



**UNIVERSIDAD NACIONAL
“PEDRO RUIZ GALLO”**



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA**

**TOXICIDAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PLANTAS DE
CAMPO Y CALLOS *IN VITRO* DE *Tagetes minuta* Y *Tagetes erecta*
SOBRE *Meloidogyne* spp. EN *Solanum lycopersicum* L.,
LAMBAYEQUE 2019**

**TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

BR. HERRERA MONCADA WENDY LISSET
BR. SANDOVAL FUENTES MILAGRITOS GIANELLA

ASESORA:

MSC. ROJAS IDROGO CONSUELO

LAMBAYEQUE – PERÚ

2019

Toxicidad del extracto etanólico de plantas de campo y callos *in vitro* de *Tagetes minuta* y *Tagetes erecta* sobre *Meloidogyne* spp. en *Solanum lycopersicum* L., Lambayeque 2019

TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

APROBADO POR:

DR. GUILLERMO EDUARDO DELGADO PAREDES

PRESIDENTE

DR. CÉSAR ALFREDO VARGAS ROSADO

SECRETARIO

LIC. ROSA VICTORIA AMAYA ARRUNÁTEGUI

VOCAL

MSC. CONSUELO ROJAS IDROGO

ASESORA

LAMBAYEQUE – PERÚ

2019

ÍNDICE

I. INTRODUCCION.....	9
II. MARCO TEÓRICO.....	12
2.1. Antecedentes	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Materiales.....	17
3.1.1. Material Biológico.....	17
3.1.1.1. Obtención del material vegetal	17
3.1.2. Obtención de nemátodos.....	17
3.1.3. Medios de cultivo para los tratamientos <i>in vitro</i>	18
3.2. Metodología	20
3.2.1. Germinación de semillas <i>in vitro</i>	20
3.2.2. Inducción de callos	20
3.2.3. Cultivo de Ápices <i>in vitro</i>	21
3.2.4. Obtención de los extractos	21
3.2.5. Pruebas de toxicidad	21
3.2.6. Aplicación de los extractos etanólicos en plantas de <i>S. lycopersicum</i>	24
3.2.7. Evaluación del efecto de los extractos	24
3.2.8. Análisis estadísticos de datos.....	25
IV. RESULTADOS.....	26
4.1. Características de las especies vegetales en estudio.....	26
a. <i>Tagetes minuta</i>	26
b. <i>Tagetes erecta</i>	26
c. <i>Meloidogyne</i> spp.....	26
4.2. Germinación de semillas <i>in vitro</i>	27
4.3. Inducción de callos	33
4.4. Extractos etanólicos.....	37
4.5. Toxicidad de los extractos etanólicos sobre nemátodos.....	38
4.6. Efecto de los extractos etanólicos en plantas cultivadas en condiciones de invernadero .45	
4.6.1. Desarrollo de las plantas	45
V. DISCUSIÓN.....	51
VI. CONCLUSIONES	55
VII. RECOMENDACIONES	56
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
IX. ANEXOS	64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog) utilizado en el cultivo in vitro de <i>T. minuta</i> y <i>T. erecta</i> .	19
Cuadro 2 . Formulación de medios de cultivo para germinación de semillas, inducción de callos y propagación de ápices in vitro de <i>Tagetes minuta</i> y <i>T. erecta</i> .	19
Cuadro 3: Tratamientos utilizados para determinar la DL_{50} de los extractos provenientes de hojas de <i>T. minuta</i> y <i>T. erecta</i> de campo sobre <i>Meloidogyne spp.</i> en <i>Solanum lycopersicum</i> .	22
Cuadro 4: Porcentaje de germinación de semillas in vitro de <i>T. minuta</i> y <i>T. erecta</i> .	28
Cuadro 5: Porcentaje (%) de la formación de callos en segmentos de entrenudos y hojas de <i>Tagetes minuta</i> .	36
Cuadro 6: Promedios de diámetro y altura de los callos provenientes de hojas de <i>Tagetes minuta</i> de acuerdo a cada tratamiento.	37
Cuadro 7: Promedios de diámetro y altura de los callos provenientes de entrenudos de <i>Tagetes minuta</i> de acuerdo a cada tratamiento.	37
Cuadro 8: Extractos etanólicos y rendimiento obtenidos de plantas completas de <i>T. minuta</i> .	38
Cuadro 9 : Extractos etanólicos y rendimiento obtenidos de plantas completas de <i>T. erecta</i> .	38
Cuadro 10 : Extractos y rendimiento obtenidos de callos in vitro provenientes de <i>T. minuta</i> .	38
Cuadro 11 : Toxicidad de las cuatro concentraciones del extracto etanólico de hojas de plantas de campo de <i>T. minuta</i> aplicadas a <i>Meloidogyne spp.</i>	39
Cuadro 12: Toxicidad al extracto etanólico proveniente de la raíz de plantas de campo de <i>T. minuta</i> .	39
Cuadro 13: Toxicidad al extracto etanólico proveniente de inflorescencias de plantas de campo de <i>T. minuta</i> .	39
Cuadro 14: Toxicidad de las cuatro concentraciones del extracto etanólico de hojas de plantas de campo de <i>T. erecta</i> aplicadas a <i>Meloidogyne spp.</i>	40
Cuadro 15: Toxicidad de los once tratamientos del extracto etanólico proveniente de hojas de plantas de campo de <i>Tagetes minuta</i> aplicadas a <i>Meloidogyne spp.</i>	41
Cuadro 16: Toxicidad de los once tratamientos del extracto etanólico de las hojas de plantas de campo de <i>Tagetes erecta</i> aplicadas a <i>Meloidogyne spp.</i>	42
Cuadro 17: Dosis letales 50 (DL_{50}) con sus respectivos límites fiduciales con el 95% de confianza del extracto etanólico de hojas de <i>T. minuta</i> y <i>T. erecta</i> sobre <i>Meloidogyne spp.</i>	43
Cuadro 18: Tiempo de exposición del nemátodo <i>Meloidogyne spp.</i> al extracto etanólico de callos provenientes de fragmentos de hojas in vitro de <i>Tagetes minuta</i> .	45
Cuadro 19: Tiempo de exposición del nemátodo al extracto etanólico de callos provenientes de entrenudos in vitro de <i>Tagetes minuta</i> .	45
Cuadro 20: Promedios de Longitud total de las plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> expuestas a los extractos de <i>Tagetes</i> .	46

Cuadro 21: Promedios de longitud de los tallos de las plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> expuestas a los extractos de <i>Tagetes</i>	47
Cuadro 22: Promedios de longitud de las raíces de las plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> expuestas a los extractos de <i>Tagetes</i>	47
Cuadro 23: Promedios del número de hojas de <i>Solanum lycopersicum</i> según el extracto y tratamiento utilizado	47
Cuadro 24: Promedios del efecto tóxico de los extractos de <i>Tagetes minuta</i> de plantas de campo y callos <i>in vitro</i> , y de plantas de campo de <i>T. erecta</i>	48
Cuadro 25: Promedio del número de agallas por raíz secundaria de <i>Solanum lycopersicum</i> expuestas a los extractos etanólicos de <i>Tagetes</i>	49
Cuadro 26: Análisis de varianza (ANOVA) de los cuatro grupos en estudio.	49
Cuadro 27: Análisis de varianza (ANOVA) entre los extractos de <i>Tagetes minuta</i> y <i>T. erecta</i> de campo.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Procedimiento seguido en la obtención de extractos a partir de plantas de campo e <i>in vitro</i> de <i>Tagetes minuta</i> y de plantas de campo de <i>T. erecta</i> . _____	23
Figura 2. <i>Tagetes minuta</i> : a. Planta madura en campo, utilizada para obtención de extractos etanólicos y b. Semillas para la germinación, propagación de ápices e inducción de callos <i>in vitro</i> . _____	29
Figura 3. <i>Tagetes erecta</i> : a. Planta madura en campo, utilizada para obtención de extractos etanólicos y b. Semillas para la germinación, propagación de ápices e inducción de callos <i>in vitro</i> . _____	30
Figura 4: <i>Meloidogyne spp.</i> ; a. Agallas en raíz de <i>Solanum lycopersicum</i> , b. Hembra en estadio piriforme, c. Huevos, d. Estadio juvenil II. _____	31
Figura 5: Contaminación de semillas de <i>Tagetes erecta in vitro</i> : a. Semilla en proceso de germinación, b y c. Contaminación fúngica de las plántulas y d. Contaminación por <i>Fusarium sp.</i> , estadio maduro con presencia de clamidosporas. _____	32
Figura 6: Inducción de callos <i>in vitro</i> en <i>Tagetes minuta</i> a partir de segmentos de entrenudos: a. Segmentos de entrenudos, b. Crecimiento a los 30 días, c. Formación a los 45 días. _____	34
Figura 7: Inducción de callos <i>in vitro</i> en <i>Tagetes erecta</i> a partir de segmentos de hojas: a. Segmentos de hojas, b. Crecimiento a los 30 días, c. Formación a los 45 días. _____	35
Figura 8: Curva de crecimiento de la toxicidad del extracto etanólico de hojas de <i>Tagetes minuta</i> sobre <i>Meloidogyne spp.</i>	44
Figura 9: Curva de crecimiento de la toxicidad del extracto etanólico de hojas de <i>Tagetes erecta</i> sobre <i>Meloidogyne spp.</i>	44

ABREVIATURAS

2,4-D: Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético

AIA: Ácido indol-3-acético

AG₃: Ácido giberélico

NH₄NO₃: Nitrato de amonio

CaCl₂.2H₂O: Cloruro de calcio

MgSO₄.7H₂O: Sulfato de magnesio

KH₂PO₄: Fosfato de potasio

KNO₃: Nitrato de potasio

H₃BO₃: Ácido bórico

CoCl₂.6H₂O: Cloruro de cobalto

CuSO₄.5H₂O: Sulfato cúprico

FeSO₄.7H₂O: Sulfato ferroso

MnSO₄.H₂O: Sulfato de manganeso

KI: Yoduro de potasio

Na₂MoO₄.2H₂O: Molibdato de sodio

ZnSO₄.7H₂O: Sulfato de zinc

RESUMEN

Solanum lycopersicum L. es una hortaliza de gran importancia económica y nutricional, cuya producción se ve amenazada por una gran variedad de fitoparásitos; entre estos los nemátodos del género *Meloidogyne*, los cuales forman agallas en las raíces de la planta, causando alteraciones en el desarrollo y producción del tomate. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la toxicidad del extracto etanólico de plantas de campo y callos *in vitro* de *Tagetes minuta* y *Tagetes erecta* sobre *Meloidogyne* spp. en *S. lycopersicum* L. Se realizaron estudios previos de los extractos etanólicos de ambas especies a partir de las hojas; se probaron 11 concentraciones: 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,0; 1,1; 1,3; 1,5; 1,7; 1,9 y 2,0 mg/L., de las cuales se trabajaron las concentraciones 1,0; 1,5 y 2,0 mg/L en condiciones de invernadero, siendo aplicadas en plantas de *S. lycopersicum* L. El extracto etanólico de callos *in vitro* de *T. minuta* fue preparado a partir de callos cultivados en medio MS suplementado con 2,4-D utilizando únicamente la concentración 1,0 mg/L. Los extractos de *T. minuta* mostraron mayor toxicidad sobre *Meloidogyne* spp.; sin embargo, se observó menor cantidad de agallas, en raíces de plantas tratadas con el extracto de *T. erecta* a 2,0 mg/L.

Palabras clave: *Tagetes*, *Solanum lycopersicum* L., Extracto etanólico, Fitoparásitos.

ABSTRACT

Solanum lycopersicum L. is a vegetable of great economic and nutritional importance, whose production is threatened by a great variety of phytoparasites; among these the nematodes of the genus *Meloidogyne*, which form root-knot in the plant, causing alterations in the development and production of tomato. The aim of this study was to evaluate the toxicity of the ethanolic extract of field plants and *in vitro* callus of *Tagetes minuta* and *Tagetes erecta* on *Meloidogyne* spp. in *S. lycopersicum* L. Previous studies of the ethanolic extracts of both species were made from the leaves; 11 estimates were tested: 0.3; 0.5; 0.7; 0.9; 1.0; 1.1; 1.3; 1.5; 1.7; 1.9 and 2.0 mg/L., of which 1.0 particles were worked; 1.5 and 2.0 mg/L in greenhouse conditions, being applications in *S. lycopersicum* L. plants. The *in vitro* callus ethanolic extract from *T. minuta* leaves was prepared from callus grown in MS medium supplemented with 2,4-D using the concentration of 1.0 mg/L. Extracts of *T. minuta* with greater toxicity on *Meloidogyne* spp.; however, it was observed a smaller amounts of galling, in roots treated with the extract of *T. erecta* at 2.0 mg/L.

Keywords: *Tagetes*, *Solanum lycopersicum* L., Ethanolic extract, Phytoparasite

I. INTRODUCCION

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.), es una hortaliza de mucha importancia económica y nutricional, debido a su contenido de vitaminas y minerales, y costo accesible. Es consumido por una gran parte de la población, ya sea fresco o procesado.

En los últimos años la demanda de tomate ha crecido aceleradamente no solo en los países desarrollados sino también en los países emergentes y en vías de desarrollo con una producción mundial de 130 millones de toneladas anuales (Koichi, 2011). En el Perú, dentro del grupo de las hortalizas, el tomate se encuentra en el cuarto lugar en la Producción Agropecuaria con un registro de ingreso total de 50,6 millones de soles y una producción de 220618 toneladas en el año 2017; asimismo, se tiene que en el departamento de Lambayeque en ese mismo año, el productor recibió 842 soles por tonelada de tomate producido (Santa María, Sifuentes, Albújar, Cajas, & León, 2018) (FAO, 2019).

Por otro lado, la producción se ve afectada por fitoparásitos como el *Meloidogyne* spp., nemátodo considerado de importancia económica a nivel mundial por los daños que causan tales como, la reducción de la capacidad de absorción de agua y nutrientes disponibles del suelo, y formación de agallas radiculares. En consecuencia se generan pérdidas económicas, tanto por los daños ocasionados en la producción como los costos relativamente altos de su control cultural y químico (Araneda, 2008).

Es por ello que la mayoría de agricultores hacen uso excesivo de agroquímicos, los cuales relativamente disminuyen la población de *Meloidogyne* spp. y a la vez causan efectos negativos en el ecosistema y la población expuesta tanto directamente como por medio del consumo de tomate; teniéndose en cuenta que un fruto con residuos agroquímicos, incluso si se lava o hierve, las sustancias químicas permanecen y eventualmente causan daño por su acumulación en el organismo (Suárez, Palacio, & Del Puerto, 2014). Según las normativas

del manejo de cultivos emitidos por el SENASA, en los años 2012-2014, el tomate presenta una “no conformidad” de 74, 55 y 73% respectivamente (Delgado, Alvarez, & Yáñez, 2018).

Dentro de los plaguicidas usados por los agricultores figuran el Sincocin y Nemathor, principalmente para tratar los cultivos infestados con especies de nemátodos sin tomar en cuenta el daño que ocasionan, pues al no trabajar de acuerdo a las normas de bioseguridad, atentan contra su propia salud. Si bien la aplicación masiva de plaguicidas es parte integral de la agricultura moderna y de los programas de salud pública, su utilidad tiene efectos colaterales, tanto para el hombre y los animales, incrementan costos de producción y su persistencia en el suelo causa contaminación en las aguas del subsuelo. Por ello, las investigaciones están actualmente dirigidas a integrar agentes de control biológico en el manejo integrado de nemátodos.

Se considera una alternativa importante el uso de extractos vegetales, siendo la familia Asteraceae uno de los grupos recomendados, y dentro de esta el género *Tagetes*. Se considera que tendrían un efecto biocida sobre los nemátodos, teniendo como responsables a los metabolitos secundarios por detener el ciclo de vida de *Meloidogyne* spp.

Las especies de *Tagetes* constituyen un grupo de antagonistas potenciales, por poseer propiedades nematocidas, insecticidas, antivirales y fungicidas. Han mostrado eficacia en el control de fitonemátodos, especialmente contra *Pratylenchus* spp. y *Meloidogyne* spp. (Wang, Hooks, & Ploeg, 2007). *Tagetes minuta* y *Tagetes erecta*, popularmente conocidas como ‘huacatay’ y ‘flor de muerto’, respectivamente, son hierbas aromáticas anuales de la familia Asteraceae, de distribución cosmopolita y con una gran variedad de aplicaciones de gran importancia económica y ecológica.

En el caso de *T. minuta* al ser una planta rica en monoterpenos, sesquiterpenos, flavonoides, tiofenos y compuestos aromáticos acíclicos, monocíclicos y bicíclicos, es utilizado como

plaguicida (Liza, Bonzani, & Zygadlo, 2009); asimismo, en algunas comunidades de la serranía es utilizada como condimento en la preparación de platos a base de maíz y frejol. También es utilizado como antimicrobiano, antifúngico, antiviral, entre otras aplicaciones. En el caso de *T. erecta* L. es utilizado como fuente de aceites esenciales, condimento, colorante de alimentos, para controlar malezas, como insecticida, fungicida y como fuentes de pigmentos para ración de gallinas (Méndez, 2009).

En el presente trabajo de investigación se tuvo como objetivo evaluar la toxicidad del extracto etanólico de plantas de campo y callos *in vitro* de *T. minuta* y *T. erecta* sobre *Meloidogyne* spp. en *S. lycopersicum* L. en material procedente de los campos de cultivo del distrito de Reque, Lambayeque, Perú.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una hortaliza consumida a nivel mundial, en una gran variedad de menús accesibles en todas las clases sociales. Frente a esta demanda en el mundo se cultivan aproximadamente 4'848384 ha (FAO, 2019), de las cuales 139 786 ha son cultivadas en América del sur, teniendo a Brasil como el mayor productor. En el Perú se cultivaron unas 5618 ha en el 2018 y se proyecta sembrar unas 7030 ha en el 2019, de las cuales, 240 ha serán en Lambayeque (MINAGRI, 2018).

El cultivo de tomate es afectado por una gran cantidad de organismos que dañan a la planta tales como los áfidos, responsables del 70% de las virosis que esta planta puede presentar; debido a que produce un daño directo debilitando a la planta, al alimentarse de la savia que circula por el floema (Salas, Quiroz & Puelles, 2016); o por el nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.), principal causante de las agallas en las raíces, otros nematodos como *Nacobbus aberrans* también puede causar agallado en las raíces. Algunos nematodos, como *Xiphinema* spp., al alimentarse de las raíces pueden dar lugar a hinchamientos o agallas menos definidas que se localizan en las puntas de las raíces (Coyne, Nicol, & Claudius-Cole, 2009).

El nemátodo agallador de la raíz *Meloidogyne* spp. es una de las plagas que se ha extendido en la agricultura mundial. Aun cuando en promedio las pérdidas a nivel mundial causadas por *Meloidogyne* spp. y otros nemátodos se estima en 12,3%, en países en desarrollo las pérdidas pueden llegar a 14,6%. Sin embargo, algunos autores han estimado pérdidas de hasta 25% (Méndez, 2009). En Colombia, el lulo (*Solanum quitoense* Lam.) un frutal andino de gran importancia económica ha sufrido también una evidente reducción debido al ataque de patógenos como el nemátodo *Meloidogyne* spp., que ha ocasionado pérdidas de hasta

50% (Álvarez, Botina, Ortiz, & Botina, 2016). Las especies infestadas por *M. incognita*, la hiperplasia celular y la hipertrofia fueron evidentes en las agallas. La hiperplasia afectó el cilindro central y la hipertrofia generó células gigantes. Estos procesos redujeron y desorganizaron los tejidos vasculares, alterando la posición de las células del xilema (Suárez, Gil, Ghersa, Tordable, & De La Fuente, 2017).

Ante esta dificultad el uso de plaguicidas es más recurrente debido a su fácil obtención, costo accesible y visible acción; sin embargo, el uso indiscriminado llega a afectar la salud humana y al medio ambiente (Delgado, *et al.*, 2018). Entre estos tenemos al Nemathor, que es de acción sistémica acropétala y basipétala, teniendo en su composición química la quinoleína, fenoles y aditivos inertes (S.A.C., 2005) (Farfan, 2011). Otra opción es el Sincocin, el cual es un plaguicida de nivel IV (ligeramente tóxico) que tiene como ingredientes activos extractos de plantas, ácidos grasos y ácido salicílico (FAO, 2008) (Restrepo, 2015), de actividad sistémica, usado para el tratamiento de nemátodos fitoparásitos.

Numerosas investigaciones están orientadas a desarrollar alternativas de control de plagas de manera integrada, donde confluyen el conocimiento físico, agrícola y biológico, de manera que los métodos sean amigables con el ambiente y se disminuya considerablemente la contaminación de suelos, ríos y las fuentes de agua subterránea (Ajitomi, Taba, Ajitomi, Kinjo, & Sekine, 2018). Especies de varias familias, entre las que figuran, Solanáceas, Brassicaceas, Lamiaceas, Meliáceas y Asteráceas, presentaron extractos que han sido utilizados en el control de nemátodos, destacando las Asteráceas y dentro de esta las especies del género *Tagetes* dieron casi siempre los mejores resultados (Mokrini, *et al.*, 2018).

Las especies *Tagetes minuta* comúnmente conocida como “huacatay”, “epazote”, “hierba sagrada”, “menta negra” y *Tagetes erecta*, conocida como “flor de muerto”, son miembros

de la familia Asteraceae (Carhuapoma, 2011), caracterizadas por sintetizar metabolitos secundarios con propiedades que son de importancia medicinal (Iannacone, *et al.*, 2017) en el biocontrol de plagas (Salehi, *et al.*, 2018) y de utilidad en suelos de baja fertilidad (Ventura, Delgado, & Pires, 2006). Las especies de este género resultan ser un material de mucha importancia en el control eficaz frente a una amplia gama de nemátodos, ya que presentan en la composición de su aceite esencial, metabolitos de actividad biocida, los cuales interfieren en el sistema nervioso central de los nemátodos (Díaz, Serrato, Arce, & León, 2012). Además, su rápida degradación a la luz solar, carencia de persistencia, selectividad a organismos no destinatarios y carencia de bioacumulación en el ambiente (Grdiša & Gršić, 2013), lo posiciona como un plaguicida botánico de importancia en la protección de los cultivos, sin perjudicar demasiado al medio ambiente, a los controladores biológicos (Iannacone, *et al.*, 2017), o a la población; a diferencia de los plaguicidas químicos.

El follaje de *T. minuta*, ha sido experimentado sobre la nodulación radicular producida por el nematodo *Meloidogyne incognita* que parasita el ‘pimiento páprika’ *Capsicum annuum*. El experimento fue conducido en condiciones de invernadero utilizando follaje de *T. minuta* adicionada al sustrato como enmienda orgánica en 20, 35 y 50% observándose una limitación en la nodulación radicular ocasionada por *M. incognita*. Esto sugiere que posee cierto potencial en el control del nemátodo (Murga, Alvarado, & Vera, 2012), debido a que su aceite esencial está compuesto principalmente por los terpenos: limoneno, (E) y (Z)-tagetona, (Z)- β -ocimeno, dihidrotagetona, (E) y (Z)-ocimenona, (Massuh, 2014) importantes en la actividad biocida de la planta; sin embargo, su efectividad puede variar de acuerdo con la ubicación geográfica, la etapa de crecimiento y la parte de la planta (Shahzadi, Hassan, Khan, & Shah, 2010).

T. erecta, como planta trampa es eficiente para disminuir las poblaciones de nemátodos fitoparásitos, debido a que presentan en su composición metabolitos como la tagetona, dihidrotagetona, crisantenona, alilanol y el canfeno (Álvarez, *et al.*, 2016) con actividad biocida. Las exudaciones radiculares que secretan las plantas de *T. erecta* o marigold, son efectivas para atraer a los estadios juveniles de los nemátodos del género *Meloidogyne*; una vez dentro de las plantas, dichos estadios van a ser modificados en su desarrollo y multiplicación (Aballay & Insunza, 2002). Sin embargo, solo es efectiva para algunos géneros de nemátodos como *Meloidogyne* (Méndez, 2009).

Extractos acuosos de plantas completas de esta especie también han sido probados. Se evaluó la capacidad de los extractos acuosos fríos (20% p/v) aplicados a plantas de tomate (*S. lycopersicum*) en cantidades de 100 ml antes y después de la floración, estimándose después el rendimiento de frutos, obteniendo un incremento significativo en las plantas tratadas, frente al testigo, resultando más eficaces los extractos de *T. erecta* de 40 días de edad (Natarajan, *et al.*, 2006).

A nivel de cultivos *in vitro*, existen trabajos realizados en ambas especies. *T. minuta* es una de las especies que puede ser propagada por semillas, con un porcentaje de germinación de 50-60%, según las condiciones de cultivo y la germinación se llega a completar entre 10 a 15 días (Singh, Singh, & Kaul, 2003). Asimismo, tanto cotiledones como hipocótilo de *T. minuta* cultivados en medio MS mostraron una clara expansión después de una semana de ser cultivados y desarrollaron callos a los 10 días de cultivo. El porcentaje de explantes que desarrollaron callos varió de 63% a 100% para cotiledones y de 60% a 100% para hipocótilos, dependiendo de las combinaciones de reguladores de crecimiento de plantas. El color de los callos varió de blanco a blanco con áreas verdes o marrones, o marrones con áreas verdes (Mohamed, Harris, & Henderson, 1999).

Por otro lado, callos de *T. minuta* fueron derivados de hojas en medios de cultivo MS suplementados con ANA 0,54 μ M e incubados a 24 °C bajo continua iluminación, reportados como condiciones óptimas según Ekes-Kretovics, Ekes, Gyurjan, Hethelyi, & Danos (1993). En el caso de entrenudos, diferentes concentraciones de ANA y BA e incubados en oscuridad indujeron la mayor formación de callos sin regeneración de órganos (Croes, Arts, Bosveld, & Wullems, 1989). No hay reportes acerca de la toxicidad de estructuras *T. minuta* cultivada *in vitro*.

Desde la década de los 80 se despertó el interés por las investigaciones en *T. erecta*, a nivel de cultivos de tejidos *in vitro*, con fines de propagación, inducción de callos, embriogénesis somática y cultivo de células en suspensiones (Hidalgo M., 1995). Recientemente se han desarrollado protocolos sobre embriogénesis somática como parte de un sistema futuro de transformación genética, con la finalidad de mejorar las propiedades en la producción avícola (Venegas, Benítez, Leyva, Paredes, & Del Villar, 2017).

En la investigación presentada por Osman, *et al.*, (2008), se estudió el efecto de los extractos de plantas de *T. erecta* cultivadas en medio MS (ANA 0.1mg/L), siendo probados en estadíos juveniles de la segunda etapa (J2) de *Meloidogyne incognita*, en concentraciones de 34, 49, 74, 87 y 100%. Los extractos a partir de callos de semillas, hojas, tallos y raíces resultaron efectivos en el control significativo de la población de *M. incognita*, tanto en las raíces como en el suelo de cultivo. De igual manera se observó una mejora en el crecimiento de las plantas en todos los tratamientos probados.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Material Biológico

3.1.1.1. Obtención del material vegetal

El material vegetal estuvo constituido por plantas silvestres de *Tagetes minuta* y plantas cultivadas de *Tagetes erecta*. En el caso de *T. minuta*, las plantas fueron colectadas a orillas de la carretera Kerguer - Penachí, (S7°14'37"- O80° 37' 23"), ubicado en el distrito de Salas; en el caso de *T. erecta* las plantas fueron colectadas del Jardín Botánico del Parque Infantil de Chiclayo – Lambayeque.

El material para inducir callos *in vitro* de *T. minuta*, fue colectado de plantas maduras con semillas, las mismas que al ser movidas en la inflorescencia emiten un sonido característico, motivo por el cual en la caseríos de la serranía se le conoce como “shil shil”.

Las plantas fueron colectadas en fase de floración y fructificación, las cuales en esta etapa contienen los principios activos que se necesita para preparar los extractos (Solano, Quezada, Agurto, Ruiz, & Del Pozo, 2012).

Las plantas de tomate con edad de 30 días para experimentación con los extractos de *Tagetes*, fueron adquiridas de un agricultor dedicado al cultivo de tomate, el mismo que proporcionó las plantas infectadas. Estas fueron establecidas en terrinas de 44 cm de largo y 29 cm de ancho con una profundidad de 25 cm, con sustrato franco arenoso.

3.1.2. Obtención de nemátodos

Fueron identificadas plantas de *Solanum lycopersicum* L. infectadas con nemátodos, en campos de cultivo de la zona llamada “La capilla”, (S6°50'37"- O79° 49' 33"), perteneciente al distrito de Reque. Luego de retirar las plantas del suelo de manera cuidadosa, tratando que

no se deterioren las raíces, tales fueron colocadas en bolsas de polietileno y trasladadas al Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Recursos Genéticos de la Facultad de Ciencias Biológicas.

A partir de las agallas de las raíces infectadas, fueron aislados estadíos juveniles II de nemátodos del género *Meloidogyne* spp. para ser sometidos a los tratamientos experimentales.

3.1.3. Medios de cultivo para los tratamientos *in vitro*

Para los cultivos *in vitro*, el medio de cultivo estuvo constituido por las sales minerales MS (Murashige & Skoog, 1962) (Cuadro 1), suplementado con tiamina 0.4 mg/L, m- inositol 100 mg/L, sacarosa 3% y agar agar al 0,8 % para la gelificación de los medios.

En el caso del medio para inducción de callos, sobre estos componentes, se adicionó la auxina 2,4-D en 4 concentraciones: 0,05; 0,1; 0,2 y 0,4 mg/L. Para la propagación de ápices se incorporó al medio MS, AIA 0.02 mg/L y AG₃ 0,02 mg/L (Cuadro 2), el pH fue ajustado entre 5.6 – 5.8. En cada frasco se colocó 20 mL de medio de cultivo. La esterilización de los medios de cultivo se realizó a 121°C y 15 lb p² de presión durante 20 minutos.

Estos medios de cultivo luego de esterilizados, fueron conservados en refrigeración hasta el momento de su utilización.

Cuadro 1. Composición química del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog) utilizado en el cultivo *in vitro* de *T. minuta* y *T. erecta*.

Solución Madre N°	Constituyentes Químicos	Concentración (mg/L)	Volumen de la Solución Madre (ml/L)
1	NH ₄ NO ₃	1650	20,0
	KNO ₃	1900	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	
2	KH ₂ PO ₄	170	1,0
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440	
3	KI	83	1,0
4	ZnBO ₃ , 7H ₂ O	8,6	3,0
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	
	MnSO ₄ , 7H ₂ O	2,230	
	H ₃ BO ₃	6,2	
	CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025	
	CoCl ₂ , 5H ₂ O	0,025	
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	
5	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	5,0
6	m- inositol		12,5
7	Tiamina		2,5

Fuente: Guía de estudio para el cultivo de meristemas de yuca (Roca & Mroginski, 1991) del centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, Cali – Colombia.

Cuadro 2 . Formulación de medios de cultivo para germinación de semillas, inducción de callos y propagación de ápices *in vitro* de *Tagetes minuta* y *T. erecta*.

Procesos Morfogénicos	Sales Minerales	Reguladores de crecimiento (mg/L)		
		2,4 – D	AIA	AG ₃
Germinación	MS			
			0,05	
			0,1	
			0,2	
Inducción de callos	MS			
			0,4	
Propagación de ápices	MS		0,02	0,02

3.2. Metodología

3.2.1. Germinación de semillas *in vitro*

Con el objetivo de obtener material vegetal aséptico que permita la inducción de callos, fueron seleccionadas semillas en las mejores condiciones de madurez de ambas especies de *Tagetes*. Las semillas fueron colocadas a razón de 25 unidades por frasco de vidrio para la desinfección. En cámara de flujo laminar de aire esterilizado se realizó la desinfección de semillas y para ello se utilizó alcohol etílico 70% con permanencia de un minuto y posteriormente con hipoclorito sodio (lejía comercial) 5% con permanencia de 3 a 5 minutos; ambos desinfectantes fueron removidos con cuatro enjuagues utilizando agua destilada esterilizada. Luego las semillas fueron colocadas en los frascos que contenían el medio de cultivo para germinación, a razón de cinco semillas por frasco. Fueron tapados y sellados y posteriormente se incubaron en oscuridad.

Transcurridos 8 a 10 días del cultivo, los frascos con las semillas germinadas fueron transferidos a incubación bajo una irradiación de 10 W.m^{-2} de iluminación, fotoperiodo de 16/8 horas de luz/oscuridad y temperatura de 22 a 24°C, para el crecimiento armónico de las plántulas en condiciones *in vitro*.

3.2.2. Inducción de callos

Para la inducción de callos fueron utilizados tejidos de plántulas germinadas *in vitro* de *T. minuta*, ya que con *T. erecta* no se pudo trabajar debido a la contaminación. Los explantes estuvieron constituidos por segmentos de hojas y entrenudos de 0,5 cm de largo, lo cuales fueron obtenidos seccionando las plántulas utilizando pinzas y bisturí asépticos. La desinfección no fue necesaria por cuanto el material provenía de cultivos *in vitro*. Cada uno de los fragmentos, fueron establecidos en los medios de cultivos formulados para inducir callos. Este trabajo también se realizó en condiciones de asepsia en cámara de flujo laminar de aire esterilizado.

3.2.3. Cultivo de ápices *in vitro*

Con la finalidad de mantener una fuente de material vegetal aséptico, luego de obtener fragmentos de hojas y entrenudos para la formación de callos, los ápices de las plántulas fueron transferidos a medio de cultivo de propagación *in vitro* bajo las siguientes condiciones de incubación: 10 W.m⁻² de iluminación, fotoperiodo de 16/8 horas de luz/oscuridad y temperatura de 22 a 24°C.

3.2.4. Obtención de extractos

Hojas, inflorescencias y raíces de plantas adultas de las dos especies de *Tagetes* colectadas en campo, fueron secadas al ambiente bajo sombra por separado cada una de estas estructuras. Momentos antes de la molienda, las estructuras secas fueron colocadas por 10 minutos en estufa calentada previamente a 45°C, para eliminar la humedad captada del ambiente por parte del material. Luego cada una de las estructuras se sometieron a molienda en mortero, hasta tener un polvo fino. La masa seca obtenida fue sometida a extracción con etanol 96° por un período de 24 a 48 horas. Luego fue filtrado y colocado en placas de Petri para la evaporación del solvente y la concentración del extracto. En el caso de los callos obtenidos en cultivo *in vitro*, también fueron sometidos al mismo procedimiento (Fig. 1).

3.2.5. Pruebas de toxicidad para determinar la DL₅₀ de los extractos

Para la prueba de toxicidad, individuos de estadios juveniles II de nemátodos aislados de las agallas de plantas de tomate infectadas, utilizando un estereoscopio, fueron enfrentados a once concentraciones del extracto etanólico proveniente de hojas de las dos especies de *Tagetes* (cuadro 3). Para ello fueron colocados en placas de Petri con 3 mL de solución correspondientes a cada una de los tratamientos en investigación. A partir de la placa que contenía el total de nemátodos aislados en agua corriente, utilizando una pipeta Pasteur,

fueron retirados los individuos mediante aspiración y colocados en otra placa a razón de 10 por tratamiento. A cada concentración se le hicieron tres repeticiones.

Cuadro 3: Tratamientos utilizados para determinar la DL₅₀ de los extractos provenientes de hojas de *T. minuta* y *T. erecta* de campo sobre *Meloidogyne* spp. en *Solanum lycopersicum*.

Tratamientos (C)	Concentraciones (mg/L)
C1	0,3
C2	0,5
C3	0,7
C4	0,9
C5	1,0
C6	1,1
C7	1,3
C8	1,5
C9	1,7
C10	1,9
C11	2,0

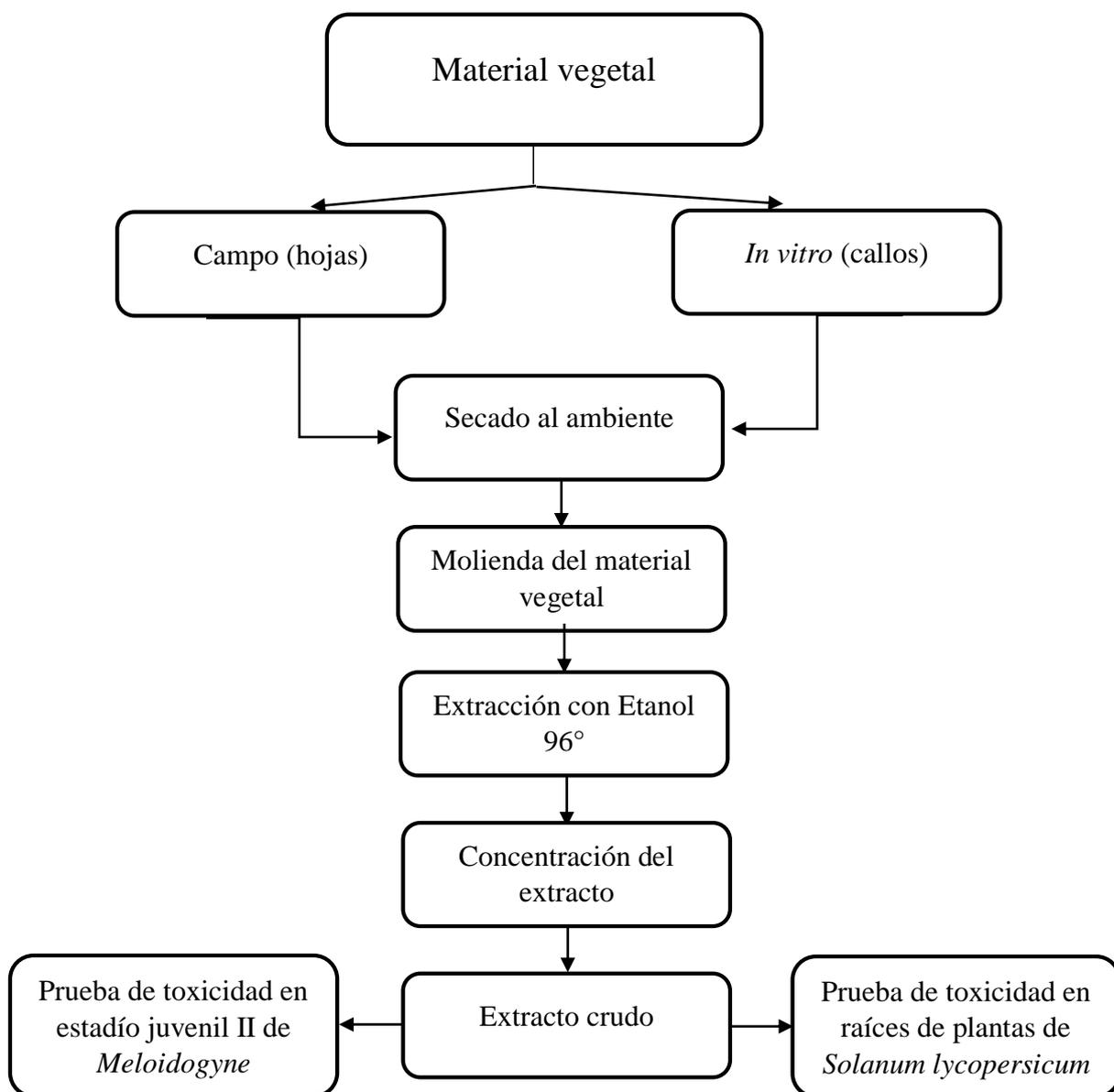


Figura 1: Procedimiento seguido en la obtención de extractos a partir de plantas de campo e *in vitro* de *Tagetes minuta* y de plantas de campo de *T. erecta*.

3.2.6. Aplicación de los extractos etanólicos en plantas de *S. lycopersicum*

Plantas sanas de tomate de un mes de edad, establecidas previamente en terrinas con un sustrato fértil tipo franco - arenoso, constituido por tierra de cultivo y arena de río en una proporción 3:1, el mismo que fue esterilizado en horno a 50°C durante 60 minutos, sirvieron para las pruebas de toxicidad de los extractos frente a *Meloidogyne* spp. en plantas de *S. lycopersicum* a nivel de invernadero. En cada terrina se establecieron cinco plantas completamente sanas.

A partir de los resultados sobre la toxicidad de los extractos según el análisis Probit, fueron seleccionadas tres concentraciones de ambas especies de *Tagetes*: 1,0; 1,5 y 2,0 mg/L. Para la aplicación de los extractos en las plantas, dos días antes se regaron a capacidad de campo.

Fueron pesados paquetes de 1,0 g de raíces con agallas obtenidas de plantas infectadas con *Meloidogyne* spp. procedente de los cultivos de tomate del Fundo La Capilla de Reque. A excepción del testigo, se asperjó 10 mL de solución alrededor de sus raíces, correspondiente a cada tratamiento seleccionado de los extractos de hojas de ambas especies de *Tagetes*. Posteriormente a cada planta sana, incluyendo al testigo, se le retiró el sustrato para exponer a las raíces y sobre ellas fue dispersado el gramo de raíces infectadas. Cada tratamiento tuvo 10 repeticiones.

Para el caso del extracto de callos *in vitro* de *T. minuta* se consideró únicamente el tratamiento más alto (2,0 mg/L). *T. erecta*, no fue considerada en esta fase del trabajo.

3.2.7. Evaluación del efecto de los extractos

Transcurrido 45 días después que las plantas de *S. lycopersicum* recibieron el tratamiento con los extractos etanólicos de las dos especies de *Tagetes*, fueron removidas de las terrinas tratando que las plantas mantuvieran todas las raíces de manera intacta.

En cada una de las plantas, fueron evaluadas las siguientes características:

- Tamaño total
- Tamaño del tallo
- Tamaño de la raíz
- Número de hojas
- Número de agallas por planta
- Promedio de agallas por raíz

3.2.8. Análisis estadísticos de datos

Para alcanzar los objetivos, los resultados de la toxicidad de los extractos se sometieron al análisis Probit. Se calcularon los parámetros estadísticos para obtener la dosis letal media (DL₅₀). Los datos obtenidos de las variables en estudio fueron sometidos a un Análisis de Varianza (ANOVA), utilizando el software estadístico SPSS versión 22.0 así como los programas de Microsoft Office Excel versión 2013, los cuales fueron expresados en cuadros y figuras.

IV. RESULTADOS

4.1. Características de las especies vegetales en estudio

a. Tagetes minuta

Es una hierba anual comúnmente conocida como “huacatay” o “Shil Shil”, nativa de los pastizales templados y regiones montañosas del sur de Sudamérica. Puede alcanzar hasta 50 cm de alto y presenta hojas de 8 a 15 cm de largo. Las inflorescencias son pequeñas, de 10 a 15 mm de largo. Posee semillas relativamente pequeñas, y los frutos están representados por aquenios (Massuh, 2014). Actúa como un nematocida potencial, gracias a sus compuestos químicos tales como dihidrotagetonina, β -ocimene y tagetenona que son los principales (Chamorro, Ballerini, Sequeira, Velasco, & Zalazar, 2008). El tamaño de las plantas obtenidas fue de 46,3 cm y de las semillas 0,9 cm las cuales presentaban pubescencia y de coloración negra (Fig. 2).

b. Tagetes erecta

Es una planta herbácea anual, comúnmente conocida como ‘flor de muerto’ o ‘marigold’, con distribución cosmopolita cuya altura oscila entre 0,30 m y 1,0 m. Las hojas poseen segmentos agudos, aserrados, glándulas inferiores pequeñas que contienen aceites esenciales; inflorescencias marginales desde ocho a muchas, femeninas; corola amarilla, ligulada, de 7-11 mm de longitud (Méndez, 2009). El tamaño de las plantas colectadas fue de 24,6 cm y las semillas de 1,8 cm, las cuales tenían una coloración negra con bandas blancas a los costados (Fig. 3).

c. Meloidogyne spp.

Es un nemátodo fitoparásito de la familia *Heteroderidae*. (Integrated Taxonomic Information System, 2013). Las hembras de algunas especies pierden su forma vermiforme

conforme maduran, se ensanchan y adoptan forma esférica al alcanzar el estadio adulto. Tienen una estructura especializada para su alimentación llamada estilete. Este es usado para inyectar enzimas dentro de las células vegetales y los tejidos, para luego extraer su contenido causando crecimiento anormal de la parte aérea de la planta, confirmándose el problema al examinar la estructura radicular, la cual sufre deformaciones denominadas agallas, que pueden variar considerablemente dependiendo de las especies de *Meloidogyne*, el cultivo y cultivar (Fig. 4) (Coyne, Nicol, & Claudius-Cole, 2009).

4.2. Germinación de semillas *in vitro*

Transcurridos de 8 a 10 días de establecidas las semillas *in vitro*, se observó la germinación en 90 % de las semillas de *T. minuta* y solo el 16% de las semillas de *T. erecta* (Anexo 1) (Cuadro 4). Un factor determinante para la germinación de semillas fue la alta contaminación en el caso de *T. erecta*, aun cuando para la desinfestación de semillas previo al cultivo se utilizó hipoclorito de sodio al 5% por 5 minutos y no pudo superarse esta contaminación, ya que al aumentar la concentración de hipoclorito se incrementó el control de la contaminación, pero se inhibió la germinación al mismo tiempo. En el caso de *Tagetes minuta* la contaminación de semillas *in vitro* solo fue de 3 %.

La contaminación fue de tipo fúngica y por el tiempo que tardó en aparecer, se considera que se trataría de microorganismos endógenos en semillas (Fig. 5).

Cuadro 4: Porcentajes de germinación de semillas *in vitro* de *T. minuta* y *T. erecta*.

ESPECIE	GERMINACIÓN (%)		
	Semillas geminadas	Semillas no germinadas	Contaminación
<i>Tagetes minuta</i>	90	7	3
<i>Tagetes erecta</i>	16	5	79

La germinación fue exitosa en ambas especies, excepto que en *Tagetes erecta*, al cabo de dos semanas se observaba el crecimiento de un hongo color rosado, identificado como *Fusarium* mediante la coloración con azul de algodón, poniendo en gran riesgo la viabilidad de la planta debido al alto grado de contaminación a nivel del endospermo, conllevando a una necrosis celular. Por otro lado el proceso de descontaminación de *Tagetes minuta* se mostró efectivo, con un bajo grado de contaminación.



Figura 2. *Tagetes minuta*: **a.** Planta madura en campo, utilizada para obtención de extractos etanólicos y **b.** Semillas para la germinación, propagación de ápices e inducción de callos *in vitro*.



Figura 3. *Tagetes erecta*: **a.** Planta madura en campo, utilizada para obtención de extractos etanólicos y **b.** Semillas para la germinación, propagación de ápices e inducción de callos *in vitro*.

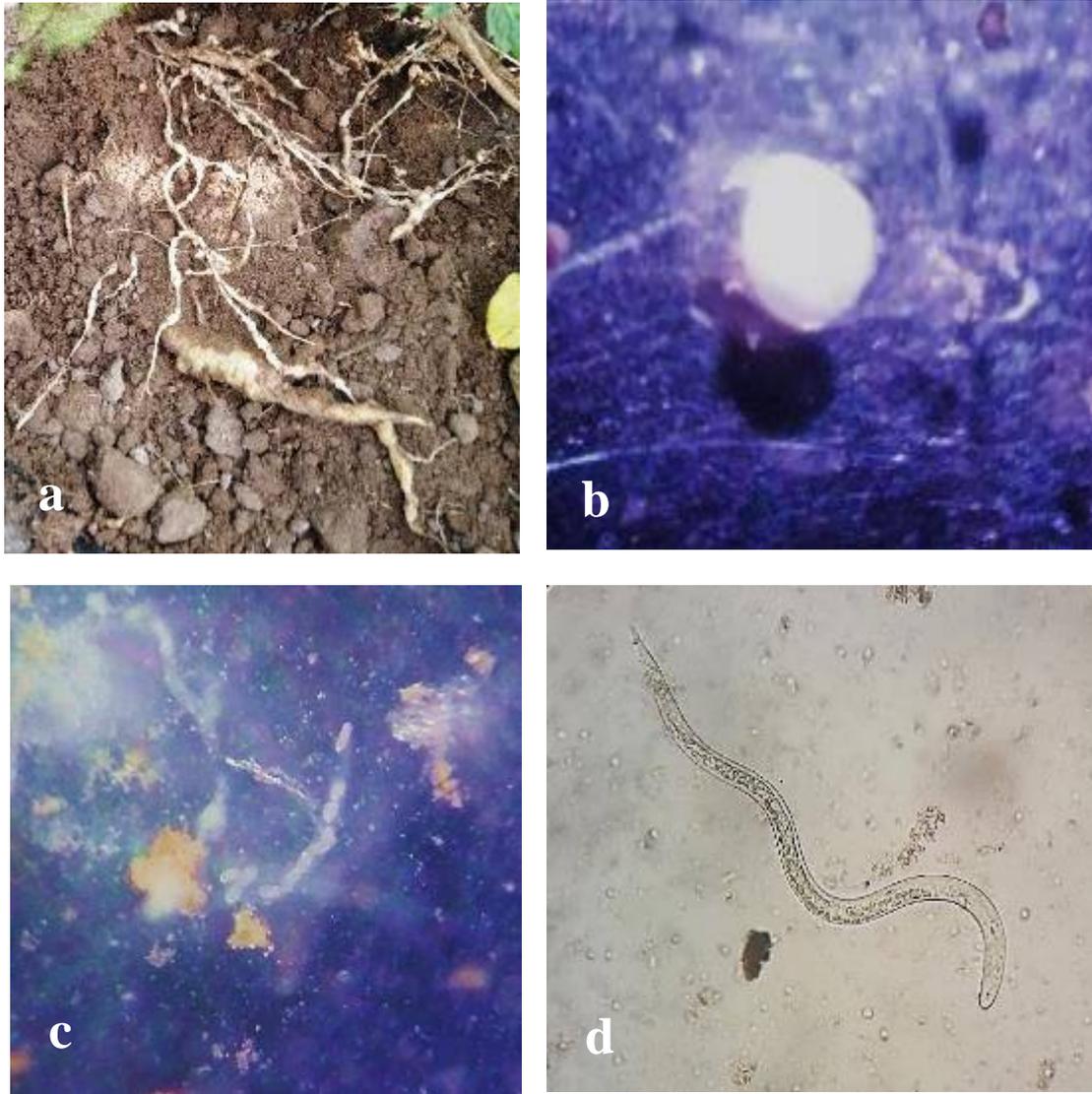


Figura 4: *Meloidogyne* spp.; **a.** Agallas en raíz de *Solanum lycopersicum*, **b.** Hembra en estadio piriforme, **c.** Huevos, **d.** Estadío juvenil II.

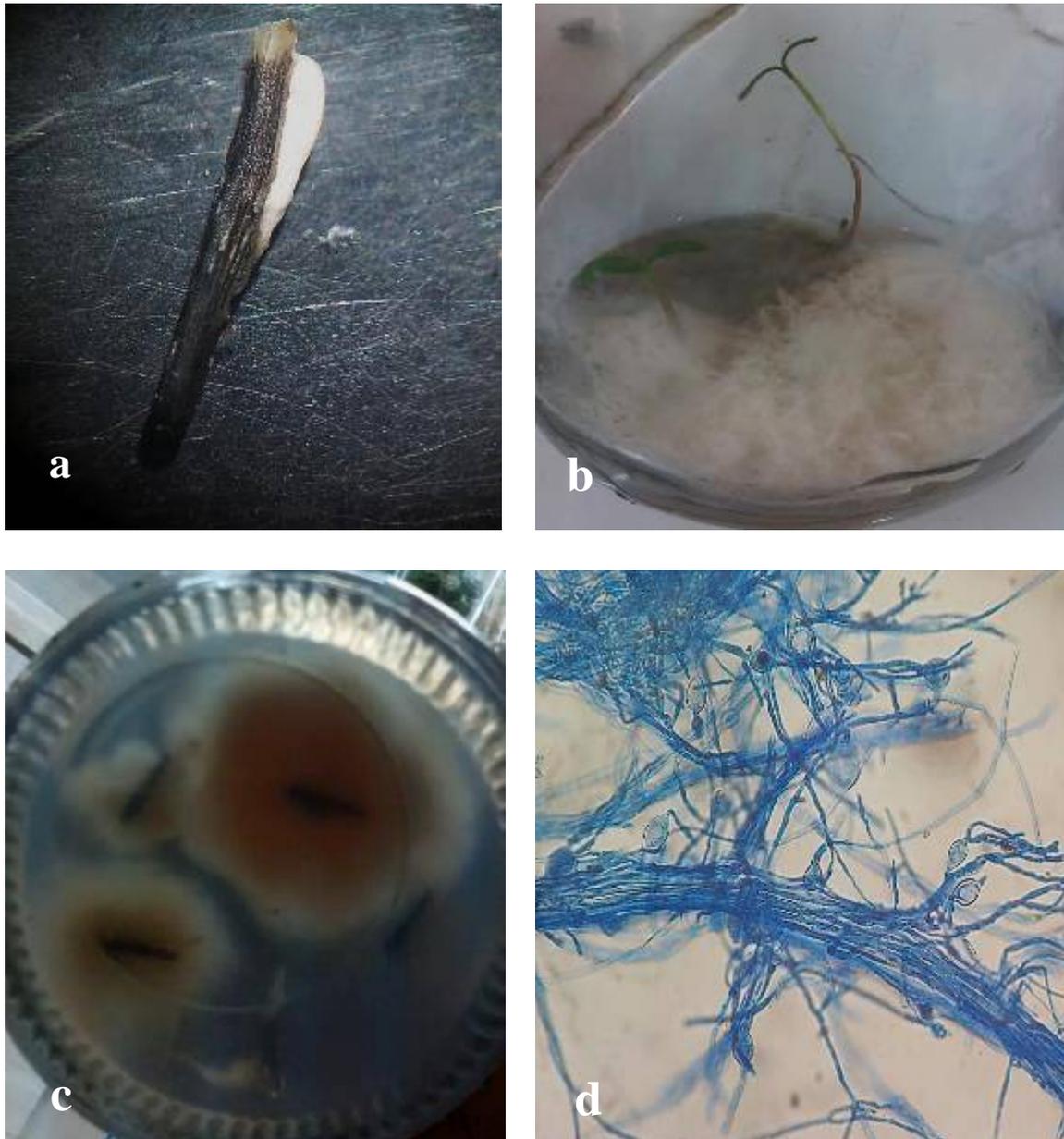


Figura 5: Contaminación de semillas de *Tagetes erecta in vitro*: **a.** Semilla en proceso de germinación, **b** y **c.** Contaminación fúngica de las plántulas y **d.** Contaminación por *Fusarium* sp., estadio maduro con presencia de clamidosporas.

4.3. Inducción de callos

Transcurridos 30 días, luego de haberse establecido el cultivo *in vitro* de fragmentos de hojas y entrenudos de *T. minuta* para la inducción de callos, se observó hinchamiento de los tejidos. 15 días más tarde se inició la proliferación de células que en el caso de los entrenudos empezó en los extremos y estos tenían un aspecto blanquecino y de consistencia compacta (Fig. 6). Por otro lado, los fragmentos de hoja desarrollaron callos en la base y en la zona de la nervadura central, presentando un aspecto amarillo – verdoso y de consistencia compacta también (Fig. 7). Al cabo de 60 días habrían alcanzado su máximo desarrollo, iniciándose necrosis de las células y aparentemente muerte del tejido.

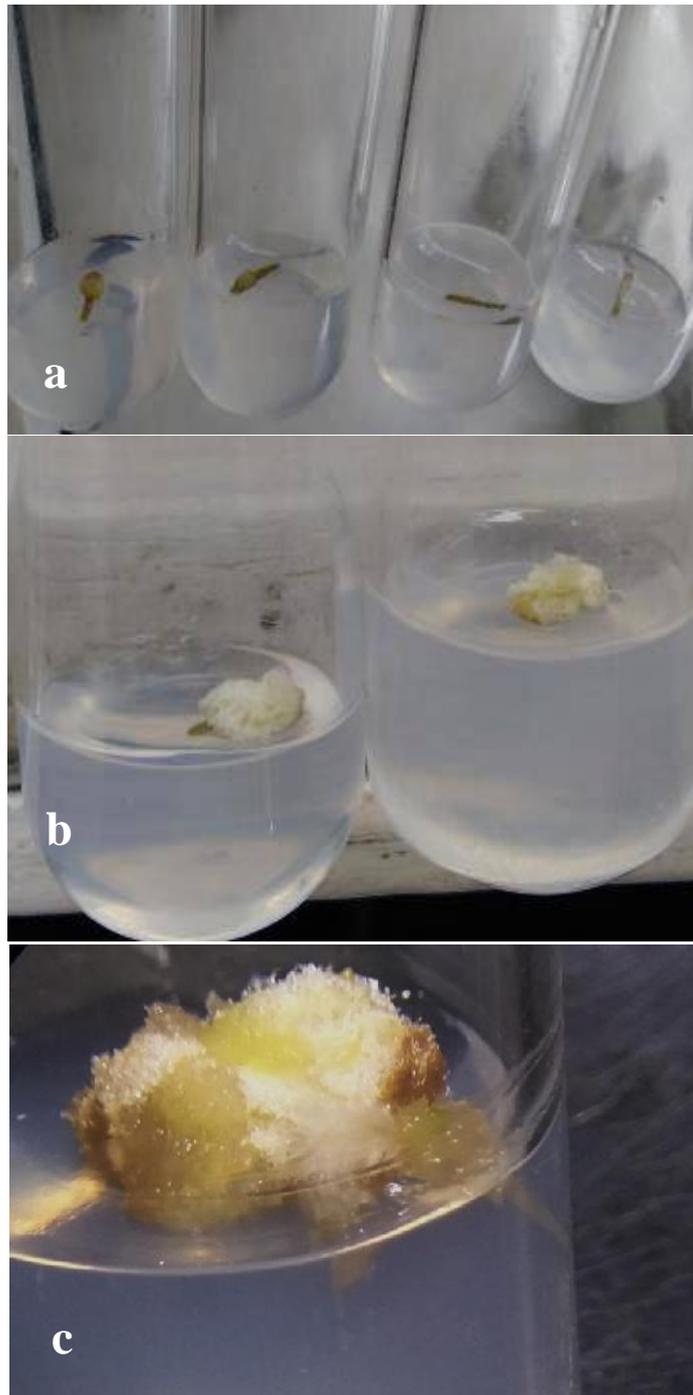


Figura 6: Inducción de callos *in vitro* en *Tagetes minuta* a partir de segmentos de entrenudos: **a.** Segmentos de entrenudos, **b.** Crecimiento a los 30 días, **c.** Formación a los 45 días.

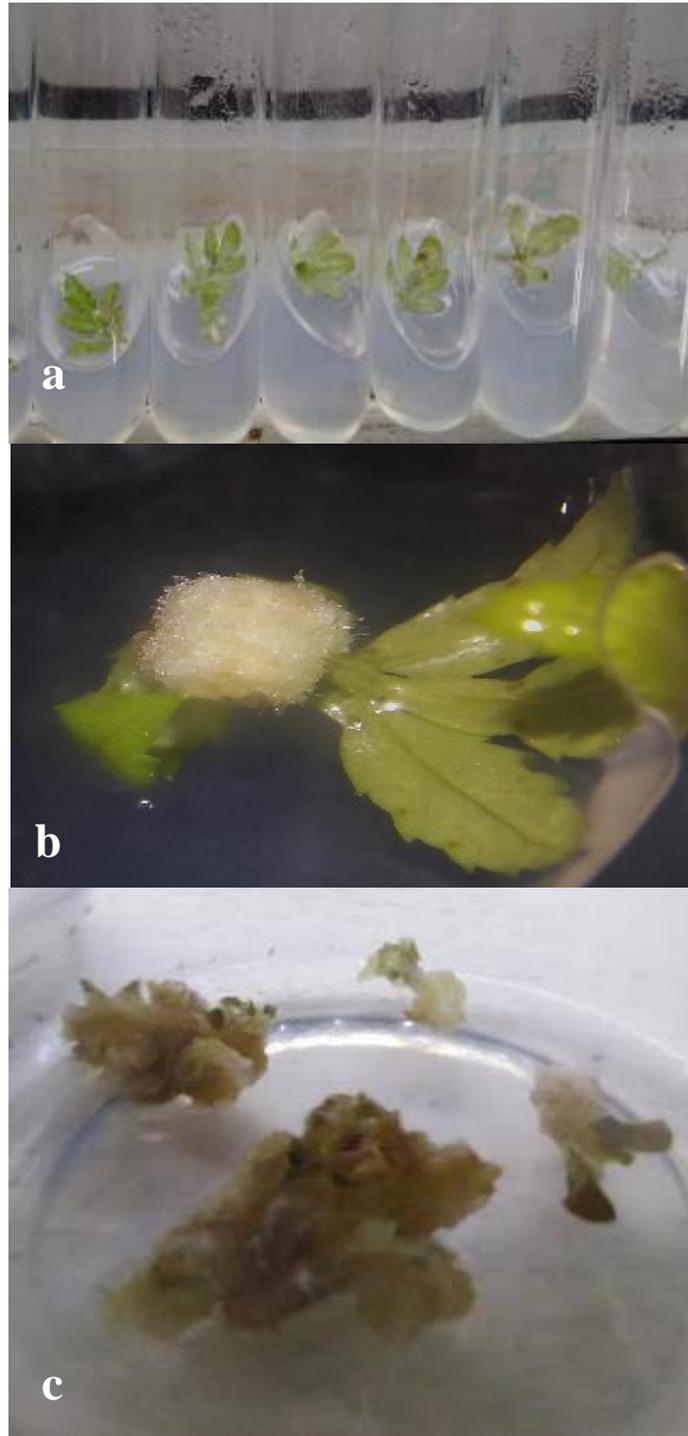


Figura 7: Inducción de callos *in vitro* en *Tagetes erecta* a partir de segmentos de hojas: **a.** Segmentos de hojas, **b.** Crecimiento a los 30 días, **c.** Formación a los 45 días.

En el cuadro 5 se muestra el porcentaje de inducción de los callos *in vitro* de *T. minuta* luego de 45 días de establecido el cultivo. Aquí se observó que en los cuatro tratamientos se indujeron callos en tejidos de hoja, y esta formación fue de 70 a 100%, sobresaliendo el T2. En el caso de los entrenudos, también se formaron callos con éxito superior a 50%, siendo el mejor el T1 que incluyó la concentración más baja de 2,4-D (0,05mg/L) y llegó a 90% de formación de callos. Cabe indicar que una ligera contaminación de 10% se presentó en los tejidos establecidos en el tratamiento T2 y T3 en entrenudos.

Cuadro 5: Porcentaje (%) de la formación de callos en segmentos de entrenudos y hojas de *Tagetes minuta*.

Procesos morfogénicos	TRATAMIENTOS (2,4-D mg/L)							
	T1 (0,05)		T2 (0,1)		T3 (0,2)		T4 (0,4)	
	H	E	H	E	H	E	H	E
FC	80	90	100	60	80	60	70	50
SFC	20	10	0	30	20	30	30	50
Contaminados	0	0	0	10	0	10	0	0
TOTAL	100	100	100	100	100	100	100	100

H = hoja FC= formación de callo
E = entrenudos SFC= sin formación de callo

En el cuadro 6, se observan los promedios de diámetro y altura de los callos *in vitro* inducidos en segmentos de hojas de *T. minuta* a 45 días de establecido el cultivo *in vitro*, donde el T2 muestra mejores características y un mayor desarrollo respecto a los demás tratamientos, ya que se observó en algunos tubos raicillas delgadas.

En el cuadro 7, sin embargo, se observan que los mejores promedios de diámetro y altura de los callos *in vitro* de entrenudo de *T. minuta*, se alcanzó en el tratamiento T1, seguido del T2.

Cuadro 6: Promedios de diámetro y altura de los callos provenientes de hojas de *Tagetes minuta* de acuerdo a cada tratamiento.

Hojas	TRATAMIENTOS (2,4 – D mg/L)			
	T1 (0,05)	T2 (0,1)	T3 (0,2)	T4 (0,4)
Diámetro	8,6 mm	10,3 mm	5,6 mm	9,3 mm
Altura	6,4 mm	6,1 mm	3,6 mm	6,0 mm

Cuadro 7: Promedios de diámetro y altura de los callos provenientes de entrenudos de *Tagetes minuta* de acuerdo a cada tratamiento.

Callos de Entrenudos	TRATAMIENTOS (2,4 – D mg/L)			
	T1 (0,05)	T2 (0,1)	T3 (0,2)	T4 (0,4)
Diámetro	10,1 mm	8,5 mm	6,7 mm	6,6 mm
Altura	6,7 mm	5,5 mm	3,8 mm	4,4 mm

4.4. Extractos etanólicos

Luego de la extracción y concentración de los extractos en el caso de *T. minuta*, se apreció que el mayor rendimiento de extracto se obtuvo en los tejidos de hojas, seguido de inflorescencias y finalmente de raíces y aun cuando la cantidad de masa seca de estas dos últimas fue mayor que el de hojas, el rendimiento fue mucho menor (Cuadro 8). En el caso de callos *in vitro* de *T. minuta*, el mayor rendimiento se obtuvo de los fragmentos de hojas, seguido de entrenudos (Cuadro 10).

En el caso de *T. erecta*, el mayor rendimiento se obtuvo en los tejidos de hojas, seguido de raíz y finalmente de inflorescencias; en este caso se observó que a pesar de no tener mucha masa seca en hojas, se obtuvo mayor cantidad de extracto (Cuadro 9).

Cuadro 8: Extractos etanólicos y rendimiento obtenidos de plantas completas de *T. minuta*.

Parte de la planta	Peso de masa seca (g)	Extracto Etanólico (g)	Rendimiento (%)
Hojas	4,89	0,24	4,9
Raíz	6,44	0,03	0,5
Inflorescencias	20,68	0,75	3,6

Cuadro 9 : Extractos etanólicos y rendimiento obtenidos de plantas completas de *T. erecta*.

Parte de la planta	Peso de masa seca (g)	Extracto Etanólico (g)	Rendimiento (%)
Hojas	3,78	0,42	11,1
Raíz	2,15	0,15	6,9
Inflorescencias	7,71	0,21	2,7

Cuadro 10 : Extractos y rendimiento obtenidos de callos *in vitro* provenientes de *T. minuta*.

Callos	Peso Fresco (g)	Peso Seco (g)	Extracto Etanólico (g)	Rendimiento (%)
Hojas	5,37	0,36	0,02	5,5
Entrenudos	3,66	0,29	0,01	3,4

4.5. Toxicidad de los extractos etanólicos sobre nemátodos

Para determinar las dosis utilizadas en pruebas de toxicidad se realizaron ensayos preliminares tomando en consideración el extracto de hojas, inflorescencias y raíces de *T. minuta* y solo de hojas de *T. erecta*, por disponerse de mayor cantidad de extracto respecto a las demás estructuras. Las dosis consideradas correspondieron a 1,0; 1,5 y 2,0 mg/L.

Como se aprecia en el cuadro 11, en el T2 (1,0 mg/L) del extracto de hojas de *T. minuta*, murieron el 100% a 53 minutos y el tiempo disminuyó paulatinamente, a medida que aumentó la concentración, llegando a morir el 100% de individuos a 10 minutos en el T4 (2,0 mg/L). En el extracto de raíces, la toxicidad fue menor, observándose que el 100% de individuos mueren a partir del T3 (1,5 mg/L) pero en mayor tiempo de exposición (Cuadro 12). En el caso del extracto de inflorescencias de *T. minuta*, únicamente se observó lentitud en el movimiento de los individuos (Cuadro 13).

Respecto a los resultados de *T. erecta* observó que a partir del T1 (0,5 mg/L) el efecto tóxico en el 100% de los individuos a 21 minutos, y a medida que aumentaron las concentraciones los individuos tardaron menos tiempo en morir (Cuadro 14).

Cuadro 11 : Toxicidad de las cuatro concentraciones del extracto etanólico de hojas de plantas de campo de *T. minuta* aplicadas a *Meloidogyne* spp.

TRATAMIENTOS (mg/L)				
Respuesta (100%) / Tiempo (min)	T1 (0,5)	T2 (1,0)	T3 (1,5)	T4 (2,0)
Movimientos lentos	120	20	6	4
Muerte	---	53	14	10

Cuadro 12: Toxicidad al extracto etanólico proveniente de la raíz de plantas de campo de *T. minuta*.

TRATAMIENTOS (mg/L)				
Respuesta (100%) / Tiempo (min)	T1 (0,5)	T2 (1,0)	T3 (1,5)	T4 (2,0)
Movimientos lentos	141	97	57	70
Muerte	---	---	88	138

Cuadro 13: Toxicidad al extracto etanólico proveniente de inflorescencias de plantas de campo de *T. minuta*.

TRATAMIENTOS (mg/L)				
Respuesta (100%) / Tiempo (min)	T1 (0,5)	T2 (1,0)	T3 (1,5)	T4 (2,0)
Movimientos lentos	83	78	70	63
Muerte	---	---	---	---

Cuadro 14: Toxicidad de las cuatro concentraciones del extracto etanólico de hojas de plantas de campo de *T. erecta* aplicadas a *Meloidogyne* spp.

	TRATAMIENTOS (mg/L)			
	T1	T2	T3	T4
Respuesta (100%) / Tiempo (min)	(0,5)	(1,0)	(1,5)	(2,0)
Movimientos lentos	16	7	5	3
Muerte	21	12	11	7

Cuadro 15: Toxicidad de los once tratamientos del extracto etanólico proveniente de hojas de plantas de campo de *Tagetes minuta* aplicadas a *Meloidogyne* spp.

Respuesta (100%) / Tiempo (min)	TRATAMIENTOS (mg/L)*																					
	C1 (0,3)		C2 (0,5)		C3 (0,7)		C4 (0,9)		C5 (1,0)		C6 (1,1)		C7 (1,3)		C8 (1,5)		C9 (1,7)		C10 (1,9)		C11 (2,0)	
	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60
Muertos	0,3	0,7	1,3	1,7	1,7	2,7	2,3	2,3	2,7	3,3	1,7	3	2,7	4,3	4,3	5	4	5,3	6	7,3	7,7	10
Vivos	9,3		8,3		7,3		7,7		6,7		7		5,7		5		4,7		2,7		0	
Total	10		10		10		10		10		10		10		10		10		10		10	

* Tres repeticiones por tratamiento

Cuadro 16: Toxicidad de los once tratamientos del extracto etanólico de las hojas de plantas de campo de *Tagetes erecta* aplicadas a *Meloidogyne* spp.

Respuesta (100%) / Tiempo (min)	TRATAMIENTOS (mg/L)*																					
	C1 (0,3)		C2 (0,5)		C3 (0,7)		C4 (0,9)		C5 (1,0)		C6 (1,1)		C7 (1,3)		C8 (1,5)		C9 (1,7)		C10 (1,9)		C11 (2,0)	
	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60
Muertos	0	0,3	0	1,3	0	1,7	1,3	2	1,7	2,3	2,3	2,7	2,7	3,3	3,7	6	3,7	5,7	5,3	7,7	6,7	10
Vivos	9,7		8,7		8,3		8		7,7		7,3		6,7		4		4,3		2,3		0	
Total	10		10		10		10		10		10		10		10		10		10		10	

* Tres repeticiones por tratamiento.

Basados en estos resultados, y contando con nuevas campañas de siembra de tomate, se montaron los experimentos para determinar con mayor exactitud la dosis letal media (DL₅₀). En ambos casos tanto el extracto de *Tagetes minuta* como de *Tagetes erecta*, la muerte al cincuenta por ciento, se alcanza desde el tratamiento C8 (1,5 mg/L) a partir de 60 minutos de exposición, aumentando progresivamente la muerte hacia los mayores tratamientos y aplicando C11 (2,0 mg/L) mueren el 100% de los individuos a los 60 minutos de exposición (Cuadro 15 y 16), cabe remarcar que estas últimas pruebas se realizaron después de tres meses.

Cuadro 17: Dosis letales 50 (DL₅₀) con sus respectivos límites fiduciales con el 95% de confianza del extracto etanólico de hojas de *T. minuta* y *T. erecta* sobre *Meloidogyne* spp.

Especie	DL50	Límites
<i>Tagetes minuta</i>	1,770	(1,613; 2,019)
<i>Tagetes erecta</i>	1,738	(1,500; 2,163)

Al comparar ambas dosis letales presentadas en el cuadro 17, se constató que los estadíos juveniles de los nemátodos de *Meloidogyne* spp. fueron susceptibles en los tratamientos de 1,770 mg/L para *Tagetes minuta* y de 1,738 mg/L para *Tagetes erecta*. Lo que significa que para lograr un cincuenta por ciento de mortalidad se necesitan esas cantidades de extracto y mientras estas aumenten, mejores serán los resultados (Fig. 8 y 9).

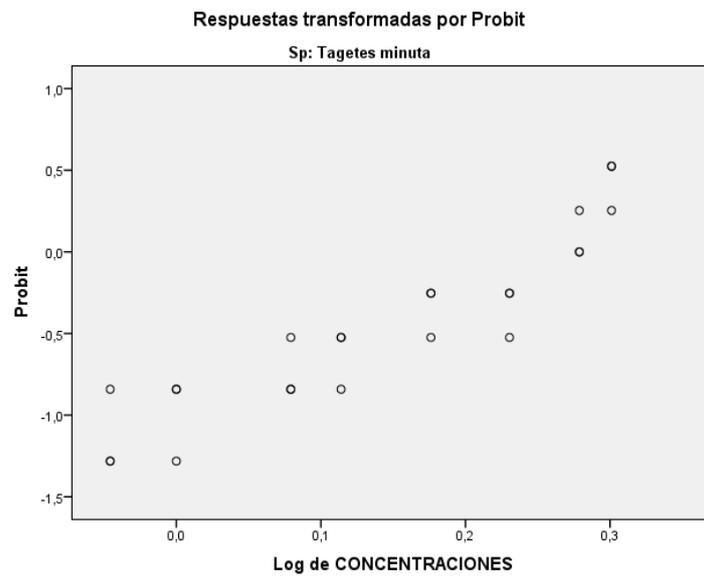


Figura 8: Curva de crecimiento de la toxicidad del extracto etanólico de hojas de *Tagetes minuta* sobre *Meloidogyne* spp.

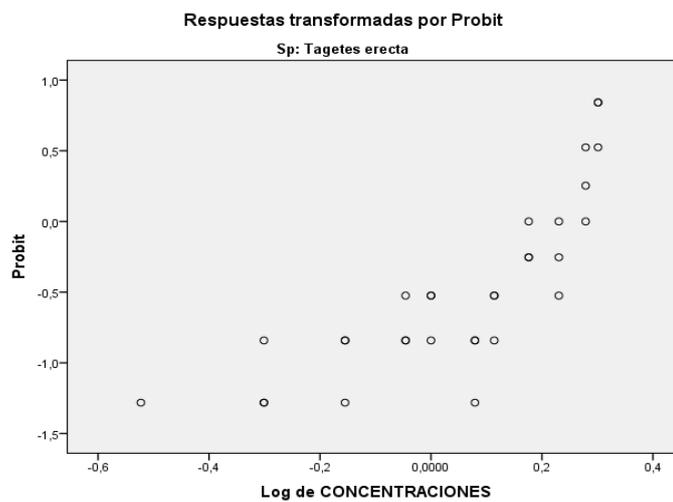


Figura 9: Curva de crecimiento de la toxicidad del extracto etanólico de hojas de *Tagetes erecta* sobre *Meloidogyne* spp.

Cuadro 18: Tiempo de exposición del nemátodo *Meloidogyne* spp. al extracto etanólico de callos provenientes de fragmentos de hojas *in vitro* de *Tagetes minuta*.

	TRATAMIENTOS (mg/L)		
	T1	T2	T3
Respuesta (100%) / Tiempo (min)	(1,0)	(1,5)	(2,0)
Movimientos lentos	25	17	9
Muerte	---	34	31

Cuadro 19: Tiempo de exposición del nemátodo al extracto etanólico de callos provenientes de entrenudos *in vitro* de *Tagetes minuta*.

	TRATAMIENTOS (mg/L)		
	T1	T2	T3
Respuesta (100%) / Tiempo (min)	(1,0)	(1,5)	(2,0)
Movimientos lentos	15	13	11
Muerte	---	---	---

En el caso del extracto de callos *in vitro* provenientes de *Tagetes minuta*, por la escasa cantidad de extracto no fue consideradas para las dosis letales medias, ya que tendría que guardarse para una única dosis de aplicación en plantas en condición de invernadero. En este caso también solo correspondió al extracto de callos de hoja que fue el único que presentó cierta toxicidad (Cuadro 18 y 19).

4.6. Efecto de los extractos etanólicos en plantas cultivadas en condiciones de invernadero

4.6.1. Desarrollo de las plantas

El desarrollo de las plantas cultivadas después del tratamiento con las tres concentraciones de los extractos de las dos especies de *Tagetes* y la infección con las raíces conteniendo las agallas de *Meloidogyne* spp. se observó muy armónico (Anexo 2). Respecto a la expresión

floral, únicamente en plantas sometidas al tratamiento T3 con extracto de *T. minuta* observada a los 75 días, obedeciendo al comportamiento floral normal de esta especie, contemplada entre los 50 y 80 días luego de la germinación.

a. Longitud de las plantas de *Solanum lycopersicum*

En cuanto a la longitud de la planta, la presencia de los extractos, aparentemente habrían estimulado una ligera mejora del crecimiento respecto al testigo, teniendo que ver de alguna manera la concentración y el genotipo de origen; en el caso del extracto de callos *in vitro*, la respuesta fue negativa, ya que el crecimiento fue muy por debajo del testigo y solo se usó el extracto T3. Los extractos T1 y T2 no fueron considerados por su baja disponibilidad (cuadro 20 y 21).

La longitud de raíces, son casi similares en ambos extractos, siendo los tratamientos T1 y T2 donde se observa una mayor longitud (Cuadro 22).

Cuadro 20: Promedios de Longitud total de las plantas de *Solanum lycopersicum* expuestas a los extractos de *Tagetes*.

Tratamientos	Longitud total (cm)		
	<i>T. minuta</i>	<i>T. erecta</i>	<i>T. minuta in vitro</i>
T0		69,08	
T1	84,48	79,28	-
T2	69,38	80,66	-
T3	66,54	70,12	33,2

0 = Testigo; 1, 2 y 3 = Tratamientos de menor a mayor.

Cuadro 21: Promedios de longitud de los tallos de las plantas de *Solanum lycopersicum* expuestas a los extractos de *Tagetes*.

Tratamientos	Tallo (cm)		
	<i>T. minuta</i>	<i>T. erecta</i>	<i>T. minuta in vitro</i>
T0		54,36	
T1	70,22	62,8	-
T2	56,9	63,84	-
T3	54,1	56,7	22

0 = Testigo; 1, 2 y 3 = Tratamientos de menor a mayor.

Cuadro 22: Promedios de longitud de las raíces de las plantas de *Solanum lycopersicum* expuestas a los extractos de *Tagetes*.

Tratamientos	Raíz (cm)		
	<i>T. minuta</i>	<i>T. erecta</i>	<i>T. minuta in vitro</i>
T0		14,72	
T1	14,26	16,48	-
T2	12,48	16,82	-
T3	12,44	13,42	11,2

0 = Testigo; 1, 2 y 3 = Tratamientos de menor a mayor.

b. Número de hojas

Cuantificando el número de hojas, se observó un mayor número en los tratamientos T1 y T2, y ligeramente mayor el de *Tagetes minuta* (Cuadro 23).

Cuadro 23: Promedios del número de hojas de *Solanum lycopersicum* según el extracto y tratamiento utilizado

Tratamientos	Hojas		
	<i>T. minuta</i>	<i>T. erecta</i>	<i>T. minuta in vitro</i>
T0		8	
T1	10,6	9,2	-
T2	9	9	-
T3	8,4	8,8	6,5

0 = Testigo; 1, 2 y 3 = Tratamientos de menor a mayor.

c. Toxicidad de extracto de *T. minuta* y *T. erecta* en plantas de *Solanum lycopersicum*

Se considera que una forma de observar y cuantificar el efecto de los extractos de manera directa en los nemátodos, es la formación de agallas en las raíces atacadas.

La cantidad de agallas desarrolladas en las raíces de *Solanum lycopersicum*, se observaron que las plantas sometidas al extracto de *Tagetes minuta*, de manera general, los tres tratamientos, indujeron una respuesta favorable en la limitación de la proliferación del nemátodo (Anexo 3). El tratamiento T3 en especial obtuvo mejores resultados, ya que solo se contabilizaron en promedio 5 agallas por raíz secundaria (Cuadro 25).

Por otro lado, las plantas sometidas a los extractos de *Tagetes erecta*, también mostraron resultados favorables y mejores en el tratamiento T2 y T3, limitando el desarrollo de agallas casi similar a *Tagetes minuta*; obteniendo por raíz secundaria un promedio de 5 a 6 agallas (Anexo 4 y 6).

Cuadro 24: Promedios del efecto tóxico de los extractos de *Tagetes minuta* de plantas de campo y callos *in vitro*, y de plantas de campo de *T. erecta*.

Tratamientos	Agallas		
	<i>T. minuta</i>	<i>T. erecta</i>	<i>T. minuta in vitro</i>
T0		85	
T1	148,4	215,6	-
T2	103,6	57,4	-
T3	70,2	52,7	387,5

0 = Testigo; 1, 2 y 3 = Tratamientos de menor a mayor.

En el caso del extracto de *Tagetes minuta in vitro*, no se obtuvieron buenos resultados, ya que estas plantas no presentaron un buen desarrollo en comparación a las demás (Anexo 5b y cuadro 24 y 25).

Cuadro 25: Promedio del número de agallas por raíz secundaria de *Solanum lycopersicum* expuestas a los extractos etanólicos de *Tagetes*.

Tratamientos	Agallas en raíces secundarias		
	<i>T. minuta</i>	<i>T. erecta</i>	<i>T. minuta in vitro</i>
T0		8,2	
T1	9,2	17,9	-
T2	8,4	5,6	-
T3	5	6	25

0 = Testigo; 1, 2 y 3 = Tratamientos de menor a mayor.

Cuadro 26: Análisis de varianza (ANOVA) de los cuatro grupos en estudio.

		Suma de	Grados de	Media	F	Sig.
		cuadrados	libertad	cuadrática		
Número de Agallas por Planta	Entre grupos	641348,600	2	320674,300	263,663	,000
	Dentro de grupos	32838,100	27	1216,226		
	Total	674186,700	29			
Longitud de la Planta (cm)	Entre grupos	8977,304	2	4488,652	19,871	,000
	Dentro de grupos	6099,056	27	225,891		
	Total	15076,360	29			
Número de Hojas	Entre grupos	20,067	2	10,033	6,033	,007
	Dentro de grupos	44,900	27	1,663		
	Total	64,967	29			

Los grupos que se analizaron fueron: el testigo, extracto de *Tagetes minuta* y *Tagetes erecta* de campo y el extracto de callos *in vitro* de *T. minuta*. En este análisis se encontró una diferencia significativa en el número de agallas, número de hojas; en las cuales *T. minuta* se obtienen mejores resultados, y en la longitud total de la planta, sobresaliendo *T. erecta* (Cuadro 26).

Cuadro 27: Análisis de varianza (ANOVA) entre los extractos etanólicos de *Tagetes minuta* y *T. erecta* de campo

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrático promedio	F	Sig.
Interceptación	Hipótesis	836159,618	1	836159,618	17,766	,059
	Error	87536,936	1,860	47065,751 ^a		
Extracto	Hipótesis	15,138	1	15,138	,001	,973
	Error	34771,014	3	11590,338 ^b		
Tratamientos	Hipótesis	175922,854	3	58640,951	5,059	,108
	Error	34771,014	3	11590,338 ^b		
Extracto * Tratamientos	Hipótesis	34771,014	3	11590,338	6,335	,001
	Error	131720,696	72	1829,454 ^c		

Entre los grupos de los extractos etanólicos de *Tagetes minuta* y *Tagetes erecta* de campo, no se encontró una diferencia significativa. No obstante, entre tratamientos sí, sobresaliendo el T3 (2,0 mg/L) de ambas especies.

Entre los grupos de extractos de *T. minuta* provenientes de plantas de campo e *in vitro*, sí se observó una diferencia significativa, en la cual el T3 de *T. minuta* de campo inhibió la proliferación del nemátodo, en comparación al extracto etanólico proveniente de callos de *T. minuta in vitro* (Cuadro 27).

V. DISCUSIÓN

Actualmente, una alternativa para tratar plagas y enfermedades en los vegetales y en el hombre, sin causar impactos negativos, indudablemente es utilizando extractos naturales de las plantas (Sharifi-Rad, Salehi, Shafiri-Rad, Setzer, & Iriti, 2018). Las numerosas investigaciones realizadas en especies del género *Tagetes*, muestran el potencial químico que poseen y gracias a ello se debería la actividad biológica que presentan. Quedando evidenciado en las respuestas donde según el análisis Probit DL_{50} , del estadio larval II de *Meloidogyne* spp. enfrentado con los extractos de *Tagetes minuta* y *T. recta* se alcanzó con 1.7 mg/L.

Todos los tejidos evaluados de *Tagetes minuta* contienen componentes biocidas que pueden ser de utilidad en el control de *Meloidogyne*. La calidad y cantidad de estos componentes varían según el estado fenológicos de las plantas y los genotipos, no influyendo el lugar de procedencia (Salehi *et al.*, 2018).

El T3, que incluyó 2,0 mg/L de extracto etanólico de *T. minuta*, ejerció una mayor toxicidad sobre *Meloidogyne* spp. en comparación con el T1(1,0 mg/L) y T2 (1,5 mg/L) del tratamiento en plantas, al presentar menor número de agallas respecto al testigo. Resultados similares fueron reportados por Murga, Alvarado, & Vera (2012) quienes investigaron el efecto del follaje del ‘huacatay’ *T. minuta* sobre la nodulación radicular producida por el nematodo *Meloidogyne incognita* en ‘pimiento páprika’ (*Capsicum annuum*); adicionándole el follaje de *T. minuta* 20, 35 y 50% (v/v), concluyendo que el follaje de *T. minuta*, adicionado al suelo de cultivo de plantas de *C. annuum*, limitaba más no eliminaba en su totalidad la nodulación radicular ocasionada por *M. incognita*.

Los estudios realizados en lulo (*Solanum quitoense* Lam.) indicaron también que el aceite esencial de *Tagetes zypaquirensis*, aplicado a las plantas y suelo presentó actividad nematocida al reducir las poblaciones de *Meloidogyne* (Álvarez *et al.*, 2016). *T. minuta* es usado a su vez como “planta trampa” puesto que al ser infestada por *Meloidogyne incognita*, algunos de estos son capturados, y en su mayoría nunca alcanzan la madurez sexual; en consecuencia, se observa una reducción en la densidad de la segunda generación de *M. incognita* (Suárez *et al.*, 2017).

El extracto etanólico de hojas de *T. minuta* fue el más tóxico, seguido de raíces y las inflorescencias; resultados similares obtuvo Weaver, *et al.*, (1994), por lo que se presume que los extractos de raíces y inflorescencias contienen una cantidad de compuestos que actúan más lentamente con un tiempo de mortalidad más extendido; además, de considerar que la característica volátil de los metabolitos presentes en los capítulos, jugarían un papel en contra de la actividad biocida sobre los nemátodos. En el caso de *T. minuta* se ha determinado alrededor de 67 sustancias químicas, las mismas que en su mayoría estarían presentes en bajas cantidades y en algunos casos en trazas (Salehi *et al.*, 2018).

Si bien la toxicidad de *T. minuta* no muestra efectos de forma instantánea como se ha observado en los plaguicidas químicos; su rápida degradación a la luz solar, carencia de persistencia, selectividad a organismos no destinatarios y carencia de bioacumulación en el ambiente (Grdiša & Gršić, 2013), lo posiciona como un plaguicida botánico de importancia en la protección de los cultivos y en la disminución de riesgos sobre el medio ambiente y la población.

Tanto el extracto de hojas de *T. minuta* como *T. erecta* mostraron un control satisfactorio sobre *Meloidogyne* spp. debido a la presencia de terpenos como limoneno, tagetona y dihidrotagetona (Massuh, 2014), cuyas concentraciones de tagetona llegarían a 7% e

hdihidrotagetona a 37%. En hojas hay menor número de compuestos, pero en mayor cantidad y en raíces de *T. erecta* se encuentran presentes los tiofenos (Salehi *et al.*, 2018), los mismos que ya no serían tan efectivos actualmente sobre los nemátodos.

En general *T. minuta*, mostró ligeramente una mayor toxicidad sobre *Meloidogyne spp.* en comparación con *T. erecta*. Infiérese, sin embargo, que la actividad tendría relación con la variación y volatilización de sus componentes, puesto que la ubicación geográfica no influenciaría marcadamente en la producción de los compuestos activos (Salehi *et al.*, 2018. Makang'A Omache, 2012). Los resultados obtenidos, después de evaluar la formación agallas en las raíces de *Solanum lycopersicum*, indicaron que 100% de las plantas en cada tratamiento presentaron formación de agallas, puesto que el tomate es una planta susceptible al nemátodo (FAO, 2013).

El T3 (2,0 mg/L) del extracto etanólico de hojas de *T. erecta* presentó mayor efecto tóxico al observarse una mayor disminución en la cantidad de agallas en la raíces de *S. lycopersicum*; sin embargo, las plantas tratadas con T1 (1,0 mg/L) y T2 (1,5 mg/L) mostraron un mejor desarrollo en comparación con la planta testigo, como lo manifestaron Natarajan, *et al.*, (2006) al reportar que la altura y número de hojas y rendimiento de los frutos del tomate (*Lycopersicon esculentum*) fueron significativamente mayores en las 51 plantas tratadas con *T. erecta*, respecto a las no tratadas; además, de presentar un índice de agallas radiculares significativamente más bajo en plantas tratadas que en las plantas testigo.

El 90% de la germinación de *T. minuta* y solo 16% de *T. erecta*, se debió principalmente a la calidad de las semillas. Particularmente, en el caso de *T. erecta*, la escasa tasa de germinación se debió a la presencia de *Fusarium spp.*, de comportamiento endógeno, el cual se desarrolla en semillas que se formaron en campo (Amrutha, Rajeswari, & Ramesh, 2014). Los callos inducidos a partir de hojas y entrenudos de plántulas de *T. minuta* mostraron un

porcentaje de desarrollo entre 70-100% y 50-90%, indicando que los tejidos de las hojas son más sensibles que los tejidos de entrenudos a la presencia o actividad de la auxina 2,4- D. La toxicidad del extracto de callos de *T. minuta* fue nula, indicando que los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica no estuvieron en la cantidad o calidad suficiente. Los compuestos responsables de la toxicidad de las especies de Tagetes, ya sean los triterpenoides y esteroides, son altamente volátiles, (Castillo & Barrantes, 2019) lo que habría provocado que no se encontraran resultados favorables con estos extractos.

Posiblemente en la síntesis y almacenamiento de metabolitos secundarios sea necesario un órgano, mas no únicamente las células, dependiendo así de la diferenciación morfológica y bioquímica. En este caso el extracto etanólico de callos T3 (1,5 mg/L), provenientes de hojas *in vitro* de *T. minuta*, no disminuyó el desarrollo de agallas en las raíces en comparación con la planta testigo, contabilizándose 387,5 agallas. Por lo que se presume que los factores a los que se expusieron los cultivos no fueron los indicados para la síntesis de metabolitos secundarios de actividad contra *Meloidogyne* spp.

VI. CONCLUSIONES

En base a la investigación realizada en el presente trabajo se llegó a las siguientes conclusiones:

1. La toxicidad de los extractos etanólicos de hojas de *Tagetes minuta* y *Tagetes erecta* de campo no presentaron una diferencia significativa estadísticamente en su actividad biocida sobre *Meloidogyne spp.*, según el análisis de varianza. Además según la prueba Probit la DL_{50} se alcanzó con una concentración de 1,7 mg/L en ambas especies de Tagetes.
2. El extracto etanólico de hojas de *T. minuta* de campo que mostró mayor tasa de mortalidad sobre *Meloidogyne spp.* en *Solanum lycopersicum* L., fue el T3 (2,0 mg/L), en el cual se formaron 70,2 agallas radiculares en promedio.
3. El extracto etanólico de hojas de *T. erecta* de campo que mostró mayor tasa de mortalidad sobre *Meloidogyne spp.* en *Solanum lycopersicum* L., fue el T3 (2,0 mg/L), en el cual se formaron 52,7 agallas radiculares en promedio.
4. En el único tratamiento, que incluyó 2,0 mg/L de extracto etanólico de callos *in vitro* a partir de explantes de hojas de *T. minuta*, mostró una baja tasa de mortalidad sobre *Meloidogyne spp.*, puesto que se formaron 387,5 agallas radiculares en promedio. Sin embargo, mostró efectividad en las pruebas de toxicidad sobre *Meloidogyne* en condiciones *in vitro*.

VII. RECOMENDACIONES

Basados en los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, se recomienda lo siguiente:

1. Utilizar mayores dosis de extracto etanólico de hojas, inflorescencias y raíces de *T. minuta* y *T. erecta*, para encontrar la DL₅₀ y DL₉₀, con la finalidad de mejorar el control sobre *Meloidogyne* spp. en plantas en condiciones de invernadero y campo.
2. Obtener extractos de plantas de campo en diferentes estadios de desarrollo, para encontrar el momento ideal de la producción de los metabolitos secundarios responsables de la toxicidad sobre nemátodos.
3. Aplicar de manera inmediata los extractos etanólicos, para evitar la pérdida de actividad biocida, debido a la volatilización de los metabolitos secundarios.
4. Explorar otros reguladores de crecimiento en la inducción de callos *in vitro* a partir de explantes de hojas y entrenudos, que permitan un mejor desarrollo de los callos, que el observado en el presente estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. Osman, H., A.Y. El-Gindi, Taha, H., El-Kazzaz, A., Youssef, M., H. Ameen, H., & M. Lashein, A. (2008). Biological Control of Root-knot Nematode *Meloidogyne incognita*: 2- Evaluation of the Nematicidal Effects of *Tagetes erecta* Tissue Culture under Laboratory and Greenhouse Conditions. *Egypt. J. Phytopathol.*, 36(1-2), 33-44.
- Aballay E., E., & Insunza B., V. (Julio de 2002). Evaluación de plantas con propiedades nematocidas en el control de *Xiphinema index* en vid de mesa cv. Thompson Seedless en la zona central de Chile. *Agricultura Técnica* , 62(3), 357-365. Recuperado el 2019
- Ajitomi, A., Taba, S., Ajitomi , Y., Kinjo, M., & Sekine, K.-t. (Marzo de 2018). Efficacy of a Simple Formulation Composed of Nematode-Trapping Fungi and *Bidens pilosa* var. *radiata* Scherff Aqueous Extracts (BPE) for Controlling the Southern Root-Knot Nematode. *Microbes Environ*(33(1)), 4-9. Recuperado el setiembre de 2019
- Alvarez Escobedo, A. M., & Murga Gutiérrez, S. N. (2013). Efecto de tres dosis de *Drechlerella* sp. sobre las poblaciones de *Meloidogyne incognita* en *Asparagus officinalis* cv. UC 157 F2 en invernadero. tesis de pre grado, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo. Recuperado el Enero de 2019
- Álvarez, D. E., Botina, A. J., Ortíz, A. J., & Botina, L. L. (2015). Evaluación nematocida del aceite esencial de *Tagetes zypaquirensis* en el manejo del nematodo *Meloidogyne* spp. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 33(1), 22-23.
- Amrutha Gayathri, D., Krishna Rao, V., Rajeswari, B., & Ramesh Babu, T. (2014). Detection and Identification of Seed Mycoflora of Safflower. *International Journal of Current Research and Academic Review*, 2(1), 41-45.
- Araneda, D. A. (2008). Actividad nematocida sobre *Meloidogyne hapla* de extractos acuosos. UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE, FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS, Valdivia-Chile.

- Carhuapoma Yance, M. (2011). Plantas aromáticas nativas del Perú. Biocomercio de fragancias, sabores y fitocosméticos. Lima, Perú: CONCYTEC.
- Castillo Quispe, M. R., & Barrantes Arriola, C. d. (2019). *Determinación de la DL50 y TL50 de los extractos etanólicos de Tagetes minuta "Huacatay" y Lantana camara "Lantana" sobre Spodoptera frugiperda "gusano cogollero de maíz" en la fase larval del segundo instar, en condiciones de laboratorio*. Tesis de grado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Lima. Recuperado el Octubre de 2019
- Coyne, D., Nicol, J., & Claudius-Cole, B. (2009). *Nematología práctica: Una guía de campo y laboratorio*. Instituto Internacional de Agricultura y el Centro Internacional de Mejora del Maíz y trigo. Cotonou, Benin: International Institute of Tropical Agriculture. Recuperado el Abril de 2018
- Croes, A. F., Arts, A. M., Bosveld, M., & Wullems, G. J. (1989). Control of thiophene accumulation in calli of two *Tagetes* species. *Physiology Plant*, 205-210.
- Chamorro, E., Ballerini, G., Sequeira, A., Velasco, G., & Zalazar, M. (2008). Chemical Composition of Essential Oil From *Tagetes Minuta* L. Leaves and Flowers. *Journal of the Argentine Chemical Society*, 96(1-2), 80-86. Recuperado el Junio de 2018
- Delgado Zegarra, J., Alvarez Risco, A., & Yáñez, J. A. (2018). Uso indiscriminado de pesticidas y ausencia de control sanitaria para el mercado interno en Perú. *Panam Salud Pública*(48), 6. Recuperado el Julio de 2019
- Díaz, F., Serrato, M., Arce, M., & León, J. (2012). Composición del aceite esencial de *Tagetes lacera*, planta endémica de Baja California del Sur, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 543 - 547. Recuperado el 2019
- Dixit Priyanka, T. S., & Verma Kumar, N. (2013). A Brief Study on Marigold (*Tagetes* species): a Review. *Internacional Research Journal of Pharamacy*(4(8)), 43-48.
- Ekcs-Kretovics, J., Ekcs, M., Gyurjan, I., Hethelyi, E., & Danos, B. (1993). Accumulation of essential oil components in tissue cultures of *Tagetes minuta* L. *Acta. Horti.*, 243-247.
- FAO. (2008). *Workshop on non-chemical alternatives to replace methyl bromide as a soil fumigant*. FAO. Rome: R. Labrada.

- FAO. (2013). *El cultivo de tomate con buenas prácticas agrícolas en la agricultura urbana y periurbana*. FAO. Obtenido de <http://www.fao.org/3/a-i3359s.pdf>
- FAO. (18 de Enero de 2019). *Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura*. Obtenido de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- Farfan Menendez, M. D. (2011). “*Comportamiento del nemátodo del nódulo Meloidogyne incognita (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 con 12 productos químicos*”. Lima. Perú: Universidad Agraria la Molina.
- Ferreira, J., & Janick, J. (1996). Roots as an enhancing factor for the production of artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua*. *Plant Cell, tissue and organ culture*, 211-21. Recuperado el Diciembre de 2018
- García Calvario, J. M. (2013). *Evaluación de la Efectividad Biológica de Extractos de Nogal Carya illinoensis Koch, para el Control del Nemátodo Agallador Meloidogyne incognita en Tomate Solanum Lycopersicum., bajo condiciones de Invernadero*. Tesis , Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Parasitología, Saltillo, Coahuila, México. Recuperado el Setiembre de 2018, de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4381/T19996%20GARCIA%20CALVARIO,%20JOSE%20MIGUEL%20%20TESIS.pdf?sequence=1>
- Grdiša, M., & Gršić, K. (2013). Botanical insecticide in plant protection . *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 85-93.
- Hidalgo M., A. (1995). *Evaluación de diferentes métodos para la obtención, in vitro, de callos de marigold, Tagetes erecta L*. Undergraduate thesis, Universidad Nacional de Colombia, Faculty of Agricultural Science, Medellín, Colombia.
- Iannacone, J., Alvarino, L., Guabloche, A., Ventura, K., La Torre, M. I., Carhuapoma, M., & Castañeda, L. (2017). Efecto tóxico agudo y crónico de *Tagetes minuta* "Huacatay" (Asteraceae) y carbaril sobre seis entomofagos de importancia en control biológico. *The biologist (Lima)*, 15, 85-97.
- Integrated Taxonomic Information System. (2013). *Taxonomía del género Meloidogyne*. Recuperado el Mayo de 2018, de <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2013/browse/tree/id/13177085>

- Jaramillo N., J., Rodriguez, V. P., Guzman, A. M., Zapata, M., & Rengifo M. (2007). *Buenas prácticas agrícolas en la producción de tomate bajo condiciones protegidas*. Gobernación de Antioquia: FAO.
- Koichi Numata, { . I. (2011). Estudio sobre el caso de la producción creciente del tomate en los desiertos mediante el sistema agrario con poco insumo: desafíos en la zona
- Krueger, R., Dover, K., McSorley, R., & Wang, H. (2010). *Marigolds (Tagetes spp.) for Nematode Management. ENY-056 (NG045)*. University of Florida, Gainesville, FL., Entomology & Nematology Department, Florida. Recuperado el Junio de 2018
- Liza, M., Bonzani, N., & Zygadlo, J. (2009). Allelopathic potencial of *Tagetes minuta* terpenes by a chemical, anatomical and phytotoxic approach. *Biochemical, Systematic and Ecology*, 36: 882-890. Recuperado el Junio de 2018
- Makang' A Omache, B. (September de 2012). Composition and repellency of essential oils of *Tagetes minuta* from different zones in Kenya against brown ear tick (*Rhipicephalus appendiculatus*). Nairobi, Kenia: Kenyatta University.
- Massuh, Y. (2014). *Estudio de caracteres morfológicos y bioquímicos en Suico (Tagetes minuta L.)*. IMBIV. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Recuperado el 2019
- Méndez García, E. F. (2009). *El cultivo de Marigold (Tagetes erecta L.) en el Perú: presente y futuro*. Tesis para optar el grado de Magister Scientiae, Universidad Nacional Agraria La Molina, Escuela de Post Grado, Lima. Recuperado el Junio de 2019
- MINAGRI. (2018). *Plan nacional de cultivos (Campaña Agrícola 2018-2019)*.
- Mohamed, M.-H., Harris, P. J., & Henderson, J. (1999). An efficient in vitro regeneration protocol for *Tagetes minuta*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 211-215.
- Mokrini, F., Janati, S., Houari, A., Essarioui, A., Bouharroud, R., & Mimouni, A. (2018). Management of plant parasitic nematodes by means organic amendment. *Rev. Mar. Sci. Agron.*(6(3)), 337-344. Recuperado el setiembre de 2019
- Murga Gutiérrez, S. N., Alvarado Ibáñez, J. C., & Vera Obando, N. Y. (Diciembre de 2012). Efecto del follaje de *Tagetes minuta* sobre la nodulación radicular de *Meloidogyne incognita* en *Capsicum annum*, en invernadero. *Revista Peruana de Biología*, 3(19), 257-260.

- Natarajan, N., Cork, A., Pandi, R., Velavan, S., Boomathi, N., & Dhakshnamoorthy, G. (2006). Cold aqueous extracts of African marigold, *Tagetes erecta* for control tomato root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Crop Protection*, 1210-1213.
- Perry, R., Moens, M., & Starr, J. (2009). *Root-Knot Nematodes. First edition*. London, United Kingdom. CABI. Recuperado el Abril de 2018, de http://books.google.cl/books?id=ACmHXeF8SHQC&pg=PA70&lpg=PA70&dq=Rootknot+nematodes+Escrito+por+Roland+N.+Perry,Maurice+Moens,James+L.+Starr&source=bl&ots=2pWJ9Zg_T5&sig=AEJjA5TM0IAaw5Vb0k3R7Sh7Qg&hl=es&ei=0Ot0TeKNGo_2gAfqyM0_&sa=X&oi=book_result&ct=resu
- Restrepo Bolívar, J. D. (2015). *Identificación de los impactos ambientales asociados al uso de pesticidas en la producción de gulupa (Passiflora edulis sim) en dos sistemas de producción: tecnificado y convencional*. Caldas, Antioquia: Corporación Universitaria Lasallista.
- Roca, M., & Mroginski, L. (1991). *Cultivo de Tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- S.A.C., C. A. (2005). *Nemathor 20L*. Folleto Técnico, Lima. Perú.
- Salas F., C., Quiroz E., C., & Puelles T., J. (2016). *Plagas del tomate: Pulgones*. Instituto de investigación agropecuarias INIA Intihuasi. Santiago, Chile: Ministerio de agricultura.
- Salehi, B., Valussi, M., Bezerra Morais-Braga, M. F., Pereira Carneiro, J. N., Alves Borges Leal, A. L., Melo Coutinho, H. D., Sharifi-Rad, J. (2018). *Tagetes spp. Essential Oils and Other Extracts: Chemical Characterization and Biological Activity*. *Molecules*, 23(1), 1-35.
- Santa María, J., Sifuentes, E., Albújar, V., Cajas, J. C., & León, C. (2018). *"Boletín Estadístico de Producción Agrícola y Ganadera" IV Trimestre 2017*. Boletín, Ministerio de Agricultura y Riego, Lima. Recuperado el Setiembre de 2018, de http://siea.minagri.gob.pe/siea/sites/default/files/produccion-agricola-ganadera-ivtrimestre2017_220318_0.pdf
- Seminis. (s.f.). *Seminis Vegetable*. Recuperado el Abril de 2018, de <http://www.seminis-las.com/recursos/guias-de-enfermedades/tomates/southern-root-knot-nematode-syn-root-knot-root-gall/>

- Shahzadi, I., Hassan, A., Khan, U., & Shah, M. (2010). Evaluating biological activities of the seed extracts from *Tagetes minuta* L. found in Northern Pakistan. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(20), 2108-2112. Recuperado el Mayo de 2019
- Sharadchandra, P., Koon-Hui, W., & Brent S., S. (2012). Effects of *Tagetes patula* on Active and Inactive Stages of Root-Knot Nematodes. *Journal of Nematology*, 1(44), 26-30.
- Sharifi-Rad, M., Salehi, B., Shafiri-Rad, J., Setzer, W., & Iriti, M. (2018). *Pulicaria vulgaris* gaertn. Essential oil: An alternative or complementary treatment for leishmaniasis. *Cell. Mol. Biol.*(64), 18-21. Recuperado el Setiembre de 2019
- Singh, V., Singh, B., & Kaul, V. K. (2003). Domestication of wild marigold (*Tagetes minuta* L.) as a potential economic crop in western Himalaya and north Indian plains. *Econ. Bot.*, 535-544.
- Solano Castillo, T. F., Quezada Zapata, C., Agurto Córdova, G. B., Ruiz Toledo, J., & Del Pozo Nuñez, E. (2012). *Efecto de extractos botánicos estandarizados para control de cogollero y nematodo agallador en el cultivo de tomate de mesa*. Universidad Nacional de Loja, Ecuador. Recuperado el Junio de 2019, de ediciones.inca.edu.cu/files/congresos/2012/CD/memorias/ponencias/.../AES-P.57.pdf
- Soule, J. A. (1993). *Tagetes minuta : Una nueva hierba potencial de América del sur*. Nueva York: J. Janick y JE Simon (eds.).
- Suárez Tamayo, S., Palacio Estrada , D. E., & Del Puerto Rodríguez, A. M. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Cubana Hig Epidemiol*, 3(52), 372-87.
- Suárez, S. A., Gil, A., Ghersa, C. M., C. Tordable, M., & De La Fuente, E. (2017). Efecto de diferentes proporciones de *Tagetes minuta* y *Glycine max* sobre *Meloidogyne incognita*. *Ecología Austral*, 210-218.
- Venegas Espinoza, P. E., Benítez García, I., Leyva Peralta, A. L., Paredes López, O., & Del Villar Martínez, A. (2017). Somatic embryogenesis from leaf explants of *Tagetes erecta* L. *Plant Biotechnology*, 187-192. Recuperado el setiembre de 2019
- Ventura Araujo, P., Delgado Leão Ramos, M., & Pires de Carvalho, M. (2006). *Um Porto de ávores*. Portugal: Campo Aberto.

Wang, K.-H., Hooks, C., & Ploeg, A. (2007). . *Protecting crops from nematode pests: Using marigold as an alternative to chemical nematicides*. University of Hawaii, Honolulu.

Weaver, D. K., Wells, C. D., Dunkel, F. V., Bertsch, W., Sing, S. E., & Sriharan, S. (1994). Insecticidal Activity of Floral, Foliar, and Root Extracts of *Tagetes minuta* (Asterales: Asteraceae) Against Adult Mexican Bean Weevils (Coleoptera: Bruchidae). *Entomological Society of América*, 1718-1725.

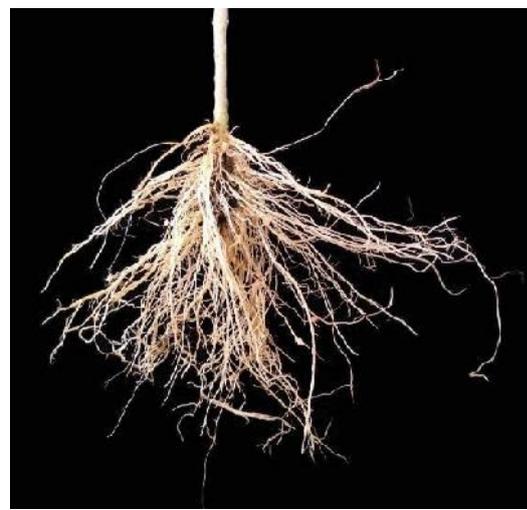
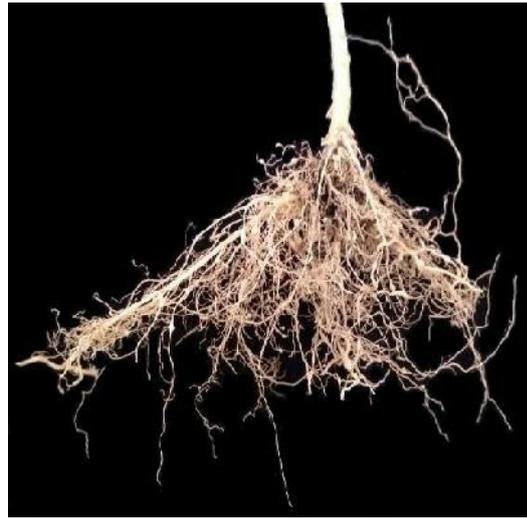
5. ANEXOS



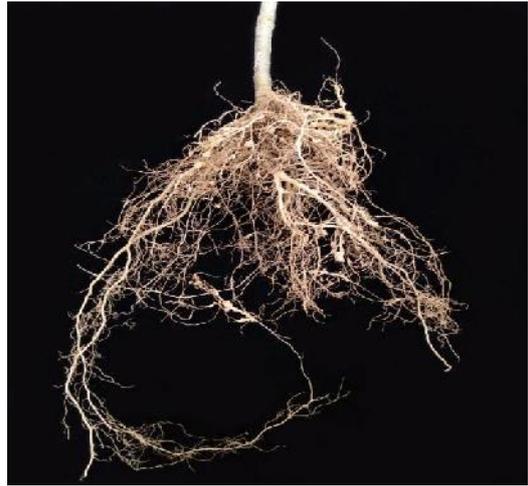
Anexo 1: *Tagetes minuta* *in vitro*: **a.** Frascos con semillas en germinación, **b.** Crecimiento de las plántulas a los 8 días, **c.** Formación de la planta a los 30 días.



Anexo 2: *Solanum lycopersicum*: **a.** Plantas instaladas en terrinas, **b.** Plantas aptas para infestación con edad de 37 días, **c.** Plantas sometidas a los tratamientos con los extractos etanólicos.



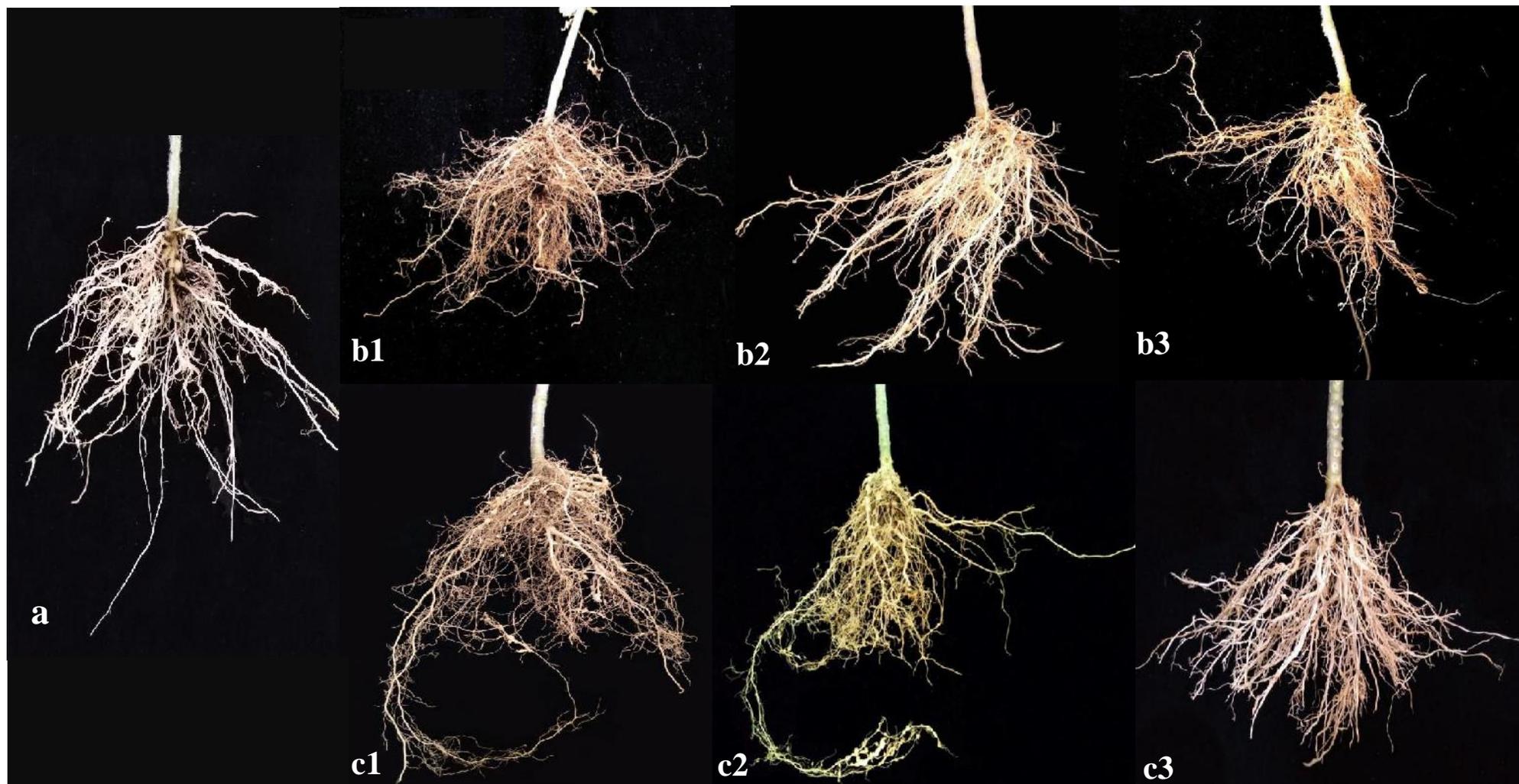
Anexo 3: *Solanum lycopersicum*: **a.** Planta tratada con T1 de *Tagetes minuta*, **b.** Planta tratada con T2 de *T. minuta*, **c.** Planta tratada con T3 de *T. minuta*.



Anexo 4 : *Solanum lycopersicum*: **a.** Planta tratada con T1 de *Tagetes erecta*, **b.** Planta tratada con T2 de *T. erecta*, **c.** Planta tratada con T3 de *T. erecta*.



Anexo 5: *Solanum lycopersicum*: **a.** Planta testigo, **b.** Planta tratada con extracto al 2,0 mg/L de callos *in vitro* provenientes de hojas de *Tagetes minuta*.



Anexo 6: Raíces de *Solanum lycopersicum*: **a.** Testigo, **b.** T1, T2 y T3 de *Tagetes minuta* de campo, **c.** T1, T2 y T3 de *T. erecta* de campo.