bellvert, F., Comte, G., Haichar, F. E. Z., Achouak, W., & Berge, O. (2009). *Exogenous glucosinolate produced by Arabidopsis thaliana has an impact on microbes in the rhizosphere and plant roots*. ISME Journal, 3(11), 1243–1257. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.68>
- Cantuña, N. (2013). *Detección e identificación del nematodo formador de agallas Meloidogyne spp. en suelos agrícolas destinados al cultivo de Solanum lycopersicum mediante la técnica PCR*. Recuperado de <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/7993/1/AC-B-ESPE-047705.pdf>
- Chango Palate, E. A. (2015). *Universidad Técnica de Ambato Facultad de Ciencias Agropecuarias*. Universidad Técnica de Ambato. Recuperado de [http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/18309/1/Tesis-114 IngenierÍA Agronómica -CD 369.pdf](http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/18309/1/Tesis-114%20Ingenier%C3%ADa%20Agron%C3%B3mica%20-%20CD%20369.pdf)
- Chirinos Rodríguez, Jessica Marisol; Chota Vidal, L. R. (2018). *Efecto antibacteriano in vitro del extracto de Tropaeolum majus en cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175*. Recuperado de [http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/10241/Chirinos Rodríguez Jessica Marisol.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/10241/Chirinos%20Rodr%C3%ADguez%20Jessica%20Marisol.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Clarke, D. B. (2010). *Glucosinolates, structures and analysis in food*. Analytical Methods, 2(4), 310. <https://doi.org/10.1039/b9ay00280d>
- Coyne, D. L., & Claudius-cole, J. M. N. B. (2007). *Nematología práctica : Una guía de campo y laboratorio*. Cotonou, Benin.

- Dávila, M., Vásquez, C., & Pomboza, P. (2018). *Primer reporte de Raphanus raphanistrum L. en los páramos de Chimborazo*, Ecuador. *Idesia (Arica)*, 35(ahead), 0–0. <https://doi.org/10.4067/s0718-34292017005000201>
- De Medeiros, H. A., De Araújo Filho, J. V., De Freitas, L. G., Castillo, P., Rubio, M. B., Hermosa, R., & Monte, E. (2017). *Tomato progeny inherit resistance to the nematode Meloidogyne javanica linked to plant growth induced by the biocontrol fungus Trichoderma atroviride*. *Scientific Reports*, 7(1), 40216. <https://doi.org/10.1038/srep40216>
- Eisenback, J. D., Hirshmann, H., Sasser, J. N., & Triantaphyllov, A. C. (1983). *Guía para la identificación de las cuatro especies más comunes del nematodo agallador (Meloidogyne especies) con una clave pictórica.*, (June 1983).
- Flor Peregrín, M. E. (2013). *Uso de agentes de control y protección biológica frente a nemátodos del género Meloidogyne en cultivos protegidos bajo plástico*. Recuperado de <http://digibug.ugr.es/handle/10481/29519%5Cnhttp://digibug.ugr.es/bitstream/10481/29519/1/21862369.pdf>
- García, Evangelina Laura; Sánchez-Puerta, M. V. (2012). *Characterization of a Root-Knot Nematode Population of Meloidogyne arenaria from Tupungato (Mendoza, Argentina)*. *Journal of nematology*, 44(3), 291–301. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23481918%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3547342>
- García Melo, F., & Sánchez Martín, L. (2013). *Autoensamblaje de moléculas orgánicas: mecanismos y construcción de estructuras supramoleculares de dimensionalidad modulada memoria para optar al grado de doctor presentada por bajo la dirección del doctor*. Recuperado de <https://eprints.ucm.es/23924/1/T34949.pdf>
- Geng, C., Nie, X., Tang, Z., Zhang, Y., Lin, J., Sun, M., & Peng, D. (2016). *A novel serine protease, Sep1, from Bacillus firmus DS-1 has nematicidal activity and degrades multiple intestinal-associated nematode proteins*. *Scientific Reports*, 6(1), 25012. <https://doi.org/10.1038/srep25012>
- Giancarlo, Ventura, M., Esparza, D., Dean, D., & Villar, A. del. (1996). *Revista de la Facultad de Agronomía. Revista de la Facultad de Agronomía* (Vol. 13). 2000. Universidad del Zulia. Recuperado de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-78182005000400001&script=sci_arttext
- Gil, J. (2000). *Métodos de lucha contra los Culicoides*. Recuperado de https://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1963_06.pdf
- Hernández-Ochandía, D., Arias, Y., Gómez, L., Peteira, B., Miranda, I., & Rodríguez, M. G. (2012). *Elementos del ciclo de vida de población cubana de Meloidogyne incognita* Life cycle elements of a Cuban population *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White). *Rev. Protección Veg.*, 27(3), 188–193.
- Hernández Lauzardo, A. N. B. B. S. V. del V. M. G. (2007). *Revista fitotecnia mexicana publicada por la Sociedad Mexicana de Fitogenética*. *Revista*

- Fitotecnia Mexicana (Vol. 30). Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Recuperado de <http://www.redalyc.org/html/610/61030202/>
- Iler Iler, D. C. (2017). *Evaluación de la actividad nematocida in vitro de aceites esenciales frente a Meloidogyne*. Recuperado de <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/26608>
- LAINCO, S. . (2017). *Desinfectante de suelos informe técnico*. Barcelona. Recuperado de <https://www.lainco.es/files/pdf/a47993db19415791f35444fe6b19fb4b.pdf>
- Lazzeri, L., Malaguti, L., Bagatta, M., D'Avino, L., Ugolini, L., De Nicola, G. R., ... Iori, R. (2013). *Characterization of the main glucosinolate content and fatty acid composition in non-food Brassicaceae seeds*. *Acta Horticulturae*, 1005(1005), 331–338. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1005.38>
- León, G., Rincón, A., & Jiménez, P. (2016). *La Producción de Metabolitos Secundarios en la Familia Brassicaceae*. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 9(2), 282. <https://doi.org/10.18359/rfcb.388>
- Lino, K., Rodríguez, J., Solano, M., Silva, C., Sedano, N., & Vásquez, W. (2015). *Evaluation of phenolic compounds and antioxidant capacity of three color petal cress*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 81(4), 319–327. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2015000400004&lng=es&nrm=iso&tlng=
- Liu, P., Behray, M., Wang, Q., Wang, W., Zhou, Z., Chao, Y., & Bao, Y. (2018). *Anti-cancer activities of allyl isothiocyanate and its conjugated silicon quantum dots*. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19353-7>
- Malik, M. S., Norsworthy, J. K., Culpepper, A. S., Riley, M. B., & Bridges, W. (2008). *Use of Wild Radish (Raphanus raphanistrum) and Rye Cover Crops for Weed Suppression in Sweet Corn*. *Weed Science*, 56(4), 588–595. <https://doi.org/10.1614/ws-08-002.1>
- Manrique, I., Arbizu, C., Vivanco, F., Gonzales, R., Ramírez, C., Chávez, O., ... Ellis, D. (2013). *Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pav. Colección de germoplasma de mashua conservada en el Centro Internacional de la Papa (CIP)*. *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Mercedes, M., & Cortes, A. (2011). *Análisis y comparación de los glucosinolatos presentes en diferentes accesiones de cubio (Tropaeolum tuberosum) para evaluar su uso potencial en el control del patógeno de la papa Spongospora subterranea*. Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/5300/1/mariamercedesarias cortes.2011.pdf>
- Molina-Vargas, L. F. (2013). *Mecanismo de acción de los isotiocianatos*. *Agronomía Colombiana*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652013000100008
- Molina-vargas, L. F., & Bentura-castellanos, J. U. (2009). *Rhizoctonia solani Kühn* AG-3, 0(1), 37–40.

- Moya Castillo, E. V., & Pérez Betancourt, Y. (2017). *Evaluación de la actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica in vitro de los extractos vegetales de Marco (Ambrosia arborescens) y Quishuar (Buddleja incana), obtenidos mediante secado por aspersión*. Universidad Técnica de Ambato. Recuperado de http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/26010/1/BQ_128.pdf
- Nowicki, D., Rodzik, O., Herman-Antosiewicz, A., & Szalewska-Pałasz, A. (2016). *Isothiocyanates as effective agents against enterohemorrhagic Escherichia coli: Insight to the mode of action*. Scientific Reports, 6(February), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep22263>
- Orellano Gonzales, E. V., & Valverde Torres, J. M. (2017). *Propiedades físicas, antocianinas y capacidad antioxidante del atomizado de Mashua (Tropaeolum Tuberosum) encapsulado con maltodextrina*. Universidad Nacional del Centro del Perú. Recuperado de <http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/UNCP/4776>
- Ortega Martínez, L., & Martínez Valenzuela, C., & Huerta de la Peña, A., & Ocampo Mendoza, J., & Sandoval Castro, E., & Jaramillo Villanueva, J. (2014). *Uso y manejo de plaguicidas en invernaderos de la región norte del estado de Puebla*. Acta Universitaria, 24(3). Recuperado de <http://www.redalyc.org/html/416/41631291001/>
- Peraza-Padilla, W., Rosales-Flores, J., Esquivel-Hernández, A., Hilje-Rodríguez, I., Molina-Bravo, R., & Castillo-Castillo, P. (2014). *Identificación morfológica, morfométrica y molecular de Meloidogyne incognita en higuera (Ficus carica L.) en Costa Rica*. Agronomía Mesoamericana, 24(2), 337. <https://doi.org/10.15517/am.v24i2.12533>
- Poma, L., & Paz, F. (2017). *Efecto antimicrobiano del extracto de cubio (Tropaeolum tuberosum) frente a Listeria monocytogenes en carne de hamburguesa*. Universidad de La Salle. Facultad de Ingeniería. Ingeniería de Alimentos. Recuperado de <http://repository.lasalle.edu.co/handle/10185/21223#.XSWRDY8Ub5k.mendeley>
- Quispe, C., Mansilla, R., Chacón, A., & Blas, R. (2015). *Ecología Aplicada. Ecología Aplicada (Vol. 14)*. Universidad Nacional Agraria La Molina. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162015000200013
- Ramallo, R., Wathelet, J.-P., Le Boulengé, E., Torres, E., Marlier, M., Ledent, J.-F., ... Larondelle, Y. (2004). *Glucosinolates in isaño (Tropaeolum tuberosum) tubers: qualitative and quantitative content and changes after maturity*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 84(7), 701–706. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1691>
- Ramírez, Freddy, Grijalva, Rosita, Navarrete, Ximena, Guerrero, R. (2015). *Asociados con tomate de árbol (Solanum betaceum Cav.) en las provincias de Imbabura*, 2(1), 48–53.
- Ratko, D. L. (2018). *Identificación de las formas adultas de los nematodos gastrointestinales y pulmonares de los rumiantes en la República Argentina*. Red de Helminología de FAO para América Latina y el Caribe., 1, 1–33. Recuperado

de <http://cnia.inta.gov.ar/helminto>.

- Ridley, C. E., & Ellstrand, N. C. (2009). *Evolution of enhanced reproduction in the hybrid-derived invasive, California wild radish (Raphanus sativus)*. *Biological Invasions*, 11(10), 2251–2264. <https://doi.org/10.1007/s10530-008-9412-1>
- Rincón, A. (2014). *Biosíntesis de los glucosinatos e importancia nutricional humana y funciones de protección a las plantas*. *Alimentos Hoy*, 22(31), 64–80.
- RUBY, C. R. J. M. C. V. L. (2018). Io Fa Ac Fa Io.
- Salaue, L. M. (2012). *Universidad Complutense de Madrid Facultad de Farmacia Departamento de Nutrición y Bromatología II (bromatología) semillas de frutos nativos y cultivados en Chile: su aceite como fuente compuestos nacionales memoria para optar al grado de doctor presentad*. Recuperado de <https://eprints.ucm.es/11255/1/T32158.pdf>
- Salazar, W., & Gúzman, T. (2014). *Efecto nematocida de extractos de Quassia amara y Brugmansia suaveolens sobre Meloidogyne sp. asociado al tomate en Nicaragua*. *Agronomía Mesoamericana*, 25(1), 111–119. Recuperado de http://www.mag.go.cr/rev_meso/v25n01_111.pdf
- Silva, C., Quezada, F., Filio, M., Solano, M., & Ramos, O. (2017). *Efecto de presión y temperatura en la extracción de isotiocianato de bencilo por fluidos supercríticos a partir de hojas de Tropaeolum majus L.* *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 19(1), 389–396. <https://doi.org/10.18271/ria.2017.313>
- Talib, W. H., & Mahasneh, A. M. (2010). *Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine*. *Scientia pharmaceutica*, 78(1), 33–45. <https://doi.org/10.3797/scipharm.0912-11>
- Vilchis Martinez, K., Manzanilla López, R., Powers, S., & Montes Belmont, R. (2013). *Efecto de extractos vegetales en crudo en el parasitismo de Pochonia chlamydosporia Var. Chlamydosporia sobre Meloidogyne incognita*. *Nematropica*, 43(2), 254–260. Recuperado de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20143078616>
- Wang, J., Qiu, Y., Wang, X., Yue, Z., Yang, X., Chen, X., ... Li, X. (2017). *Insights into the species-specific metabolic engineering of glucosinolates in radish (Raphanus sativus L.) based on comparative genomic analysis*. *Scientific Reports*, 7(1), 16040. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16306-4>
- Warwick, S. I. (2011). *Brassicaceae in Agriculture*. En Richard A. Jorgensen (Ed.), *Genetics and Genomics of the Brassicaceae* (pp. 33–65). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7118-0_2
- Winde, I., & Wittstock, U. (2011, septiembre). *Insect herbivore counteradaptations to the plant glucosinolate-myrosinase system*. *Phytochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.016>
- Wu, X., Zhou, Q.-H., & Xu, K. (2009). *Are isothiocyanates potential anti-cancer drugs*. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(5), 501–512. <https://doi.org/10.1038/aps.2009.50>

ANEXOS

Anexo I. Material vegetal colectado para el análisis, tubérculos de mashua, hojas y flores de mastuerzo.



Anexo II. proceso de secado del material vegetal (hojas y flores de mastuerzo).



Anexo III. Concentración del extracto, evaporación del solvente en el rotavapor.



Anexo IV. Determinación de Solidos Solubles Totales (SST) de los extractos.



Anexo V. Proceso de destilación para obtener el isotiocianato presente en los extractos.



Anexo VI. Indicador de color (viraje) para la cuantificación del isotiocianato.



Anexo VII. Recolección de nematodos utilizando la técnica Baermann.



Anexo VIII. Selección de nematodos para su posterior identificación.



Anexo IX. Análisis estadístico de las concentraciones del extracto de mostaza mediante el diseño experimental AxB.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% DE MORTALIDAD	144	0,99	0,99	6,33

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	213494,79	49	4357,04	230,06	<0,0001
REPLICAS	19,79	2	9,90	0,52	0,5947
CONCENTRACIÓN	146008,33	7	20858,33	1101,38	<0,0001
TIEMPO DE EXPOSICIÓN	34035,42	5	6807,08	359,43	<0,0001
CONCENTRACIÓN*TIEMPO DE EX..	33431,25	35	955,18	50,44	<0,0001
Error	1780,21	94	18,94		
Total	215275,00	143			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,11543

Error: 18,9384 gl: 94

REPLICAS Medias n E.E.

2	68,44	48	0,63	A
1	68,54	48	0,63	A
3	69,27	48	0,63	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,49730

Error: 18,9384 gl: 94

CONCENTRACIÓN Medias n E.E.

0	0,00	18	1,03	A
5	47,22	18	1,03	B
10	54,17	18	1,03	C
15	73,61	18	1,03	D
25	82,22	18	1,03	E
50	95,28	18	1,03	F
75	98,61	18	1,03	F
100	98,89	18	1,03	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,65491

Error: 18,9384 gl: 94

TIEMPO DE EXPOSICIÓN Medias n E.E.

2	48,13	24	0,89	A
4	53,54	24	0,89	B
6	62,08	24	0,89	C
8	74,17	24	0,89	D
24	87,08	24	0,89	E
48	87,50	24	0,89	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

