



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES**  
**CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL**

**EVALUACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Tagetes erecta*. EN EL  
CONTROL DE LA MARCHITEZ BACTERIANA (*Ralstonia  
solanacearum*), PRESENTE EN CLONES DE EUCALIPTO TROPICAL  
(*Eucalyptus urograndis*).**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**  
**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PARA TITULACIÓN DE GRADO**  
**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
TÍTULO DE INGENIERA FORESTAL**

**LAURA SUSANA LLERENA CRUZ**

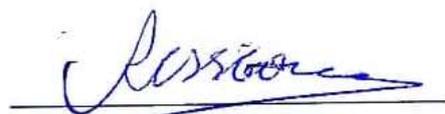
**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2019**

## Hoja de Certificación

EL TRIBUNAL DE TRABAJO DE TITULACIÓN CERTIFICA, que el proyecto de investigación titulado: **EVALUACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Tagetes erecta* EN EL CONTROL DE LA MARCHITEZ BACTERIANA (*Ralstonia solanacearum*), PRESENTE EN CLONES DE EUCALIPTO TROPICAL (*Eucalyptus urograndis*)**, de responsabilidad de la señorita Laura Susana Llerena Cruz, ha sido prolijamente revisado quedando autorizada su presentación.

### TRIBUNAL DE TRABAJO DE TITULACIÓN



**Dra. Rosa del Pilar Castro Gómez Ph.D**

**DIRECTORA**

Fecha: 11/12/2019



**Ing. Carlos Francisco Carpio Coba**

**MIEMBRO**

Fecha: 11/12/2019

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2019**

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Laura Susana Llerena Cruz declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos que constan en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como Autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 11 de diciembre del 2019

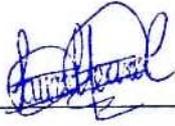


---

Laura Susana Llerena Cruz  
060493585-8

## AUTORIA

La autoría del presente trabajo investigativo es de propiedad intelectual y exclusiva del autor y de la empresa Novopan del Ecuador S.A. conjuntamente con la Escuela de Ingeniería Forestal y de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.



---

Laura Susana Llerena Cruz

060493585-8

## **DEDICATORIA**

A mis padres Jorge Llerena (+) y Carmen Cruz por todo el amor, la paciencia y el esfuerzo entregado durante toda su vida para que yo pueda cumplir con esta meta, por ayudarme siempre en todo, por hacer cumplir mis sueños de ser una profesional y encaminarme cada día para ser una mejor persona.

A mis hermanos, Juan, Martha, Jorge, Alicia y Ángel, por todo su apoyo incondicional entregado a mi sin medida siempre que eh necesitado de unas palabras de aliento o simplemente un abrazo, por servirme de guía para edificar mi vida que apenas empieza, con principios y valores.

A toda mi familia que, aunque no está conmigo todo el tiempo los llevo en el corazón siempre.

## AGRADECIMIENTOS

A mi mamita, Carmen Cruz, por brindarme su apoyo y amor incondicionalmente durante toda mi vida, por estar conmigo cuando más la necesitaba y por ser un pilar indispensable para mí en el cumplimiento de todas mis metas.

A mi hermana, Carmen Llerena por ser mi soporte siempre, por sus palabras de aliento cuando más decaída me sentía, por ser más que mi hermana mi segunda madre, por ser mi guía a lo largo de mi vida y ayudarme a forjar mi carácter.

A mi hermano negrito, Ángel Llerena por estar siempre a mi lado, por todos sus consejos, por ser mi mejor amigo en el mundo y mi cómplice de aventuras hoy y siempre.

Al Ing. Carlos Carpio y a la Dra. Rosita Castro por todo su apoyo y paciencia no solo en la elaboración de mi proyecto de titulación sino también a lo largo de mi carrera como estudiante, por brindarme los conocimientos necesarios para mi vida profesional.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Recursos Naturales, Carrera de Ingeniería Forestal, por los conocimientos entregados durante todos mis años de estudio y permitirme cumplir mi sueño de ser Ingeniera Forestal.

A mi novio y colega Gabriel Córdova, por ser una persona muy especial en mi vida, por todos los consejos y cariño entregado en todo este tiempo y ayudarme a culminar exitosamente todo lo que me eh propuesto hasta ahora.

A todos los que hicieron posible el desarrollo de mi tesis y me han servido de apoyo a lo largo de mis años de preparación académica.

## INDICE

LISTA DE TABLAS .....	i
LISTA DE FIGURAS .....	ii
LISTA DE ANEXOS .....	iii
I. EVALUACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE <i>Tagetes erecta</i> EN EL CONTROL DE LA MARCHITEZ BACTERIANA ( <i>Ralstonia solanacearum</i> ), PRESENTE EN CLONES DE EUCALIPTO TROPICAL ( <i>Eucalyptus urograndis</i> ).....	2
II. INTRODUCCIÓN .....	2
A. IMPORTANCIA .....	2
B. PROBLEMA .....	3
C. JUSTIFICACIÓN .....	3
D. OBJETIVOS.....	4
E. HIPÓTESIS .....	4
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	5
A. GENERALIDADES .....	5
B. EUCALIPTO TROPICAL ( <i>Eucalyptus urograndis</i> ) .....	5
C. TINCIÓN DE GRAM .....	11
D. MARCHITEZ BACTERIANA ( <i>Ralstonia solanacearum</i> ) .....	12
E. CONTROL QUÍMICO.....	22
F. EXTRACTOS BOTÁNICOS .....	26
G. EXTRACCIÓN ACUOSA.....	27
H. EXTRACCIÓN DE METABOLITOS EN VINAGRE.....	29
I. FLOR DE MUERTO ( <i>Tagetes erecta</i> ) .....	31
J. TAMIZAJE FITOQUÍMICO .....	34
IV. MATERIALES Y METODOS .....	35

A.	CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR.....	35
B.	METODOLOGÍA .....	37
VII.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	57
VIII.	CONCLUSIONES .....	68
IX.	RECOMENDACIONES .....	69
X.	RESUMEN.....	71
XI.	SUMMARY .....	72
XII.	BIBLIOGRAFIA.....	73
XIII.	ANEXOS.....	76

## **LISTA DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Taxonomía del Eucalipto tropical .....	6
<b>Tabla 2.</b> Requerimientos del Eucalipto tropical ( <i>Eucalyptus urograndis</i> ).....	9
<b>Tabla 3.</b> Propiedades físicas y mecánicas de Eucalipto tropical .....	10
<b>Tabla 4.</b> Taxonomía de la bacteria <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	14
<b>Tabla 5.</b> Taxonomía de Flor de muerto ( <i>Tagetes erecta</i> L) .....	32
<b>Tabla 6.</b> Tratamientos evaluados en el ensayo 1 .....	42
<b>Tabla 7.</b> Cantidad de <i>Tagetes erecta</i> utilizada para la elaboración de los extractos.....	42
<b>Tabla 8.</b> Escala para la evaluación antagónica de biocontroladores .....	45
<b>Tabla 9.</b> Tratamientos evaluados en el Ensayo 2-Parte 1 .....	46
<b>Tabla 10.</b> Tratamientos evaluados en el Ensayo 2- Parte 2.....	47
<b>Tabla 11.</b> Relación Extracto- Agua para las concentraciones .....	49
<b>Tabla 12.</b> Escala Mcfarland.....	50
<b>Tabla 14.</b> Mediana de los porcentajes de inhibición, resultantes del efecto de los tratamientos evaluados en el control de <i>Ralstonia solanacearum</i> , (Kruskal Wallis). En ensayos realizados entre el 9 y el 21 de mayo del 2019.....	57
<b>Tabla 15.</b> Mediana de los halos de inhibición, resultantes del efecto de los tratamientos evaluados sobre <i>Ralstonia solanacearum</i> , (Kruskal Wallis). En ensayos realizados entre el 19 y el 21 de junio del 2019. ....	58
<b>Tabla 16.</b> Mediana de los halos de inhibición, resultantes del efecto de los tratamientos evaluados sobre <i>Ralstonia solanacearum</i> . (Kruskal Wallis) En el ensayo realizado el 2 y el 4 de julio del 2019.....	59
<b>Tabla 17.</b> Tamizaje fitoquímico .....	60

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Plantas de Eucalipto tropical ( <i>Eucalyptus urograndis</i> ) .....	7
<b>Figura 2.</b> <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	13
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de resistencia bacteriana .....	16
<b>Figura 4.</b> Transporte de agua y nutrientes por el Xilema y Floema. ....	18
<b>Figura 5.</b> Flor de muerto ( <i>Tagetes erecta</i> L.) .....	32
<b>Figura 6.</b> Ubicación de los sitios de investigación de la ESPOCH .....	35
<b>Figura 7.</b> Vista de una caja Petri con un estriado por agotamiento .....	45
<b>Figura 8.</b> Prueba de Tinción Gram en <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	57

**LISTA DE ANEXOS**

<b>Anexo 1.</b> Recolección de la muestra de eucalipto tropical contaminada con <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	76
<b>Anexo 2.</b> Reconocimiento de la planta <i>Tagetes erecta</i> L. en el herbario .....	76
<b>Anexo 3.</b> Limpieza del laboratorio.....	77
<b>Anexo 4.</b> Aislamiento y réplica de la bacteria <i>Ralstonia solanacearum</i> . .....	77
<b>Anexo 5.</b> Elaboración de los extractos.....	77
<b>Anexo 6.</b> Instalación del ensayo.....	78
<b>Anexo 7.</b> Evaluación del crecimiento de la bacteria y el porcentaje de inhibición de la misma en los diferentes extractos: .....	78
<b>Anexo 8.</b> Resultado de la evaluación diaria del porcentaje de inhibición de los tratamientos propuestos para control de <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	91
<b>Anexo 9.</b> Elaboración de antibiograma.....	96
<b>Anexo 10.</b> Análisis de varianza no paramétrico Kruskal Wallis.....	97
<b>Anexo 11.</b> Elaboración del tamizaje .....	99
<b>Anexo 12.</b> Evaluación del tamizaje fitoquímico extracto por maceración en agua fría .....	99
<b>Anexo 13.</b> Evaluación del tamizaje fitoquímico extracto por decocción.....	100
<b>Anexo 14.</b> Evaluación del tamizaje fitoquímico extracto por infusión.....	100
<b>Anexo 15.</b> Presencia de compuestos.....	103

I. EVALUACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Tagetes erecta* EN EL CONTROL DE LA MARCHITEZ BACTERIANA (*Ralstonia solanacearum*), PRESENTE EN CLONES DE EUCALIPTO TROPICAL (*Eucalyptus urograndis*)

II. INTRODUCCIÓN

La superficie plantada con eucalipto (*Eucalyptus* spp.) ha ido en aumento a nivel mundial, superando actualmente los 20 millones de hectáreas Naidoo et al., (2014). Sin embargo, las plantaciones forestales de Eucalipto en los últimos años han presentado un aumento de la problemática sanitaria a nivel mundial, generando pérdidas económicas y ambientales. Los principales agentes causales son: hongos, bacterias, manchas foliares, cancro de fuste o ramas, muerte regresiva, marchitamiento vascular y roya (*Puccinia graminis*) (Pérez et al., 2010).

La marchitez bacteriana de Eucalipto tropical, causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi et al., (1995) constituye potencialmente una de las principales enfermedades de la especie. Esta enfermedad de gran importancia económica debido a su naturaleza sistémica de las infecciones, de los daños causados y de las diversas características que dificultan su control. La bacteria puede llegar a ser transmitida por herramientas de corte, implementos forestales e incluso por contaminación desde el suelo cuando este no ha pasado un proceso de sanitizado previo a el trasplante. En vivero, la transmisión de la bacteria durante la propagación por estacas puede resultar en una difusión eficaz por las plantas contaminadas (Mafia, 2006).

El control de *Ralstonia solanacearum* puede resultar muy agresivo para el ambiente debido al mal uso de plaguicidas químicos en los cultivos forestales. Una alternativa de solución a esta problemática consiste en el uso y manejo de plaguicidas botánicos e inclusive la utilización adecuada de organismos biocontroladores, que en la mayoría de los casos requieren de menor equipo de protección, disminuyen considerablemente el daño al ambiente y ocasionan bajos costos de producción. Por tal motivo en esta investigación se propone el uso de, *Tagetes erecta*. (Flor de muerto) para ser probada en

el control de *Ralstonia solanacearum* raza 2, debido a que en estudios anteriores realizados con esta planta mostro buenos resultados en el control de hongos patógenos, nematodos e insectos, y se prueba actualmente en el control de bacterias en plantas de *Eucalyptus urograndis* (Herrera *et al.*, 2007).

## **A. IMPORTANCIA**

La presente investigación aportará con importante información sobre nuevas alternativas de control para la bacteria *Ralstonia solanacearum* causante de la enfermedad conocida como Marchitez bacteriana que afecta a cultivos tanto hortícolas como forestales.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación. FAO (2015), actualmente en el mundo se utilizan 3013,97 millones de kilos de pesticidas químicos al año. En un estudio realizado por el ministerio de salud pública del Ecuador en el año 2012, la tasa de intoxicación externa así como de los mismos agricultores es de 49.2 % de los 2527 casos registrados a intoxicaciones por plaguicidas por la mala manipulación o el uso frecuente de los mismos.

Frente a estos índices de contaminación severa, es urgente que la empresa privada se apoye en las universidades e institutos de investigación para buscar alternativas, lo cual mediante la utilización de extractos vegetales para controlar ciertos patógenos serian posibilidades viables de conseguir para que empresas como NOVOPAN DEL ECUADOR S.A. sigan produciendo con calidad, pero siendo amigables con el medio ambiente.

## **B. PROBLEMA**

En la región Costa del país específicamente en el cantón Buena Fe existe una alta incidencia de marchitez bacteriana en las plantaciones de *Eucalyptus urograndis* causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum* misma que se encuentra en el suelo de muchos sectores de la región costa y llega a infectar a la planta por el contacto de las raíces y el suelo, esto ha provocado que rendimientos en la producción de especies forestales en estos lugares se vean disminuidos por lo cual se ve prioritario dar solución a esta problemática tomando en cuenta las fuertes inversiones que realizan los productores año tras año para mejorar su producción y crecer dentro del ámbito ambiental económico y social.

## **C. JUSTIFICACIÓN**

A través del Departamento Forestal, la Empresa NOVOPAN S.A ha desarrollado programas de forestación con diversas especies; una de las cuales es el *Eucalyptus urograndis*. Con el fin de obtener plantaciones exitosas al final de cada turno de las distintas especies, todas las actividades desarrolladas están sujetas a normas de conservación ambiental.

La presente investigación generará información actualizada sobre el control de *Ralstonia solanacearum* mientras se ve sometida a un estrés generado por un mecanismo de control biológico partiendo de la utilización de *Tagetes erecta* más conocida como flor de muerto. Esta investigación tiene como fin facilitar una alternativa de control de *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith presentes en las plantaciones de *Eucalipto urograndis*, disminuyendo así la incidencia de esta enfermedad en el predio y lograr una mayor producción en beneficio de la empresa NOVOPAN DEL ECUADOR S.A.

## **D. OBJETIVOS**

### **GENERAL**

Evaluar el extracto acuoso de *Tagetes erecta* L. en el control de la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum* Smith), presente en clones de Eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*).

### **ESPECIFICOS**

1. Evaluar diferentes dosificaciones del extracto acuoso, decocción e infusión de la Flor de Muerto *Tagetes erecta* L. en el control de *Ralstonia solanacearum* Smith en el laboratorio de fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH.
2. Realizar un tamizaje fitoquímico a los diferentes extractos acuosos de *Tagetes erecta* L. en el laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

## **E. HIPÓTESIS**

### **1. HIPÓTESIS NULA**

Las diferentes dosificaciones del extracto acuoso de *Tagetes erecta* L. no controlan la incidencia de *Ralstonia solanacearum* Smith en plantas de Eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*).

### **2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA**

Al menos una de las diferentes dosificaciones del extracto acuoso de *Tagetes erecta* L. ayuda a controlar la incidencia de *Ralstonia solanacearum* Smith en plantas de Eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*).

### III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### A. GENERALIDADES

La necesidad de proteger los cultivos ha favorecido la generación de diversas estrategias como la utilización de plantas con propiedades biocidas el cual es un instrumento importante dentro del manejo ecológico de plagas. Según Álvarez (2005), las plantas con propiedades biocidas pueden ser sustitutos naturales de los insecticidas y fungicidas químicos.

Según Álvarez (2005), la familia *Asteraceae* es poseedora de propiedades medicinales esta familia reúne más de 23500 especies repartidas en unos 1600 géneros por lo que es la familia con mayor riqueza y diversidad biológica. El género *Tagetes* posee sustancias aromáticas que lo distingue de otros grupos, como son los aceites esenciales que posibilitan su empleo en el control de plagas.

#### B. EUCALIPTO TROPICAL (*Eucalyptus urograndis*)

##### 1. Generalidades y taxonomía

El eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*) es un híbrido entre (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*) considerada una especie de rápido crecimiento mayor a 45 m<sup>3</sup>/Ha/año. Crece normalmente hasta 25 metros de altura, en ocasiones alcanza los 50 metros con diámetros de 0,3 a 1,5 metros de diámetro (Carvalho, 2003).

En cuanto a híbridos, la definición dada por Zobel *et al.*, 1987; es más apropiada: híbrido se refiere al cruzamiento entre especies (híbridos interespecíficos) y algunas veces entre orígenes bien diferentes dentro de una misma especie (híbridos intraspecíficos). Los híbridos heredan las características de sus padres de una manera intermedia. Dado que se hereda tanto lo bueno como lo malo, es muy recomendable utilizar los mejores genotipos como padres. Asociado aparece el concepto de superioridad híbrida, término usado en producción animal para indicar complementariedad (debido a genes de acción aditiva), cuando el híbrido combina características deseadas de ambos padres y heterosis o vigor híbrido (debida a genes de acción no aditiva), toda vez que el híbrido es superior, gene-

ralmente en términos de crecimiento, a la medida de los padres (Vargas, 1982).

## 2. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica según PyCmaderas en el año 2013 de la especie Eucalipto Tropical (*Eucalyptus urograndis*), se encuentra detallada en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Taxonomía del Eucalipto tropical

<b>Reino:</b>	<b>Plantae</b>
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase:</b>	Rosidae
<b>Orden:</b>	Myrtales
<b>Familia:</b>	Myrtaceae
<b>Subfamilia:</b>	Myrtoideae
<b>Tribu:</b>	Eucalypteae
<b>Género:</b>	<i>Eucalyptus</i>
<b>Especie:</b>	<i>E. urophylla X E. grandis</i>

Fuente: (PyCmaderas, 2013)

## 3. Descripción botánica

### Copa

Betancourt (1987). menciona que las hojas que se agrupan agolpadas en los extremos de las ramillas, producen una copa de aspecto poco frondoso.

### Fuste

Codo del Pozuzo (2001), afirma que el eucalipto tiene un fuste recto y de forma cilíndrica. La corteza exterior (ritidoma) es marrón claro con aspecto de piel y se desprende a tiras dejando manchas grises o parduzcas sobre la corteza interior, más lisa. Se caracteriza y reconoce fácilmente por su corteza, que se desprende en tiras que, tras permanecer colgado del árbol

durante un cierto tiempo, acaban por caer al suelo tras las ventoleras, dejando ver al exterior una nueva corteza de color blanco plateado o azulado-pruinoso.

### **Altura**

Betancourt, (1987) menciona que pueden llegar a medir más de 60 m de altura. La corteza exterior (ritidoma) es marrón claro con aspecto de piel y se desprende a tiras dejando manchas grises o parduzcas sobre la corteza interior, más lisa. Los bosques de eucaliptos pueden crear problemas de incendios incontrolables debido a la gran altura que alcanzan estos árboles en poco tiempo de crecimiento y a la fácil combustión de su madera: en bosques densos de eucaliptos, las llamas de un incendio pueden alcanzar más de 300 metros de altura.

### **Hojas**

Las hojas jóvenes de los eucaliptos son sésiles, ovaladas y grisáceas, alargándose y tornándose coriáceas y de un color verde azulado brillante de adultas; contienen un aceite esencial, de característico olor balsámico, que es un poderoso desinfectante natural (Luzar, 2007)

### **Flores y frutos**

Luzar, (2007) menciona que el eucalipto presenta flores blancas y solitarias con el cáliz y la corona unidos por una especie de tapadera que cubre los estambres y el pistilo, de esta peculiaridad procede su nombre, eu-kalypto en griego significa "bien cubierto" la cual, al abrirse, libera multitud de estambres de color amarillo. Los frutos son grandes cápsulas de color casi negro con una tapa gris azulada que contiene gran cantidad de semillas (Figura 1).



**Figura 1.** Plantas de Eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*)

Fuente: (Novopan, 2019)

#### **4. Distribución Geográfica**

Originario de Australia y Tasmania, es un grupo de rápido crecimiento, en el que se cuentan cerca de 700 especies de Eucalipto, distribuidas en regiones, especialmente de climas mediterráneos, tropicales o subtropicales, Se localiza también en México, Brasil, Guatemala, Nicaragua, Costa Rica, Colombia, Ecuador y Chile. (P&CMadera.2013). En el Ecuador el *Eucalyptus urograndis* se encuentra plantado en la provincia de Esmeraldas en una superficie inicial de 1.000 ha en la zona de Muisne, Tonchigüe y Sua (Ecuadorforestal 2012).

#### **5. Características Edafoclimáticas**

Prefiere los climas húmedos y sin heladas. Se ha implantado, erróneamente, en zonas de menores precipitaciones, en los que sufre fuertes ataques de *Phoracantha* (escarabajo taladrador) cuando aparecen años de veranos muy secos (Muñoz, 2018).

Se presentan frecuentemente daños por heladas por debajo de unos  $-3^{\circ}\text{Celsius}$  (especialmente si las heladas se producen cuando el árbol está brotando) y siempre si las temperaturas descienden de  $-5^{\circ}\text{Celsius}$ . Si bajan de  $-6^{\circ}\text{C}$  a  $-8^{\circ}\text{C}$  es posible que el arbolado llegue incluso a morir, especialmente si son prolongados (no suele soportar más de 10 días de heladas por año) (Tabla 2). Si se producen en tiempo de sequía o en periodo de actividad vegetativa. Son muy sensibles a las heladas las plantas más jóvenes. La resistencia a las heladas aumenta al alcanzar los dos o tres años de edad (Álvarez & Varona, 1998.).

Puede soportar máximas estivales de hasta  $40^{\circ}\text{Celsius}$ . Sus limitaciones térmicas estivales le obligan a una distribución más bien costera, en la que además disfruta de mejor humedad relativa en el aire (Muñoz, 2018).

En el norte de España, y por actuar el frío como factor limitante, alcanza unos 300-400 metros de altitud, aunque en climas muy suaves-próximos al mar- puede llegar hasta los 450-550. Algunas plantaciones -absolutamente erróneas- llegan a los 700m de altitud, en donde sufre mucho por efecto del frío. En general, los 550m. Son una altitud que no debería superarse nunca (Maile, 1996).

**Tabla 2.** Requerimientos del Eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*)

Requerimientos climáticos	
<b>Altitud</b>	0 – 2.000 msnm
<b>Precipitación</b>	800 -1.200 mm
<b>Temperatura</b>	24°Celsius
Requerimientos edáficos	
Suelos franco – arcilloso, no compactados, profundos, que mantengan buen drenaje	

Fuente: (Ecuadorforestal, 2012).

### **Propiedades Organolépticas de la madera**

Entre las principales propiedades organolépticas de la madera tenemos: color característico de amarillo pálido, posee un veteado poco diferenciado, tiene una textura mediana, un grano que va de recto a entrecruzado, un sabor no distintivo y un brillo medio (Ecuadorforestal, 2012).

### **Usos de la madera**

Su madera es utilizada para celulosa, postes de alumbrado, trozas para aserrados, puntales para construcción civil, fabricación de postes, suelos de parquet, soportes en minas, tableros de fibras, biomasa para energía, tutores para tabaco, para construcción de ranchos y cercos (PyCmaderas, 2013).

### **Propiedades físicas y mecánicas**

Las propiedades físicas y mecánicas de la madera de eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*) según Ecuador forestal en el año 2012 son las mencionadas en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Propiedades físicas y mecánicas de Eucalipto tropical

<b>Densidad aparente</b>	450 a 550 kg/m <sup>3</sup> - liviana
<b>Dureza</b>	300 a 500 blanda
<b>Flexión</b>	Resistente
<b>Compresión</b>	Muy resistente
<b>Tracción</b>	Resistente
<b>Preservación</b>	Acepta preservantes sin dificultad

Fuente: Ecuadorforestal 2012.

### Clones

En su forma más común, el mejoramiento forestal se da por la selección de individuos superiores, identificados en plantaciones comerciales, las cuales pueden ser vegetativamente multiplicadas, o restablecidas en un delineamiento adecuado para la comprobación de su superioridad genética, para la producción de semillas o para la propagación comercial (PyCmaderas, 2013).

En el Ecuador el *Eucalyptus urograndis* se encuentra plantado en la provincia de Esmeraldas en una superficie inicial de 1.000 ha en la zona de Muisne, Tonchigüe y Sua. Esta especie de eucalipto es la más plantada en la sierra ecuatoriana. Su popularidad se basa en que es una especie rustica de rápido crecimiento, fácil adaptación y tiene gran valor comercial como material de construcción. El género *Eucalyptus* en Ecuador, tiene su trascendencia económica tanto en la industrialización como en la exportación de productos madereros. Es muy utilizado en la reforestación para plantaciones de producción de protección y sistemas agroforestales. Es una especie de rápido crecimiento con alta capacidad de rebrote a partir del tocón, lo que representa una buena alternativa para pequeños propietarios de producción de leña, postes o madera para aglomerado en rotaciones cortas. Su buena poda natural disminuye los costos del manejo. La madera es fina y muy cotizada en el mercado local (Ecuadorforestal, 2012).

### C. TINCIÓN DE GRAM

La Tinción de Gram es una técnica que permite observar las bacterias. Las bacterias son microorganismos unicelulares que conviven habitualmente con el ser humano. En muchos casos forman parte de nuestra flora habitual y la de nuestro entorno sin ocasionar ningún peligro para la salud. En otras situaciones, las bacterias pueden ser patógenas, es decir, producen infecciones de diversos tipos. Para poder identificarlas y tratarlas es necesario clasificarlas. Las diferentes clasificaciones atienden a diversos criterios y características bacterianas: morfología, metabolismo, presencia de pared celular, etc. Una de las maneras de diferenciar a las bacterias es en base a la presencia de una pared celular. Así, hay bacterias con una pared gruesa (formada por peptidoglicanos) y otras con una pared mucho más delgada (Ormaechea, 2017).

La tinción de Gram se utiliza en microbiología desde finales del siglo XIX. Es una técnica muy sencilla que se basa en el uso de un colorante (tinción) y que tiene una gran utilidad en medicina. La tinción de Gram es un tipo de tinción que se realiza sobre las bacterias para observarlas mejor bajo el microscopio. Según la distribución del peptidoglicano de la pared celular que las envuelve, se tiñen de una forma u otra. Así, las bacterias que no se tiñen mediante esta técnica se denominan Gram negativas. Están formadas por una pared más fina formada por menos capas de peptidoglicano y una segunda membrana rica en lípidos (que repele la tinción Gram), al microscopio aparecen incoloras (Ormaechea, 2017).

Las Gram positivas tienen una pared celular mucho más gruesa, formada por un gran número de capas de peptidoglicanos entre las que se inserta la tinción Gram, dando un color violeta intenso al microscopio y se clasifican como Gram +. La gran aportación práctica de la tinción de Gram es que permite determinar el tipo de antibiótico, así como su eficacia. El antibiótico de elección ha de ser capaz de atravesar la pared bacteriana, en función de si la bacteriana es gram positiva o negativa se seleccionará el antibiótico más eficaz (Ormaechea, 2017).

El proceso es muy sencillo, consiste en estos pasos (Ormaechea, 2017):

- ✓ Recoger la muestra de bacterias a estudio mediante un isopo (bastón estéril de algodón).
- ✓ Extender dicha muestra sobre un portaobjetos y dejarla secar.
- ✓ Fijar la muestra mediante un alcohol (metanol).
- ✓ Aplicar el tinte de violeta de genciana sobre el portaobjetos y esperar un minuto.

- ✓ Enjuagar la muestra con agua y aplicar un fijador del violeta de genciana (lugol). El lugol y el violeta de genciana forman un complejo insoluble en agua capaz de penetrar en la pared de las células bacterianas.
- ✓ Lavar de nuevo el portaobjetos con una mezcla de alcohol y acetona durante unos segundos.
- ✓ Opcionalmente se puede añadir una tinción de safranina o fucsina para distinguir las gram negativas que aparecerán bajo el microscopio (en lugar de incoloras) con un tono rosado o rojo. Lavar con agua.
- ✓ Ya se puede observar la muestra al microscopio donde se visualizarán de color violeta las gram positivas y de color rosa-rojizo las gram negativas.

En el caso de las bacterias gram positivas los complejos insolubles se quedan atrapados entre las capas de peptidoglicano de la pared bacteriana, sin disolver y dando la coloración morada característica al observarlas al microscopio. En cambio, en las bacterias gram negativas estos compuestos sí que se disuelven y pierden su color. Al microscopio se verán incoloras o de color rosa-rojo, en función de si se ha añadido la fucsina al final de la técnica de tinción de Gram (Ormaechea, 2017).

## **D. MARCHITEZ BACTERIANA (*Ralstonia solanacearum*)**

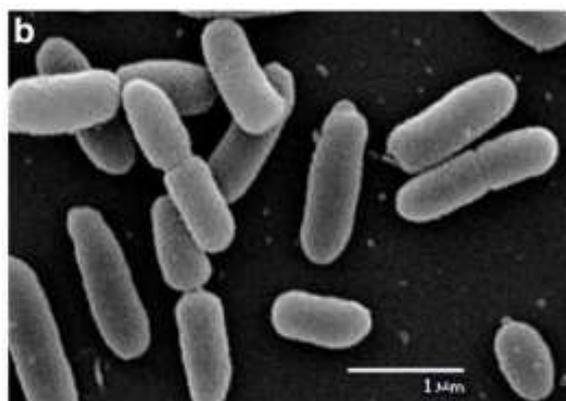
### **1. Generalidades y taxonomía**

La bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum* es causante de la marchitez bacteriana en diversos cultivos en regiones de clima tropical y subtropical, así como en algunos países de clima templado. La enfermedad afecta a varios cientos de especies vegetales distribuidas en más de cincuenta familias (Hayward, 1994).

Según Sequeira (1994). *Ralstonia solanacearum* es una especie heterogénea que se encuentra poco relacionada filogenéticamente con otros grupos del género *Pseudomonas*. Las únicas especies que muestran relación con ella son *P. pickettii* patógeno ocasional en humanos y *P. syzygii*, causante del marchitamiento del clavo de olor en Sumatra. Las evidencias sugieren que *R. solanacearum* es una especie que surgió temprano en la historia geológica, posiblemente como un patógeno de los ancestros de las plantas modernas. Buddenhagen Kelman (1964) concluyeron que las cepas de *R. solanacearum* son el producto de un largo

proceso evolutivo que se ha producido de manera independiente en varias áreas geográficas y en diferentes hospederos.

Es una bacteria Gram-negativa, no fluorescente. Si bien las colonias no son fluorescentes pueden presentar un pigmento castaño en medios de cultivo complejos (Denny & Hayward, 2001). No hidroliza gelatina o lo hace muy débilmente, ni almidón, reduce nitratos, produce gas, oxida glucosa, no crece a 4° Celsius o a más de 40° Celsius, no crece a pH 4 o 9. Es oxidasa y catalasa positiva (EPPO, 2004). *Ralstonia solanacearum* es un bacilo móvil de 0,5-0,7  $\mu\text{m}$  x 1,5-2,5  $\mu\text{m}$  con flagelo polar (uno o cuatro cuando se presentan), aeróbicos estrictos. La bacteria se multiplica fácilmente en el hospedante, pero es de lento crecimiento *in vitro*, en relación con otros patógenos bacterianos (Figura 2). Pierde fácilmente patogenicidad en medios de cultivos (French *et al.*, 1995). Sin embargo, el organismo se puede mantener por años en agua destilada estéril a temperatura ambiente (Shew & Lucas, 1991).



**Figura 2.** *Ralstonia solanacearum*

**Fuente:** (Sousa, 2016).

## 2. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de la bacteria *Ralstonia solanacearum* según Agrocalidad en el año 2013 se muestra a continuación en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Taxonomía de la bacteria *Ralstonia solanacearum*

<b>Dominio</b>	Bacteria
<b>Filo</b>	Proteobacteria
<b>Clase</b>	Beta Proteobacteria
<b>Orden</b>	Burkholderiales
<b>Familia</b>	Ralstoniaceae
<b>Género</b>	Ralstonia
<b>Especie</b>	<i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith 1896) Yabuuchi <i>et al.</i> , 1996

**Fuente:** (Agrocalidad, 2013)

### 3. Epidemiología

La bacteria patógena afecta al sistema vascular de la planta, al tener la capacidad de distribuirse en forma sistémica desde el rizoma infectado hasta la flor masculina. El moco puede iniciarse en una plantación determinada, cuando el patógeno es introducido a través de rizomas enfermos. Las plantas que se desarrollan a partir de dicho material enfermo, pueden llegar a producir racimos, donde la flor masculina contiene gran cantidad de bacterias que fluyen a través de las heridas que dejan las brácteas de las bellotas al caerse. Este flujo de látex contaminado puede ser adquirido por los insectos que lo transportan desde las plantas enfermas hacia flores de plantas sanas. En este caso, la infección se inicia a partir de las flores hasta llegar a alcanzar el pseudotallo, rizoma y finalmente las raíces (Melgar, 2012).

La transmisión de moco puede ocurrir también cuando las raíces enfermas se entrecruzan con las plantas sanas o por medio de las herramientas contaminadas que se emplean en las diferentes labores culturales, como deshoje y deshije principalmente. (Sotomayor, 2012) La bacteria puede sobrevivir en suelo meses e incluso varios años, en las raíces de los hospederos, esto depende de las condiciones ecológicas y flora prevalente en cada sitio. Es necesario tener en cuenta que puede haber un gran número de arvenses en el lote infectadas por la bacteria, pero con reacción asintomática (ICA, 2011).

#### 4. Características de *Ralstonia solanacearum*

*Ralstonia solanacearum* se manifiesta de manera diferente según los huéspedes, distribución geográfica, patogenicidad, relaciones epidemiológicas y propiedades fisiológicas. Cepas patogénicas específicas de ciertos hospedantes pueden evolucionar en determinadas partes del mundo y no en otras, y se requiere que confluyan factores ambientales y biológicos para la expresión de síntomas en hospedantes susceptibles (Hayward, 1991).

La bacteria penetra por heridas producidas en raíces, tallos o estomas. Se mueve por los vasos en un proceso acelerado por las temperaturas altas. La velocidad de movimiento también depende de la parte de la planta que es colonizada, por ejemplo, en plantas de tabaco la bacteria penetra más rápidamente por el tallo que por raíces (Ono *et al.*, 1984).

La enfermedad es severa con temperaturas entre 24 a 35° Celsius. Raramente aparece en climas templados, cuando la temperatura, está por debajo de 10° Celsius. Existen requerimientos térmicos diferentes para el óptimo desarrollo de la enfermedad según las diferentes razas. Las temperaturas bajas influyen en la expresión del síntoma (Nyangeri *et al.*, 1984); (Swanepol, 1990).

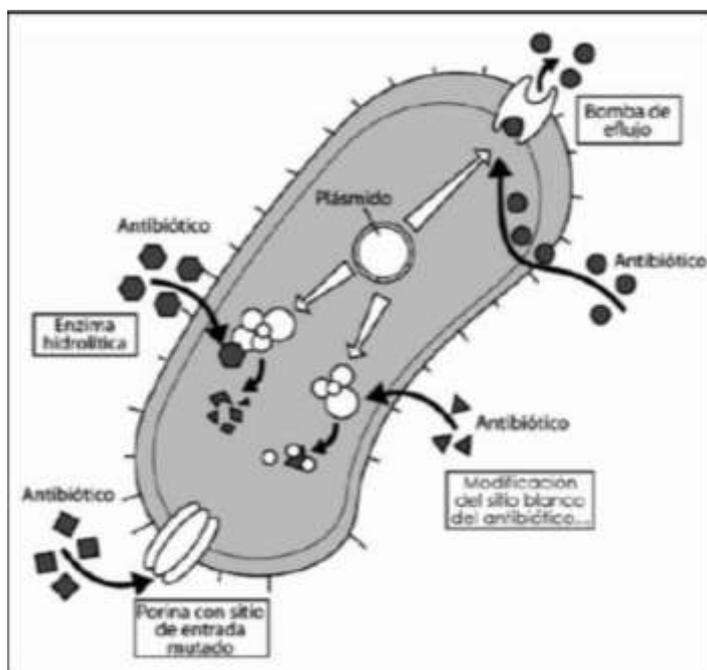
Alta humedad en el suelo, y períodos de tiempo lluviosos están asociados con una mayor severidad. La humedad de la tierra es uno de los factores principales para la reproducción y supervivencia del patógeno; la favorecen rangos entre 0,5-1,0 bar y la inhiben rangos entre 5 a 15 bares (Nesmith & Jenkins, 1985).

En la interacción planta-patógeno, se identificaron varios genes involucrados, de los cuales algunos son esenciales para conferir lo que se llama compatibilidad básica y otros determinan el rango de hospedantes de las bacterias (Feng *et al.*, 1992). La virulencia de la enfermedad que causa *R. solanacearum* se define como el resultado de múltiples factores que trabajan en conjunto. La producción de polisacáridos extracelulares (EPS) es importante para el desarrollo de la enfermedad, aunque su mecanismo de acción es incierto.

El factor de virulencia más importante para el desarrollo de patogénesis es el EPS1, (polímero compuesto de N-acetil galactosamine, desoxi-L-ácido galacturónico y trideoxi-Dglucosa). Doce genes están involucrados en su biosíntesis. La oclusión y ruptura de los vasos del xilema debido a la alta presión osmótica es lo que probablemente ocasiona el marchitamiento (Agrios, 2005) ;( Huang *et al.*, 1995); (Hugouvieux *et al.*, 1996); (Schell *et al.*, 1988).

## 5. Mecanismos de resistencia

La resistencia antimicrobiana es un problema continuo y en aumento. Se hace aún mayor cuando un microorganismo presenta más de un mecanismo de resistencia y cuando tiene la facultad de transmitirlo, no sólo a su descendencia, sino también a otras bacterias de su misma o diferente especie (Figura 3). Los fenómenos de resistencia antimicrobiana son variados, destacando entre ellos cuatro mecanismos principales (Moreno *et al.*, 2009):



**Figura 3.** Mecanismos de resistencia bacteriana

**Fuente:** (Moreno *et al.*, 2009).

### 1) Enzimas hidrolíticas

Las bacterias sintetizan enzimas que hidrolizan al antimicrobiano, destruyendo su acción antibacteriana, sin tener posibilidad de actuar sobre el microorganismo (Moreno *et al.*, 2009).

- ✓ Beta-lactamasas: son enzimas que hidrolizan la unión peptídica endocíclica del anillo beta-lactámico. La producción de beta-lactamasas es el mecanismo más frecuente de resistencia antibiótica. Existen continuas mutaciones que producen expresión de beta-lactamasas de espectro extendido, manifestándose como resistencia a cefalosporinas de tercera generación. Para combatir esta resistencia se utiliza un inhibidor enzimático que tiene mayor afinidad a la enzima e impide la destrucción del antimicrobiano y de esta manera permite su acción (Moreno *et al.*, 2009).

## 2) Modificación del sitio activo

La modificación de un aminoácido genera un blanco diferente y así disminuye la afinidad de unión por el antimicrobiano (Moreno *et al.*, 2009).

- Modificación de PBP: El PBP (penicillin-binding-protein) es un complejo enzimático que permite la síntesis del peptidoglicano, un compuesto de la pared celular en bacterias, principalmente en Gram positivas, si se produce mutación del sitio de unión al antimicrobiano como los beta-lactámicos, éstos no pueden actuar y se genera resistencia a ellos (Moreno *et al.*, 2009).
- Modificación ribosomal: Los genes erm A y erm B producen modificación del sitio activo del ribosoma, mediante metilación. Este mecanismo es importante en la resistencia a macrólidos en *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* (Moreno *et al.*, 2009).

## 3) Disminución de la permeabilidad de la pared celular al ingreso del antimicrobiano

Cambios en el diámetro y/o número de porinas pueden bloquear el ingreso del antimicrobiano a la bacteria (Moreno *et al.*, 2009).

- Porinas: Existe disminución de la expresión de porinas lo que disminuye la susceptibilidad a *betalactámicos* y *fluorquinolonas* en *Pseudomonas*"(Moreno *et al.*, 2009).

## 4) Bombas de reflujo

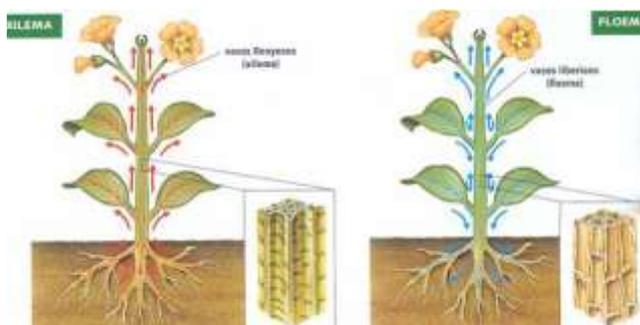
Transporta al antimicrobiano hacia el exterior de la célula sin modificaciones, pero sin acción antimicrobiana. Existen bombas de eflujos multidrogas en la pared bacteriana que permiten la expulsión de drogas como los antimicrobianos. Los genes involucrados son MefA

{*Streptococcus pneumoniae*), NorA (*Staphylococcus aureus*) y Mex (*Pseudomonas aeruginosa*). Estos genes explican la resistencia a macrólidos en estos patógenos y a *fluoroquinolonas*. Para combatir este tipo de resistencia se encuentran en estudio la asociación de inhibidores de bombas de eflujo junto con el antimicrobiano (Moreno *et al*, 2009).

## 6. Colonización de *Ralstonia solanacearum*

La penetración de *R. solanacearum* se produce por medio de heridas en el sistema radicular y en los lugares de emergencia de raíces secundarias. Después de la penetración, la bacteria coloniza los espacios intercelulares de la corteza de la raíz y del parénquima vascular, culminando con la desestructuración de las paredes celulares, lo que facilita, en una segunda etapa, la diseminación por el sistema radicular (Vasse *et al.*, 1995).

Al igual que todas las bacterias fitopatógenas *Ralstonia solanacearum* es incapaz de penetrar el tejido vegetal intacto, y para ingresar dentro de la planta utiliza las diminutas heridas naturales causadas por la emisión de nuevas raíces, heridas causadas por herramientas al realizar prácticas de cultivo en el suelo y en la parte aérea (deshierbe, podas, amarre etc.) o bien causadas por insectos o nematodos. Especies del nematodo agallador (*Meloidogyne spp.*) son particularmente importantes porque en adición al daño que provocan por si mismos magnifican el problema al favorecer las infecciones de la bacteria por las heridas que causan en las raíces (Melgar *et al.*, 2012).



**Figura 4.** Transporte de agua y nutrientes por el Xilema y Floema.

Fuente: ([www.portalfruticola.com](http://www.portalfruticola.com), 2019)

En la figura 4 observamos que en los vasos del xilema, la población bacteriana rápidamente alcanza altos niveles de población ( $> 1 \times 10^{10}$  ufc/g de tejido fresco, ejemplo en los tomates

(*Solanum lycopersicum*), seguidamente con la aparición del síntoma de la marchitez y culminando con la muerte de la plantas (Denny, 2000).

Las bacterias alcanzan los elementos del xilema grandes y se diseminan en la planta, donde se multiplican, una vez establecidos en los vasos del xilema, las bacterias pueden ingresar a los espacios intercelulares de las células del parénquima en la corteza y médula en varias áreas de la planta. Aquí *Ralstonia solanacearum* es capaz de disolver las paredes celulares y crear bolsas viscosas de bacterias y desechos celulares. La producción de polisacáridos altamente polimerizados aumenta la viscosidad del xilema, lo que resulta en taponamiento (Melgar *et al.*, 2012).

Puesto que la bacteria se multiplica aceleradamente en el sistema de microscópicos vasos conductores de agua dentro de las raíces y tallos, al exprimir entre los dedos el extremo de una sección basal del tallo de una planta afectada se puede observar que de un anillo en la orilla fluyen pequeñas gotas lechosas que contienen millones de bacterias, la presencia de este flujo bacteriano es utilizado como un método simple para el diagnóstico confirmativo de ocurrencia de Marchitez bacteriana (Melgar *et al.*, 2012).

## **7. Marchitez bacteriana en eucalipto**

Recientemente, la incidencia de la marchitez bacteriana resultó en serios perjuicios en viveros clonales en los estados de Bahía, Espírito Santo, Maranhão y Minas Gerais. Además de las pérdidas provenientes del descarte de plantas, mini cepas y plantas vegetativas contaminadas, la incidencia de la enfermedad resultó alta en costos, para la erradicación del patógeno, construcción de adaptaciones en las estructuras de vivero, para minimizar los riesgos de nuevas contaminaciones. Se suman a ello los perjuicios referentes a las alteraciones de los cronogramas de plantación y la eliminación de determinados clones élite de eucalipto (*Eucalyptus spp*), esto lo menciona (Alfenas *et al.*, 2006).

La marchitez bacteriana en mini jardín clonal fue diagnosticada por primera vez por el equipo del Laboratorio de Patología Forestal y Genética de la Interacción Planta Patógeno de la UFV (Universidad Francisco de Vitoria) en abril de 2006. Sin embargo, por algún tiempo, la enfermedad permaneció con su etiología desconocida, en virtud del ineditismo y de la enfermedad la manifestación de síntomas que, a primera vista, se confunden con tensiones

abióticas (falta de agua), principalmente en razón de la siembra de plantas pasadas y con malformación radicular. En este último caso, las minicepas expresaban más intensamente los síntomas (Mafia, 2006).

En Brasil, a pesar de su gran impacto en cultivos agronómicos, especialmente en tomate y papa, la marchitez bacteriana es una enfermedad relativamente reciente para el eucalipto cultura. Su primera ocurrencia data del inicio de la década de 1980, cuando Sudo et al., (1983) relataron la enfermedad en plantaciones de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) y bracinga (*Mimosa scabrella* Benth).

Posteriormente, la enfermedad fue observada en eucalipto en la entonces Compañía Monte Dorado, en Pará, en 1984 y posteriormente en la Camargo Corrêa (Tucuruí, Pará) y en la Copener (Bahía). En 1985, Dianese y Takatsu identificaron la biovar 1 de *R. solanacearum* a partir de cultivos de la bacteria originarios de plantas de eucalipto cultivadas en Monte Dourado, Pará. Otros tres aislados del patógeno, originarios del Pará y de Bahía, que se identificaron como biovar 1 (Robbs et al., 1988).

## **8. TIPOS DE CONTROL**

### **Control químico**

El control químico de enfermedades en plantas hace referencia al uso de sustancias tóxicas, de síntesis química, con acción biocida, con el objetivo de prevenir o controlar varios patógenos que afectan los cultivos, se basa en la mayoría de los casos en la aplicación de fungicidas y en menor grado de bactericidas y nematocidas (Rivas, Flores, 2012).

- ✓ Bactericidas y fumigantes.
- ✓ Hipoclorito de sodio.

### **Control físico**

El control físico consiste en la utilización de algún agente físico como la temperatura humedad, insolación, fotoperiodismo y radiaciones electromagnéticas, en intensidades que resulten letales para las plagas. El fundamento del método es que las plagas sólo pueden desarrollarse y sobrevivir dentro de ciertos límites de intensidad de los factores físicos ambientales; más allá de los límites mínimos y máximos, las condiciones resultan letales. Por ejemplo: La Solarización (Cisneros, s.f.).

## Control biológico

Es el uso de microorganismos vivos para el control de patógenos, a través de diferentes tipos de antibiosis. El uso de microorganismos benéficos ha incrementado su interés y demanda como alternativa en el manejo integrado de patógenos de importancia económica, debido a las muchas restricciones en el uso de productos químicos (López, Segovia, & Morán, 2016).

- ✓ *Trichoderma* spp.
- ✓ Microorganismos de montaña.
- ✓ Enmiendas al suelo.
- ✓ Ceniza.
- ✓ Bocashi.
- ✓ Inducción de resistencia.
- ✓ Ácido salicílico.

## 9. Importancia

La marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* fue reportada por primera vez en Estados Unidos en 1896 por Erwin F. Smith, en papa (*Solanum tuberosum*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y berenjena (*Solanum melongena*) (Hayward, 1994). En Brasil, la enfermedad fue descrita por Von Parseval, en 1922, en papa, en el Estado de Rio Grande do Sul (Takatsu & López, 1997).

Actualmente, *R. solanacearum* es considerada una de las bacterias fitopatógenas más importantes del mundo, en virtud de los grandes daños causados, de su amplia distribución geográfica, de la extensa gama de huéspedes y de las dificultades de control. La bacteria causa enfermedad en más de 200 especies de plantas, englobando aproximadamente 50 familias botánicas (Hayward, 1991).

La gama de hospederos incluye no sólo solanáceas, sino también leguminosas, algunas monocotiledóneas y varias especies arbóreas. En virtud de su gran importancia, *R. solanacearum* fue uno de los primeros patógenos de plantas con el genoma totalmente secuenciado (Denny, 2000). Se sabe que el patógeno es endémico en diferentes regiones tropicales y subtropicales del mundo (Genin & Boucher, 2002).

En la ausencia del hospedero, la bacteria es capaz de sobrevivir en el suelo por períodos prolongados, en asociación con la materia orgánica o con malas hierbas, sin evidenciar síntomas (Hayward, 1991), así como puede entrar en estado de dormición, permaneciendo como células viables, pero no cultivables, según lo constatado para varios microorganismos de suelo (Grey & Steck, 2001).

Existen fuertes evidencias de que varias especies forestales son anfitriones de *R. solanacearum*. Sin embargo, los informes sobre la declinación de los árboles son limitados Supriadi *et al.*, (2001). Para el eucalipto (*Eucalyptus spp.*), Liang *et al.*, (1992) reportó una incidencia de 2-10%, mientras que la diseminación de la enfermedad constituye una amenaza para el desarrollo de las plantas, en el sur de China.

Una situación similar se encuentra para la casuarina (*Casuarina equisetifolia*), en esa misma región, donde la enfermedad está presente por 30 años (Liang, 1992). La marchitez bacteriana en eucalipto en el sur de China fue reportada en 1982 (Cao, 1982). En general, los síntomas en plantas arbóreas infectadas por *R. solanacearum* son marchitez permanente, decoloración y bloqueo de los tejidos vasculares. Sin embargo, los síntomas típicos pueden variar de acuerdo con la especie hospedera. Los aislados del patógeno obtenido de un hospedante pueden infectar otras especies dificultando el control (Supriadi *et al.*, 2001).

En el Ecuador la enfermedad conocida con el nombre de marchitez bacteriana ataca principalmente a cultivos de ciclo corto estando entre estos la papa y el tomate principalmente que son afectados por *R. solanacearum* generando pérdidas económicas considerables a nivel productivo para el país, de esta manera también podemos mencionar el avance que tiene la bacteria a nivel de suelo ya que una vez que mata a una planta esta se degrada en el suelo, dejando que la bacteria se reproduzca con los micro y macro nutrientes que se encuentren en este y permitiendo de esta manera infectar otro tipo de plantaciones como es el caso de las plantaciones forestales (Ecuadorforestal, 2012).

## **E. CONTROL QUÍMICO**

Información recopilada de: Vademécum agrícola 2016-2017.

## 1. **HIDRÓXIDO DE COBRE**

**FORMULACIÓN Y CONCENTRACIÓN:** Gránulos dispersables en agua con 538 g de ingrediente activo por kilogramo de producto comercial. Su nueva formulación representa a un sólido fluyente que puede ser medido por peso o por volumen.

**ACCIÓN FITOSANITARIA:** es un fungicida-bactericida de contacto y de amplio espectro, seguro para el medio ambiente, aceptado por la agricultura orgánica y de altísima actividad fitosanitaria. Gracias a su nueva formulación de Gránulos Dispersables en Agua, asegura una correcta aplicación del producto.

**COMPATIBILIDAD:** es incompatible con Polisulfuro de calcio, Carbamatos, Diazinon, Folpet, Clorpirifos, Fenvalerato, TMDT, Ditiocarbamatos. Se recomienda hacer una premezcla con la dosis equivalente de la etiqueta del producto y observar los posibles cambios adversos en el tanque de mezcla (precipitación, floculación, etc.) posteriormente hacer una prueba de fitotoxicidad, asperjando un área pequeña del cultivo y observando que no existan efectos tóxicos en el mismo.

**PRECAUCIONES:** En caso de ingestión llamar al Centro de Atención de Toxicológica o al médico para sugerir tratamiento. Dar a la persona un vaso con agua si es capaz de tragar. No inducir el vómito a menos que sea dirigido por el médico o centro de atención toxicológica. Nunca administrar nada por la boca a una persona inconsciente.

## 2. **METALAXIL/ CARBAMATOS**

**ACCION FITOSANITARIA:** es un fungicida sistémico. Eficaz para el control de enfermedades causadas por hongos ascomicetos, hongos imperfectos y basidiomicetos, inhibiendo el desarrollo micelial tanto interno como externo, disminuyendo la germinación de las esporas o conidias del hongo.

**FORMULACIÓN Y CONCENTRACIÓN:** Polvo mojable que contiene 500 g de ingredientes activos por kg de producto comercial.

**DOSIS:**

200 – 400 g / 200 l

1-2 g/l

**COMPATIBILIDAD:** se puede mezclar con la mayoría de los fungicidas, insecticidas y fertilizantes foliares existentes en el mercado. Es incompatible con productos de reacción alcalina, para su mejor utilización se recomienda hacer pruebas preliminares.

**PRECAUCIONES:** Es nocivo en caso de ingestión, venenoso en caso de inhalación e irritante para los ojos.

Evite la contaminación de alimentos para personas y animales.

Durante la aplicación, EVITE COMER.

Deséchese y cámbiese de ropa, luego de terminada la aplicación.

ANTES DE COMER, BEBER O FUMAR, lávese con abundante agua y jabón.

Use guantes, lentes, mascarilla y ropa apropiada cuando vaya a aplicar el producto.

**MODO DE ACCION:** fungicida de doble acción es absorbido por la raíz y tejido verde de las plantas, para ser transportado por la savia hacia las partes afectadas donde detiene el desarrollo de la enfermedad y protege de nuevas infecciones.

**MODO DE EMPLEO:** Aplicar tratando de cubrir totalmente la planta con el caldo. Para preparar la mezcla vierta el producto en un recipiente con agua y agite hasta conseguir una buena mezcla luego, verter al tanque de aplicación y completar con agua hasta la cantidad deseada.

### 3. SULFATO DE COBRE PENTAHIDRATADO

**ACCIÓN FITOSANITARIA:** es un bactericida y fungicida sistémico de acción preventiva y curativa contra una amplia gama de enfermedades bacterianas y fungosas que afectan los cultivos ornamentales, frutales, hortalizas y cultivos extensivos varios.

**FORMULACIÓN Y CONCENTRACIÓN:** Es una formulación acuosa, soluble de Sulfato de cobre pentahidratado al 24 %, equivalente al 5,5% de Cobre metálico; que contiene 240 g de ingrediente activo por litro de producto comercial.

**MODO DE ACCIÓN:** Su proceso de fabricación exclusiva convierte las moléculas de cobre en absorbibles por el follaje, transportándolas en forma sistémica a los tejidos de toda la planta, dándole efectiva protección contra los choques de hongos y bacterias.

**MECANISMO DE ACCIÓN:** es absorbido por la planta y transportado por la corriente de savia, permitiendo que las moléculas de cobre sean absorbidas y transportadas vía sistémica a través de los tejidos de la planta, controlando una amplia gama de enfermedades fungosas y bacteriales. Este compuesto químico inhibe la germinación del estado vegetativo de los hongos y destruye la pared celular. Sobre bacterias inhibe la germinación de las esporas y destruye la pared celular bacteriana.

**COMPATIBILIDAD:** Se puede mezclar con otros pesticidas. Sin embargo, se recomienda realizar pruebas de compatibilidad antes de la aplicación al cultivo.

**PRECAUCIONES:** El producto es irritante para la piel y mucosa respiratoria; las personas con alergia a la piel deben tomar precauciones.

Durante la preparación y utilización del producto NO COMER, BEBER O FUMAR.

#### 4. SULFATO DE ESTREPTOMICINA

**INGREDIENTE ACTIVO:** Aminoglucósido. Antibiótico sistémico con actividad bactericida y fungicida. Se obtiene por fermentación de *Streptomyces griseus*. Su efecto depende de la concentración. Inhibidor de la función ribosómica, actúa inhibiendo la biosíntesis de las proteínas, interfiriendo la elongación de la cadena peptídica. Una vez dentro de la célula se une de manera irreversible al ribosoma bacteriano en las subunidades 30S y 50S. Entre otras consecuencias produce lecturas incorrectas del código genético lo que induce la síntesis de proteínas anómalas. Algunas de éstas son proteínas de membrana que intervienen en la formación de canales que permiten la entrada de más antibiótico a la célula. La inhibición de la síntesis de proteínas se puede producir por los siguientes mecanismos:

- 1) Bloqueo del inicio de la síntesis proteica.
  - 2) lectura incompleta debida a un bloqueo prematuro de la traducción y la consecuente producción de polipéptidos incompletos.
  - 3) Incorporación de aminoácidos incorrectos y producción de polipéptidos anormales.
- Se considera poco persistente.

**CAMPO DE ACTIVIDAD:** Resulta efectivo en el control de numerosas bacterias. Entre las de interés agrícola destacan: agalla de la corona (*Agrobacterium tumefaciens*), agallas de la corona (*Agrobacterium* ), cáncer bacteriano del chile (*Corynebacterium* ), chancro bacteriano del chile y del jitomate (*Clavibacter michiganensis*), mancha bacterial de los cítricos (*Xanthomonas sp.*), mancha bacterial del tomate (*Xanthomonas vesicatoria*), pierna negra de la papa (*Erwinia* ), pudriciones suaves, blandas o acuosas (*Erwinia carotovora*), tizón bacteriano (*Pseudomonas cichorii*) y tizón de fuego (*Erwinia amylovora*), etc.

Igualmente resulta efectivo frente a algunos hongos, entre otros: antracnosis [pudrición amarga de algunos frutos] (*Glomerella cingulata*), cenicilla vellosa del manzano (*Podosphaera leucotricha*), moho azul del tabaco (*Peronospora hyoscyami*), pudrición negra del manzano y peral (*Botryosphaeria obtusa*) y roña o sarna del peral (*Venturia pyrina*), etc.

**RECOMENDACIONES DE USO:** Para utilizar en agricultura: no utilice en medicina veterinaria ni humana. Es preferible pulverizar al anochecer. Puede aparecer clorosis en arroz, durazno, maíz, algunas ornamentales, peral y vid, esto se puede evitar con la adición de citrato de hierro o cloruro de hierro en el tanque de aplicación. En pimiento y tomate se aconseja aplicar cuando aparezcan las primeras hojas. En frutales no debe ser aplicado después de la fructificación. Incompatible con piretrinas y productos alcalinos. Almacenar en refrigeración y proteger de la humedad. Para reducir el inicio de resistencias a menudo se aplica en mezcla con otros bactericidas con distinto modo de acción como la oxitetraciclina.

## F. EXTRACTOS BOTÁNICOS

### 1. Generalidades

Para la elaboración de medicamentos a base de material vegetal se debe tomar en cuenta que existen diferentes métodos para extraer los principios activos contenidos en dicha planta, los cuales necesitan de un líquido extractivo que va a depender del procedimiento técnico y de la naturaleza química del principio activo (Carrión & García, 2010).

**Procedimiento general de obtención de soluciones extractivas** (Carrión & García, 2010):

**1-. Preparación o acondicionamiento de la droga:**

- Fragmentación y división del material con la finalidad de disminuir el tamaño de partícula y aumentar el área de contacto con el líquido.
- Desfibrado, precipitación de las proteínas, inactivación de las enzimas.

**2-. Extracción propiamente dicha:**

- El procedimiento a seguir dependerá de las características del material a extraer, por lo que se realizará con o sin ayuda del calor, en caso que se requiera con agitación, etc.

**3-. Expresión:**

- Una vez realizada la extracción se exprime el residuo con la finalidad de liberar la solución extractiva retenida en él.

**4-. Lavado del residuo.**

- Utilizando pequeñas alícuotas del menstuo utilizado en la extracción.

**5-. Filtración.**

- Tiene la finalidad de eliminar el material que pueda quedar en suspensión y clarificar la solución obtenida.

**G. EXTRACCIÓN ACUOSA**

El agua tiene la ventaja de ser natural y económica pero no es muy selectiva y además fácilmente alterable por la acción de microorganismos. Extracción es la operación de Separación de una mezcla de sustancias por disolución de cada componente, sirviéndose de

uno o varios disolventes, donde siempre se obtienen por lo menos dos componentes (Carrión & García, 2010):

- la solución extraída en su disolvente (solución extractiva)
- su residuo

## **1. Extracción por decocción**

Llamada también cocimiento, este procedimiento consiste en llevar a la mezcla de droga a la temperatura de ebullición del agua, manteniendo esta temperatura durante un período variable que suele oscilar de 15 a 30 minutos. Se deberá reponer el agua que se va evaporando, para que no se quemé la droga. Cuando las drogas son de carácter leñoso, algunas farmacopeas recomiendan tiempos de exposición a la temperatura de ebullición más prolongados, 30 a 40 minutos (Carrión & García, 2010).

De todas las preparaciones con plantas medicinales las decocciones son las más utilizadas y las que presentan una forma más segura y natural de adquirir los principios activos de las plantas. Se pueden realizar con una sola planta o con varias a la vez. En general, se confeccionan tomado como elemento principal la hierba base y como disolvente el agua, normalmente caliente, aunque también puede realizarse en agua fría (Salvat, 1992).

La decocción o cocimiento es el método de extracción de los principios activos de una planta consistente en hacerla hervir en agua a fuego lento de 3 a 30 minutos, generalmente sobre las partes más duras de la misma desmenuzadas- raíces, tallos, cortezas o semillas y dejarla reposar con un tiempo mínimo de 10 minutos. Para realizar este proceso, se verterán unas 6 cucharaditas de hierba seca o el doble de fresca en  $\frac{3}{4}$  de litro de agua. Se enciende el fuego hasta que hierva y mantenerlo así hasta que el líquido se reduzca en una tercera parte, es decir sobre medio litro, lo cual se producirá normalmente después de 20 minutos y a la media hora. Luego colocar un colador sobre la taza y filtrarla. Conservar en la nevera o en un lugar fresco un máximo de 24 horas (Benavides, 2008).

## **2. Extracción por infusión**

Es el método más frecuente de extracción de los principios activos de una planta. Consiste en verter agua caliente, generalmente sobre partes más tiernas –hojas o flores, y dejarla reposar entre 5 y 10 minutos. Normalmente se realiza depositando una cucharada pequeña de planta seca en el interior de una taza, lo que equivaldría a un peso aproximado de 2-3 gr. Si se trata de hierba fresca la cantidad suele ser el doble. Una vez la hierba dentro se verterá el agua que acaba de romper a hervir y se tapará para que no se evaporen las propiedades que se encuentran en sus aceites (Benavides, 2008).

Es el proceso en cual se somete a la droga previamente humedecida al contacto con el solvente a una temperatura igual a la de ebullición del agua por cinco minutos, se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se prepara al 5% (Carrión & García, 2010).

Son formas farmacéuticas líquidas, constituidas por una solución extractiva, obtenida por la acción continuada del agua caliente durante 20 minutos, sobre las drogas convenientemente divididas. Es también una maceración abreviada. Se vierte el agua hirviendo sobre la droga dividida, en cantidad aproximadamente igual al total, se tapa el recipiente preferentemente de cierre perfecto y se macera durante 20 minutos, finalmente se filtra para clarificar la solución obtenida. La temperatura máxima que se alcanza es de 80 o 90 °Celsius. Durante la extracción decrece lentamente. Se emplea para drogas de tejidos delicados, fácilmente penetrables (hojas, yemas, flores) (Carrión & García, 2010).

### **3. Extracción por maceración en agua fría**

La maceración es un método de extracción de los principios activos de una planta en un líquido. Consiste en dejar reposar una hierba en agua fría y otro solvente durante un periodo de tiempo que puede oscilar entre unas horas y varias semanas o meses (Martínez, 2019). Las maceraciones en agua se deben consumir o utilizar al poco tiempo de prepararse, dado que en el agua pueden desarrollarse fácilmente las bacterias y deteriorar el producto por lo cual es recomendable conservar en nevera siempre (Martínez, 2019).

## **H. EXTRACCIÓN DE METABOLITOS EN VINAGRE**

El vinagre es esencialmente una solución diluida de ácido acético hecho por fermentación, a la que se le agregan sales y extractos de otras materias. Estas sustancias adicionales, cuya naturaleza y cantidad exacta dependen sobre todo del ingrediente utilizado, dan al producto su cualidad distintiva. El azúcar es la base en la producción del vinagre. Cualquier solución diluida de un azúcar fermentable puede transformarse en vinagre en condiciones favorables. Muchos jugos de frutas se prestan para este fin si contienen en proporción apropiada azúcar y otras sustancias necesarias o deseables (EcuRed, 2019).

Todo vinagre se hace por dos procedimientos bioquímicos distintos y ambos son el resultado de la acción de microorganismos. El primer proceso es llevado a cabo por la acción de fermentos que transforman el azúcar en alcohol y en el gas bióxido de carbono. Esta es la fermentación alcohólica. El segundo proceso resulta de la acción de un grupo amplio de aceto-bacterias que tienen el poder de combinar el oxígeno con el alcohol, para así formar ácido acético. Esta es la fermentación acética o acetificación (EcuRed, 2019).

Para este tipo de extracciones el proceso es similar al de cualquier macerado o fermentación y consiste en la extracción de los metabolitos de la planta para su aprovechamiento a través de una solución líquida en este caso el Vinagre que gracias a sus propiedades ácidas se convierte en un bactericida de gran espectro y valor relativamente económico si se lo compara con un producto agroquímico. El procedimiento es sencillo y consiste en una serie de pasos detallados a continuación:

- ✓ Se lavó las hierbas frescas y se las seco muy bien. Se usan aproximadamente 60 g. de hierbas por 500 ml de vinagre.
- ✓ Se trituro ligeramente en el mortero las ramitas u hojas y colócalas en un recipiente de cristal limpio y seco.
- ✓ Añade el vinagre hasta que las cubra bien. Tapa el recipiente herméticamente y déjalo macerar un mes preferiblemente en un lugar soleado, porque de esta manera los sabores se desarrollan más rápido.
- ✓ Cuela el vinagre, ponlo en una botella esterilizada y añádele para decorarlo unas ramitas de la hierba que hayas empleado.
- ✓ Los vinagres se conservan bien durante años, tornándose su sabor más suave y dulce con el añejamiento.

La dilución al 5% es bactericida (pH menor de 3). A concentraciones menores (pH 3-6) la dilución es bacteriostática, es decir que no produce la muerte de la bacteria pero impide su reproducción (Solé, 2013).

- Soluciones del 1-5% se utilizan como antibacterianas frente a *Pseudomonas spp*, *Haemophilus spp*, algunos hongos (*Candida spp*) y protozoos (*Tricomonas spp*).
- Los macerados en vinagre son una magnífica forma de conservar las propiedades de los alimentos y de las plantas medicinales (Solé, 2013).

## **I. FLOR DE MUERTO (*Tagetes erecta*)**

### **1. Generalidades y taxonomía**

Planta erecta, anual, cuya altura oscila entre 30 hasta 110 cm. Sus hojas son opuestas, pinnadas, subdivididas en segmentos lanceolados o dentados y ciliados. La flor compuesta es muy aromática y sus tonalidades van del naranja hasta el amarillo (Figura 5). Posee un largo periodo de floración que se extiende durante todo el verano y el otoño. Se reproduce fácilmente por semillas. Es una especie de la familia Asteraceae, nativa de México, donde se encuentra en estado silvestre principalmente en los estados de Chiapas, Estado de México, Morelos, Puebla, San Luis Potosí, Sinaloa, Tlaxcala, Oaxaca, Jalisco y Veracruz. También se encuentra en los países de América Central (Rzedowski & Rzedowski, 2001).



**Figura 5.** Flor de muerto (*Tagetes erecta* L.)

Fuente: (Conabio, 2009).

## 2. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de la flor de muerto *Tagetes erecta* L según Conabio en el año de 2009 se encuentra detallada en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Taxonomía de Flor de muerto (*Tagetes erecta* L)

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>Subreino:</b>	Traqueobionta
<b>Superdivisión:</b>	Spermatophyta
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase:</b>	Asteridae
<b>Orden:</b>	Asterales
<b>Familia:</b>	<i>Asteraceae</i>
<b>Género:</b>	<i>Tagetes</i>

---

**Especie:** *Tagetes Erecta L.*

---

Fuente: (Conabio, 2009).

### 3. Descripción botánica

Según Villareal, J.A. 2003. Las características botánicas primordiales de la planta *Tagetes erecta* más conocida como flor de muerto son las siguientes:

**Hábito y forma de vida:** Planta erecta.

**Tamaño:** De hasta 1,8 m de alto.

**Tallo:** Estriado, a veces acostillado, glabro o pubescente.

**Hojas:** Opuestas en la parte inferior, alternas en la parte superior; de hasta 20 cm de largo, pinnadas, de 11 a 17 foliolos, lanceolados a linear-lanceolados, de hasta 5 cm de largo y 1,5 cm de ancho, agudos a acuminados, aserrados a subenteros, los inferiores de cada hoja frecuentemente setiformes (en forma de hilos), los superiores reducidos, a veces completamente setiformes; con glándulas redondas abundante.

**Inflorescencia:** Cabezuelas solitarias o agrupadas por varias, sobre pedúnculos de hasta 15 cm de largo, provistos de brácteas pinnadas con segmentos cerdiformes en el ápice.

**Cabezuela/Flores:** **Cabezuela** con involucre campanulado, de 13 a 20 mm de alto y 9 a 25 mm de ancho, con 5 a 11 brácteas, glabras y de ápices triangulares, con dos hileras de glándulas. **Flores liguladas:** 5 a 8, o más frecuentemente numerosas, amarillas a rojas, sus láminas oblanceoladas a obovadas de 1 a 2 cm de largo. **Flores del disco:** 150 a 250 en las cabezuelas sencillas, en las "dobles" muestra diferentes grados de transformación en lígulas, corolas amarillas a anaranjadas, de 8 a 10 mm de largo.

**Frutos y semillas:** Aquenios lineares de 7 a 10 mm de largo, glabros o hispídulos en los ángulos, vilano de 1 o 2 escamas acuminadas de 6 a 12 mm de largo y 2 o 3 escamas romas de 3 a 6 mm de largo, más o menos unidas entre sí.

**Raíz:** Fibrosa.

#### **4. Metabolitos primarios**

Según Camacho *et al.*, (2018), se confirma la presencia de flavonoides, terpenoides, antocianinas, taninos, antraquinonas, glucósidos cardiotónicos, antocianinas, flobataninos, esteroides, cumarinas y emodinas. El contenido de los tipos de metabolitos se determinó de manera cualitativa a través del sistema no paramétrico de cruces.

#### **5. Usos**

El empleo de aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas es una opción importante para controlar insectos, hongos y nemátodos causantes de fuertes daños a la agricultura (Pérez *et al.*, 2003). Según Serrato (2003), los bajos costos de producción del aceite esencial de esta 5 especie y su origen orgánico, representan una opción económica y ecológica importante comparada con productos insecticidas de origen sintético, los cuales, además de ser fuente de contaminación ambiental y de daño a la salud humana, parcialmente son causa de incosteabilidad de los sistemas de producción agrícolas (Villareal, 2003).

#### **J. TAMIZAJE FITOQUÍMICO**

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímico, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés (Palacios, 2008).

El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Debe de permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente en una orientación y debe de interpretarse en conjunto con los resultados del screening farmacológico (Palacios, 2008).

Así cuando una planta revela acción sobre el sistema nervioso central durante el tamizaje farmacológico y presencia de alcaloides en el tamizaje fitoquímico, es bastante probable que la acción farmacológica se deba a la fracción alcaloidal. De la misma manera, el hecho de evidenciarse acción anti-inflamatoria en el tamizaje farmacológico y la presencia de flavonoides en el tamizaje fitoquímico, puede dar lugar a procesos de aislamiento y sometimiento a pruebas más específicas de estos compuestos. Efectos catárticos pueden ser asociados a las antraquinonas. La presencia de glicósidos cianogénicos durante la marcha fitoquímica puede dar lugar a la descartación de la planta por su alta toxicidad (Palacios, 2008).

El tamizaje fitoquímico consiste en la realización de las siguientes pruebas para la determinación de diferentes metabolitos; para la determinación de alcaloides (ensayo de Dragendorff, Wagner y Mayer), taninos (ensayo de cloruro férrico y gelatina-sal), cumarinas (ensayo de Baljet), flavonoides (ensayo de Shinoda y citrobórico), triterpenos (ensayo de Liebermann-Buchard y Salkowski), saponinas (prueba de espuma y vainillina-ácido sulfúrico), quinonas (ensayo de Bornträger) y glicosidos cardiotónicos (ensayo de Kedde, Raymond-Marthoud y Keller-Kiliani). Para la lectura de los resultados, expresada como concentración relativa de los metabolitos, se tuvo en cuenta la simbología siguiente (Beltrán *et al*, 2013):

Presencia abundante [+++], presencia moderada [++], presencia leve [+], ausencia [-].

## **METABOLITOS PRIMARIOS**

### **CARBOHIDRATOS**

Los carbohidratos son compuestos existentes como unidades simples (monosacáridos), dímeros y formas poliméricas de varias longitudes, denominados polisacáridos. Se utilizan como formadores de película, humectantes e hidratantes de la piel, debido a su capacidad de retención de cationes minerales, por la que producen acumulación osmótica de agua (Mimoko, 2019).

Entre los derivados de carbohidratos simples, el ácido ascórbico (vitamina C) es un ácido de azúcar con marcadas propiedades antioxidantes, que puede ser utilizado en cosméticos antienvjecimiento. El ascórbico ejerce una acción sinérgica con tocoferol, sirviendo como un donador que restaura el estado reducido de esta molécula y, a continuación, favorece su papel

de defensa antioxidante en las membranas celulares. A altas dosis, tiene también un efecto despigmentante. Es difícil utilizarlo en forma natural puesto que es bastante inestable. Se usan las formas estabilizadas o liposomizadas. Actualmente se considera que la diferencia está en que los mucílagos son constituyentes normales de las plantas, mientras que las gomas son productos que se forman en determinadas circunstancias, mediante la destrucción de membranas celulares y la exudación. Se hinchan y forman geles con el agua. Se disuelven dando disoluciones viscosas. Son emolientes, demulcentes y antiinflamatorios (Mimoko, 2019).

## **LIPIDOS**

O sea, aceites, ceras y grasas. En la planta, son sustancias de reservas, una fuente de energía celular, agentes protectores y constituyentes de membrana: Son insolubles en agua, solubles en disolventes orgánicos apolares y no son volátiles Van a ser en muchos casos nuestro solvente puesto que habrá compuestos que solo se pueden extraer con disolventes como el éter...o con ellos, como los aceites, ceras, y algunos bálsamos y resinas (Mimoko, 2019).

## **PROTEINAS**

La extracción y separación de proteínas es algo más complicada en tanto en cuanto es más difícil separar estas de otros compuestos, al menos con los medios de los que disponemos en nuestras casas. La industria farmacéutica utiliza la electroforesis, o la centrifugación a altas velocidades para separar las proteínas del resto de sustancias extraídas junto con ellas, pudiendo hacer extractos puros, o extraer la proteína pura. Nosotros podremos capturar estos activos, pero no separarlos efectivamente (Mimoko, 2019).

## **METABOLITOS SECUNDARIOS**

Los principales metabolitos secundarios que se extraen de una planta son (Mimoko, 2019):

**Glicosidos:** La mayoría son solubles en agua y alcohol. Se vuelven inactivos (o menos activos) tras su hidrólisis con agua, por lo que es conveniente conservarlos con un porcentaje alto de alcohol. >40%

**Saponinas:** espuman cuando se agitan en solución acuosa. Son neutras y solubles en agua. Tras su hidrólisis forman azúcares y precipitan.

**Enzimas:** solubles en agua e insolubles en alcohol. Habitualmente se destruyen a temperaturas  $>70^{\circ}\text{C}$

**Alcaloides:** solubles en alcohol y poco solubles en agua. Los alcaloides se encuentran generalmente bajo la forma de sales alcaloidales en las plantas, las cuales son solubles en alcohol, agua. Los alcaloides se extraen bien con una mezcla de agua-glicerina. Son inestables si se calientan.

**Derivados antraquinonicos:** solubles en agua y alcohol. No todos son estables al calor: soportan infusión, pero no decocción.

**Taninos:** solubles en agua y glicerina. La inclusión de un 5-10% de glicerina incrementa la acción de los taninos y previene precipitaciones después de periodos prolongados. Algunos taninos son insolubles en alcohol, y pueden romperse con el calentamiento prolongado.

**Aceites volátiles:** Solubles en aceite Y alcohol y solo ligeramente solubles en agua o glicerina. Se evaporan con el calor

**Resinas:** solubles en aceite o alcohol de alta graduación e insolubles en agua. Funden cerca del punto de ebullición.

**Gomas-mucilagos:** solubles en agua, insolubles en alcohol, y disolventes orgánicos. Coagulan con el calor.

**Proteínas:** solubles en agua, insolubles en alcohol, coagulan (se desnaturalizan) con calor.

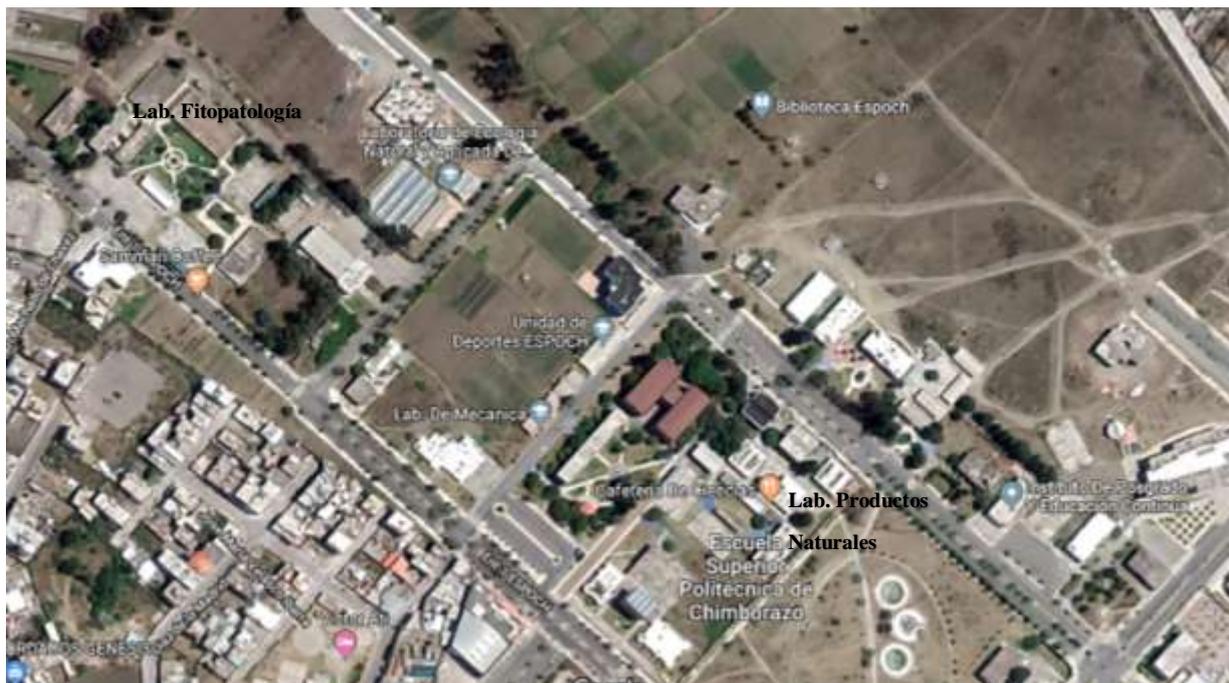
**Aceites fijos (grasas) y ceras:** insolubles en agua. No evaporan

#### IV. MATERIALES Y METODOS

##### A. CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR

###### 1. Localización

La investigación se realizó en el laboratorio Sanidad Vegetal, sección Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales, en el laboratorio de Ecología Natural y Aplicada, en el laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias todos ellos pertenecientes a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (Figura 6).



**Figura 6.** Ubicación de los sitios de investigación de la ESPOCH

Fuente: (Google Maps, 2019)

###### 2. Ubicación geográfica

Coordenadas Proyectadas UTM Zona 17S, Datum WGS84, 0038608 S, 7930624 O con altitud de 2831 msnm (Fuente: Datos GPS, 2019)

## **B. METODOLOGÍA**

### **INSUMOS PARA LOS ENSAYOS**

#### **1. Recolección de la muestra de *R. solanacearum***

Se procedió a recolectar el material infectado de *Ralstonia solanacearum* de 5 árboles de Eucalipto tropical en la hacienda “La Chelita”, ubicada a 15 minutos del recinto Los Ángeles en la parroquia Patricia Pilar en el cantón Buena Fe, provincia Los Ríos. Para esto nos ayudamos de un machete desinfectado para extraer partes vegetales del tronco y ramas en donde se podía visualizar y extraer fácilmente la bacteria, luego se etiquetó las muestras y se las llevó al laboratorio de Fitopatología previamente esterilizado, donde permaneció en refrigeración a 10° Celsius hasta su uso.

#### **2. Identificación de *Tagetes erecta***

Las muestras de flor de muerto (*Tagetes erecta*) que se utilizaron en las extracciones fueron obtenidas del vivero “Las Palmas” que se encuentra ubicado en la parroquia Nayón en el cantón Quito, provincia de Pichincha.

#### **Para el reconocimiento de la muestra se realizaron los siguientes pasos:**

Se retiró todo el sustrato a la planta que se va a llevar a identificar, posteriormente se llevó la muestra al herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y se procedió a lavar muy bien la muestra para luego prensar la muestra y llevarla al horno de secado durante 8 días. Una vez que la muestra se secó, se llevó a cabo la identificación para esto nos ayudamos de una guía botánica Konemann del año 2003 además de las otras muestras que se encuentran en el herbario de la ESPOCH. Se determinó que la especie con la que se trabajó es *Tagetes erecta* y al ser una especie cultivada no tenía ningún problema en su uso o aprovechamiento, se empleó plantas provenientes del mismo vivero por lo cual nos aseguramos de usar el mismo material genético.

### 3. Aislamiento del patógeno

Una vez obtenida la cepa de *Ralstonia solanacearum* se procedió a replicar en cajas Petri con el siguiente protocolo (Remache, 2018):

- ✓ En un frasco Erlenmeyer de 200 mL y con ayuda de una Balanza Analítica Digital se pesó 2,8gr de agar nutriente para diluir en 100 mL de agua destilada.
- ✓ En un frasco BOECO de 500 mL y con ayuda de una Balanza Analítica Digital (RADWAG AS 220.R2, Poland, (2013) se pesó 4,5 gr de Bacto agar para diluir 150 mL de agua destilada.
- ✓ Se colocó en el agitador orbital con plancha calefactor (COLE-PARMER, China, 2013), 3 minutos aproximadamente cada frasco para acelerar la dilución del agar
- ✓ Se llevaron ambos frascos al autoclave (BIOBASE, Shandong, 2017), durante un ciclo de 45 minutos aproximadamente y a una temperatura de 121°Celsius para su esterilización.
- ✓ Una vez terminado el proceso de esterilización se trasladó el frasco con el medio de cultivo a la cámara de flujo laminar (BIOBASE, Shandong, 2017). Donde en condiciones totales de asepsia se dispensó el medio agar nutritivo en 10 cajas Petri y Bacto agar en 10 cajas Petri para su posterior solidificación.
- ✓ Una vez solidificado el medio de cultivo, con el asa de transferencia se realizó la siembra de la bacteria, para lo cual se usó el método de cultivo por estrías.
- ✓ Se dejó en la incubadora (MEMMERT, Alemania, 2007), a una temperatura promedio de 29°Celsius.

### 4. Identificación de la Bacteria *Ralstonia solanacearum* mediante Tinción Gram

Protocolo elaborado conjuntamente con el Ingeniero Álvaro Rivera Técnico docente del laboratorio de Fitopatología de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo:

- ✓ Se esterilizaron 3 placas portaobjetos en el autoclave BIOBASE, Shandong, 2017 durante un ciclo.
- ✓ Se colocó una gota de agua destilada sobre una placa porta objetos
- ✓ Se procedió a tomar una mínima cantidad de bacteria con el asa de transferencia y colocarla en la gota de agua que se encontraba previamente en la placa portaobjetos.

- ✓ Se pasó por el mechero rápidamente para fijar la muestra y se dejó secar la placa portaobjetos.
- ✓ Se enjuago con agua destilada y se procedió a colocar unas gotas de yodo durante 1 minuto.
- ✓ Nuevamente se enjuagó con agua destilada y se colocó alcohol cetona durante 1 minuto para proceder a enjuagar con agua destilada.
- ✓ Se colocó Safranina 5 minutos para proceder a enjuagar y dejar secar.
- ✓ Finalmente se colocó aceite de inmersión y se colocó en el microscopio (COMECTA-IVYMEN, España, 2008) para su observación, en la cual se pudo ver claramente que tenía forma alargada típica de los bacilos y su color se tornó rojo por lo cual, con ayuda de los Ingenieros Álvaro Rivera y Rosa Castro, inmediatamente se determinó que se trataba de *R. solanacearum*.

## 5. Réplica de la bacteria

Una vez obtenida la cepa de *R. solanacearum* se procedió a replicar en cajas Petri con el siguiente protocolo (Remache, 2018):

- ✓ En un frasco Erlenmeyer de 200 mL y con ayuda de una Balanza Analítica Digital (RADWAG AS 220.R2, Poland, 2013) se pesa 2,3gr de agar nutriente para diluir en 100 mL de agua destilada.
- ✓ Se coloca en el agitador (COLE-PARMER, China, 2013), 3 minutos aproximadamente cada frasco para acelerar la dilución del agar
- ✓ Se lleva a él autoclave (BIOBASE, Shandong, 2017), a una temperatura de 121 ° Celsius para su esterilización.
- ✓ Mantenerlo en baño maría hasta que la temperatura sea de 48-50°Celsius.
- ✓ El medio así preparado puede ser utilizado inmediatamente o puede conservarse en refrigeración hasta por dos semanas, siempre y cuando las cajas de Petri se guarden en recipientes herméticamente sellados para prevenir la evaporación. No se deben utilizar medios secos o envejecidos (Bernal y Guzmán, 1984).

## 6. Elaboración de los extractos acuosos de *Tagetes erecta*.

### Extracción por decocción

Este proceso se realizó con la planta en verde

- ✓ Se seleccionó y lavó las partes de la planta de *Tagetes erecta* que se utilizaron en la decocción en este caso fue aprovechada toda la planta excepto la raíz.
- ✓ Se puso a hervir 2 litro de agua destilada una vez que se encontró en ebullición se procedió a colocar 125 gr en la balanza digital (Sartorius 1507B, Polonia, 2012) de flor de muerto (*Tagetes erecta*).
- ✓ Se dejó en el agua destilada hasta que hierva aproximadamente 20 minutos en la estufa (Taurus fornax, Brasil, 2014).
- ✓ Con ayuda de un colador se separó la parte sólida de planta y se colocó el extracto en el recipiente de vidrio color ámbar previamente esterilizado.
- ✓ Se dejó reposar hasta que se enfrié a temperatura ambiente y se procedió a utilizar en las diferentes concentraciones.

### **Extracción por infusión**

Este proceso se realizó con la planta en verde,

- ✓ Se seleccionó y lavó las partes de la planta de flor de muerto (*Tagetes erecta*) fueron hojas y flores.
- ✓ Se colocó las partes de la planta de flor de muerto (*Tagetes erecta*) en un recipiente y se pesó la muestra.
- ✓ Se colocó 1000 mL de agua destilada en un recipiente de metal y se dejó hervir, una vez fuera de la exposición al fuego se colocó la muestra de flor de muerto (*Tagetes erecta*)
- ✓ Se dejó reposar de 5 minutos y se coló. De igual manera se esperó que se enfrié a temperatura ambiente y se procedió a utilizar en las diferentes concentraciones

### **Extracción por maceración en agua fría**

Este proceso se realizó con la planta seca,

- ✓ Se seleccionó y lavó las partes de la planta de *Tagetes erecta* que se iban a utilizar en la maceración, en este caso se utilizó toda la planta excepto las raíces.
- ✓ Se colocó las partes de la planta en una estufa de secado por ventilación natural (STF-N, Madrid, 2008) hasta que llegue al punto de quiebre, esto llevo aproximadamente 14 horas a 50°Celsius.
- ✓ Se pulverizó la muestra cuando esta se encontraba seca con la ayuda de un molino y se colocó en una bolsa de papel filtro.

- ✓ Se colocó 1000mL de agua destilada en el frasco de vidrio color ámbar.
- ✓ Se procedió con ayuda de un embudo de papel a colocar 100 gr en la balanza digital (Sartorius 1507B, Polonia, 2012) de la muestra pulverizada en el frasco que contiene 1000mL de agua destilada.
- ✓ Se dejó reposar 24 horas antes de utilizar

### **7. Extracción por maceración en vinagre (ácido acético al 5%)**

Este proceso se realizó con la planta seca

- ✓ Se seleccionó y lavó las partes de la planta de *Tagetes erecta* que se iban a utilizar en la maceración en vinagre en este caso se utilizó toda la planta excepto las raíces.
- ✓ Se colocó las partes de la planta que se van a utilizar en un horno de secado hasta que llegue al punto de quiebre.
- ✓ Se pulverizó la muestra cuando esta se encuentre seca con la ayuda de un molino
- ✓ Se colocó 1000mL de vinagre en el frasco de vidrio color ámbar.
- ✓ Se procedió con ayuda de un embudo de papel a colocar 100 gr de la muestra pulverizada en el frasco que contiene 1000mL de vinagre.
- ✓ Se dejó reposar 48 horas antes de usar.

## **EVALUACIÓN DE LAS DIFERENTES DOSIS DE EXTRACTOS DE *Tagetes erecta* EN EL CONTROL DE *Ralstonia solanacearum*.**

### **ENSAYO 1.**

#### **1. Tratamientos y diseño experimental**

Se usaron concentraciones al 25, 50 y 100%. Combinadas con agua destilada de la siguiente manera (Tabla 6):

**Tabla 6.** Tratamientos evaluados en el ensayo 1

<b>Tratamiento</b>	<b>Extractos / Testigos</b>
1	Decocción al 25%
2	Decocción al 50 %
3	Decocción al 100%
4	Infusión al 25%
5	Infusión al 50%
6	Infusión al 100%
7	Macerado en agua fría al 25%
8	Macerado en agua fría al 50%
9	Macerado en agua fría al 100%
10	Testigo negativo (Agua)
11	Testigo positivo (Hidróxido de cobre)

**Fuente:** (Llerena, 2019).

La cantidad de planta que se utilizó en los diferentes extractos fue homogénea en cada una de ellos (Tabla 7), aunque después del proceso de extracción la cantidad de líquido disminuyó notablemente. Para los extractos también se esquematizó todo el uso de materiales tal es el caso del agar nutriente, así también las relaciones que existen entre el extracto líquido y el medio previo a ser dispensado en cada caja Petri.

**Tabla 7.** Cantidad de Tagetes erecta utilizada para la elaboración de los extractos

<b>Acuoso</b>		
<b>Macerado en Frío</b>	<b>Infusión</b>	<b>Cocción</b>
100 g Planta Seca	125 g Planta Fresca	125 g Planta Fresca
1000 mL Agua Destilada	1000 mL Agua Destilada	2000 mL Agua Destilada

**Fuente:** (Llerena, 2019).

### **Diseño experimental**

Para este primer ensayo de laboratorio se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con cinco repeticiones para cada concentración, con tres concentraciones de extractos

acuoso: Decocción, Infusión y macerado en agua fría al 25, 50 y 100 %, un grupo testigo positivo y un grupo testigo negativo.

## 2. Manejo del experimento

Para este experimento se utilizó el método de vertido en placa mismo que consiste en la combinación del medio de cultivo (Agar nutriente) con el líquido biocontrolador en este caso los extractos acuoso de *Tagetes erecta*,

### Aplicación de las diferentes dosis en cepas de *Ralstonia Solanacearum*.

Para la aplicación de las dosis nos ayudamos de un medio previamente preparado con las diferentes dosis de extracto.

- ✓ En un Erlenmeyer de 250mL se procedió a la preparación del medio, para esto se utilizó 2,3gr de agar nutriente para 70 mL de agua destilada al cual se le va a añadir la primera dosis (C1) de 30 mL de extracto como la dosis al 100%, es decir el extracto puro.
- ✓ En un Erlenmeyer de 250mL se procedió a la preparación del medio, para esto se utilizó 2,3gr de agar nutriente para 70 mL de agua destilada al cual se le va a añadir la segunda dosis (C2) 15 mL de extracto y 15 mL de agua destilada como la dosis al 50%.
- ✓ En un Erlenmeyer de 250ml se procedió a la preparación del medio, para esto se utilizó 2,3gr de agar nutriente para 70 mL de agua destilada al cual se le va a añadir la tercera dosis (C3) 7,5 mL de extracto y 22,5 mL de agua destilada como la dosis al 25%.

De igual manera para la evaluación de los testigos:

- ✓ Para el testigo positivo, en un Erlenmeyer de 250mL se procedió a la preparación del medio, para esto se utilizó 2,3gr de agar nutriente para 100 mL de agua destilada al cual se le va a añadir 0,5 gr de Hidróxido de Cobre.
- ✓ Para el testigo negativo, en un Erlenmeyer de 250mL se procedió a la preparación del medio, para esto se utilizó 2,3gr de agar nutriente para 100 mL de agua destilada.

Después de dispensar los diferentes tratamientos en las cajas Petri de vidrio se procedió a replicar la bacteria con ayuda de un asa de transferencia por el método de estriado. El estriado por agotamiento, en el cual se dividió al agar en tres secciones. Inicialmente, el asa de inoculación se esteriliza al pasarla por el fuego, se deja enfriar y se toma una cierta cantidad de la caja Petri con bacterias para luego hacer una inoculación a manera de zigzag (estriado)

en la primera sección del agar. Después, se esterilizó el asa, se deja enfriar en una sección del agar y se hace el estriado en la segunda sección del agar teniendo en cuenta que las líneas deben tocarse en dos puntos con el estriado anterior. A continuación, se pasó por el fuego el asa para esterilizar, se dejó enfriar en una esquina del agar y se realiza el estriado en la tercera sección tomando en cuenta que debe tocarse en un punto con el estriado de la segunda sección. (Figura 7) (Madigan *et al*, 2009)



**Figura 7.** Vista de una caja Petri con un estriado por agotamiento

### 3. Evaluación del ensayo

Se realizaron evaluaciones diarias durante 5 días. Para la evaluación de la capacidad biocontroladora se empleó la escala utilizada por Ezziyyani *et al.*, 2004 (Tabla 8)

**Tabla 8.** Escala para la evaluación antagónica de biocontroladores

Grado o Clase	Capacidad de Inhibición	Potencial Biocontrolador	Porcentaje de Inhibición (%)
0	Ninguna inhibición de la superficie de la cepa patógena	Muy malo	0 a 10
1	¼ inhibición de la superficie de la cepa patógena	Malo	10,1 a 30
2	½ inhibición de la superficie de la cepa patógena	Deficiente	30,1 a 50
3	Total inhibición de la superficie de la cepa patógena	Bueno	50,1 a 70
4	Total inhibición de la superficie de la cepa patógena esporulación	Muy bueno	>70

	sobre ella.		
--	-------------	--	--

**Fuente:** (Ezziyyani *et al.*, 2004).

#### 4. Análisis de los resultados

Para llevar a cabo el análisis de los resultados en el método de vertido en placa se realizó una transformación de la información numérica de porcentajes a números enteros mediante la utilización de la tabla elaborada por Ezziyyani *et al.*, 2004., con los valores obtenidos se llevó a cabo un análisis de varianza (ADEVA), pero al no existir diferencias significativas se realizó una comprobación de los supuestos con estadística no paramétrica mediante la prueba de Kruskal Wallis en el programa InfoStat.

### ENSAYO 2.

#### Parte 1.

##### 1. Tratamientos y diseño experimental

El número de tratamientos utilizados en este ensayo (Tabla 9), fue de 14 para realizar la primera parte del ensayo número dos en el cual se buscaba comprobar la eficiencia del extracto mediante antibiogramas de disco.

**Tabla 9.** Tratamientos evaluados en el Ensayo 2-Parte 1

Tratamiento	Extractos / Testigos
1	Decocción al 10%
2	Decocción al 20%
3	Decocción al 30%
4	Infusión al 10%
5	Infusión al 20%
6	Infusión al 30%
7	Vinagre al 10%
8	Vinagre al 20%
9	Vinagre al 30%
10	Extracto ácido al 10%
11	Extracto ácido al 20%
12	Extracto ácido al 30%
13	Testigo negativo (Agua)

14	Testigo positivo (Hidróxido de cobre)
15	Testigo positivo (Metalaxil)

**Fuente:** (Llerena, 2019).

**Tabla 10.** Tratamientos evaluados en el Ensayo 2- Parte 2

Tratamiento	Testigos
1	Vinagre al 5%
2	Vinagre al 10%
3	Vinagre al 15%
4	Vinagre al 20%
5	Vinagre al 30%
6	Testigo positivo(Phyton)
7	Testigo positivo (Estreptomycin)

**Fuente:** (Llerena, 2019)

## Diseño experimental

### Parte 1

Para esta prueba se usó un diseño de bloques completamente al azar con 5 repeticiones para cada tratamiento de extracto, con tres concentraciones, un grupo testigo blanco de ácido acético al 5% (Vinagre comercial), 2 testigos positivos: Hidróxido de cobre (Kocide) y Metalaxil (Korso), además de un grupo testigo negativo, para el extracto por decocción, infusión y extracto ácido como método efectivo alternativo. Se usaron concentraciones al 10, 20 y 30 % de los diferentes extractos.

### Parte 2

Para esta prueba se usó un diseño de bloques completamente al azar con 5 repeticiones para cada tratamiento, un grupo testigo blanco de ácido acético al 5% (Vinagre comercial), 2 testigos positivos: Sulfato de cobre pentahidratado (Phyton) y Sulfato de Estreptomycin, además de un grupo testigo negativo, para el grupo de testigo blanco se usaron concentraciones al 5, 10, 15, 20 y 30 %.

## 2. Manejo del experimento

### Parte 1 y 2

#### Preparación del medio

Una vez obtenida la cepa de *R. solanacearum* se procede a replicar en cajas Petri con el siguiente protocolo (Remache, 2018):

- ✓ En un frasco Erlenmeyer de 200 mL y con ayuda de una Balanza Analítica Digital (RADWAG AS 220.R2, Poland, 2013), se pesa 2,3gr de agar nutriente para diluir en 100mL de agua destilada.
- ✓ Se colocó en el agitador (COLE-PARMER, China, 2013), 3 minutos aproximadamente cada frasco para acelerar la dilución del agar
- ✓ Se llevó a él autoclave (BIOBASE, Shandong, 2017), a una temperatura de 121 ° Celsius para su esterilización.
- ✓ Se mantuvo en baño maría hasta que la temperatura sea de 48-50°Celsius.

El medio así preparado puede ser utilizado inmediatamente o puede conservarse en refrigeración hasta por dos semanas, siempre y cuando las cajas de Petrí se guarden en recipientes herméticamente sellados para prevenir la evaporación. No se deben utilizar medios secos o envejecidos (Bernal y Guzmán, 1984).

### **Preparación de las concentraciones de vinagre**

Debido a los buenos resultados que mostro el vinagre por si solo se tomó la decisión de utilizar el testigo absoluto y reducir las concentraciones a: 5, 10, 15, 20 y 30 % respectivamente (Tabla 11). Se preparó 100 mL de cada concentración utilizando las relaciones realizadas con los porcentajes.

### **Preparación de los testigos químicos**

#### **Hidróxido de cobre**

- ✓ En un frasco de vidrio de 200 mL se colocó 100 mL de agua a lo cual se le añadieron 0.5 gr de Hidróxido de cobre.

#### **Metalaxil**

- ✓ En un frasco de vidrio de 200 mL se colocó 100 mL de agua a lo cual se le añadieron 0.25 gr de Metalaxil.

#### **Sulfato de cobre pentahidratado**

- ✓ En un tubo de ensayo se colocó 100 mL de agua a lo cual se le añadieron 0,25 gr de Sulfato de cobre pentahidratado.

#### **Sulfato de estreptomicina**

- ✓ En un tubo de ensayo se colocó 100 mL de agua a lo cual se le añadió 1 gr de Sulfato de estreptomicina.

Las dosificaciones del extracto fueron en concentraciones de 10 20 y 30 % respectivamente (Tabla 11), todas estas combinadas con agua destilada en proporciones. Se probó también un testigo absoluto que viene a ser el vinagre en las mismas concentraciones, para determinar la diferencia que existe entre el extracto ácido y el vinagre por sí solo.

**Tabla 11.** Relación Extracto- Agua para las concentraciones

Porcentaje de extracto de <i>Tagetes erecta L</i>	Porcentaje de agua destilada
<b>10%</b>	90%
<b>20%</b>	80%
<b>30%</b>	70 %

Fuente: (Llerena, 2019).

### **Suspensión del microorganismo en estudio**

- ✓ Se colocó 100 mL de agua destilada en un tubo de ensayo posteriormente se elaboró una tapa de aluminio y algodón.
- ✓ Luego se introdujo el tubo de ensayo en el autoclave (BIOBASE, Shandong, 2017), durante un ciclo de una hora aproximadamente, con el fin de obtener agua estéril.
- ✓ Tomamos una mínima cantidad de bacteria de la caja Petri con ayuda de un asa de transferencia y la sumergimos en el tubo de ensayo que contenía agua estéril.
- ✓ Se Procedió a agitar el tubo con la suspensión hasta que el agua se ponga turbia y esté lista para utilizar.
- ✓ Para evitar inóculos muy concentrados o muy diluidos, se utilizó la escala de Mcfarland (Tabla 12).

**Tabla 12.** Escala McFarland

<b>Estándar McFarland</b>	<b>Número de células</b>
0,5	1,5
1	3
2	6
3	9
4	12
5	15
6	18
7	21
8	24
9	27
10	30

**Fuente:** (McFarland, 2018).

### **Siembra de la muestra**

- ✓ Se sumergió un aplicador de algodón estéril, dentro de la suspensión del microorganismo en estudio.
- ✓ Se colocó el aplicador por encima del nivel del contenido del tubo y se procedió rotar contra las paredes del mismo para remover el exceso del inóculo.
- ✓ Se sembró el inóculo uniformemente sobre la superficie del medio con el aplicador. Se realizó esta siembra en tres direcciones.
- ✓ Se permitió que la superficie del medio sembrado se seque durante 5-20 minutos, manteniendo la caja con la tapa cerrada.

### **Antibiograma de discos**

- ✓ Se colocaron los 4 discos sobre la superficie del agar con pinzas estériles; con éstas, se presionó los discos ligeramente sobre el agar para asegurar un contacto uniforme.
- ✓ Se colocó inmediatamente 20 micro litros de los extractos y testigos tanto positivos como negativo sobre cada disco.

- ✓ El líquido se difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración.
- ✓ Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecieron rodeados por una zona de inhibición.

### **3. Evaluación del ensayo**

#### **Parte 1 y 2**

- ✓ A las 24 horas se midió la zona de inhibición de cada disco contra una superficie oscura bajo luz reflejada. Se midió el diámetro de la zona incluyendo los 6 mm del disco, con una regla sobre el respaldo de la caja de Petrí sin remover la tapa.
- ✓ Una lectura de 6 mm indica que no hay zona de inhibición.
- ✓ El punto final de inhibición completa del crecimiento se estimó a simple vista.

Si se necesita un resultado muy rápido, el diámetro de la zona de inhibición puede leerse después de 6-8 horas de incubación, pero estas lecturas deben confirmarse posteriormente, al término del período de incubación de 18 horas.

### **4. Análisis de los resultados**

#### **Parte 1 y 2**

Para el análisis de los resultados con el método de antibiograma de discos la variable a evaluar fue el diámetro formado por el halo de inhibición. Debido a la gran cantidad de ceros se procedió a realizar el análisis de varianza no paramétrico Kruskal Wallis en el programa estadístico InfoStat.

#### **Tamizaje fitoquímico a los extractos acuosos de *Tagetes erecta* L. en el laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de ciencias de la ESPOCH.**

Se realizó un tamizaje fitoquímico que nos permitió contrastar los componentes que se encuentran presentes en la planta con los resultados del análisis microbiológico.

Para determinar la efectividad que tendrían los 3 extractos de flor de muerto (*Tagetes erecta*) en este caso como bactericida, se realizaron los siguientes ensayos:

**Ensayo de Dragendorff:** Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides.

- ✓ A la alícuota se le añadió 1 gota de ácido clorhídrico concentrado
- ✓ Se procedió a calentar suavemente y se dejó enfriar hasta acidez.
- ✓ Con la solución acuosa ácida se realizó el ensayo, añadiendo 3 gotas del reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado (+++).

#### **Ensayo de Mayer:**

- ✓ A la alícuota se le añadió 1 gota de ácido clorhídrico concentrado
- ✓ Se procedió a calentar suavemente y se dejó enfriar hasta acidez.
- ✓ Se añadió una pizca de cloruro de sodio en polvo, se agitó y filtro.
- ✓ Luego Añadimos 2 ó 3 gotas de la solución reactiva de Mayer, si se observa opalescencia (+), Turbidez definida (++), precipitado coposo (+++).

#### **Ensayo de Wagner:**

- ✓ A la alícuota se le añadió 1 gota de ácido clorhídrico concentrado
- ✓ Se procedió a calentar suavemente y se dejó0 enfriar hasta acidez.
- ✓ Se añade 2 ó 3 gotas del reactivo, si se observa opalescencia (+), Turbidez definida (++), precipitado coposo (+++).

**Ensayo de Baljet:** Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular Coumarinas.

- ✓ Se evaporó el solvente en baño de agua y se le adiciono alcohol en la menor cantidad (1 mL).
- ✓ Una vez que la solución se encuentre en ese estado se le adicionó 1mL del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++ y +++) respectivamente.

El reactivo de Baljet se prepara de la siguiente forma:

Solución 1: Hidróxido de sodio al 10 % en agua.

Solución 2: Ácido pícrico al 1 % en etanol.

Las soluciones se tuvieron preparadas de forma independiente y se mezclaron en igual cantidad de volumen cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo.

**Ensayo de Borntrager:** Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas.

- ✓ Debía evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo.
- ✓ Se adicionó 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio ó amonio al 5 % en agua.
- ✓ Se agitó mezclando las fases y se dejó en reposo hasta su separación. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (++) , coloración roja (+++).

**Ensayo de Liebermann-Bouchard:** Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides.

- ✓ Debía evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo.
- ✓ Se adicionó 1 mL de anhídrido acético y se mezcló bien.
- ✓ Por la pared del tubo de ensayos se dejaron resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar.

Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración:

- 1- Rosado-azul muy rápido.
- 2- Verde intenso-visible, aunque rápido.
- 3- Verde oscuro-negro-final de la reacción.

**Ensayo de Catequinas:**

- ✓ Para ello, se tomó de la solución alcohólica una gota, con la ayuda de un capilar y se apliqué la solución sobre papel de filtro.

- ✓ Sobre la mancha se aplicó solución de carbonato de sodio.
- ✓ Luego de eso se vio la aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, lo que indica un ensayo positivo.

**Ensayo de Fehling:** Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores.

- ✓ En la solución se adicionaron 2 mL del reactivo y se calentó en baño de agua 5-10 minutos la mezcla.

El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo.

El reactivo se prepara de la siguiente forma:

Solución A: Se pesaron 35 g de sulfato cúprico hidratado cristalizado y se disolvieron con agua hasta un volumen total de 1000 mL.

Solución B: Se pesaron 150 g de tartrato de sodio y potasio y 40 g de hidróxido de sodio y se disolvieron con agua hasta un volumen total de 1000 mL.

Las soluciones se tuvieron preparadas de forma independiente y se mezclaron igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo.

Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar.

**Ensayo del cloruro férrico:** Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal.

- ✓ A una alícuota del extracto se añadió acetato de sodio para neutralizar la solución.
- ✓ Posteriormente se le añadieron tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica.

Un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.

- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

**Ensayo de Shinoda:** Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto de un vegetal.

- ✓ Se diluyó la solución con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico.
- ✓ Después de la reacción se esperó 5 minutos y se añadió 1 mL de alcohol amílico.
- ✓ Se mezclaron las fases y se dejaron reposar hasta que estas se separen.

El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intensos en todos los casos.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSION

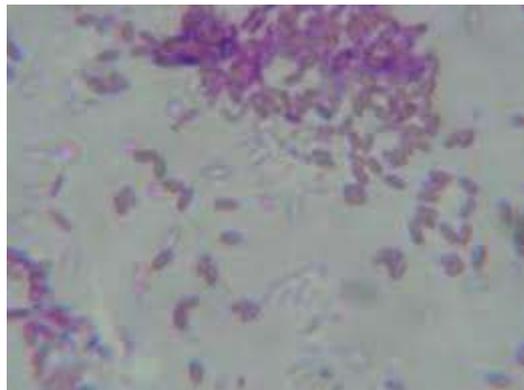
### 1. INSUMOS PARA LOS ENSAYOS

#### Identificación de la Bacteria *Ralstonia solanacearum* mediante Tinción Gram

**Tinción Gram:** negativa

**Tipo de bacteria:** bacilos

**Coloración:** rojiza



**Figura 8.** Prueba de Tinción Gram en *Ralstonia solanacearum*

Fuente: (Llerena, 2019)

### 2. EVALUACIÓN DE LAS DIFERENTES DOSIS DE EXTRACTOS DE *Tagetes erecta* EN EL CONTROL DE *Ralstonia solanacearum*.

#### ENSAYO 1.

Después de la evaluación de los resultados y al ver que el análisis de varianza ADEVA, no mostro diferencias significativas se realizó un análisis de varianza no paramétrico mediante la prueba de Kruskal Wallis (Tabla 14), para determinar rangos de similitud.

**Tabla 13.** Mediana de los porcentajes de inhibición, resultantes del efecto de los tratamientos evaluados en el control de *Ralstonia solanacearum*, (Kruskal Wallis). En ensayos realizados entre el 9 y el 21 de mayo del 2019

Tratamientos	Medianas 1er día	Medianas 3er día	Medianas 5to día
Infusión 25%	0 A	0 A	0 A
Infusión 50%	0 A	0 A	0 A
Testigo negativo	0 A	0 A	0 A
Infusión 100%	0 A	0 A	0 A
Decocción 100%	0 A	0 A	0 A
Decocción 25%	0 A	0 A	0 A
Decocción 50%	0 A	0 A	0 A
Macerado frio 50%	60 B	0 A	0 A
Macerado frio 25%	60 B	0 A	0 A
Macerado frio 100%	80 B	0 A	0 A
Testigo positivo	80 B	75 B	65 B

**Fuente:** (Llerena,2019)

Después de realizar la prueba de Kruskal Wallis se determinó que existen diferencias significativas en el control de *Ralstonia* entre los tratamientos al primero, tercero y quinto día. (Tabla 16).

Se observó que se forman dos rangos de agrupación de los tratamientos. Los tratamientos en que se observó mayor control de la bacteria el primer día fueron: Macerado en agua fría al 50% con un porcentaje de inhibición de 60%, Macerado de agua fría al 25% con 60%, Macerado de agua fría al 100% con 60% y el testigo positivo con 80% respectivamente. Pero los días posteriores se probó que únicamente el testigo positivo correspondiente al hidróxido de cobre mostro control hacia la bacteria.

Mientras que el rango en el que no se observó ningún efecto de control encontramos a los siguientes tratamientos: Decocción al 100%, 50 % y 25%, infusión al 100%, 50 % y 25%, y testigo negativo que consistía en agua destilada.

**ENSAYO 2.****Parte 1.**

**Tabla 14.** Mediana de los halos de inhibición, resultantes del efecto de los tratamientos evaluados sobre *Ralstonia solanacearum*, (Kruskal Wallis). En ensayos realizados entre el 19 y el 21 de junio del 2019.

<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>MEDIANAS</b>				
Korso	0.00	A			
Kocide	0.00	A			
Decocción 20	0.00	A			
Agua	0.00	A			
Decocción 10	0.00	A			
Infusión 10	0.00	A	B		
Infusión 20	8.00	A	B	C	
Infusión 30	8.00	A	B	C	
Decocción 30	7.00	A	B	C	
Vinagre 20	9.00		B	C	D
Ácido 10	10.00			C	D
Vinagre 10	10.00			C	D
Ácido 20	12.00			C	D
Ácido 30	13.00				D
Vinagre 30	15.00				D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

Después de realizar la prueba de Kruskal Wallis se determinó que existen diferencias significativas en el control de *Ralstonia solanacearum* entre los tratamientos.

Se observó que se forman seis rangos de agrupación de los tratamientos. Solo los dos últimos fueron mejores en el control de la bacteria y estos son: Ácido 30% (13mm) y Vinagre 30% (15mm).

Mientras que los que presentaron un menor efecto de control son los siguientes tratamientos: Korsó (0 mm), Kocide (0 mm), Decocción al 20% (0 mm), Agua destilada (0 mm), Decocción al 10% (0 mm), Infusión al 10% (0 mm), Infusión al 20 % (8 mm), Infusión al 30% (8 mm), Decocción al 30 % (7 mm).

**Parte 2.**

**Tabla 15.** Mediana de los halos de inhibición, resultantes del efecto de los tratamientos evaluados sobre *Ralstonia solanacearum*. (Kruskal Wallis) En el ensayo realizado el 2 y el 4 de julio del 2019.

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>MEDIANAS</b>			
Vinagre 5	0.00	A		
Vinagre 10	8.00	A	B	
Vinagre 15	9.00	A	B	
Vinagre 20	10.00	A	B	
Vinagre 30	13.00		B	C
Phyton	21.00			C
Estreptomycin	29.00			C

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

Después de realizar la prueba de Kruskal Wallis se determinó que existen diferencias significativas en el control de *Ralstonia* entre los tratamientos.

Se observó que se forman cuatro rangos de agrupación de los tratamientos. Los tratamientos en que se observó mayor control de la bacteria fueron: Solución de Vinagre al 30 % (13 mm), Phyton (21 mm) y Estreptomycin (29 mm).

Mientras que el rango en el que se observó un menor efecto de control encontramos a los siguientes tratamientos: Solución de Vinagre al 5% (0 mm), Solución de Vinagre al 10% (8 mm), Solución de Vinagre al 15% (9 mm) y Solución de Vinagre al 20 % (10 mm).

**3. TAMIZAJE FITOQUÍMICO A LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE *Tagetes erecta*, EN EL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA ESPOCH (Tabla 17)**

**Tabla 16.** Tamizaje fitoquímico

<b>Ensayos</b>	<b>Decocción</b>	<b>Infusión</b>	<b>Macerado en Agua</b>
<b>Ensayo de Dragendorff para ALCALODES</b>	Positivo +++	Positivo +++	Positivo +++
<b>Ensayo de Mayer para ALCALOIDES</b>	Positivo	Positivo	Positivo
<b>Ensayo de Wagner para ALCALOIDES</b>	Positivo +	Positivo +	Positivo +
<b>Ensayo de Borntrager para QUINONAS</b>	Positivo	Positivo	Positivo +
<b>Ensayo de Liebermann-Bouchard para TRITERPENOS Y ALCALOIDES</b>	Positivo	Positivo	Negativo

<b>Ensayo de Catequinas para CATEQUINAS</b>	Positivo +	Positivo +	Positivo
<b>Ensayo de Fehling para AZUCARES REDUCTORES</b>	Positivo	Positivo	Positivo
<b>Ensayo de cloruro férrico para TANINOS</b>	Positivo	Positivo	Positivo
<b>Ensayo de Shinoda para FLAVONOIDES</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>Ensayo de Baljet para CUMARINAS</b>	Positivo ++	Positivo ++	Positivo ++

Fuente: (Llerena, 2019).

Los tres extractos: decocción, infusión y macerado en agua fría, dieron positivo a los ensayos de Dragendorff, Mayer y Wagner mismos que permiten reconocer la presencia de alcaloides. En el Ensayo de Borntrager los tres extractos dieron positivo a la presencia de quinonas. En el ensayo de Liebermann-Bouchard el extracto de decocción e infusión dieron positivo a la presencia de esteroides y el macerado en agua dio negativo. En el ensayo de Catequinas los tres extractos dieron positivo. En el ensayo de Fehling los tres extractos dieron positivo a la presencia de azucares. En el ensayo de cloruro férrico los tres extractos dieron positivo a la presencia de taninos y/o compuestos fenólicos. Ninguno de los extractos expuestos al ensayo de Shinoda dio positivo lo que significa que no tiene presencia de flavonoides mismos que actúan de bactericidas. En el Ensayo de Baljet dieron positivos todos los extractos presentando compuestos con agrupamiento lactónico, en particular cumarinas.

Lo cual nos da como resultado que la planta tiene presencia de alcaloides, quinonas, esteroides, azúcares, taninos, compuestos fenólicos, cumarinas; mientras que para actuar como bactericida con la prueba de Shinoda no se encontró la presencia de flavonoides.

## DISCUSION

Los resultados obtenidos en esta investigación, muestran que después de haberse aplicado los extractos botánicos que debían actuar de controladores no hubo un ningún efecto positivo de inhibición dado que la bacteria *Ralstonia solanacearum* presentaba un crecimiento abundante en presencia del extracto tanto de infusión como de decocción, en cuanto del extracto macerado en agua destilada fría se logró observar que los metabolitos: flavonoides y alcaloides que actúan como bactericida estaban realizando un control efectivo los primeros dos días de evaluación pero al no realizar ningún control en los días posteriores se descarta su posible uso a nivel de vivero o campo, se evidencio también que el crecimiento de la bacteria probablemente se debió a la lixiviación de los metabolitos de la planta, lo cual es corroborado por López Rivera(2015), quien manifiesta que para retener de mejor manera los metabolitos tanto primarios como secundarios se debe procurar hacer extracciones alcohólicas y después verificar el grado de toxicidad.

Por lo anterior, se acepta la hipótesis nula planteada: Al menos una de las diferentes dosificaciones del extracto acuoso de *Tagetes erecta*, no ayuda a controlar la incidencia de *Ralstonia solanacearum* Smith en plantas de Eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*).

Por otro lado, se comprueba que el macerado en vinagre o también llamado extracto ácido mismo que constituía de ácido acético al 5% diluido con agua destilada en 5 concentraciones, de las cuales se puede decir que a partir del 10% de dilución el vinagre es un controlador efectivo para bacterias resistentes. Así también en el control químico con mayor efectividad tenemos el sulfato de cobre pentahidratado que actúa bien en el control preventivo de bacterias y hongos ya que “los mecanismos de control biológico para bacterias son básicamente los mismos que para el control biológico de hongos” (Fravel, 1989), comprobando de esta forma la vulnerabilidad de la bacteria *Ralstonia solanacearum* a los productos que contienen cobre y azufre.

Respecto a lo mencionado en el párrafo anterior se deduce que probablemente el lento crecimiento del patógeno se da porque en el laboratorio se trabaja en condiciones controladas de humedad, temperatura y nutrientes los cuales son muy diferentes en condiciones naturales en las que se halla esta bacteria habitualmente. Los extractos y el empleo de algunas sustancias que intervienen como mecanismo de defensa, puede ser de gran ayuda para los productores de madera, pues se cree que gran parte del efecto de los extractos de las plantas sobre plagas y enfermedades más que deberse a algún tipo de toxicidad directa, se produce por el fortalecimiento estructural de la planta, incrementando su resistencia a la penetración de esporas, capsulas o bien estimulando un desarrollo vigoroso para superar un ataque. En cuanto al vinagre comercial estudios: “En el campo de la medicina se probó vinagre para mitigar y controlar bacterias causantes de tuberculosis, así también otros tipos de bacilos, demostraron también que el efecto bactericida del vinagre se mantiene incluso en condiciones “sucias”. Bajo estas condiciones más fisiológicas, la disminución de las bacterias viables fue significativa, hasta 100 millones de veces menos bacterias. Ellos hallaron que la exposición a vinagre (ácido acético al 5 %) durante 20 minutos reduce las bacterias vivas de *Mycobacterium tuberculosis*” (Howar T, 2015).

Los resultados que se obtuvieron son muy variables y esto es debido a la calidad y concentración de las sustancias activas que pueden llegar a variar, debido a la localización de la planta, edad del material vegetal con que se preparan los extractos; además porque muchos compuestos son aromáticos, solubles en agua o son degradados rápidamente por la luz solar.

En cuanto al tamizaje fitoquímico podemos decir que nuestros resultados obtenidos en el laboratorio de productos naturales de la facultad de ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo tienen una gran similitud a los resultados presentados en la tabla generada por Olga Lock en el año de 1998, sirviendo este documento para ayudar a identificar las propiedades y características que tienen los metabolitos primarios y secundarios que mediante procesos de extracción se logran obtener en los extractos botánicos para brindar una alternativa de controlador de plagas y enfermedades.

Autores como Devika, R., & Koilpillai, J. (2012), refirieron de igual manera la presencia de flavonoides, alcaloides, terpenoides, taninos y saponinas, glucósidos cardiotónicos y cumarinas, en extractos del genero *Tagetes* a través de extractos etanólicos y acuosos, para

dicha caracterización cierta cantidad conocida de las muestras fueron tomadas y sometidas a medidas cualitativas análisis fitoquímico con dos solventes tales como: agua, etanol y éter de petróleo a través de métodos estándar para carbohidratos, Tanino, Saponinas, Flavonoides, cardias glucósidos, terpenoides, flobataninos, antraquinonas, alcaloides, quinonas, fenoles y cumarinas. Las diferencias con relación a los metabolitos encontrados en el presente trabajo y las observadas por otros investigadores, pueden estar relacionadas con diversos factores como la época del año en que tomaron las muestras, el secado y la variedad o genotipo.

En cuanto a la presencia de azúcares reductores el ensayo realizado por Conrado Camacho *et al.*, (2012), muestra valores superiores de azúcares reductores en los extractos etanólicos con relación a las variantes acuosas. Las mayores concentraciones fueron obtenidas en hojas de *Tagetes erecta*. La presencia de azúcares reductores en *T. erecta*, no solo contribuye a la caracterización bioquímica de esta especie, sino que además estos azúcares interfieren con la extracción de saponinas, las cuales son de gran interés comercial. También nos afirma que los tipos de metabolitos secundarios encontrados en extractos de *Tagetes erecta* L. nos marcan las potencialidades de esta planta, debido a la presencia en general de flavonoides, terpenoides y taninos que han sido referidos con diversas propiedades biológicas. De igual manera, la actividad antibacteriana que posee sugiere el uso de esta especie para combatir enfermedades en animales y humanos provocadas por bacterias patógenas y justifica el empleo etnobotánico de esta especie en el combate de diversas patologías

## VIII. CONCLUSIONES

1. Se acepta la hipótesis nula “Las diferentes dosificaciones del extracto acuoso de *Tagetes erecta* L. no controlan la incidencia de *Ralstonia solanacearum* Smith en plantas de Eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*)”.
2. Se logró demostrar que la bacteria tiene un cierto grado de vulnerabilidad alto en cuanto a los productos sulfatados, de esta manera se da la apertura para utilizar tanto el sulfato de cobre pentahidratado y el sulfato de estreptomicina que fueron los que dieron resultados excelentes de inhibición de la bacteria de laboratorio, y sería una alternativa efectiva para controlar y prevenir el crecimiento de la bacteria *Ralstonia solanacearum*.
3. En cuanto al Tamizaje fitoquímico realizado podemos concluir que los tres extractos; decocción, infusión y macerado en agua fría de la planta *Tagetes erecta* posee metabolitos primarios y secundarios de gran utilidad entre estos podemos mencionar: alcaloides, quinonas, triterpenos, esteroides, cumarinas, taninos y Catequinas. Si bien la literatura nos dice que para que una planta cumpla con la función de bactericida debe tener flavonoides y alcaloides, *Tagetes erecta* presento alcaloides, pero no flavonoides por lo cual se descarta la posibilidad de utilizarlo para el control de bacterias de similares características que *Ralstonia solanacearum*.

## **IX. RECOMENDACIONES**

1. Para realizar el secado de la muestra de una planta es mejor separar las partes de la planta (flor, hojas, tallo, raíces), y de ser posible secarlas parte por parte. Así se evita la manipulación constante del horno de secado en caso de utilizarlo.
2. Realizar más investigaciones en cuanto al control de plagas y enfermedades mediante la utilización de extractos botánicos ya que estos al ser orgánicos son amigables con el medio ambiente y esto ayudaría a mitigar de cierta forma el paso acelerado de la contaminación por pesticidas químicos que a la larga solo destruyen el suelo, mismo que se encarga de proveer medicinas y alimentos.
3. Evaluar los tratamientos que contenían vinagre comercial (ácido acético al 5%) en plantas a nivel de vivero o de campo, ya que las soluciones realizadas con este material mostraron buenos resultados a nivel de laboratorio en el control de *Ralstonia solanacearum*.
4. Elaborar un esquema de posibles usos que se le puede dar a la planta *Tagetes erecta L.* ya que queda demostrado en el tamizaje realizado para este documento las propiedades que la misma tiene al poseer: Quinonas, esteroides, cumarinas, Catequinas, taninos, azúcares reductores, y alcaloides que actúan de biocontroladores naturales.

## X. RESUMEN

La presente investigación propone: evaluar el efecto de extractos acuosos de flor de muerto (*Tagetes erecta*) en el control de la Marchitez bacteriana producida por *Ralstonia Solanacearum*, presente en plantaciones comerciales de *Eucalyptus urograndis* en la hacienda los Ángeles, cantón Buena Fe, provincia de Los Ríos, que pertenece a la empresa NOVOPAN DEL ECUADOR S.A; para dar solución a este problema se ha planteado la posibilidad de utilizar extractos botánicos. Se realizaron aislamientos de cepas de *Ralstonia solanacearum* para probar la eficiencia de los extractos acuosos: decocción, infusión, macerado en frío, extracción ácida y ácido acético al 5% (vinagre). El diseño experimental utilizado fue diseño de bloques completamente al azar (DCA) y se estructuró de 28 tratamientos y 5 repeticiones. Hubo 4 controles químicos (hidróxido de cobre, Metalaxil, sulfato de cobre pentahidratado y estreptomina y uno absoluto (agua). Se efectuaron dos métodos para realizar la evaluación de los tratamientos. El primero fue el método de Vertido en placa donde se probaron los tratamientos de decocción al 25,50 y 100, %; infusión al 25,50 y 100, %; macerado en agua al 25,50 y 100, % e hidróxido de cobre y Metalaxil, con esta metodología la evaluación cada 24 horas durante 5 días. El segundo método fue un antibiograma en donde se determinó que las soluciones que contenían ácido acético al 5% poseen potencial antagonista y se evaluó midiendo el halo de inhibición de los tratamientos a las 24 horas. Posteriormente se realizó el tamizaje fitoquímico de la planta *T. erecta*. Al final del ensayo se determinó que la capacidad antagonista del extracto acuoso es cero ya que no presenta ningún control para *R. solanacearum*.

**Palabras clave:** EXTRACTO BOTÁNICO – TAMIZAJE FITOQUÍMICO – CAPACIDAD ANTAGONICA – EUCALIPTO TROPICAL – CEPA BACTERIANA – ANTIBIOGRAMA.

**Por: Laura Llerena**



## XI. SUMMARY

The present investigation proposes: to evaluate the effect of aqueous extracts of the dead flower (*Tagetes erecta*) in the control of the bacterial wilting produced by *Ralstonia Solanacearum*, present of commercial plantations of *Eucalyptus urograndis* in the Los Angeles farm, Buena Fe Canton, Los Rios Province, which belongs to the company NOVOPAN DEL ECUADOR S.A; to solve this problem has been raised the possibility of using botanical extracts. Insulation of *Ralstonia solanacearum* strains was performed to test the efficiency of aqueous extracts: decoction, infusion, cold macerated, acid extraction and 5 % acetic acid (vinegar). The experimental design used was completely random block design (RBD) and it was structured of 28 treatments and 5 repetitions. There were 4 chemical controls (copper hydroxide, metalaxil, pentahydrate copper sulphate and streptomycin (water). It was effected two methods to perform the treatment evaluation. The first was the method of pouring in plate where decoction treatments were tested at 25, 50 and 100%; Infusion at 25, 50 and 100% macerated in water at 25, 50 and 100% copper hydroxide and Metalaxil, with this methodology the evaluation every 24 hours for 5 days. The second method was an antibiogram where solutions containing 5% acetic acid of antagonistic potential were determined and evaluated by measuring the inhibition halo of treatments at 24 hours. Subsequently the phytochemical screening of the Plant. *T. erecta* plant was performed. At the end of the trial it was determined that the antagonistic capacity of the aqueous extract is zero as it has no control for *R. solanacerum*.

**KEYWORDS:** BOTANICAL EXTRACT - PHYTOCHEMICAL SCREENING - ANTAGONISTIC CAPACITY- TROPICAL EUCALYPTUS - BACTERIAL STRAIN - ANTIBIOGRAM.



## **XII. BIBLIOGRAFIA**

1. Abraf. (2013). *Efecto de cinco sustratos sobre índices de crecimiento de plantas de eucalipto grandiss, (Carica papaya L.) bajo invernadero*. Rev. Cienc. Hortíc. 1(2), 142-253.
2. Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. Department of Plant Pathology University of Florida. Elsevier academic press. p. 922.
3. Agrocalidad. (2013). *Ficha técnica número #4bi Marchitez Bacteriana (Ralstonia solanacearum E.F.Smith)*. Sintomatología y daños. Recuperado el 17 de enero del 2018, Disponible en: <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/sanidad-vegetal/3-control-fitosanitario/04-gestion-de-manejo-y-control-de-plagas-especificas/b-prevencion-ingreso-moko-platano/4bi-ficha-tecnica-r.solanacearum-raza-2-min.pdf>.
4. Alfenas, A. C., Mafia, R. G., Sartório, R. C., Binoti, D. H .B., Silva, R. R., Lau, D. & Vanetti, C. A. (2006). *Ralstonia solanacearum em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. Fitopatología Brasileira*. Recuperado el 08 de enero del 2018, Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/fb/v31n4/05.pdf>
5. Álvarez P. & Varona, J. C. (1998). *Silvicultura*. La Habana. Cuba: Editorial y Educación. p. 22
6. Alvarez, B., Vasse, J., Le Courtois, V., Trigales-Demery, D., Lopez, M. M., & Trigales, A. (2008). *Comparative behaviour of Ralstonia solanacearum biovar 2 in diverse plant species*. Phytopathology. 98(1), 59-68
7. Beltrán, C., Díaz, F., & Gómez, H. (2013). *Tamizaje fitoquímico preliminary de especies de plantas promisorias de la costa atlántica colombiana*. Universidad de Cartagena. Cartagena de Indias, Colombia. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 18(4). Recuperado el 22 de mayo del 2019. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962013000400013](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000400013).
8. Benavides C. (2008). *Determinación de la eficiencia de las decocciones de eucalipto, Molle, Romero, para el control de damping off, en la producción de plántulas de Pino (Pinus radiata d. Dont), Eucalipto (Eucalyptus Globulus) a nivel de vivero*. (Tesis de grado. Ingeniero Forestal). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba. Recuperado el 09 de marzo del 2019. Disponible en:

- <http://bibliotecas.esPOCH.edu.ec/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=45052>.
9. Betancourt, A. (1987) *Silvicultura especial de árboles maderables tropicales*, Editorial Científico – Técnica, La Habana – Cuba, p. 435
  10. Martínez, V. (2019). Maceración de plantas. Recuperado el 02 de Mayo del 2019. Disponible en: <https://www.botanical-online.com/productos-naturales/preparaciones-maceraciones>.
  11. Buddenhagen, I. W., & Kelman, A. (1964). *Biological and Physiological Aspects of Bacterial Wilt Caused by Pseudomonas solanacearum*, *Annu.Rev. Phytopathol.* 2,203-230
  12. Cao, J. D. (1982). *Investigation of bacterial wilt in Eucalyptus saligna and E. grandis introduced from Brazil*. *Gruangxi Forestry Science Technology* 4:30-31. Recuperado el 05 de febrero del 2018, Disponible en: [https://www.fabinet.up.ac.za/publication/pdfs/1692011\\_zhou\\_et\\_al\\_austral\\_plant\\_pathol.pdf](https://www.fabinet.up.ac.za/publication/pdfs/1692011_zhou_et_al_austral_plant_pathol.pdf)
  13. Camacho, C., Pérez, Y., Valdivia, A., Ramírez, H., & Gómez, L. (2018). *Phytochemical and antibacterial properties of extracts of Tagetes erecta L. (Asteraceae)*. Centro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba. Recuperado el 09 de Julio del 2019. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ind/v31n1/2224-5421-ind-31-01-53.pdf>.
  14. Carrión, A., & García, C. (2010). *Preparacion de extractos vegetales: determinacion de eficiencia de metodica*. Universidad de Cuenca. Facultad de ciencias químicas. Escuela de bioquímica y farmacia. Cuenca – Ecuador. pp. 27 – 31.
  15. Carvalho, G., Carvalho, M., Ferreira, D., Faria, J., & Broz R. (2001) *Diterpenos, Triterpenos y Esteroides Das flores de Wedelia paludosa*. *Quim.* 24(1), 24.
  16. Codo del Pozuzo. (s.f.) *Proyector Forestales y Agro – Forestales Recurso Forestal: Reforestación y plantaciones forestales*. Recuperado el 09 de Julio del 2019. Disponible en: <http://www.cododelpozuzo.com/3.html>
  17. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (2009). *Catálogo taxonómico de especies de México*. In *Capital Nat. México. México: CONABIO*.
  18. Denny. (2000). *Gram Negative Bacteria. Ralstonia*, *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria* (3a. ed.). APS Press. St. Paul, MN, EE.UU. pp. 151-174.

19. Ducrot, P. H. (2005). *Organic chemistry's contribution to the understanding of biopesticida activity of natural products from higher plants*. pp. 47–58
20. Ecuadorforestal, (2012). *Ficha técnica número #10 Eucalipto (Eucalyptus urograndis). Características y propiedades*. Recuperado el 09 de Julio del 2019. Disponible en: <http://ecuadorforestal.org/fichas-tecnicas-de-especies-forestales/ficha-tecnica-no-10-eucalipto/>
21. EcuRed. (2019). *Vinagre y sus usos*. Recuperado el 06 de agosto del 2019. Disponible en: <https://www.ecured.cu/Vinagre>.
22. Fravel, D. R. (1989). *Rolo of antibiotics in the biocontrol of plant disease*. Annual Review of Phytopathology. 26,75- 91.
23. Genin, S., & Boucher, C. (2002). *Ralstonia solanacearum: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome*. *Molecular Plant Pathology*. 3:111- 118. Recuperado el 06 de agosto del 2019. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20569316>.
24. Grey, B. E., & Steck, T. R. (2001). *The viable but nonculturable state of Ralstonia solanacearum may be involved in long-term survival and plant infection*. *Applied Environmental Microbiology*. 67:3866-3872. Recuperado el 15 de enero del 2018, Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11525979>
25. Hartmann, H., Kester, D. (1974) *Propagación de plantas principios y prácticas Trad. A.Ambrosio*. San Juan Tlihuaca, MX. Continental. pp. 319-360.
26. Hayward, A. C. (1991) *Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by Pseudomonas solanacearum*. Annual Review Phytopathology 29:65-87. Recuperado el 18 de Junio del 2019, Disponible en: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.py.29.090191.000433>
27. Herrera, B., Vargas, Y., Marrero, R., Arévalo, M. C., & Jiménez. (2007). *Efecto del extracto crudo de hojas de Tagetes erecta L. en el control de cuatro hongos patógenos de hortalizas "in vitro"*. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Cuba.
28. Howard, T. (2015). *Descubren accidentalmente que el vinagre mata bacterias que causan tuberculosis y lepra. Estados Unidos y Fracia*. Recuperado el 30 de agosto del 2019. Disponible en: <http://latinamericanscience.org/spanish/2015/12/descubren-accidentalmente-que-el-vinagre-mata-a-las-bacterias-que-causan-tuberculosis-y-lepra/>

29. Liang, Z. C., Guo, Q., & Wu, Q. P. (1992). *Bacterial wilt of eucalyptus in South China*. *Bacterial Wilt Newsletter* 8:5. Recuperado el 06 de enero del 2019, Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-41582006000400005](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582006000400005)
30. López Rivera, C. (2015). *Evaluación in-vitro de la actividad antifúngica del extracto de Bocconia frutescens L. frente al hongo Trichophyton mentagrophytes*. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 1(27). Recuperado el 06 de enero del 2019. Disponible en: [:https://www.ojs.asociacioncolombianadecienciasbiologicas.org/index.php/accb/article/view/107](https://www.ojs.asociacioncolombianadecienciasbiologicas.org/index.php/accb/article/view/107)
31. Lopez, C. A., & Takatsu, A. (1997). *Controle da murcha bacteriana*. *Fitopatologia Brasileira*. 22:224-225. Recuperado el 10 de enero del 2018, Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-90162001000300010](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162001000300010)
32. Ministerio del Ambiente de Ecuador. (2013). *Estadísticas del patrimonio natural. Datos de bosques, ecosistemas, especies, carbón y deforestación del Ecuador continental*. Recuperado el 11 de marzo del 2019. Disponible en: <http://suia.ambiente.gob.ec/documents/10179/346525/ESTADISTICAS+DE+PATRIMONIO+FINAL.pdf/b36fa0a7-0a63-4484-ab3e-e5c3732c284b>
33. Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2009). *Biología de los Microorganismos*. New Jersey. Estados Unidos: Pearson Prentice Hall.
34. Mafia M. (2006). *Manejo integrado de doenças do eucalipto em viveiro*. In: *Tecnologías alternativas para o controle de pragas e doenças*. Viçosa UFV ; EPAMIG. pp. 81-101, 378. Recuperado el 03 de enero del 2018, Disponible en: <http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/1039/texto%20completo.pdf?sequence=1>
35. Mafia, R. G. (2004) *Rizobactérias como promotoras do enraizamento, crescimento e como agentes de biocontrole de doenças na propagação clonal do eucalipto*. *Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG. p105. Recuperado el 10 de enero del 2018, Disponible en: <http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/1039/texto%20completo.pdf?sequence=1>

36. Moreno, C., González E., & Beltrán, C. (2009). *Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios*. Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello, 69(2), 185-192. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-48162009000200014>
37. Muñoz, L. (2018). *Evaluación de la propagación de Eucalyptus urophylla X grandis (Eucalipto urograndis) por semillas y clones en el vivero forestal Los Ángeles, de la "Empresa Novopan del Ecuador S.A" ubicado en el sector Los Ángeles, parroquia Patricia Pilar, cantón Buena Fe, provincia de Los Ríos*. (Tesis de grado. Ingeniera Forestal). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba - Ecuador. Recuperado el 27 de enero del 2019. Disponible en: [http://bibliotecas.esPOCH.edu.ec/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=59479&query\\_desc=an%3A11328](http://bibliotecas.esPOCH.edu.ec/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=59479&query_desc=an%3A11328).
38. Naidoo, S. C., Külheim, L., Zwart, R., Mangwanda, C. N., Oates, E. A., Visser, F. E., Wilken, T. B., Mamni, A. A., & Myburg. (2014). Uncovering the defense responses of Eucalyptus to pests and pathogens in the genomics age. *Tree Physiology* 34(9):931-943. Recuperado el 06 de febrero del 2018, Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/10.1093/treephys/tpu075>
39. Nchemo Maile & Maarten Nieuwenhuis. (1996) Vegetative Propagation of *Eucalyptus nitens* Using Stem Cuttings, *South African Forestry Journal*, 175:1, 29-34.
40. Nyangeri, J. B., Gathuru, E. M., & Mukunya, D. M. (1984). Effect of latent infection on the spread of bacterial wilt of potatoes in Kenya. *Tropical Pest Management* 30, 163-165.
41. Ono, K., Hara, H., & Akazawa, J. (1984). Ecological studies on the bacterial wilt, caused by *Pseudomonas solanacearum*. In: The movement of the pathogen in tobacco plants. *Bulletin of the Okayama Tobacco Experiment Station* (43), 41-46.
42. Ormaechea, E. (2017). La tinción de Gram es una técnica muy sencilla que se basa en el uso de un colorante que permite observar las bacterias mejor que bajo el microscopio. España. Recuperado el 26 de noviembre de 2019. Disponible en: <https://www.salud.mapfre.es/pruebas-diagnosticas/otras-pruebas-diagnosticas/tincion-de-gram/>.
43. Palacios, M. (2008). Introducción a la farmacognosia. Recuperado el 22 de Mayo del 2019. Disponible en: <http://farmacognosia-farmaciauadech.blogspot.com/>.

44. P&CMaderas, (2013). Ficha técnica Eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*). Distribución y hábitat. Propiedades de la madera. Recuperado el: 06 de febrero del 2018. Disponible en: [file:///C:/Users/comer/Desktop/TODO%20TESIS/ARTÍCULOS%20Y%20DOCUM%20RS/IMPRESAS/EucaliptoUrograndis\(EucalyptusUrophyllaXEucaliptusGrandis\).pdf](file:///C:/Users/comer/Desktop/TODO%20TESIS/ARTÍCULOS%20Y%20DOCUM%20RS/IMPRESAS/EucaliptoUrograndis(EucalyptusUrophyllaXEucaliptusGrandis).pdf)
45. Pérez, M. P., Navas J. P., Cortés, M. J., Villalobos, P., & Castillo, P. (2003). *Nematicidal activity of essential oils and amendments from Asteraceae against root-knot nematodes*. *Plant Pathol.* 52: 395–401.
46. Pérez, A. M. J., Wingfield, B., Slippers, N. A., Altier, R. A., & Blanchette. (2010). *Endophytic and canker-associated Botryosphaeriaceae occurring on non-native Eucalyptus and native Myrtaceae trees in Uruguay*. *Fungal Diversity* 41 (1):53-69. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=1244927&pid=S0717-9200201600030000200028&lng=es](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=1244927&pid=S0717-9200201600030000200028&lng=es).
47. Remache F. (2018). *Evaluación del efecto de microorganismos antagonistas en el control de la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum* E. F. Smith), presente en plantaciones de eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*) en la hacienda Los Ángeles, Cantón Buena Fé, Provincia de los Ríos*. (Tesis de grado. Ingeniería Forestal.). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba – Ecuador. pp. 29-33.
48. Robbs, C. F., Cruz, A. P., & Neto, J. R. (1988). *Algumas estratégias de controle à murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) em eucaliptos*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA. Jaguariúna, SP. Comunicado Técnico. (3), 4.
49. Rzedowski, G., & Rzedowski, J. (2001). *Flora fanerogámica del Valle de México*. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
50. Salvat, M. (1992). *Encyclopedia de la Cuenca*. Pamplona – España. p. 315, 316, 317.
51. Sequeira, L. (1994) *The Life and Times of Pseudomonas solanacearum*, *Plant Pathogenic Bacteria* no. 66, INRA Editions, París. pp. 37-44.
52. Serrato, C. (2003). *Aspectos del cultivo de dos especies de Tagetes productoras de aceites esenciales*. *Rev. Naturaleza y Desarrollo* 1(1), 15–22.

53. Sierra, R., Campos, F., & Chamberlin, J. (1999). *Áreas prioritarias para la conservación de la biodiversidad en el Ecuador continental*. Un estudio basado en la diversidad de ecosistemas y su ornitofauna. Pichincha-Ecuador. Ministerio de Medio Ambiente, Proyecto INEFAN/GEF-BIRF.
54. Smith, E. F. (1986). *A bacterial disease of tomato, eggplant and Irish potato (Bacillus solanacearum sp.* US Dep. Agric. Div. Veg. Physiol. Path. Bull. 12,1–28.
55. Sudo, S., Oliveira, N., & Pereira, A. (1983). *Eucalipto (Eucalyptus sp.) e bracatinga (Mimosa scabrella Penth), novos hospedeiros de Pseudomonas solanacearum E.F. Smith. Fitopatologia Brasileira* 8,631.
56. Supriadi, Karden, M., & Sitepu, D. (2001) *Bacterial wilt disease of woody trees caused by Pseudomonas solanacearum*. Jurnal Litbang Pertanian. 20(3), 106-112. Recuperado el 18 de junio del 2019. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/262762990\\_Characterization\\_of\\_isolates\\_of\\_Ralstonia\\_solanacearum\\_biovar\\_2\\_pathogenic\\_to\\_Eucalyptus\\_urograndis\\_hybrids](https://www.researchgate.net/publication/262762990_Characterization_of_isolates_of_Ralstonia_solanacearum_biovar_2_pathogenic_to_Eucalyptus_urograndis_hybrids)
57. Vargas, G. (1982). *Estudio sobre el enraizamiento de Eucalyptus deglupta Blumes. Tesis posgrado. Turrialba, Costa Rica*. Universidad de Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales. p. 60.
58. Vasse, J., Frey, P., & Trigalet, A. (1995). *Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by Pseudomonas solanacearum*. Molecular Plant-Microbe Interaction. 8,241-251. Recuperado el 10 de Junio del 2019, Disponible en: <https://www.apsnet.org/publications/mpmi/BackIssues/Documents/1995Articles/Microbe08-241.pdf>
59. Villarreal, J. A. (2003). *Compositae. Tribu Tageteae*. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
60. Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., & Nishiuchi, Y. (1995). *Transfer of two Burkholderia and an Alcaligenes species to Ralstonia gen. nov.: proposal of Ralstonia pickettii (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., Ralstonia solanacearum (Smith 1896) comb. nov. & Ralstonia eutropha* Microbiology and

Immunology 39:897-904. Recuperado el 10 de junio del 2019, Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8657018>.

### XIII. ANEXOS

**Anexo 1.** Recolección de la muestra de eucalipto tropical contaminada con *Ralstonia solanacearum*.



**Anexo 2.** Reconocimiento de la planta *Tagetes erecta* l. en el



herbario

**Anexo 3. Limpieza del laboratorio**



**Anexo 4.** Aislamiento y réplica de la bacteria *Ralstonia solanacearum*.



**Anexo 5.** Elaboración de los extractos





**Anexo 6.** Instalación del ensayo



**Anexo 7.** Evaluación del crecimiento de la bacteria y el porcentaje de inhibición de la misma en los diferentes extractos:

### 1. DECOCCIÓN

<b>Fecha de evaluación: 09/05/2019</b>			
<b>Concentraciones</b>	<b>Repetición</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
C1 - 100%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C2 - 50%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0

	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C3 – 25%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
<b>Fecha de evaluación: 10/05/2019</b>			
<b>Concentraciones</b>	<b>Repetición</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
C1 - 100%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C2 – 50%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C3 – 25%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
<b>Fecha de evaluación: 13/05/2019</b>			
<b>Concentraciones</b>	<b>Repetición</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
C1 - 100%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0

	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C2 – 50%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C3 – 25%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
<b>Fecha de evaluación: 14/05/2019</b>			
<b>Concentraciones</b>	<b>Repetición</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
C1 - 100%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C2 – 50%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C3 – 25%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
<b>Fecha de evaluación: 15/05/2019</b>			
<b>Concentraciones</b>	<b>Repetición</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje</b>

			<b>de inhibición</b>
C1 - 100%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C2 – 50%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C3 – 25%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0

## 2. INFUSIÓN

<b>Fecha de evaluación: 09/05/2019</b>			
<b>Concentraciones</b>	<b>Repetición</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
C1 - 100%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C2 – 50%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C3 – 25%	1	Abundante	0

	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
<b>Fecha de evaluación: 10/05/2019</b>			
<b>Concentraciones</b>	<b>Repetición</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
C1 - 100%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C2 – 50%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C3 – 25%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
<b>Fecha de evaluación: 13/05/2019</b>			
<b>Concentraciones</b>	<b>Repetición</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
C1 - 100%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C2 – 50%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0

	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
<b>C3 – 25%</b>	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
<b>Fecha de evaluación: 14/05/2019</b>			
<b>Concentraciones</b>	<b>Repetición</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
C1 - 100%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C2 – 50%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C3 – 25%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
<b>Fecha de evaluación: 15/05/2019</b>			
<b>Concentraciones</b>	<b>Repetición</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
C1 - 100%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0

	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C2 – 50%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C3 – 25%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0

### 3. MACERADO EN AGUA

<b>Fecha de evaluación: 09/05/2019</b>			
<b>Concentraciones</b>	<b>Repetición</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
C1 - 100%	1	Mínimo	80
	2	Mínimo	80
	3	Mínimo	80
	4	Mínimo	80
	5	Mínimo	60
C2 – 50%	1	Mínimo	60
	2	Mínimo	50
	3	Mínimo	50
	4	Mínimo	60
	5	Mínimo	60
C3 – 25%	1	Mínimo	60
	2	Mínimo	60
	3	Mínimo	60
	4	Mínimo	60
	5	Mínimo	60

<b>Fecha de evaluación: 10/05/2019</b>			
<b>Concentraciones</b>	<b>Repetición</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
C1 - 100%	1	Nulo crecimiento de bacteria Presencia de hongos	100
	2	Nulo crecimiento de bacteria Presencia de hongos	100
	3	Nulo crecimiento de bacteria Presencia de hongos	100
	4	Nulo crecimiento de bacteria	100
	5	Nulo crecimiento de bacteria	100
C2 – 50%	1	Nulo crecimiento de bacteria Presencia de hongos	100
	2	Nulo crecimiento de bacteria Presencia de hongos	100
	3	Nulo crecimiento de bacteria Presencia de hongos	100
	4	Nulo crecimiento de bacteria Presencia de hongos	100
	5	Nulo crecimiento de bacteria Presencia de hongos	100
C3 – 25%	1	Nulo crecimiento de bacteria Presencia de hongos	100
	2	Nulo crecimiento de bacteria Presencia de hongos	100
	3	Nulo crecimiento de bacteria Presencia de hongos	100
	4	Nulo crecimiento de bacteria Presencia de hongos	100
	5	Nulo crecimiento de bacteria Presencia de hongos	100

**Repetición del ensayo**

<b>Fecha de evaluación: 15/05/2019</b>			
<b>Concentraciones</b>	<b>Repetición</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
C1 - 100%	1	Mínimo	80
	2	Mínimo	80
	3	Mínimo	80
	4	Mínimo	80
	5	Mínimo	80
C2 – 50%	1	Mínimo	60
	2	Mínimo	60
	3	Mínimo	60
	4	Mínimo	60
	5	Mínimo	60
C3 – 25%	1	Mínimo	60
	2	Mínimo	60
	3	Mínimo	60
	4	Mínimo	60
	5	Mínimo	60
<b>Fecha de evaluación: 16/05/2019</b>			
<b>Concentraciones</b>	<b>Repetición</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
C1 - 100%	1	Mínimo	60
	2	Mínimo	60
	3	Mínimo	60
	4	Mínimo	60
	5	Mínimo	60
C2 – 50%	1	Abundante	20
	2	Abundante	20
	3	Abundante	20
	4	Abundante	20
	5	Abundante	20
C3 – 25%	1	Abundante	20

	2	Abundante	20
	3	Abundante	20
	4	Abundante	20
	5	Abundante	20
<b>Fecha de evaluación: 17/05/2019</b>			
<b>Concentraciones</b>	<b>Repetición</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
C1 - 100%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C2 – 50%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C3 – 25%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
<b>Fecha de evaluación: 20/05/2019</b>			
<b>Concentraciones</b>	<b>Repetición</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
C1 - 100%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C2 – 50%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0

	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C3 – 25%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
<b>Fecha de evaluación: 21/05/2019</b>			
<b>Concentraciones</b>	<b>Repetición</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
C1 - 100%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C2 – 50%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0
C3 – 25%	1	Abundante	0
	2	Abundante	0
	3	Abundante	0
	4	Abundante	0
	5	Abundante	0

**TESTIGO POSITIVO**

<b>Fecha de evaluación: 09/05/2019</b>		
<b>Repeticiones</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
1	Mínimo	80

2	Mínimo	80
3	Mínimo	80
4	Mínimo	80
5	Mínimo	80
<b>Fecha de evaluación: 10/05/2019</b>		
<b>Repeticiones</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
1	Mínimo	70
2	Mínimo	70
3	Mínimo	70
4	Mínimo	70
5	Mínimo	70
<b>Fecha de evaluación: 13/05/2019</b>		
<b>Repeticiones</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
1	Mínimo	75
2	Mínimo	75
3	Mínimo	75
4	Mínimo	75
5	Mínimo	75
<b>Fecha de evaluación: 14/05/2019</b>		
<b>Repeticiones</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
1	Mínimo	75
2	Mínimo	75
3	Mínimo	75
4	Mínimo	75
5	Mínimo	75
<b>Fecha de evaluación: 15/05/2019</b>		
<b>Repeticiones</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
1	Mínimo	65

2	Mínimo	65
3	Mínimo	65
4	Mínimo	65
5	Mínimo	65

#### 4. TESTIGO NEGATIVO

<b>Fecha de evaluación: 09/05/2019</b>		
<b>Repeticiones</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
1	Abundante	0
2	Abundante	0
3	Abundante	0
4	Abundante	0
5	Abundante	0
<b>Fecha de evaluación: 10/05/2019</b>		
<b>Repeticiones</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
1	Abundante	0
2	Abundante	0
3	Abundante	0
4	Abundante	0
5	Abundante	0
<b>Fecha de evaluación: 13/05/2019</b>		
<b>Repeticiones</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
1	Abundante	0
2	Abundante	0
3	Abundante	0
4	Abundante	0
5	Abundante	0
<b>Fecha de evaluación: 14/05/2019</b>		
<b>Repeticiones</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>

	<b>bacteria</b>	<b>inhibición</b>
1	Abundante	0
2	Abundante	0
3	Abundante	0
4	Abundante	0
5	Abundante	0
<b>Fecha de evaluación: 15/05/2019</b>		
<b>Repeticiones</b>	<b>Crecimiento de la bacteria</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
<b>1</b>	<b>Abundante</b>	<b>0</b>
<b>2</b>	<b>Abundante</b>	<b>0</b>
<b>3</b>	<b>Abundante</b>	<b>0</b>
<b>4</b>	<b>Abundante</b>	<b>0</b>
<b>5</b>	<b>Abundante</b>	<b>0</b>

**Anexo 8.** Resultado de la evaluación diaria del porcentaje de inhibición de los tratamientos propuestos para control de *Ralstonia solanacearum*.

<b>Variable</b>	<b>TRATAMIENTO</b>	<b>N</b>	<b>Medias</b>	<b>D.E.</b>	<b>Medianas</b>	<b>H</b>	<b>p</b>
RESULTADO 1ER DIA	DECOCCION 100%	5	0.00	0.00	0.00	39.16	<0.0001
RESULTADO 1ER DIA	DECOCCION 25%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 1ER DIA	DECOCCION 50%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 1ER DIA	INFUSION 100%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 1ER DIA	INFUSION 25%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 1ER DIA	INFUSION 50%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 1ER DIA	MACERADO FRIO 100%	5	76.00	8.94	80.00		
RESULTADO 1ER DIA	MACERADO FRIO 25%	5	60.00	0.00	60.00		
RESULTADO 1ER DIA	MACERADO FRIO 50%	5	58.00	4.47	60.00		
RESULTADO 1ER DIA	TESTIGO NEGATIVO	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 1ER DIA	TESTIGO POSITIVO	5	80.00	0.00	80.00		

**Tratamientos**

**Medianas**

INFUSION 25%	0.00	A
INFUSION 50%	0.00	A
TESTIGO NEGATIVO	0.00	A
INFUSION 100%	0.00	A
DECOCCION 100%	0.00	A
DECOCCION 25%	0.00	A
DECOCCION 50%	0.00	A
MACERADO FRIO 50%	60.00	B
MACERADO FRIO 25%	60.00	B
MACERADO FRIO 100%	80.00	B
<u>TESTIGO POSITIVO</u>	<u>80.00</u>	<u>B</u>

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

<u>Variable</u>	<u>TRATAMIENTO</u>	<u>N</u>	<u>Medias</u>	<u>D.E.</u>	<u>Medianas</u>	<u>H</u>	<u>p</u>
RESULTADO 2DO DIA	DECOCCION 100%	5	0.00	0.00	0.00	39.69	<0.0001
RESULTADO 2DO DIA	DECOCCION 25%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 2DO DIA	DECOCCION 50%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 2DO DIA	INFUSION 100%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 2DO DIA	INFUSION 25%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 2DO DIA	INFUSION 50%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 2DO DIA	MACERADO FRIO 100%	5	60.00	0.00	60.00		
RESULTADO 2DO DIA	MACERADO FRIO 25%	5	20.00	0.00	20.00		
RESULTADO 2DO DIA	MACERADO FRIO 50%	5	20.00	0.00	20.00		
RESULTADO 2DO DIA	TESTIGO NEGATIVO	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 2DO DIA	TESTIGO POSITIVO	5	70.00	0.00	70.00		

Tratamientos      Medianas

INFUSION 25%	0.00	A
INFUSION 50%	0.00	A
TESTIGO NEGATIVO	0.00	A
INFUSION 100%	0.00	A
DECOCCION 100%	0.00	A
DECOCCION 25%	0.00	A
DECOCCION 50%	0.00	A
MACERADO FRIO 50%	20.00	B
MACERADO FRIO 25%	20.00	B
MACERADO FRIO 100%	0.00	B
<u>TESTIGO POSITIVO</u>	<u>70.00</u>	<u>B</u>

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
RESULTADO 3ER DIA	DECOCCION 100%	5	0.00	0.00	0.00	13.39	<0.0001
RESULTADO 3ER DIA	DECOCCION 25%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 3ER DIA	DECOCCION 50%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 3ER DIA	INFUSION 100%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 3ER DIA	INFUSION 25%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 3ER DIA	INFUSION 50%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 3ER DIA	MACERADO FRIO 100%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 3ER DIA	MACERADO FRIO 25%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 3ER DIA	MACERADO FRIO 50%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 3ER DIA	TESTIGO NEGATIVO	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 3ER DIA	TESTIGO POSITIVO	5	75.00	0.00	75.00		

**Tratamientos**

**Medianas**

INFUSION 50%	0.00	A
MACERADO FRIO 100%	0.00	A
MACERADO FRIO 25%	0.00	A
MACERADO FRIO 50%	0.00	A
TESTIGO NEGATIVO	0.00	A
DECOCCION 100%	0.00	A
DECOCCION 25%	0.00	A
DECOCCION 50%	0.00	A
INFUSION 25%	0.00	A
INFUSION 100%	0.00	A
<u>TESTIGO POSITIVO</u>	<u>75.00</u>	<u>B</u>

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
RESULTADO 4TO DIA	DECOCCION 100%	5	0.00	0.00	0.00	13.39	<0.0001
RESULTADO 4TO DIA	DECOCCION 25%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 4TO DIA	DECOCCION 50%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 4TO DIA	INFUSION 100%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 4TO DIA	INFUSION 25%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 4TO DIA	INFUSION 50%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 4TO DIA	MACERADO FRIO 100%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 4TO DIA	MACERADO FRIO 25%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 4TO DIA	MACERADO FRIO 50%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 4TO DIA	TESTIGO NEGATIVO	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 4TO DIA	TESTIGO POSITIVO	5	75.00	0.00	75.00		

**Tratamiento**

**Medianas**

INFUSIÓN 50%	0.00	A
MACERADO FRIO 100%	0.00	A
MACERADO FRIO 25%	0.00	A
MACERADO FRIO 50%	0.00	A
TESTIGO NEGATIVO	0.00	A
DECOCCIÓN 100%	0.00	A
DECOCCIÓN 25%	0.00	A
DECOCCIÓN 50%	0.00	A
INFUSIÓN 25%	0.00	A
INFUSIÓN 100%	0.00	A
<u>TESTIGO POSITIVO</u>	<u>75.00</u>	<u>B</u>

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

<u>Variable</u>	<u>TRATAMIENTO</u>	<u>N</u>	<u>Medias</u>	<u>D.E.</u>	<u>Medianas</u>	<u>H</u>	<u>p</u>
RESULTADO 5TO DIA	DECOCCION 100%	5	0.00	0.00	0.00	13.39	<0.0001
RESULTADO 5TO DIA	DECOCCION 25%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 5TO DIA	DECOCCION 50%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 5TO DIA	INFUSION 100%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 5TO DIA	INFUSION 25%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 5TO DIA	INFUSION 50%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 5TO DIA	MACERADO FRIO 100%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 5TO DIA	MACERADO FRIO 25%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 5TO DIA	MACERADO FRIO 50%	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 5TO DIA	TESTIGO NEGATIVO	5	0.00	0.00	0.00		
RESULTADO 5TO DIA	TESTIGO POSITIVO	5	65.00	0.00	65.00		

Tratamientos

Medianas

INFUSION 50%	0.00	A
MACERADO FRIO 100%	0.00	A
MACERADO FRIO 25%	0.00	A
MACERADO FRIO 50%	0.00	A
TESTIGO NEGATIVO	0.00	A
DECOCCION 100%	0.00	A
DECOCCION 25%	0.00	A
DECOCCION 50%	0.00	A
INFUSION 25%	0.00	A
INFUSION 100%	0.00	A
<u>TESTIGO POSITIVO</u>	<u>65.00</u>	<u>B</u>

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

### Anexo 9. Elaboración de antibiograma



### ENSAYO 2.



9	0.00	0.00	0.00	7.40	3.20	5.20	6.40	0.00	5.0E-03	0.01	1.5E-	
04	0.01	1.3E-03	3.1E-04									
10	-10.20	-10.20	-10.20	-2.80	-7.00	-5.00	-3.80	-10.20	-10.20	0.88	0.33	
	0.95	0.68	0.42									
11	-10.80	-10.80	-10.80	-3.40	-7.60	-5.60	-4.40	-10.80	-10.80	-0.60	0.26	
	0.94	0.58	0.35									
12	-14.80	-14.80	-14.80	-7.40	-11.60	-9.60	-8.40	-14.80	-14.80	-4.60	-4.00	
	0.30	0.57	0.86									
13	-11.20	-11.20	-11.20	-3.80	-8.00	-6.00	-4.80	-11.20	-11.20	-1.00	-0.40	3.60
		0.64	0.39									
14	-12.00	-12.00	-12.00	-4.60	-8.80	-6.80	-5.60	-12.00	-12.00	-1.80	-1.20	2.80
	-0.80		0.70									
15	-17.60	-17.60	-17.60	-10.20	-14.40	-12.40	-11.20	-17.60	-17.60	-7.40	-6.80	-2.80
	-6.40	-5.60										

## ENSAYO 2.

### ANALISIS DE VARIANZA NO PARAMETRICO KRUSKALWALIS

Variable	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Resultados	Estreptomycin	5	28.80	1.30	29.00	28.32	0.0001
Resultados	Phyton	5	20.80	1.92	21.00		
Resultados	Vinagre 10	5	6.40	3.65	8.00		
Resultados	Vinagre 15	5	6.40	5.94	9.00		
Resultados	Vinagre 20	5	8.20	4.82	10.00		
Resultados	Vinagre 30	5	13.00	2.74	13.00		
Resultados	Vinagre 5	5	0.00	0.00	0.00		

### Matriz de Diferencia de medianas y valores de p (diagonal superior) entre tratamientos

	1	2	3	4	5	6	7
1	0.44	5.8E-04	2.0E-03	5.0E-03	0.08	1.6E-05	
2	8.00	0.01	0.02	0.04	0.32	3.9E-04	
3	22.40	14.40	0.72	0.53	0.10	0.38	
4	22.40	14.40	0.00	0.78	0.19	0.22	
5	20.60	12.60	-1.80	-1.80	0.30	0.13	
6	15.80	7.80	-6.60	-6.60	-4.80	0.01	
7	28.80	20.80	6.40	6.40	8.20	13.00	

### Anexo 11. Elaboración del tamizaje



### Anexo 12. Evaluación del tamizaje fitoquímico extracto por maceración en agua fría

<b>Ensayos</b>	<b>Resultado</b>
Ensayo de Dragendorff	<b>Positivo +++</b>
Ensayo de Mayer	<b>Positivo</b>
Ensayo de Wagner	<b>Positivo +</b>
Ensayo de Borntrager	<b>Positivo +</b>
Ensayo de Liebermann-Bouchard	<b>Negativo</b>
Ensayo de Catequinas	<b>Positivo</b>
Ensayo de Fehling	<b>Positivo</b>
Ensayo del cloruro férrico	<b>Positivo</b>
Ensayo de Shinoda	<b>Negativo</b>
Ensayo de Baljet	<b>Positivo ++</b>

**Anexo 13.** Evaluación del tamizaje fitoquímico extracto por decocción

<b>Ensayos</b>	<b>Resultado</b>
Ensayo de Dragendorff	<b>Positivo +++</b>
Ensayo de Mayer	<b>Positivo</b>
Ensayo de Wagner	<b>Positivo +</b>
Ensayo de Borntrager	<b>Positivo</b>
Ensayo de Liebermann-Bouchard	<b>Positivo</b>
Ensayo de Catequinas	<b>Positivo +</b>
Ensayo de Fehling	<b>Positivo</b>
Ensayo del cloruro férrico	<b>Positivo</b>
Ensayo de Shinoda	<b>Negativo</b>
Ensayo de Baljet	<b>Positivo ++</b>

**Anexo 14.** Evaluación del tamizaje fitoquímico extracto por infusión

<b>Ensayos</b>	<b>Resultado</b>
Ensayo de Dragendorff	<b>Positivo +++</b>
Ensayo de Mayer	<b>Positivo</b>
Ensayo de Wagner	<b>Positivo +</b>
Ensayo de Borntrager	<b>Positivo</b>
Ensayo de Liebermann-Bouchard	<b>Positivo</b>
Ensayo de Catequinas	<b>Positivo +</b>
Ensayo de Fehling	<b>Positivo</b>
Ensayo del cloruro férrico	<b>Positivo</b>
Ensayo de Shinoda	<b>Negativo</b>
Ensayo de Baljet	<b>Positivo ++</b>

## Anexo 15. Presencia de compuestos

Reacción	Reactivo	Color/ Precipitado	Presencia de:
<b>Benedict</b>	$FeCl_3$	Rojo, Vino Azul, Verde	Compuestos fenólicos Taninos pirocatequicos Taninos pirogalicos
<b>Taninos</b>	$H_2O$	Espuma	Saponinas
<b>Alcaloides</b>	<i>Dragendorff, Wagner y Mayer</i>	Opalescencia, turbidez definida, precipitado	Alcaloides
<b>Baljet</b>	1g ácido $\frac{Pícrico}{EIOH + Na OH 10\% \text{ ácido}}$	Rojo claro a oscuro	<i>Lactonas – <math>\alpha\beta</math></i> Insaturados (Cumarinas)
<b>Borntrager</b>	$NaOH 5\% \text{ ácido}$	Rosado, Rojo	Quinonas
<b>Liebermann - Bouchard</b>	$H_2SO_4$ $CH_3 - \text{anhidroacetico}$	Verde, Azul, Verdoso	Esteroides
<b>Shinoda</b>	<i>Limaduras de Mg + HCL –</i>	Amarillo, rojo, azul, violeta, sin color	Flavonoides o soflavonas Suronas

Fuente: Técnicas de Análisis de (Olga Lock, 1998).