EVALUACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tagetes zypaquirensis* PARA EL MANEJO DEL NEMATODO *Meloidogyne incognita*.

JENNIFER ALEIDA BOTINA JOJOA

ABNER JARMINTON ORTIZ CANAMEJOY

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRICOLAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA AGROFORESTAL
SAN JUAN DE PASTO
2014

EVALUACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tagetes zypaquirensis* PARA EL MANEJO DEL NEMATODO *Meloidogyne incognita*.

JENNIFER ALEIDA BOTINA JOJOA
ABNER JARMINTON ORTIZ CANAMEJOY

Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de INGENIERO AGROFORESTAL

Presidente
DAVID EDUARDO ALVAREZ SANCHEZ I.A. candidato M.Sc.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRICOLAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA AGROFORESTAL
SAN JUAN DE PASTO
2014

NOTA DE RESPONSABILIDAD

Las ideas y conclusiones aportadas en el siguiente trabajo son responsabilidad exclusiva del autor.
Artículo 1ro del Acurdo No. del Acurdo No. 324 de octubre 11 de 1966 emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

_____
Firma de presidente de tesis

_____
Firma de jurado

_____
Firma de jurado

SAN JUAN DE PASTO, ABRIL DEL 2014

AGRADECIMIENTOS

David E. Álvarez Sánchez, Ingeniero Agrónomo, Investigador Grupo de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Nariño.

Claudia Quiroz. M.Sc, Docente Facultad de Ciencias Agrícolas Universidad de Nariño.

Luis Alfredo Molina M.Sc, Docente Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Nariño.

Al Grupo de Investigación de Sanidad Vegetal GRISAV de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Nariño.

Al Grupo de Investigación Tecnologías Emergentes en Agroindustria TEA de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de Nariño.

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación COLCIENCIAS

A la Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales de la Universidad de Nariño.

A Dios por las bendiciones recibidas, a nuestra familia, amigos y compañeros.

CONTENIDO

Pág.

RESUMEN 7

ABSTRACT 8

INTRODUCCIÓN 9

MATERIALES Y MÉTODOS 11

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 15

CONCLUSIONES 28

EVALUACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tagetes zypaquirensis* PARA EL MANEJO DEL NEMATODO *Meloidogyne incognita*[1]

EVALUATION OF ESSENTIAL OIL *Tagetes zypaquirensis* MANAGEMENT OF NEMATODE *Meloidogyne incognita*.

Jennifer Botina[2]
Abner Ortiz[3]
David Álvarez[4]

RESUMEN

El lulo *Solanum quitoense* Lam., es un frutal andino de gran importancia económica, por las propiedades nutricionales de sus frutos; sin embargo las áreas sembradas y rendimientos a nivel departamental, han sufrido una evidente reducción debido al ataque de patógenos, entre estos el nemátodo del nudo radical (*Meloidogyne incognita*) alcanzando pérdidas del 50%. En la naturaleza existen diferentes recursos vegetales con propiedades nematicidas, destacándose al género *Tagetes.* El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad nematicida del aceite esencial de *Tagetes zypaquirensis* sobre *M. incognita*; bajo condiciones de invernadero, en donde se evaluaron cuatro concentraciones del aceite esencial (100, 200, 400, 800 mg/kg de suelo) aplicados a un suelo con ±400 J2/100 g, además, se establecieron tres comparadores: un tratamiento sin aplicación de aceite esencial, un suelo sin nematodo (± 0,0 J2) y la aplicación de i.a. carbofuran (1cc/L). Para cada tratamiento las variables a evaluar fueron: severidad, altura de planta, peso fresco y seco aéreo, peso fresco radical, número de huevos del nematodo/100g raíz y número de J2/100 g de suelo. En el análisis cromatográfico los componentes mayoritarios del aceite

[1] Documento de investigación presentado como requisito para optar al título de Ingeniero Agroforestal.

[2] Estudiante de Ingeniería Agroforestal. Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pasto, Colombia. E-mail; jenniferossy@yahoo.es 2014.

[3] Estudiante de Ingeniería Agroforestal. Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pasto, Colombia. E-mail; x-trem_88@hotmail.com.2014.

[4] I. A. investigador. Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas. Programa de Ingeniería Agronómica. E-mail; ingdeas@hotmail.com.2014.

esencial de *T. zypaquirensis* fueron dihidrotagetona y E-tagetona con una proporción relativa de 42,2% y 22,9%, los resultados indicaron que la concentración 800 mg/kg de aceite esencial presento la misma acción nematicida que el producto con i.a. Carbofuran al reducir las poblaciones de *M. incognita*. y presento valores similares en las variables fitometricas, concluyendo que el aceite esencial *T. zypaquirensis* puede ser una alternativa para el manejo de la enfermedad del nudo radical.

Palabras clave: Nudo radical, Aceite esencial, Dihidrotagetona, E-tagetona, *Solanum quitoense* Lam.

ABSTRACT

The *Lulo Solanum quitoense* Lam, is an Andean fruit of great economic importance, the nutritional properties of fruit; however the areas planted and yields at the departmental level, suffered an apparent reduction due to pathogens, among these the root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) reaching 50% losses. In nature there are different types of vegetables with nematicidal properties, highlighting the genus *Tagetes.* The objective of this research was to evaluate the nematicidal activity of the essential oil of *Tagetes zypaquirensis* on *M. incognita*; under greenhouse conditions, where four concentrations of essential oil (100, 200, 400, 800 mg/kg soil) applied to soil with J2/100 $\pm$400 g, were evaluated further three comparators were established: a treatment without application of essential oil, a floor without nematode ($\pm$ 0,0 J2) and applying ia carbofuran (1cc / L). For each treatment to evaluate the variables were: severity, plant height, fresh weight and dry air, fresh root weight, number of eggs and number of root nematodo/100g J2/100 g floor. In chromatographic analysis the major components of the essential oil of *T. zypaquirensis* were dihydrotagetone and E - tagetone with a relative ratio of 42.2 % and 22.9 %, the results indicated that the concentration 800 mg / kg of essential oil present the the same action nematicide product ia Carbofuran to reduce populations of *M. incognita*. and presented similar values in fitometricas variables , concluding that the essential oil *T. zypaquirensis* may be an alternative for the management of root knot disease .

Key works: radical Knot, essential oil, dihydrotagetone, E-tagetone, *Solanum quitoense* Lam.

INTRODUCCIÓN

El lulo *Solanum quitoense* Lam., es un frutal andino de gran importancia económica debido a las características nutricionales y agroindustriales que lo hacen apetecible en los mercados nacionales e internacionales, siendo los principales importadores Europa, Japón, Corea y Estados Unidos (MADR, 2012). Colombia por ser parte del centro de origen de esta especie frutícola, cuenta con una oferta ambiental óptima para el mismo (Belalcazar, 2011) exportando un promedio de 80 a 120 ton anuales a mercados internacionales, el área cultivada de este frutal en Colombia es de 5.469 hectáreas, con una producción promedio de 21.225 ton, identificándose el departamento del Huila como el mayor productor con 15.120 ton, le siguen los departamentos del Valle del Cauca, Boyacá, Tolima, Santander y Nariño, este último participa a nivel nacional con 319 hectáreas y una producción de 1.596 ton, siendo un frutal comercial de importancia económica de la región (Chaves *et al.*, 2002; MADR, 2012).

Sin embargo a nivel departamental la tendencia de hectáreas sembradas y rendimiento de lulo, ha súfrido una evidente reducción desde el año 2008, pasando de 480 hectáreas cosechadas a 319 hectáreas en el 2011, reportando una tasa de crecimiento promedio anual de -2,57% (MADR, 2012). Betancourth (2005) y Chaves *et al*. (2002), indican que esta reducción se debe entre muchos factores como: acaros, picudo de la flor, trips o bicho candela, gusano perforador del fruto, tizón del lulo, moho blanco, antracnosis, fusarium y entre ellos la presencia del nemátodo *Meloidogyne* spp., causante del problema fitosanitario "Nudo radical del lulo", el cual afecta los municipios de San Pedro de Cartago, Colón, El Tambo, Ancuya, Buesaco, La Unión, San Lorenzo y Consacá.

Los nemátodos agalladores de raíces entre los cuales se encuentra *Meloidogyne incognita*, son los más importantes a nivel mundial, tanto por su amplia distribución como por el elevado número de familias y especies de plantas que afecta (Betancourth, 2011). En el cultivo lulo provocan hinchazones o agallas en la raíz que disminuyen significativamente

los rendimientos y la vida útil de la planta afectada, pasando de 5 a 2 años (Tamayo *et al*., 2003; Gaviria y Burbano, 2005; Krueger *et al*., 2007), principalmente al comprometer la absorción de agua y nutrientes, y permitir el ingreso de microorganismos causantes de enfermedades radiculares (Tamayo *et al*., 2003). Sumado a lo anterior, *Meloidogyne incognita* presenta un difícil manejo debido a que viven bajo tierra o en el interior de la raíz afectada, dificultando su control (Krueger *et al*., 2007). La estrategia de manejo utilizada por el agricultor frente a la enfermedad del nudo radical del lulo, utilizando pesticidas agrícolas, el cual es costoso y se basa en el uso de moléculas del grupo de los organofosforados, carbamatos y algunos fumigantes de alta residualidad en el suelo (Whitehead, 1997); la aplicación de estos productos catalogados como nematicidas, causan fuertes problemas de contaminación ambiental (Fernández y Juncosa, 2002; Gaviria *et al.*, 2005; Murcia y Stashenko, 2008).

Ante esta problemática, se considera necesario evaluar alternativas económicamente más rentables y menos contaminantes, como el uso de estrategias biosostenibles (Munera, 2002), dentro de éstas, se encuentran el empleo de aceites esenciales (A.E.) extraídos de plantas aromáticas, los cuales se reportan como una opción importante para controlar insectos (Rosso *et al*., 2004), hongos (Terblanche y Cornelius, 2000) y nemátodos (Sasser., 1989; Sikora., 1992; Perez *et al*., 2003), de forma no-persistentes, biodegradable y no tóxicos para los microorganismos benéficos (Kimpinski *et al.,* 2000). Dentro de estas especies promisorias se destaca la utilización de plantas del género *Tagetes* sp., el cual ha sido reconocido por producir compuestos nematicidas como E-Tagetona, cis-ocimeno, dihidrotagetona, entre otros compuestos (Ploeg, 1999; Kimpinski *et al.*, 2000).

La especie *T. zypaquirensis*, es un arbusto perenne que se encuentra en las cordilleras Colombianas, es conocida por los múltiples beneficios etnobotánicos, también se considera como una planta con características plaguicidas por sus compuestos alelopáticos, los cuales pueden ser liberados por volatilización, exudados radiculares, lixiviación desde las plantas y por descomposición de residuos (Tsay *et al*., 2004). Los compuestos que emana son generalmente metabolitos secundarios que actúan como defensa ante enfermedades y parásitos (Halbrendt 1996; Pérez *et al*., 2003; Tsay *et al*., 2004). Dentro de la composición

química que posee la especie de *T. zypaquirensis* se encuentran los grupos monoterpenos, sesquiterpenos, esteres de tilo, ácidos grasos de los cuales el más representativo es la Dihidrotegetona que es un compuesto tóxico para algunos nemátodos (Ordoñez, 2011), sin embargo, no existen reportes en literatura sobre la utilización del aceite esencial extraído de la especie *T. zypaquirensis*, sobre nematodos del genero *Meloidogyne*.

Por lo anterior, la presente investigación evaluó el efecto nematicida del aceite esencial de *T. zypaquirensis*, en el manejo del nemátodo *Meloidogyne* sp., causante del nudo radical del lulo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. El presente trabajo se desarrolló en el invernadero y planta piloto de la Universidad de Nariño, localizados en el Municipio de Pasto a 2.525 metros de altitud y una temperatura que oscila entre 13 a 18 ° C (IDEAM, 2009).

Material vegetal. Se identificó arbustos de *Tagetes zypaquirensis*, en praderas naturales del Municipio de Pasto, corregimiento de Cabrera (1°12'49.48"N y 77°12'57.91"O). Hojas e inflorescencias fueron colectadas de forma masiva y llevadas a la Planta Piloto de la Universidad de Nariño para la extracción de su aceite esencial.

Extracción del aceite esencial. Se utilizó la técnica de hidrodestilación simple modificada de Quintero (2004), mediante montaje tipo Clevenger donde hizo pasar agua a una temperatura de 100 a 105 °C durante 2h a través de un matraz balón de 1 L que contenía 500 g de material vegetal de *T. zypaquirensis.* La muestra agua-aceite fue condensada y luego separada empleando un embudo de decantación; el aceite obtenido se secó con sulfato de sodio anhidro y se almaceno a 8 °C hasta su utilización.

Perfil cromatográfico del aceite esencial. El análisis químico del aceite de *T. zypaquirensis*, se realizó mediante cromatografía de gas vinculado a espectrometría de masas (CG-MS), utilizando un equipo Shimadzu QP-20105 CGMS equipado con un inyector split/splitless a temperatura de 250 °C, relación split 1:100 y un detector de

ionización en llama (FID) (280 °C). Los datos cromatográficos fueron adquiridos y procesados con el programa Shimadzu Class VP 4.3. Para la separación del aceite esencial se utilizó una columna apolar DB-5 (J&W) de 30 m x 0,25 mm D.I. y 0,25 μm de una fase estacionaria de 5% fenil-polimetilsiloxano. La temperatura del horno fue programada de 40 °C (5 min) hasta 250 °C a 5 °C min^{-1}. El gas de arrastre y gas auxiliar empleado fue helio (99,99%,Aga-Fano S.A) a flujo de 1 ml min^{-1}, las velocidades de flujo para gases de combustión en el FID fueron 300 mL min^{-1} para el aire y 30 mL min^{-1} para el hidrógeno. El volumen inyectado de los extractos fue de 1,0 μL. Los espectros de masas se obtuvieron en modo SCAN en un intervalo de masas de 38 a 450 m/z.

La identificación de los compuestos se realizó utilizando los índices de retención de Kovats, así como por comparación de los espectros de masas obtenidos con aquellos de la librería de espectros Wiley. La cuantificación se realizó mediante el cálculo del porcentaje relativo de áreas de cada compuesto.

Evaluación de la actividad nematicida del aceite esencial. El aceite esencial de *T. zypaquirensis.,* fue diluido en una solución de agua estéril que contenía una relación de Etanol (grado analítico) y Tween-20 al 5% (v/v); esta solución final fue utilizada para calcular las diferentes dosis del ensayo en invernadero.

Para determinar el efecto del aceite esencial sobre el nemátodo causante del nudo radical, se utilizó la metodología descrita por Oka *et al.,* (2000), el cual indica disponer en bolsas plásticas 1.500 g de suelo inoculado con el nematodo de *M. incognita* $\pm$400 J2 por g de suelo, obtenidos previamente por el método de centrifugación y flotación en sacarosa (Castro *et al.* 2011). Seguidamente los aceites esenciales se aplicaron en el suelo bajo una relación de 100, 200, 400 y 800 mg/Kg calculados a partir de la densidad del aceite esencial. Adicionalmente se establecieron tres comparadores: un tratamiento con suelo infestado con el nemátodo sin la aplicación de aceite esencial, suelo sin presencia del nematodo esterilizado en autoclave (15 psi, 15 minutos) y un testigo químico con aplicación de nematicida comercial i.a. Carbofuran (33,2%) bajo una dosis de 1 cc/L.

Cinco días después de la disposición de los tratamientos, una planta de lulo (variedad castilla) de 4 semanas de edad, fue trasplantada a cada bolsa plástica.

Diseño experimental. Se utilizó un diseño irrestrictamente al azar (D.I.A.) con siete tratamientos y diez repeticiones para un total de 70 unidades experimentales, los valores de cada variable evaluada se tomaron de cada unidad experimental constituida por una bolsa plástica de 3 Kg de capacidad con una plántula de lulo, los tratamientos se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Descripción de los tratamientos evaluados.

Tratamiento	**Característica**	**Población inicial nematodo**
1	a.e. *T. zipaquirensis* dosis 100 mg/Kg	± 400 J2/100g suelo
2	a.e. *T. zipaquirensis* dosis 200 mg/Kg	± 400 J2/100g suelo
3	a.e. *T. zipaquirensis* dosis 400 mg/Kg	± 400 J2/100g suelo
4	a.e. *T. zipaquirensis* dosis 800 mg/Kg	± 400 J2/100g suelo
5	i.a. Carbofuran (33,21%) +	± 400 J2/100g suelo
6	Agua destilada*	± 0,0 J2/100g suelo
7	Agua destilada**	± 400 J2/100g suelo

*Testigo 1 **Testigo 2

Variables a evaluar. Pasados 110 del establecimiento de los tratamientos, en las unidades experimentales, se evaluaron las siguientes variables, mediante una evaluación destructiva de las plantas de lulo:

Incidencia. Se determinó calculando el porcentaje de plántulas infectadas por el nematodo *M. incognita* en las 10 plantas totales de cada tratamiento, utilizando la siguiente fórmula: % de infección = ($N_{o.}$ Plántulas infestadas / Total de plántulas) * 100.

Severidad. Se evaluó con base en el índice de nudosidad, determinando el número de agallas y/o masas de huevos por planta, utilizando la escala de infección radical propuesta por Taylor y Sasser (1983).

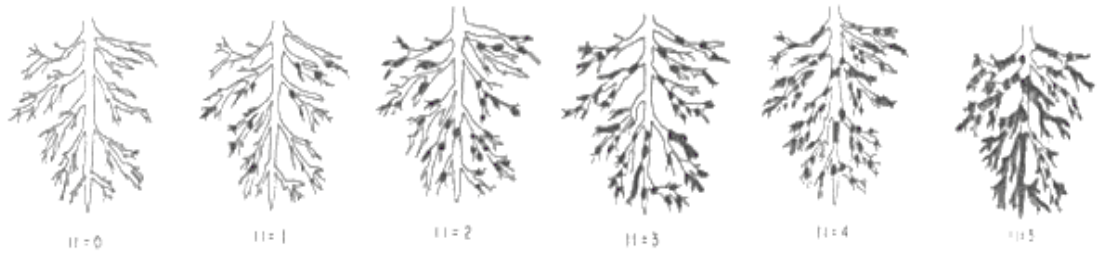


Figura 1. Escala de infección radical causado por *Meloidogyne* spp. Taylor y Sasser (1983).

Altura de planta. Se midió la altura de la planta tomando como referencia la base hasta el ápice del tallo, llevando un registro cada 15 días, desde el momento del trasplante hasta completar la investigación (110 días) obteniendo la altura final.

Peso fresco Raíz. Se separó con la ayuda de un bisturí la raíz y tallo de cada planta, para su posterior pesaje en balanza analítica, tomando el total de plantas del tratamiento (Niño *et al.*, 2008).

Peso fresco y seco aéreo. Se pesó hojas y tallos de cada planta evaluada de manera *in situ* con ayuda de una balanza analítica para determinar el peso fresco; seguidamente el material fue empacado en bolsas de papel rotuladas llevándose al horno a 65ºC hasta obtener peso constante, determinando el peso seco aéreo.

Conteo de J2 de *M. incognita*. Se utilizó el método de extracción conteo con solución azucarada descrito por Caveness y Jensen (1955). En la primera fase, se tomaron muestras de 100 g de suelo, cada una fue lavada a presión con 5 L de agua en un balde de 10 L de capacidad, el suelo en suspensión se dejó sedimentar durante 20 s, al cabo de este periodo

se separó el sobrenadante a través de un juego de cribas de 60, 125 y 325 mallas, el lavado de la muestra fue repetido una vez más. En la segunda fase, el residuo de suelo retenido en la criba de 325 mallas fue dispuesto en un tubo de centrifugación de 50 mL para iniciar un ciclo de centrifugado a 1.800 rpm por 3 min, el líquido sobrenadante fue descartado y posteriormente sustituido por una solución azucarada con una densidad específica de 1,17 (471 g/ L de solución), la muestra es nuevamente centrifugada con las mismas rpm e igual tiempo, el sobrenadante fue vertido a través de una criba de 325 mallas y lavado con abundante agua; posteriormente la suspensión de nematodos fue pasada con ayuda de un gotero a la rejilla de conteo para su determinación usando un microscopio.

Conteo de huevos de *M. incognita*. Se tomaron al azar cuatro plantas por tratamiento, la extracción de huevos del sistema radical para su conteo se realizó macerando 100 g de raíz en 500 mL de agua destilada usando una licuadora por 15 s, la solución obtenida se vertió en cribas de 60 y 325 mallas. El número de huevos por sistema radical, fue determinado utilizando la rejilla de conteo de nemátodos determinándose con la ayuda de un estereoscópico a 60X (Elyousr *et al.*, 2010).

Análisis estadístico: Se realizó un Análisis de Varianza (ANDEVA) para las variables a evaluar, se realizó una Prueba de Comparación de Medias LSD Fischer al 5% de confianza, m ediante el paquete estadístico Infostat® (Di Rienzo 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Perfil cromatográfico del aceite esencial. Se identificaron 10 compuestos principales, que de acuerdo a su patrón de fragmentación, aparecieron con tiempos de retención de Kovats en la secuencia que se indica en la (Tabla 2). La Dihidrotagetona se reporta como el compuesto mayoritario con una cantidad relativa de 42,2%, seguido de la E-tagetona con 22,9%, por último la Trans-ocimenona con 20,8%. Los resultados obtenidos son similares en estudios realizados por Escobar *et al.*, (2009) los cuales identificaron los componentes principales de *Tagetes zypaquirensis* de la región de Cundinamarca, con una cantidad relativa del 42,0 % de dihidrotagetona, E-tagetona con 5,8% y 12,3% de trans-ocimenona. La diferencia de las proporciones encontradas de los compuestos, pueden explicarse por las

condiciones climaticas de cada especie, estado de crecimiento del arbusto, así como método y condiciones de extracción del aceite esencial (Serrato *et al.,* 2007). En estudios realizados por Saavedra *et al*. (2002), De Feo *et al*. (2005), Stefanazzi *et al*. (2006) y Serrato *et al*. (2007) señalan que la E-tagetona se encuentra presente en las especies de *T. terniflora, T. lacera* y *T. zypaquirensis* en cantidades relativas del 10,7% hasta el 27%.

En cuanto a la trans-ocimenona según Stefanazzi *et al*. (2006) y Escobar *et al.* (2009) reportan que en especies como *T. terniflora, T. caracasana* y *T. zypaquirensis* sus cantidades relativas corresponden a 17,5%, 1,8% y 12,3% respectivamente. En general para Adekunle *et al*. (2007) el metabolito dihidrotagetona constituye uno de los principales ingredientes activos del genero *Tagetes.*

Tabla 2. Composición química del aceite esencial de *T. zypaquirensis* mediante el análisis cromatográfico.

No.	Tiempo de retención (min)	Cantidad relativa (%)	Identificación
1	12,195	2,2	cis-ocimeno
2	12,658	42,2	Dihidrotagetona
3	13,293	1,3	No identificado
4	14,257	0,7	Z-Tagetona
5	14,846	22,9	E-Tagetona
6	15,785	5,6	cis-Ocimenona
7	15,995	20,8	trans-Ocimenona
8	18,342	0,4	α-Farneseno
9	19,884	1,4	Isocariofileno
10	20,982	0,5	Espatulenol

Incidencia. Se evaluó la presencia o ausencia de síntomas de la enfermedad del nudo radical realizando un muestreo de raíces. Los resultados obtenidos indicaron que el 100% de plantas en cada tratamiento presentaron afecciones del nematodo (Figura 2). Sin embargo, el tratamiento T4 (800 mg/kg) al igual que T5 (i.a. Carbofuran) ejercieron un

mayor control nematicida, al encontrarse un número menor de agallas radicales causadas por *M. incognita* (Figura 2). Hay que destacar, que el cultivo de lulo presenta un alto grado de susceptibilidad al ataque del nemátodo *Meloidogyne* spp. Los altos porcentajes de afección son explicados por Moens *et al.* (2009), Sikora y Fernández (2005) autores que mencionan alta susceptibilidad de la especie vegetal.

Resultados similares a esta investigación fueron reportados por Parada y Guzmán, (1997) quienes evaluaron extractos acuosos de ajo (*Allium satium*), papayo (*Carica papaya*), pasto barrenillo (*Cynodon dactylon*) y marygold (*Tagetes* sp.) con el propósito de determinar sus efectos nematicidas sobre *Meloidogyne incognita* en frijol (*Phaseolus vulgaris*); Parada y Guzman encontraron valores del 100% de incidencia 60 días después de la inoculación del nematodo, sin embargo fue evidente la acción nematicida de *Tagetes* determinada por el grado de reacción de la planta de frijol frente a los demás extractos evaluados, los autores indican que en este caso se debe tener en cuenta el índice de agallamiento y las respuestas diferenciales de severidad de la enfermedad en comparación al testigo absoluto.

Severidad. Los resultados obtenidos 110 días después del trasplante indicaron variación en los grados de severidad en los diferentes tratamientos (Figura 2, Tabla 3), determinando que la concentración de aceite esencial 100 mg/kg presento el mayor porcentaje de afección con valores porcentuales entre el 51-75% de la escala de afección radical, observandose un alto índice de nudosidad, afectando según Taylor y Sasser (1983) los procesos de absorción de nutrientes. Los tratamientos T2, T3 y T4 (200, 400, 800 mg/kg) así como el tratamiento T5 (i.a. Carbofuran) presentaron valores entre el 26 y el 50% de severidad, observándose nudosidades alargadas, sin embargo, el sistema radical no se ve afectado totalmente (Taylor y Sasser, 1983). El tratamiento T6 ($\pm$0,0 J2 *M. incognita*) expreso un desarrollo radicular normal y un valor de 0% de severidad de la enfermedad. En cuanto al tratamiento T7 ($\pm$ 400 J2/100 g de suelo) como comparador absoluto (testigo 2) presento el máximo valor de severidad en la investigación con un promedio del 76 al 100% de afección radical (Tabla3), en donde según Taylor y Sasser (1983) la alimentación de la planta es interrumpida existiendo pudrición de tejidos afectados.

En estudios realizados en frijol (*Phaseolus vulgaris*) por Parada y Guzmán (1997) y en piña (*Ananas comosus*) por Rodríguez *et al.*, (2001) quienes evaluaron diferentes extractos botánicos, entre ellos *Tagetes* sp., frente al nematodo *Meloidogyne incognita*, concluyeron que la aplicación del extracto acuoso aplicado en suelo disminuyo el índice de agallamiento a nivel de invernadero demostrando la acción biocida del genero *Tagetes*, estos resultados respaldan los resultados obtenidos en esta investigación referente a la disminución de los índices de severidad de la enfermedad. López y Estévez (2006), Díaz y Serrato (2012), indican que las especies *Tagetes patula, Tagetes erecta* y *Tagetes filifolia* son un recurso biológico eficaz frente a una amplia gama de nematodos, al presentar en su composición metabolitos como la Tagetona que pertenece a la serie de monoterpenos, que en conjunto de otros compuestos como la Dihidrotagetona, Crisantenona, Alilanisol, Canfeno presentan actividad nematicida. Al respecto se ha planteado la hipótesis, de que algunos aceites esenciales interfieren en el sistema nervioso central de los nematodos, en el caso de *Bursaphelenchus xylophilus* el aceite esencial de Ajowan (*Trachyspermum ammi*) y Allspice (Pimenta dioica) afecto los receptores de octopamina, que actúa como neurotransmisor, afectando su movilidad e induciendo mortalidad en las poblaciones evaluadas (Park *et al.*, 2007). Sin embargo, es preciso indicar que el modo de acción de los aceites esenciales y sus componentes principales contra los nematodos no es claro, pero es posible determinar la acción nematicida de metabolitos secundarios extraídos de diferentes especies vegetales presentan (Park *et al.*, 2007).

T1 = a.e. 100 mg/Kg

T2 = a.e. 200 mg/Kg

T3 = a.e. 400 mg/Kg

T4 = a.e. 800 mg/Kg

T5 = i.a Carbofuran (33,21%)

T6 = (Testigo1) Agua destilada ± 0,0 J2

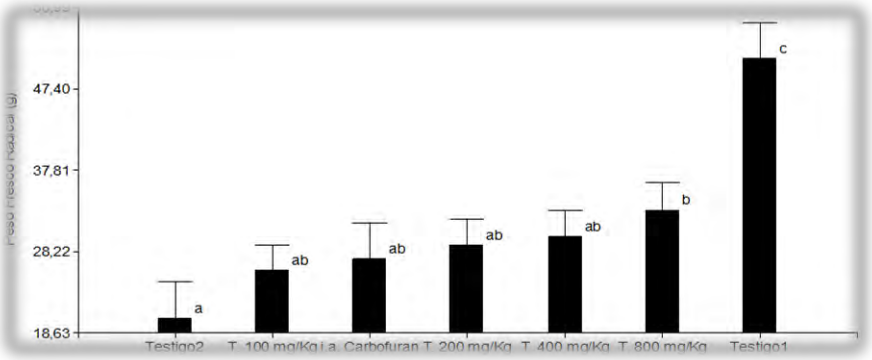
T7 = (Testigo2) Agua destilada ± 400 J2

Figura 2. Severidad de la enfermedad del Nudo radical del lulo a la aplicación del aceite esencial de *T. zypaquirensis* y testigos.

Peso Fresco Radical (PFR). El análisis estadístico LSD de Fischer al 95% de confiabilidad, separo cuatro grupos estadísticos (Figura 3), en donde el tratamiento T7 (+400 J2 sin aplicación a.e.) presento el valor de PFR más bajo en la investigación con 20,37g observándose escasez de raíces y bajo vigor, el siguiente grupo estadístico lo conformo los tratamientos T1, T2, T3 y T5 con un valor promedio de 29,11 g, se destaca que estadísticamente el tratamiento T4 (800 mg/Kg) en el cual se aplicó la mayor dosis del aceite esencial de *T. zipaquirensis* presento diferencias estadísticas con las demás concentraciones y superando también a la aplicación del producto agroquímico con principio activo Carbofuran el cual reporto 33,07 g; finalmente se pudo determinar en esta investigación que el comparador absoluto (T6) en el cual no se inoculo el nematodo *M. incognita* el valor de PFR fue muy superior respecto a los demás tratamientos con 51,01 g (Tabla 3). Teniendo en cuenta que la severidad de la enfermedad obtenida en los tratamientos con las dosis de aceite esencial, el porcentaje fue menor al 50% se ve directamente relacionada la variable PFR como lo indica Park *et al.*, (2007) explicando posiblemente la reducción en la población de *M. incognica* por parte del producto natural evaluado en las diferentes concentraciones, afectando el factor de reproducción del nematodo. Taylor y Sasser (1983) y El-Sherif *et al*. (2007) señalan que las raíces infestadas con *Meloidogyne* sp., son más cortas que las raíces sanas, tienen menos raíces laterales y menos pelos radicales reduciendo el peso radical, lo cual concuerda con lo ocurrido en el tratamiento T7.

Llive (2009) en ensayos realizados a nivel de invernadero utilizando extractos acuosos de *Tagetes* sp., determinaron que este, reduce la penetración del nemátodo *Radopholus similis* en banano (*Mussa* sp.) aumentando directamente el peso radical fresco de la planta. Por otra parte en experimentos en laboratorio realizados por Riga (2005), en los cuales se evalúo el efecto de extractos de *Tagetes erecta y Tagetes patula* para el control, *Meloidogyne hapla* y *Pratylenchus penetrans*, inoculados en raíces rábano, maíz y tomate demostraron que ambas especies controlaron las poblaciones de los nematodos, presentando un sistema radical similar al testigo absoluto. De igual manera los estudios realizados por Lehman (1979) demostraron que los extractos acuosos de *T. patula*, *T. erecta y T. minuta* tienen

efecto nematicida para el control de nematodo de la papa *P. penetrans*, obteniendo resultados de control poblacional cerca del 63% mejorando su sistema radical.



Firgura 3. Evaluacion de la variable peso fresco radical (PFR) 110 dias despues del transplante de las plantas de lulo. (Letras distintas indican diferencias según las Pruebas de Comparación de LSD Fisher).

Peso Fresco Aéreo (PFA) y Peso Seco Aéreo (PSA): El análisis estadístico LSD de Fischer al 95% de confiabilidad, separo cuatro grupos (Tabla 3, Figura 4) el primero en el cual se agrupo el tratamiento T6 (± 0,0 J2) obtuvo el mayor peso PFA con 114,89 g, seguidamente T5 (i.a. Carbofuran) con 91,68 g. Respecto a los tratamientos con aplicación del aceite esencial T1-T4 se estableció un valor promedio de 74,35 g, presentando diferencias significativas respecto al tratamiento T7 (±400 J2) siendo este el peso más bajo. En cuanto al PSA el análisis estadístico formó cuatro grupos, los tratamientos T1-T3 presentaron un valor promedio de 7,28 g (Figura 5), siendo diferentes a los tratamientos T4 (800 mg/Kg) con 8,62 g y T5 (i.a. Carbofuran) con 8,46 g; el tratamiento T6 (±0,0 J2) con 17,66 g presento el máximo valor en gramos de PSA a diferencia del tratamiento T7 (±400 J2) el cual solo reporto 6,07 g. En cuanto a la aplicación del aceite esencial, todas sus dosis evaluadas presentaron mejor comportamiento en las variables PFA y PSA respecto al tratamiento T7., en el cual la enfermedad del nudo radical afecto a las plantas de lulo de forma agresiva (Tabla 3), indicando la acción biocida del aceite esencial *T. zypaquirensis*. Según Chen *et al*. (2004) los síntomas de la afección del nematodo *Meloidogyne* spp. sobre

la parte aérea de las plantas, son: inhibición de la brotación, disminución del crecimiento deficiencias nutricionales en forma de clorosis del follaje y senescencia de hojas entre otros, ya que los nematodos interfieren en la producción y translocación de sustancias provenientes de las raíces, como las hormonas giberelinas y citoquininas, y también de sustancias que regulan la fotosíntesis; otro síntoma, a pesar de existir humedad adecuada en el suelo, es la marchitez temporal, que debido al menor tamaño del sistema radical y a que los elementos vasculares en los nódulos se rompen y deforman, interrumpiendo mecánicamente el flujo normal de agua y nutrientes. Taylor y Sasser (1983) señalan que los anteriores síntomas, están directamente relacionados con el nivel poblacional del nematodo y con el nivel de susceptibilidad de la especie.

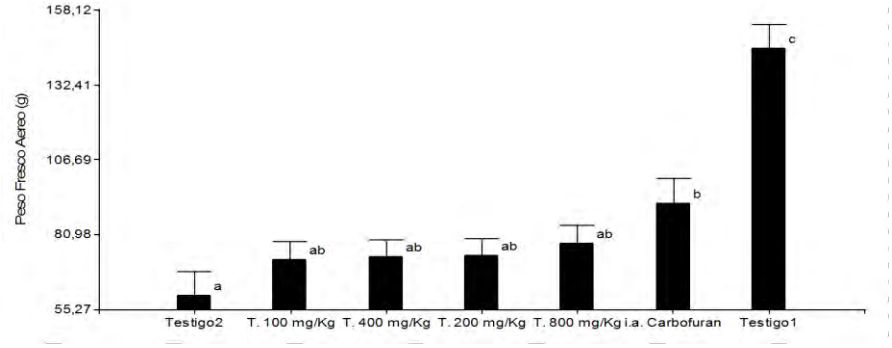


Figura 4. Evaluacion de la variable peso fresco aereo (PFA) 110 dias despues del transplante de las plantas de lulo. Letras distintas indican diferencias según las Pruebas de Comparación de LSD Fisher.

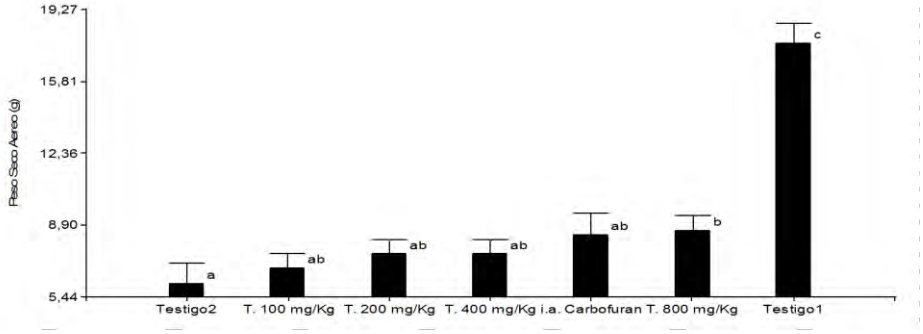


Figura 5. Evaluacion de la variable peso seco aereo (PSA) 110 dias despues del transplante de las plantas de lulo. Letras distintas indican diferencias según las Pruebas de Comparación de LSD Fisher

Tabla 3. Efecto del aceite esencial *Tagetes zypaquirensis* sobre las variables e índice de agallamiento en plantas de lulo.

N°	Tratamiento	Peso Fresco Aéreo (g)	Peso Seco Aéreo (g)	Peso Fresco Radical (g)	Altura Planta final (cm) **	Grados de afección	% Nudosidad
1	a.e. 100 mg/Kg	72,50 ab	6,83 ab	26,03 ab	29,44 a	4	51-75
2	a.e 200 mg/Kg	73,73 ab	7,51 ab	29,06 ab	32,06 b	3,25	26-50
3	a.e 400 mg/Kg	73,39 ab	7,52 ab	30,07 ab	30,44 b	3,25	26-50
4	a.e. 800 mg/Kg	77,80 ab	8,62 b	33,07 b	34,86 c	3,25	26-50
5	i.a. Carbofuran (33,21%)	91,68 b	8,46 ab	27,31 ab	32,13 b	3,25	26-50
6	Testigo 1. (±0,0 J2)	114,89 c	17,66 c	51,01 c	32,06 b	0.00	0
7	Testigo 2 (±400 J2)	59,94 a	6,07 a	20,37 a	26,88 a	5	76-100
	C.V.	**15,31**	**16,58**	**20,27**	**12,59**	**-**	-

*Los datos corresponden al promedio de 10 repeticiones; letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a la Prueba de Comparación de Medias LSD Fischer al 5% de confianza.

Altura de planta final: Los resultados obtenidos de acuerdo a la Prueba de comparación de medias de Fischer (Tabla 3) indicaron que los tratamientos T1 (100 mg/Kg) y el tratamiento T7 (±400 J2) presentaron las plantas de menor altura con medidas de 29,44 y 26,88 cm respectivamente, siendo estos estadísticamente diferentes a los tratamientos T2, T3, T5 los cuales presentaron un crecimiento igual al tratamiento T6 (±0,0 J2). Según los autores Ploeg (2000), Zaki *et al.* (2001), Kumar y Khanna (2006), afirman que la reducción en la altura de las plantas se debe a una alta densidad de *Meloidogyne* sp., patógeno que impide la adecuada expansión de las raíces interrumpiendo la nutrición de la planta, causándole achaparramiento, afectando el número de hojas y el peso de raíz.

La variable altura de planta presento un valor estadísticamente superior al Testigo 1. al ser aplicada una dosis de 800 mg/kg de aceite esencial de *T. zypaquirensis* indicando una alta eficiencia en el manejo de la enfermedad del nudo radical, Adegbite y Adesiyan (2006) señalan que a un mayor tiempo de exposición o dosis con los extractos de *Tagetes patula* se afecta en mayor proporción la capacidad infectiva del nematodo *Meloidogyne* spp., al obtener una mayor disminución de la población tras 48 h de interacción con los extractos en ensayos realizados a nivel *in vitro*; adicional a esto, el crecimiento mayor obtenido al aplicar una dosis de 800 mg/Kg del aceite esencial puede explicarse al hecho que este tipo de compuestos, adicionalmente a la actividad biocida frente a diferentes microorganismos, en muchos casos presentan moléculas bioactivas capaces de inducir o activar los mecanismos de defensa de la planta y también los llamados bioestimulantes de crecimiento en diferentes especies vegetales (Talamini y Stadnik, 2004).

Conteo de huevos de J2 de *M. incognita*: El análisis estadístico LSD de Fischer al 95% de confiabilidad, separo cinco grupos (Tabla 4) Se evidencio la actividad nematicida del aceite esencial de *T. zypaquirensis* sobre el número de huevos de *Meloidogyne incognita* en los tratamientos T1,T2,T3 y T4 se observa una reducción de estructuras reproductivas, el análisis estadístico evidencia en esta variable un comportamiento de mayor eficiencia en los tratamientos T3 (400 mg/Kg) y en el tratamiento T5 (i.a. Carbofuran) con 2.832,20 y 2.923,67 huevos/100 g raíz respectivamente, seguidamente se encuentra un grupo estadístico conformado por los tratamientos T1 (400 mg/Kg), T2 (200 mg/Kg) con 3.655,40 y 3.570,47 huevos/100 g raíz respectivamente, es posible determinar una relación inversamente proporcional entre la adición del aceite esencial y la población del patógeno, a excepción del tratamiento T4 (800 mg/kg) el cual presenta un comportamiento diferencial. La mayor cantidad de huevos se presentó comprensiblemente en el tratamiento T7 ($\pm$400 J2) con 4.315,27 huevos/100 g raíz y la menor cantidad de huevos se contabilizo en el tratamiento T6 ($\pm$0,0 J2) como se describe en la Tabla 4, el efecto nematicida del aceite esencial de *T zypaquirensis* afecto en cada tratamiento evaluado el factor de reproducción de *M. incógnita*.

En estudios realizados por Oka *et al.* (2000) los cuales evaluaron la actividad nematicida de aceites esenciales de 27 especies y sus compuestos, principalmente de la familia Asteraceae entre ellos *Tagetes* sp., presentaron efectos nematicidas sobre el número de huevos de *Meloidogyne javanica* en plantas de tomate. Tal como lo afirma Chitwood (2002) muchos aceites esenciales de plantas y sus compuestos como: monoterpenos, sesquiterpenos, esteres de etilo poseen actividad nematicida. Según el análisis cromatográfico realizado para la especie de *T. zypaquirensis*, posee los compuestos: Dihidrotagetona *E*-tagetona y *cis*-ocimeno que pertenecen al grupo de los monoterpenos, compuestos reportados en estudios como nematicidas. Al respecto evaluaciones realizadas acerca de la eficiencia de algunos extractos y aceites que presentan propiedades biocidas a nivel *in vitro*, los reportes documentados demuestran que varias plantas entre ellas el *Tagetes* sp., por sus componentes al presentar sustancias sirven como repelentes (Rosso *et al.*, 2004) y controladores de nemátodos (Lehman, 1979). Las especies más utilizadas del genero *Tagete s* son: *Tagetes erecta* L. y *Tagetes. patula* L. que contienen compuestos que corresponden al grupo de monoterpenos como la *E*-tagetona entre otros componentes del aceite esencial del genero *Tagetes*., el cual reporta actividad nematicida e insecticida en ensayos realizado *in vitro* (Krueger *et al.*, 2007).

Conteo de J2 de *M. incognita*. El análisis estadístico LSD de Fischer al 95% de confiabilidad, agrupo los tratamientos T1 (100 mg/Kg) que fue la menor dosis evaluada y T7 ($\pm$400 J2) tratamiento sin aplicación aceite esencial con 357,70 y 441,0 J2/100 g de suelo respectivamente. En estudios realizados a nivel *in vitro* con aceites esenciales y extractos acuosos de cinco especies de *Tagetes* según Barajas *et al*. (2011) señalan que bajas concentraciones de aceites esenciales y extractos acuosos no presentan efectos consistentes sobre los nematodos y hongos.

La efectividad del aceite esencial en los tratamientos T2, T3, T4 y T5 redujo el número de nematodos de *M. incógnita* (Tabla 4) con un promedio aproximado de 281,82 J2/100 g teniendo en cuenta que la población inicial fue de $\pm$ 400 J2/100 g suelo, Adekunle *et al*. (2007) afirman que la Dihidrotagetona y la Ocimenona tienen actividad directa sobre

juveniles del genero *Meloidogyne.* También, Unlenbrock y Bijloo (1958) y Chitwood, (2002) concluyeron que el efecto depresor de *Tagetes* sp., sobre las poblaciones de nematodos se debe a la presencia de politienilos, en especial de a-tertienil entre otros. Moreira *et al.* (2009) realizaron estudios en la eclosión y la mortalidad de los juveniles J2 de *M. incognita* con aceites esenciales de seis especies vegetales de alecrim pimenta *(Lippia sidoides* Cham.), alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), capim citronela *(Cymbopogon winterianus* Jowitt*),* capim santo *(Cymbopogon citratus* D. C. Strapf.), cidreira *(Lippia alba* Mill*)* e eucalipto *(Eucalyptus* terenticornis Sm.*)* en siete concentraciones (0; 0,3125; 0,0625; 1,25; 2,5; 5,0 y 10,0 ml L^{-1}) mostrando una alta mortalidad con 5,0 e 10,0 ml L^{-1} en una población inicial de 360 huevos de J2, obtvieron una mortalidad del 100% en 48 horas, a respecto Según Oka *et al*. (2000) y Salgado y col.(2003) afirman que los aceites esenciales están compuestos por diversos metabolitos que pueden incidir en el metabolismo del nematodo inhibir o interrumpir las funciones vitales desde las primeras etapas del desarrollo embrionario, así como los mecanismos de movimiento en debido a una posible ruptura del sistema nervioso. Según Oka (2001), aceites esenciales también pueden causar la ruptura de las membranas celulares de los menores y la consiguiente alteración de su permeabilidad, un hecho muy común en los hongos expuestos a los aceites esenciales. Para Campos *et al*. (2006) y Salgado *et al*. (2003) la presencia de sustancias de diferentes grupos químicos de los aceites esenciales puede actuar con eficacia sinérgica sobre los nematodos, con rotura de membranas o que afecta al sistema nervioso o ser catalizador reacción adversa a los nematodos, desde el comienzo del desarrollo embrionario hasta la eclosión de sí mismo J2. Este tipo de acción podría explicar la ausencia de eclosión y o mortalidad de J2.

Tabla 4. Efectividad del aceite esencial *Tagetes zypaquirensis* en el control Huevos y J2

N°	Tratamiento	***Meloidogyne* (Huevos)/100 g raíz**	***Meloidogyne* (J2)/100 g suelo**
1	*Tagetes zypaquirensis* 100 mg/Kg	3.655,40 d	357,70 c
2	*Tagetes zypaquirensis* 200 mg/Kg	3.570,47 d	316,87 b
3	*Tagetes zypaquirensis* 400 mg/Kg	2.832,20 c	303,80 b
4	*Tagetes zypaquirensis* 800 mg/Kg	2.081,87 b	254,80 b
5	i.a Carbofuran (33,21%)	2.923,67 c	251,53 b
6	Testigo 1 (± 0,0 J2)	0,020 a	0,007 a
7	Testigo 2 (± 400 J2)	4.315,27 e	441,0 c
	C.V.	***7,82***	***17,22***

*Los datos corresponden al promedio de 4 repeticiones; letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a la Prueba de comparación de medias LSD Fischer al 5% de confianza. Población inicial de ±400 J2/100 g suelo y, huevos/100 g raíz.

**información obtenida 110 días del trasplante.

Estudios realizados por Aballay (2004) mencionan que los aceites esenciales de diferentes especies vegetales, pueden presentar actividad nematicida igual o superior a productos de síntesis química como el Bromuro de Metilo o la moléculas Carbofuran, ampliamente utilizada en el manejo de *Meloidogyne* spp. En esta investigación se confirma los reportes de Stefanazzi *et al*. (2006) y Adekunle *et al*. (2007) quienes indican que compuestos como la Dihidrotagetona, E-tagetona y Trans-Ocimenona afectan las poblaciones del nematodo causante del nudo radical, influyendo directamente sobre las variables número de huevos y numero de machos J2 de *Meloidogyne* sp a nivel de invernadero.

CONCLUSIONES

Se identificaron tres compuestos principales mayoritarios mediante CG-MS en el aceite esencial de *Tagetes zipaquirensis,* por su proporción relativa Dihidrotagetona (42,2%), E-tagetona (22,9%) y Trans-ocimenona (20,8%).

La dosis que presento mayor efectividad nematicida fue 800 mg/kg de aceite esencial de *T. zypaquirensis* presentando diferencias estadísticas frente a las variables peso seco aéreo, peso fresco radical, altura de planta final y conteo de huevos/100 g de raíz en comparación con el testigo 1 y 2.

La aplicación de aceite esencial de *T. zipaquirensis* disminuye la severidad e incidencia de la enfermedad del "Nudo radical del lulo", incrementando el valor de las variables fitometricas: Altura de planta, Peso fresco aéreo, Peso seco aéreo y Peso fresco radical en plántulas de lulo (*Solanum quitoense*) a nivel de invernadero.

Se concluye que el aceite esencial de *Tagetes zypaquirensis* presenta actividad biocida sobre las poblaciones del nematodo *Meloidogyne incognita,* determinadas en la disminución del número de huevos del nematodo/100g raíz y numero de J2/100 g de suelo a nivel de invernadero.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación COLCIENCIAS y a la Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales de la Universidad de Nariño por la financiación de esta investigación.

BIBLIOGRAFIA

ANGULO, R. 2003. El Cultivo del Lulo. Memorias curso de actualización manejo del Cultivo de Lulo Chía ,28 Noviembre de 2003.64pp.

ADEGBITE, A. y ADESIYAN, O. 2006. Root extracts of plants to control root-knot nematode on edible Soybean (Peer reviewed papers). Journal of Vegetable Science 12 (2): 5 - 12.

ADEKUNLE, O; ACHARYA, R. and SINGH, B. 2007. Toxicity of pure compounds isolated from *Tagetes minuta* oil to *Meloidogyne incognita.* Australasian Plant Disease Notes. 2, 101–104.

AHMAD, A; TLYAGI, S. and ALAM, M. 1988. Self interaction of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato. Nematologia Mediterranea 16:227-228.

BARAJAS, J; MONTES R; CASTREJÓN, F; FLORES, M. y SERRATO, M. 2011 Propiedades antifúngicas en especies del género *Tagetes*. Revista mexicana de micología. 34: 85-91, 2011.

BELALCAZAR, J. 2011. Análisis de la competitividad del sistema de producción de lulo (*solanum quitoense lam*.) en tres Municipios de Nariño. Tesis de grado Magister en Ciencias Agrarias, con énfasis en Desarrollo Empresarial Agropecuario. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.128 p.

BELAIR, G. Y TREMBLAY, N. 1995. The influence of chitinurea amendments applied to an organic soil on a *Meloidogyne* hapla population and on the growth of greenhouse tomato. Phytoprotection 76:75-80.

BELALCAZAR, J.2011. Análisis de la competitividad del sistema de producción de lulo (*solanum quitoense lam*.) en tres Municipios de Nariño. Tesis de grado Magister en Ciencias Agrarias, con énfasis en Desarrollo Empresarial Agropecuario. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.128 p.

BETANCOURTH, C 2005. Aspectos fitosanitarios de importancia en frutales andinos de clima frio y frío moderado. En: Memorias del I Seminario Internacional sobre agrobiodiversidad y producción de frutales andinos de clima frío y frío moderado. Pasto.

BETANCOURTH, C 2011. Susceptibilidad de genotipos de solanum spp., al nematodo causante del nudo radical meloidogyne spp. (chitwood). Acta Agronómica 60 (1) 2011, p 50-67.

CASTRO, L; FLORES, L. Y URIBE, L. 2011. Efecto del vermicompost y quitina sobre el control de Meloidogyne incognita en tomate a nivel de invernadero. En: Agronomía Costarricense, 35(2): 21-32.

CAMPOS, H; CAMPOS, V y POZZA, E. 2006. Efeito do tempo e da temperatura de incubação de juvenis do segundo estádio (J2) no teor de lipídio corporal e no parasitismo de Meloidogyne javanica em soja. Fitopatologia Brasileira, v. 31, n. 04, p. 387-393,

CAVENESS, F. and JENSEN, J. 1955. Modification of the centrifugal flotation technique for the isolation and concentration of nematodes and their eggs from soil and plant tissue. Proc. helm. Soc. Wash., 22: 87-89.

CHAVES, J.; GAVIRIA, F.; TORRES, F.; y OBANDO, L. 2002. Análisis de algunos aspectos agroeconómicos del cultivo del lulo (Solanum quitoense L.). En: Revista de Ciencias Agrícolas, Vol. XIX No I-II. Universidad de Nariño, Facultad de ciencias agrícolas. Pasto. Págs. 178-188.

CHAN, S. AND LÓPEZ, R. 1986. Efecto de diferentes densidades iniciales de Meloidogyne incognita sobre el crecimiento del tomate. Agronomía Costarricense 16(2):165-169.

CHEN, Z. y DICKSON, W. 2004. Nematology; Advances and perspectives, Nematode Management and Utilization. Londres, Tsinghua University & Cabi. v. 2. P 1254.

CHITWOOD, .J. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. Annual Review of Phytopathology 40: 221 - 249.

CHOI, H; KIM, J; SHIN, S. and PARK, K. 2007a. Nematicidal activity of monoterpenoids against the pine wood nematode (Bursaphelenchus xylophilus). Russian Journal of Nematology 15:35–40.

CHOI, H; PARK, J; SHIN, S; KIM, H. and PARK, K. 2007b. Nematicidal activity of medicinal plant essential oils against the pine wood nematode (Bursaphelenchus xylophilus). Applied Entomology and Zoology 42:397–401.

CROPWATCH. 2006. *Tagetes* oil phototoxicity. Further clarifications. http://www.cropwatch.org/tageteclarify.html; última consulta 18.I.2014.

DÍAZ, F; SERRATO, M; ARCE, M. Y LEÓN, J. 2012. Composición del aceite esencial de *Tagetes lacera*, planta endémica de Baja California del Sur, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 83: 543-547.p.

DI RIENZO, A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.; GONZALEZ, L.: TABLADA, M.; ROBLEDO, W. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www.infostat.com.ar

DÍAZ, F. y SERRATO, M. 2011. Composición del aceite esencial de *Tagetes Parryi* A. GRAY. Resvista Fitotecnia Mexicana. Vol. 34, num. 2, pp. 145-148.

DE FEO, E.; URRUNAGA, R. y PIZZA. 2005. Composition and *in vitro* toxicity of the esential oil of *Tagetes terniflora* HBK. (Asteraceae). Flavour and fragrance journal 20:89-92.

EL-SHERIF, G.; REFAEI, R.; NAGAR, E. y SALEM, M. 2007. The role of eggs inoculum level of Meloidogyne incognita on their reproduction and host reaction. African Journal of Agricultural Research 2 (4): 159 - 163.

ELYOUSR, A; KAMAL, A; ZAKAULLAH, K; MAGD, E. and MONTASER, F. 2010. Evaluation of plant extracts and pseudomonas spp. For control of root knot nematode, meloidogyne incognita on tomato. Nematropica. Vol 40, $N_0$2, 12 p.

ESCOBAR, P; HERRERA1, L; LEAL1, S; DURÁN, C. y STASHENKO, E. 2009. Composición química y actividad anti-tripanosomal de aceites esenciales obtenidos de *Tagetes* (Fam. *Asteraceae*), recolectados en Colombia. Salud UIS. 41: 280-286

FERNÁNDEZ, C. y JUNCOSA, R. 2002. Biopesticidas: ¿La agricultura del futuro? Phytoma 141: 14-19.

GAVIRIA, W. y BURBANO, L. 2005. Etiología de los problemas radicales en lulo (*Solanum quitoense*) en la zona Norte del Departamento de Nariño. Tesis ingeniero agrónomo. Universidad de Nariño, Faculta de Ciencias Agrícolas; Pasto. 57 p.

HALBRENDT, J. 1996. Allelopathy in the management of plant parasitic nematodes, Journal of Nematology 28 (1):8-14.

IDEAM. 2009. Instituto de Hidrologia, Meteorología y Estudios Ambientales. Datos meteorológicos. Pasto

KARSSEN, G. and MOEN, M. 2006. Root-knot nematodes. In: Perry, R. N.; and Moens, M. Plant Nematology. CABI publishing, Wallingford, U.K. Pp. 59-90.

KIMPINSKI, J; ARSENAULT, C; GALLANT, A. and SANDERSON J. 2000. The effect of marigolds (Tagetes sp.) and other cover crops on Pratylenchus penetrans and on following potato crops. J. Nematol. 32: 531-536.

KONG, O; LEE, S; MOON, Y; LEE, G. and AHN, J. 2006. Nematicidal activity of plant essential oils against Bursaphelenchus xylophilus (Nematoda: Aphelenchoididae). Journal of Asia-Pacific Entomology 9:173–178.

KUMAR, S. y KHANNA, A. 2006. Effect of neem-based products on the root-knot nematode, Meloidogyne incognita, and growth of tomato. Nematologia Mediterranea . 34:141-146. p.

KRUEGER, R; DOVER, K; MCSORLEY, R. and WANG, K. 2007. Marigolds (*Tagetes* sp.) for Nematode Management. Entomology and Nematology Department, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, FL 32611, Department of Plant and Environmental Protection Services, University of Hawaii at Manoa, Honolulu. HI 96822.

KHAN, H; AHMAD, R; AKHTAR, A; MAHMOOD, A; BASIT, T. and NIAZ, T. 2000. Effect of inoculum density of Meloidogyne incognita and plant age on severity of root-knot disease in tomato. Int. J. Agric. Biol. 2:360-363.

LEHMAN, S. 1979. Factors influencing nematode control with Marigolds (en línea). Nematology Circular no.50. Consultado 19 nov. 2011. Disponible en http://www.doacs.state.fl.us/pi/enpp/nema/nemacirc/nem050.pdf

LlIVE, F. 2009. Uso de extractos acuosos de raquis de banano y Tagetes sp. enriquecidos con bacterias y hongos endofíticos para el control biológico de Radopholus similis (Cobb) Thorne. Tesis Magister Scientiae en agricultura ecológica. Escuela de Posgrado CATIE, Costa Rica,. 94 p.

LÓPEZ, I. y ESTÉVEZ, A. 1992. Actividad nematicida de plantas Asteráceas frente a Meloidogyne inognita. In Reunión Anual de ONTA (27 abril AL 1 mayo, 1992) Lanzarote, Islas Canárias, España. Resúmenes. Neotropical 22(2):129.

MINISTERIO DE AGRICULTURA y DESARROLLO RURAL – MADR. 2012. Anuario estadístico de frutas y hortalizas 2012 y sus calendarios de siembras y cosechas. [Online].

Disponible: http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/ReportesAjax/VerReporte.aspx, consultado: febrero de 2013.

MOENS, T; ARAYA, M; SWENNEN, R. and WAELE, D. 2003. Biodegradación acelerada de nematicidas de Musa. In Rivas, G; Rosales, F. Eds. Taller Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas. Guayaquil, Ecuador (11-13 de agosto 2003). INIBAP. MUSALAC. Montpellier, FR. p. 105-118.

MOREIRA, F; GONZAGA, C y INNECCO, R. 2009. Eclosão e mortalidade de juvenis J2 de Meloidogyne incognita raça 2 em óleos essenciais. Rev. Ciênc. Agron., Fortaleza, v. 40, n. 3, p. 441-448

MURCIA, M. y STASHENKO, E. 2008. Determinación de plaguicidas organofosforados en vegetales producidos en Colombia. Agro Sur Vol. 36(2). 11p.

MUNERA, E. 2002. Nematodos asociados con el cultivo del lulo. pp. 135-141. En: Giraldo, M.J. y J.P. Higuera. (eds.). Memorias IV Seminario de Frutales de Clima Frío Moderado. Corpoica, Universidad Pontificia Bolivariana, Centro de Desarrollo Tecnológico de Frutales, Medellín.

NIÑO J; CORREA, N; MILENA, Y; MOSQUERA, M; OSCAR, M. y BUSTAMANTE, M. 2007. Evaluación de extractos vegetales para el control de la broca del café (Hypothenemus hampei, ferrari). Scientia.

ORDOÑEZ, B. 2011. Actividad insecticida de los aceites esenciales de *Tagetes minuta*, *Tagetes terniflora y tagetes zipaquirensis* sobre *premnotrypes vorax*. Tesis de grado Bioquimico Farmacéutico, Facultad de ciencias,. Escuela superior politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.110 p.

OKA, Y; NACAR, S; PUTIEVSKY, E; RAVID, U; YANIV, Z. and SPIEGEL, Y. 2000. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. Phytopathology 90:710-715.

OKA, Y. 2001. Nematicidal activity of essential oil components against the root-knot nematode Meloidogyne javanica. Nematology, v. 03, n. 02, p. 159-164.

OLTHOF, H. y POTTER, J. 1977. Effects of population densities of *Meloidogyne apla* on growth and yield of tomato. Nematol. 9(4):296-300.

PARADA, R. y GUZMÁN. F. 1997. Evaluacion de extractos botanicos contra el nematodo Meloidogyne incognita en frijol (phaseolus vulgaris). Agronomía Mesoamericana 8(1): 108-114.

PARK, K; KIM, J; LEE, S and SHIN, S. 2007. Nematicidal Activity of Plant Essential Oils and Components From Ajowan (Trachyspermum ammi), Allspice (Pimenta dioica) and Litsea (Litsea cubeba) Essential Oils Against Pine Wood Nematode (Bursaphelenchus Xylophilus). Nematology. 39(3): 275–279.

PARK, K; PARK, Y; KIM, J; CHOI, S; CHOI, H; KIM, S. and SHIN, C. 2005. Nematicidal activity of plant essential oils and components from garlic (Allium sativum) and cinnamon (Cinnamomum verum) oils against the pine wood nematode (Bursaphelenchus xylophilus). Nematology 7:767–774.

PÉREZ, M; CORTÉS, A; VILLALOBOS, J. y CASTILLO, P. 2003. Nematicidal activity of essential oils and organic amendments from Asteraceae against root-knot nematodes. P. 395–401.

PLOEG, T. 1999. Greenhouse studies on the effect of marigolds (Tagetes sp.) on four Meloidogyne species. J. Nematol. 31: 62-69.

PLOEG, T. 2000. Effects of amending soil with *Tagetes patula* cv. single gold on *Meloidogyne incognita* infestation of tomato. Nematology 2:289-493. p.

QUINTERO, A. y GONZALEZ, N. 2004. Aceite esencial de las hojas *Hyptis umbrosa* Salzm, extraído por diferentes técnicas. Acta Científica Venezolana. 55, 181-187

ROSSO, L; CANDIDA, P; LEONETTI, y CIANCIO, A. 2004. Alteraciones histopatológicas causadas por *Meloidogyne incognita* en almendro (*Prunus amygdalus*). Nematropica. 34:257-261

RODRÍGUEZ, J; FERNÁNDEZ, J; REBOLLEDO, L. y URIZA, D. 2001. Uso De Extractos Vegetales Para El Combate Del Nematodo Agallador (Meloydogyne Sp.) De La Piña (Ananas Comosus (L.) Merr.) En El Campo Experimental Cotaxtla Del Inifap. En: Decima Cuarta Reunión Científica - Tecnológica Forestal Y Agropecuaria, Veracruz 2001, 59 p.

RIGA, J. 2005. Root extracts of plants to control root-knot nematode on edible Soybean (Peer reviewed papers). Journal of Vegetable Science 12 (2): 5 - 12.

SASSER, J. 1989. Plant-parasitic nematodes: the farmer´s hidden enemy. Departament of plant pathology. North Carolina State University Graphics, USA. 115 p

SALGADO, S y CAMPOS, P. 2003. Eclosão e mortalidade de Meloidogyne exigua em extratos e em produtos naturais. Fitopatologia Brasileira, v. 28, n. 02, p. 166-170,

SAAVEDRA, N; VILLA, C; VITTURO, C; MOLINA, A. y MOLINA, G. 2002. Ensayo piloto de la extracción de volátiles de Tagetes terniflora H.B.K. http://www.efn.unc.edu.ar/otros/bibliocentro/index_archivos/31-tagetes.pdf; ultima consulta 22.I.2014

SIKORA, A. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the biological control of plant parasitic nematodes. Annual Review of Phytopathology 30: 245-270.

STEFANAZZI, N; GUTIERREZ, M; STADLER, T; BONONI, N. y FERRARI, A. 2006. Actividad biológica del aceite esencial de *Tagetes terniflora* Kunth (Asteraceae) en *Triboleum castaneum* Herbst (insecta, coleóptera, tenebrionidae). Boletin de sanidad vegetal de plagas 32: 439-447.

SERRATO, M; BARAJAS J. y DÍAZ, F. 2007. Aceites esenciales del recurso genético *Tagetes* para el control de insectos, nematos, ácaros y hongos. Agricultura sostenible, vol. 3. Sustancias naturales contra plagas, Lopez-olguin, F.J. Aragon-Garcia, A.

SIKORA, R. y FERNÁNDEZ, E. 2005. Nematodeparasites of vegetables. En: Luc, M.;Sikora, R. y Bridge, J. (editores), Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture (pp. 319-392). CAB International.

TAMAYO, P; NAVARRO, R. and FORERO, R. 2003. Enfermedades del Lulo en Colombia: Guía de Diagnóstico y Control. Boletín Técnico No9.Corporacion Colombiana de Investigación Agropecuaria .Corcpoica. Regional 4.Centro de Investigación ¨ la selva ¨, Rio Negro Antioquia, Colombia. Instituto Colombiano Agropecuario. ICA. Seccional Caldas .48p.

TALAMINI V. Y STADNIK J. 2004. Extractos vegetales e de algas no controle de doenças de plantas. In: Stadnik J, Talamini V (Eds) manejo ecológico de doenças de plantas, Florianopolis, SC: CCA/UFSC. p. 45-62

TAYLOR, A. y SASSER, J. 1983. Biología, identificación y control de nematodos del nudo de la raíz (especies de Meloidogyne) C.I.P USA. Artes gráficas de la universidad del estado de Carolina del Norte, 1983. 111p.

TERBLANCHE, F. AND CORNELIUS, G. 2000. A literature survey of the antifungal activity of essential oil constituents. J. Essential Oil Bearing Plants 3 (3): 139-156.

TSAY, T; WU, S. and LIN, Y. 2004. Evaluation of Asteraceae plants for control of Meloidogyne incognita. Journal of Nematology. 36(1): 36-41.

UHLENBROEK, J. y BIJLOO, J. 1958. Isolation and structure of a nematicidal principle occurring in tagetes roots. Fuente original: Christie, JR. 1979. Nematodos de los vegetales; su ecología y control. México, Limusa. p.35- 73.

WHITEHEAD, G. 1997. Plant-parasitic nematodes: their importance and control. In: Whitehead, G. (eds). Plant Nematode Control. Wallingford, UK. CAB International. p.384.

ZAPATA, B; DURÁN, C.; STASHENKO, E.; BETANCUR, L. y MESA, A. 2010. Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. Rev Iberoam Micol.; 27(2):101–103.

ZAKI, A.; SIDDIQUI, Z.; IQBAL, A. and MAHMOOD, I. 2001. Effects of *Pseudomonas fluorescens* and fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. Applied Soil Ecology 16:179-185. p.