



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
UNIDAD DE POSGRADO
MAESTRÍA EN MANEJO FORESTAL SOSTENIBLE

Proyecto de investigación y desarrollo previo a la obtención del Grado Académico Magíster en Manejo Forestal Sostenible

TEMA:

ACEITES ESENCIALES DE *Tagetes* spp. (FLOR DE MUERTO) Y SU EFECTO BACTERICIDA A *Ralstonia solanacearum* EN CONDICIONES *IN VITRO*

AUTOR:

ING. EDGAR MESIAS QUINTANA ÁLAVA

DIRECTOR:

DR. HAYRON FABRICIO CANCHIGNIA MARTINEZ

Quevedo - Ecuador

Año 2020



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
UNIDAD DE POSGRADO
MAESTRÍA EN MANEJO FORESTAL SOSTENIBLE

Proyecto de investigación y desarrollo previo a la obtención del Grado Académico Magíster en Manejo Forestal Sostenible

TEMA:

ACEITES ESENCIALES DE *Tagetes* spp. (FLOR DE MUERTO) Y SU EFECTO BACTERICIDA A *Ralstonia solanacearum* EN CONDICIONES *IN VITRO*

AUTOR:

ING. EDGAR MESIAS QUINTANA ÁLAVA

DIRECTOR:

DR. HAYRON FABRICIO CANCHIGNIA MARTINEZ

Quevedo - Ecuador

Año 2020

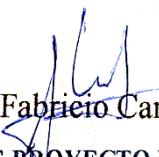
CERTIFICACIÓN.

Dr. PhD HAYRON FABRICIO CANCHIGNIA MARTINEZ en calidad de Director del perfil de investigación, previa a la obtención del Grado Académico de Magíster en Manejo Forestal Sostenible.

CERTIFICA:

Que el Ing. Forestal. EDGAR MESIAS QUINTANA ALAVA, autor del perfil de investigación titulado “**Aceites esenciales de Tagetes spp. (flor de muerto) y su efecto bactericida a *Ralstonia solanacearum* en condiciones *in vitro***”. Ha sido revisada en todos sus componentes, la misma que está apta para la presentación y sustentación formal ante el tribunal respectivo.

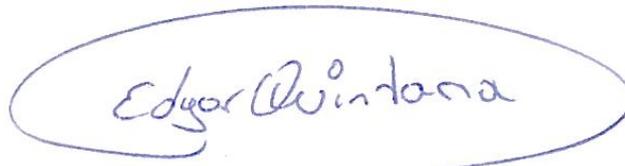
Quevedo, enero del 2020.


Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

AUTORIA

Yo, **EDGAR MESIAS QUINTANA ALAVA** declaro que los criterios, resultados, análisis, conclusiones y recomendaciones expuestas en el presente trabajo de investigación son de total y exclusiva responsabilidad del autor, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, y por la normatividad institucional vigente.

A handwritten signature in blue ink that reads "Edgar Quintana". The signature is enclosed within a hand-drawn blue oval. Below the signature is a solid horizontal line.

Ing. Forestal Edgar Mesias Quintana Alava.

DEDICATORIA

En primer lugar a Dios, por los obstáculos que me ha puesto durante todo el trayecto de la carrera, permitiéndome mejorar mis habilidades, aumentando mis fuerzas y determinación en mi vida para realizar mis metas y objetivos propuestos.

A mis padres, por ser un pilar de apoyo fundamental para lograr ser lo que soy ahora, por darme las fuerzas y valentía en mi vida.

A mis compañeras de trabajo NOVOPAN por el apoyo, para poder cumplir con mis responsabilidades como maestrante.

A los docentes de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, que forjaron mis conocimientos, enseñanzas y por apoyo para la culminación de este trabajo de investigación.

AGRADECIMIENTO

El autor de la presente investigación quiere dejar constancia de su sincero agradecimiento a las personas que hicieron posible la culminación de la misma.

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, institución que me acogió como estudiante, forjo mis conocimientos y habilidades.

A los docentes, con sus enseñanzas permitiéndome mejorar cada vez más como estudiante.

Le agradezco a mi Director de tesis, Ing. Hayron Canchignia Martínez PhD, por su apoyo y motivación lograr la culminación exitosa de Este trabajo de investigación.

A mi madre, por apoyo moral y esfuerzo para que pueda cumplir todas las metas propuestas.

PRÓLOGO

La marchitez bacteriana ocurrente en plantaciones de Eucalipto (*E. urograndis*) causada por *R. solanacearum* es una problemática que cada vez toma mayor fuerza en el país a causa de la extensión en superficie que esta especie de explotación forestal está teniendo.

Actualmente el manejo de enfermedades bacterianas en cultivos resulta en el uso de plaguicidas de origen químico que resulta en resistencia del microorganismo patogénico así como problemas derivados como pérdida de biodiversidad microbiana, generación de resistencia del microorganismo a controlar y contaminación ambiental.

Por ende en la actualidad se exploran nuevas estrategias de control que incluye el uso de microorganismos antagonistas, implementación de prácticas ecológicas o uso de aceites esenciales de plantas con compuestos bioactivos capaces de controlar los agentes causales.

Los contenidos presentados en la investigación “**ACEITES ESENCIALES DE *Tagetes* spp. (FLOR DE MUERTO) Y SU EFECTO BACTERICIDA A *Ralstonia solanacearum* EN CONDICIONES *IN VITRO*”**. Exponen un trabajo investigativo de tipo experimental apoyado por información de artículos científicos relacionados al control de *R. solanacearum* mediante el uso de plantas con compuestos bioactivos del género *Tagetes* spp.

Este trabajo analiza la obtención de aceite esencial de especies de *Tagetes* spp. así como su uso a nivel *in vitro* frente a *R. solanacearum* como punto de partida lo que potencialmente podría representar una opción para el control de la misma en plantaciones de *E. urograndis*. Esto resultaría en reducir el uso de pesticidas para su control minimizando el impacto causado en el medio ambiente y la salud humana.

RESUMEN

Ing. Rolando López Tobar, MsC
COORDINADOR DE LA CARRERA DE INGENIERIA FORESTAL

En la presente investigación se evaluó el aceite esencial obtenido a partir de flores y hojas por separado de dos especies de *Tagetes* spp. procedentes de región costa (planta costa)

y Sierra (planta sierra). Como inhibidores del crecimiento de *R. solanacearum* a nivel *in vitro*, se empleó un diseño completamente al azar 4 x 5. Los aceites esenciales de hojas y flores fueron obtenidos mediante hidrodestilación, se evaluó el rendimiento de extracción de los aceites esenciales obteniendo que los más altos rendimientos se dieron a partir de las hojas de ambas especies evaluadas: con 0,0178 y 0,01576% para planta costa y planta sierra, respectivamente mientras que los tratamientos correspondientes a las flores y fragmentos de cáliz presentaron rendimientos de 0,00684 y 0,00316% para planta sierra y planta costa. Las pruebas cualitativas dieron como resultado: Gram (-), catalasa (+) y sin mostrar fluorescencia bajo UV a 360 Nm compatibilizando con las características descritas en la literatura para esta bacteria. Se determinó la cinética de crecimiento de *R. solanacearum* en medio de cultivo King B como punto de partida para determinar el tiempo de incubación máxima para realizar los ensayos de inhibición, a la par se realizó otra cinética con la adición del solvente de los aceites esenciales (etanol al 70%-3% V/V). Se determinó que la fase estacionaria se alcanza a las 12 horas de incubación. La evaluación de dos concentraciones (2 y 3%) de aceite esencial frente al patógeno no fue suficientes para alcanzar la Concentración mínima inhibitoria –MIC debido a la presencia de turbidez en todos los ensayos. Los sub-cultivos realizados mostraron que no existió dentro de las concentraciones evaluadas Concentración Mínima Bactericida-MBC, no obstante los resultados indican que todas las concentraciones ejercieron cierta inhibición del crecimiento bacteriano destacándose el aceite esencial obtenido de flores de la planta costa con porcentaje de inhibición de 90.13%.

Palabras clave: Hidrodestilacion, Cinética de crecimiento, Aceite esencial, Concentración mínima inhibitoria –MIC, Concentración Mínima Bactericida-MBC.

ABSTRACT

In the present investigation, the essential oil obtained from flowers and leaves was evaluated separately from two species of *Tagetes* spp. coming from the coastal region (floor 1) and Sierra (floor 2). As inhibitors of the growth of *R. solanacearum* at the *in*

vitro level, s and used a completely randomized design 4 x 5. The essential oils of leaves and flowers were obtained by means of hydrodistillation, the extraction performance of the essential oils was evaluated, obtaining that the highest yields were obtained from the leaves of both species evaluated: with 0.0178 and 0.01576 % for plant 1 and plant 2, respectively, while treatments corresponding to flowers and fragments of calyx showed yields of 0.00684 and 0.00316% for plant 2 and plant 1. Qualitative tests gave as a result: Gram (-), catalase (+) and without showing fluorescence under UV at 360 Nm, making compatible with the characteristics described in the literature for this bacterium. The growth kinetics of *R. solanacearum* in King B culture medium was determined as a starting point to determine the maximum incubation time to perform the inhibition tests, at the same time another kinetics was performed with the addition of the solvent of the essential oils (70% ethanol -3% V / V). It was determined that the stationary phase is reached at 12 hours of incubation. Evaluation of two concentrations (2 and 3%) essential oil against the pathogen not been sufficient to meet the minimum inhibitory concentration -MIC due to the presence of turbidity in all ensa yos. The sub - cultures performed showed that there existed within the concentrations evaluated Concentration Minimum Bactericidal-MBC, however los results indicate that all concentrations exerted some inhibition of bacterial growth emphasizing the essential oil obtained from flowers of the plant 1 with percent 90.13% inhibition.

Key words: Hydrodistillation , Growth kinetics, Essential oil, Minimum inhibitory concentration - MIC, Minimum Bactericidal Concentration-MBC.

INDICE

CARATULA.....	i
HOJA EN BLANCO.....	ii
COPIA DE CARATULA.....	iii

CERTIFICACIÓN	iv
AUTORIA	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
PRÓLOGO.....	viii
RESUMEN	viii
ABSTRACT.....	ix
INDICE.....	x
INDICE DE TABLAS	xiii
INDICE DE FIGURAS.....	xiv
INDICE DE ANEXOS.....	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	4
MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACION	4
1.1. UBICACIÓN Y CONTEXTUALIZACIÓN DE LA PROBLEMÁTICA	5
1.2. SITUACION ACTUAL DE LA PROBLEMÁTICA.....	6
1.3. PROBLEMA DE INVESTIGACION	6
1.3.1. Problema general	6
1.3.2. Problemas derivados	7
1.3.3. Delimitación del problema.....	7
1.4. OBJETIVOS	7
1.4.1. General.....	7
1.4.2. Específicos.....	8
1.5. JUSTIFICACION.....	8
CAPITULO II	10
MARCO TEORICO DE LA INVESTIGACION	10
2.1. FUNDAMENTACIÓN CONCEPTUAL	11
2.1.1. <i>Ralstonia solanacearum</i>	11
2.1.1.1. Taxonomía de <i>R. solnacearum</i>	11
2.1.1.2. Descripción	11
2.1.2. Eucalipto (<i>Eucalyptus urograndis</i>)	16
2.1.2.1. Taxonomía de <i>E. urograndis</i>	16
2.1.2.2. Descripción	16
2.1.2.3. Propiedades organolépticas	18
2.1.2.4. Propiedades físicas y mecánicas	18
2.1.3. Infección y sintomatología de <i>R. solanacearum</i> en Eucalipto (<i>Eucalyptus urograndis</i>). ..	19

2.1.4. Control de marchitez bacteriana provocada por <i>R. solanacearum</i>	21
2.1.5. Aceites esenciales.....	23
2.1.6. Destilación por arrastre de vapor	23
2.1.7. Flor de muerto (<i>Tagetes</i> spp).....	24
2.2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	27
2.2.1. Fitogeografía y ecología del género <i>Eucalyptus</i>	27
2.2.2. Efecto de algunos aceites esenciales sobre el crecimiento de <i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary en condiciones de laboratorio	28
2.2.4. Efecto <i>in vitro</i> de aceites esenciales sobre <i>Alternaria solani</i> Sorauer.....	29
2.2.5. Extractos de <i>Tagetes patula</i> , L. (Asteraceae): un potencial bactericida contra el MOKO 30	
2.2.6. Efecto de prácticas ecológicas sobre la población de <i>Ralstonia solanacearum</i> Smith, causante de moko de plátano	31
2.2.7. Evaluación del efecto de microorganismos antagonistas en el control de la marchitez bacteriana (<i>Ralstonia solanacearum</i> e. f. smith), presente en plantaciones de eucalipto tropical (<i>Eucalyptus urograndis</i>) en la hacienda Los Ángeles, cantón Buena Fe, provincia de Los Ríos.....	32
2.3. FUNDAMENTACIÓN LEGAL	33
2.3.1. Constitución del Ecuador	33
2.3.2. Reforma del libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria (2015).....	36
METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION	38
3.1. TIPO DE INVESTIGACION	39
3.2. METODO DE INVESTIGACION	39
3.3. FUENTES DE RECOPIACION DE LA INFORMACION.....	40
3.4. INSTRUMENTO DE INVESTIGACION	40
3.5. MATERIAL GENÉTICO	41
3.6. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN	42
3.7. TRATAMIENTOS EVALUADOS	42
3. 8. DISEÑO EXPERIMENTAL	43
3. 9. MANEJO DEL EXPERIMENTO.....	44
3. 9. 1 Obtención de las muestras.....	44
3. 9. 2 Obtención de los aceites esenciales.....	44
3. 9. 3 Pruebas cualitativas de comprobación de <i>R. solanacearum</i>	46
3.9.3.1. Tinción de Gram.....	46
3.9.3.2. Prueba de catalasa.....	47
3.9.3.3. Prueba de emisión de Fluorescencia bajo luz ultravioleta a 360 nm.	47
3.9.4. Determinación de la capacidad bactericida de los aceites esenciales de hojas y flores de <i>Tagetes</i> spp.....	47

3.9.4.1. <i>Cinética de crecimiento de R. solanacearum</i>	48
3.9.4.2. <i>Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria - MIC</i>	50
3.9.4.3. <i>Determinación de la Concentración Mínima Bactericida - MBC</i>	51
3.9.5. Variables a evaluar.....	52
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
4.1. RESULTADOS.....	54
4.1.1. Contenido de humedad y Porcentajes de rendimiento de Aceite esencial de hojas y flores de dos especies de <i>Tagetes</i> spp.....	54
4.1.2. Pruebas cualitativas para comprobación de <i>R. solanacearum</i>	56
4.1.2.1. <i>Tinción de Gram</i>	56
4.1.2.2. <i>Prueba de catalasa</i>	57
4.1.2.3. <i>Prueba de emisión de Fluorescencia a UV de 360 nm.</i>	58
4.1.3. Determinación de la capacidad bactericida de los aceites esenciales de hojas y flores de <i>Tagetes</i> spp.....	59
4.1.3.1. <i>Cinética de crecimiento de R. solanacearum en medio de cultivo King B</i>	59
4.1.3.2. <i>Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria – MIC</i>	62
4.1.3.3. <i>Determinación de la Concentración Mínima Bactericida – MBC</i>	62
4.2. DISCUSIÓN.....	64
CAPITULO V.....	69
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	69
5.1. CONCLUSIONES.....	69
5.2. RECOMENDACIONES.....	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
ANEXOS.....	80

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>R. solanacearum</i>	11
Tabla 2. Clasificación taxonómica del Eucalipto tropical.....	16
Tabla 3. Propiedades organolépticas de <i>E. urograndis</i>	18
Tabla 4. Propiedades físicas y mecánicas del Eucalipto.....	18
Tabla 5. Esquema del análisis de la varianza para obtención de aceites esenciales.....	43
Tabla 6. Esquema del ADEVA para la MIC Y MIB.....	44

Tabla 7. Porcentaje de humedad y rendimiento de extracción de aceite esencial de hojas y flores de dos especies de <i>Tagetes</i> pp.	55
Tabla 8. Parámetros cinéticos de <i>R. solanacearum</i> en medios King B y King B con etanol al 70% (3% V/V).....	62
Tabla 9. Parámetros cinéticos y porcentaje de control de <i>R. solanacearum</i> en medio de cultivo King B líquido mediante la aplicación de 2 concentraciones de aceite esencial obtenido de dos especies de <i>Tagetes</i> spp.....	64

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Colonias típicas de <i>R. solanacearum</i> creciendo en medio Kelman	12
Figura 2. Pus bacteriano <i>R. solanacearum</i> sobre Eucalipto	20
Figura 3. Plantación de flor de muerto (<i>Tagetes</i> spp.).....	26
Figura 4. Rendimientos de extracción de aceite esencial de hojas y flores de dos especies de <i>Tagetes</i> spp. Las barras de error indican \pm ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Duncan).....	55
Figura 5. A. colonias de <i>R. solanacearum</i> tras 72 horas de incubación en medio de cultivo TZC (Kelman). B. resultados de tinción de gram de <i>R. solanacearum</i> (Magnificación 40x)	56
Figura 6. Resultado de prueba de Catalasa de <i>R. solanacearum</i> (Magnificación 10x)...	57
Figura 7. Prueba de emisión de Fluorescencia bajo luz UV a 360 nm A. Cepa de <i>P. Fluorescens</i> en medio líquido y sólido sobre sobre transluminador B. <i>R. solanacearum</i> en medio líquido y sólido sobre transluminador. Se evidencia la emisión de fluorescencia por parte de la cepa control mientras que <i>R. solanacearum</i> no fluorescente en medio King B.	58
Figura 8. Cinética de crecimiento de <i>R. solanacearum</i> en medio de cultivo King B. A. concentración celular. B. Densidad óptica a 600 NM. el eje de las (y)= Concentración celular y densidad óptica; (x)= Horas transcurridas.	60
Figura 9. Cinética de crecimiento de <i>R. solanacearum</i> en medio de cultivo King B. y King B suplementado con etanol al 70% (3% V/V).	61

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Certificado URKUND del reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico.	80
Anexo 2.	Razas y biovariedades de <i>R. solanacearum</i>	82
Anexo 3.	Flores de <i>Tagetes</i> spp. procedentes de región costa (planta costa)	82
Anexo 4.	Flores de <i>Tagetes</i> sp. Región Sierra(planta2)	83
Anexo 5.	Pesaje del tejido para determinación del porcentaje de humedad.....	83
Anexo 6.	Equipo de hidroddestilacion utilizado para realización de ensayos de extracción.....	84
Anexo 7.	Curva de calibración Densidad óptica (D.O.) y concentración celular (UFC/ml) de <i>R. solanacearum</i> incubada en King B.	84
Anexo 8.	Determinación de parámetros cinéticos mediante Software Estadística y modelo matemático de Gompertz.	85
Anexo 9.	Disminución del número de colonias bacterianas por efecto de Aceite esencial de flores al 3%. A. control B. Aceite esencial planta uno 3%. C. aceite esencial planta dos al 3 %	85

INTRODUCCIÓN

La bacteria *Ralstonia solanacearum* es un microorganismo de gran importancia a nivel mundial debido a ser un fitopatógeno, con una amplia distribución y con un amplio rango de hospederos. El principal efecto fisiológico que causa este patógeno en sus hospederos se denomina marchitez, que se da cuando las hojas pierden turgencia y decaen junto con toda la planta, debido a una obstrucción de los tejidos conductores que transportan el agua y nutrientes a través del tallo lo cual finaliza con la muerte de la planta.

La marchitez bacteriana producida por este microorganismo, es una enfermedad que devasta numerosos cultivos de importancia económica entre los que se cuentan el tomate, la papa, el plátano y en algunas plantas de interés ornamental y Eucalipto, la cual es la planta de interés para el desarrollo de esta investigación. Por su distribución y amplio rango de hospederos se la considera uno de los microorganismos más estudiados de la historia por ende, las estrategias de control adquieren gran importancia en las zonas tropicales y subtropicales (Rueda *et al.*, 2014).

En el Ecuador el cultivo de Eucalipto tiene trascendencia económica. (*Eucalyptus urograndis*) es una de las especies más plantadas en el mundo, una de las zonas de mayor producción de este cultivo es en la sierra ecuatoriana, es una especie rustica de rápido crecimiento y con gran valor comercial debido a ser una madera muy fina muy cotizada en el mercado local. (Remache, 2018).

Pese a los datos antes descritos, en los últimos años se ha observado aumentos en la problemática sanitaria con enfermedades causadas por hongos y bacterias. Tomando relevancia los de origen bacteriano y destacándose *Ralstonia solanacearum*, la cual constituye potencialmente una de las principales enfermedades de la especie. Esta enfermedad es de gran importancia, en virtud de la naturaleza sistémica de las infecciones, de los daños causados y de las diversas características del patosistema que dificultan su control (Remache, 2018).

Dentro de las estrategias de control de fitopatógenos se encuentra el control químico el cual es una amenaza para el medio ambiente, así como es causante de la destrucción de organismos benéficos propiciando desequilibrio microbiológico y por ende favoreciendo al aumento de las poblaciones de patógenos resistentes, debido se opta por el uso de otras estrategias de control, en este caso mediante la obtención de aceite esencial de dos especies de flor de muerto (*Tagetes spp.*).

Especies de flor de muerto (*Tagetes spp.*) contiene compuestos como alcaloides , piretrinas y ácido tánico tiofenos, que son derivados sulfurados letales contra algunos hongos y bacterias , lo cual define a esta como potencial inhibidor de crecimiento a nivel *in vitro* de *R. solanacearun*.(Arenas *et al.*, 2004).

El **primer capítulo** contiene el Marco Contextual, en éste se describe la situación actual de la problemática de la investigación, además contiene la Ubicación y contextualización

de la problemática, Problemas de investigación, Delimitación del Problema, Justificación, Cambios esperados con la investigación, Objetivo General y Específicos.

El **segundo capítulo** abarca la fundamentación conceptual, teórica y legal, sustentándose las variables de la investigación.

El **tercer capítulo** hace referencia a la Metodología de la Investigación en la cual indica los procedimientos y técnicas utilizadas en la investigación, la construcción metodológica objeto de investigación, la elaboración del marco teórico, la recolección de la información empírica, la descripción de la información obtenida en la investigación, el análisis e interpretación de resultados.

El **cuarto capítulo** describe los resultados y discusión de la investigación.

El **quinto capítulo** hace referencia a las conclusiones y recomendaciones de la investigación. Finalmente, se presenta la bibliografía.

CAPITULO I

MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACION

1.1. UBICACIÓN Y CONTEXTUALIZACIÓN DE LA PROBLEMÁTICA

La investigación se desarrolló en la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Laboratorio de Microbiología y biotecnología vegetal, que está situado en la ciudad de Quevedo provincia de Los Ríos, cuenta con una población de 150.827 habitantes, su actividad económica principal es la agropecuaria. Es la cabecera cantonal del cantón Quevedo y la ciudad más grande y poblada de la provincia de Los Ríos (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2010).

La problemática se ubica en los viveros de las instalaciones de la empresa NOVOPAN del Ecuador, las plantaciones se localizan en cuatro zonas: Zona Centro (1867,6 has), Zona Norte (1368,70 has), Zona Costa (806,36 has) y Zona Sur (2331,14 has). Con el fin de producir las plantas requeridas, la empresa produce más de dos millones de plantas cada año en sus viveros ubicados en las localidades de Itulcachi (Pichincha), Pisangacho (Imbabura) y Los Ángeles (NOVOPAN, s.f.).

Aun no se han explorado alternativas de control al uso de químicos que hayan resultado eficientes para el control de dicho patógeno en la zona, por lo que se propone el uso de aceite esencial de flor de muerto. Cabe destacar que el alcance de esta investigación será solo a nivel *in vitro*, pero se pretende que sirva como punto de partida para posteriores investigaciones a nivel *in vivo* en vivero y plantaciones establecidas.

1.2. SITUACION ACTUAL DE LA PROBLEMÁTICA

Si bien hay reportes de uso de aceites esenciales de plantas para control de *R. solanacearum*, las referencias del uso de aceite esencial de flor de muerto (*Tagetes* spp.) para la inhibición de dicho patógeno es escaso.

Aunque hay estudios referentes al uso del material vegetal completo para reducción de inoculo bacteriano, las investigaciones a nivel *in vitro* con el aceite esencial de dicha planta contra *R. solanacearum* no está establecido. Considerando los daños que causa a las plantaciones de Eucalipto dicha bacteria tanto en cultivo establecido así como en vivero, cobra vital importancia la búsqueda de alternativas de control eficientes para contrarrestar la mortalidad existente actualmente lo cual amerita el surgimiento de nuevas investigaciones, para encontrar medidas de control más efectivas, debido a eso se va a realizar dicha investigación la cual será desarrollada en el laboratorio de microbiología y biotecnología vegetal de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

1.3. PROBLEMA DE INVESTIGACION

1.3.1. Problema general

¿Cuál de las especies de *Tagetes* spp. ejercerá un control eficiente de *R. solanacearum* a nivel *in vitro*?

1.3.2. Problemas derivados

- ✓ ¿En qué medio de cultivo se realizarán los ensayos de inhibición?
- ✓ ¿Qué metodología se va a usar para los ensayos de inhibición de crecimiento bacteriano?
- ✓ ¿El etanol utilizado como control presentará inhibición del crecimiento dificultando la determinación de la inhibición por parte de las especies de *Tagetes* spp. evaluadas?

1.3.3. Delimitación del problema

- ✓ **Campo:** Ciencias forestales
- ✓ **Área:** Biotecnología
- ✓ **Línea de investigación:** Desarrollo de soluciones tecnológicas
- ✓ **Aspecto:** alternativas de control de patógenos de especies forestales
- ✓ **Tiempo:** 6 meses.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. General

Determinar el potencial del aceite esencial de dos especies de *Tagetes* spp. y *Ralstonia solanacearum* en condiciones *in vitro*.

1.4.2. Específicos

- ✓ Evaluar el rendimiento de extracción de los aceites esenciales de flores y hojas de *Tagetes* spp.
- ✓ Determinar la Concentración mínima inhibitoria –MIC en la inhibición de cinética de crecimiento bacteriano.
- ✓ Establecer la Concentración Mínima Bactericida – MBC de aceite esencial.

1.5. JUSTIFICACION.

En los últimos años la ocurrencia de agentes causales de origen bacterianos ha tomado relevancia, se tiene hasta el momento tres grupos de enfermedades bacterianas asociadas a especies de *Eucalyptus* spp., entre las principales tenemos las manchas foliares, tizón apical y marchitamiento vascular. Estas enfermedades son relativamente recientes, cuya información disponible está dispersa y relacionada a los lugares en donde se reportó.

Ralstonia solanacearum es un patógeno de gran importancia a nivel mundial por el amplio rango de hospederos, además de contar con cepas específicas que la hace aún más perjudicial, esta provoca serios daños en diferentes cultivos.

En las plantaciones de Eucalipto (*Eucalyptus urograndis*) esta bacteria representa una amenaza ya que causa la enfermedad de la marchitez, que se da cuando las hojas pierden turgencia y decaen junto con toda la planta, debido a una obstrucción de los tejidos

conductores que impide el transporte de los nutrientes y es provocado por la rápida colonización de la bacteria en el tejido.

Actualmente el control mediante variedades resistentes se dificulta debido a la gran variabilidad de aislados del patógeno y de la interacción con diversos factores bióticos y abióticos, el control biológico por su parte, aún está sujeto a muchos estudios que comprueben la existencia de microorganismos que ejerzan antagonismo al patógeno, mientras que el control químico es actualmente ineficiente y representa una gran amenaza para el medio ambiente.

Por ende se ha visto la necesidad de profundizar en el estudio de alternativas de control de dicha enfermedad mediante el uso de aceite esencial de plantas del género *Tagetes* spp, las cuales poseen la capacidad de sintetizar diversos metabolitos secundarios con potencial bactericida, ya que la bacteria causante de este problema fitosanitario provocan pérdidas a nivel de vivero y plantaciones, lo que amerita estudios de este tipo de estudio como punto de partida para su control.

CAPITULO II

MARCO TEORICO DE LA INVESTIGACION

2.1. FUNDAMENTACIÓN CONCEPTUAL

2.1.1. *Ralstonia solanacearum*

2.1.1.1. Taxonomía de *R. solanacearum*

Tabla 1. Clasificación taxonomica de *R. solanacearum*

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

Fuente: (Agrocalidad, 2013).

2.1.1.2. Descripción

Ralstonia solanacearum (sinónimo *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith) Yabuuchi *et al.*, 1995) es el agente causal del marchitamiento y muerte de cultivos de importancia económica de las regiones tropicales y subtropicales del mundo, presente también en algunas malezas (Hayward, 1991). El rango de hospedantes de *R. solanacearum* incluye cientos de especies de 44 familias de plantas (He *et al.*, 1983).

Se la describía anteriormente como *Bacillus solanacearum*, *Pseudomonas solanacearum*, *Burkholderia solanacearum*, entre otras muchas sinonimias, se presenta como una bacteria gram- negativa, aeróbica, móvil por uno a cuatro flagelos polares, en forma de bastón con 0,5 - 0,7 x 1,5 - 2,5 μm y no fluorescente (OEPP & EPPO, 2004).

Las colonias normales son lisas, fluidas, irregularmente redondeadas y opacas. En medio de Kelman, que contiene tetrazolio, las colonias virulentas son de centro rojizo y bordes blancos, mientras que las avirulentas son totalmente rojas (Kelman, 1954).

El patógeno realiza la penetración en los hospedantes por medio de heridas en el sistema radicular y en los lugares de emergencia de raíces secundarias. La diseminación de la bacteria ocurre en grandes distancias por medio de infecciones latentes en material vegetal para plantaciones, así como también por productos y sub-productos para consumo y/o para la industria (Gutarra *et al.*, 1995).

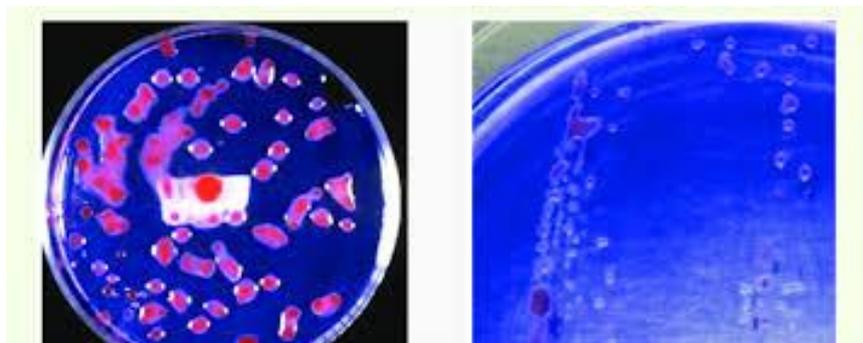


Figura 1. Colonias típicas de *R. solanacearum* creciendo en medio Kelman
Fuente: (Álvarez *et al.*, 2015).

En pequeñas distancias, la bacteria puede ser diseminada por herramientas y equipos utilizados durante las prácticas agrícolas, y potencialmente por insectos y por el propio hombre (Supriadi *et al.*, 2001).

La supervivencia en el suelo ocurre por largos períodos (células viables pero no cultivables), en asociación con la materia orgánica y las malas hierbas.

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 y Jenkins, 1985).

Comúnmente, *R. solanacearum* ha sido dividida en cinco biovares y en cinco razas, con base en propiedades bioquímicas y en la reacción sobre una gama de hospedantes, respectivamente. Sin embargo, no hay una relación perfecta entre la diferenciación de razas y la clasificación en biovares (Kelman, 1964).

Es considerada uno de los fitopatógenos bacterianos más destructivos en cultivos agrícolas. La variabilidad dentro de la especie, por lo que *R. solanacearum* es considerada una “especie complejo”, abreviado como RSSC por sus siglas en inglés “*Ralstonia solanacearum* species complex” (Safni *et al.*, 2014; Prior *et al.*, 2016).

Una especie complejo es definida como un grupo de aislados relacionados cercanamente, cuyos miembros individuales pueden representar más de una especie (Fegan & Prior, 2005).

La distribución de *R. solanacearum* es mundial y un alto número de plantas hospedantes, éstas incluyen cientos de plantas de al menos 54 familias botánicas, tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas (Prior *et al.*, 2016).

Muchas de las especies vegetales afectadas son cultivos agrícolas estratégicos o importantes alimentos de subsistencia. Entre estos la papa (*Solanum tuberosum*), tomate (*S. lycopersicum*), berenjena (*S. melongena*), maní (*Arachis hypogea*) y los plátanos (*Musa spp.*) (Cardozo *et al.*, 2010). Entre los cultivos forestales infecta principalmente a Eucalipto (Alfenas *et al.* 2004).

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).

R. 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).

Se conocen tres razas de *Ralstonia solanacearum*: la raza 1 que afecta solanáceas y otras plantas, la raza 2 afecta a bananos, y la raza 3 que afecta papa.

El principal efecto fisiológico que causa (*Ralstonia solanacearum*) en sus hospederos se denomina marchitez, que se da cuando las hojas pierden turgencia y decaen junto con toda la planta, debido a una obstrucción de los tejidos conductores que transportan el agua y nutrientes a través del tallo (Yabuuchi *et al.*, 1995).

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, minicepas 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 (Remache, 2018).

2.1.2. Eucalipto (*Eucalyptus urograndis*)

2.1.2.1. Taxonomía de *E. urograndis*

Tabla 2. Clasificación taxonómica del Eucalipto tropical

Reino	Plantae
Division	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Myrtales
Familia	Myrtaceae
Subfamilia	Myrtoideae
Genero	<i>Eucalyptus</i>
Especie	<i>E. urophylla</i> X <i>E. grandis</i>

Fuente: (PyCmaderas ,2013)

2.1.2.2. Descripción

Eucalyptus es un extraordinario género con especies adaptadas a una gran diversidad de hábitats, desde el nivel del mar hasta los 2,300 m. Se encuentran en casi todos los tipos de suelos, desde ácidos hasta alcalinos. Está ampliamente distribuido en Australia y Tasmania, donde pueden encontrarse representantes nativos (Rokich y Bell, 1995).

Su nombre deriva de las palabras griegas eu, que significa bien, y kalyp-teim, que significa cubierto. Estas plantas desempeñan un papel importante en los bosques cerrados de Australia meridional, donde suelen ser árboles de hasta 200 años que constituyen una

etapa de transición entre los bosques naturales más antiguos dañados por los incendios y los bosques pluviales cerrados.

El eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*) es un híbrido entre (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*) considerada un especie de rápido crecimiento mayor a 45 m³ /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 (Remache, 2018).

En Brasil *Eucalyptus urograndis* es un híbrido de gran importancia económica para la industria brasileña de pulpa y papel (Leonardi *et al.*, 2015).

Actualmente, las plantas de eucalipto se cultivan en todo el mundo debido a su rápida adaptabilidad a las diferentes condiciones climáticas y su fácil uso en programas de fitomejoramiento (Kullan *et al.*, 2012).

La mayoría son árboles grandes (entre ellos están los maderables), casi todos contienen productos aromáticos (resinas y gomas). Las hojas son generalmente alternas, alargadas, verdes brillantes o grisáceas. Las flores aparecen en racimos de “pompones”, los frutos son pequeñas capsulas que se abren dejando caer las semillas minúsculas (Geilfus, 1994).

2.1.2.3. Propiedades organolépticas

Tabla 3. Propiedades organolépticas de *E. urograndis*

Color	Amarillo pálido
Veteado	Poco diferenciado
Textura	Mediana
Grano	Recto o entrecruzado
Sabor	No distintivo
Brillo	Mediano
Durabilidad	Se están efectuando pruebas de individuos de las plantaciones de Esmeraldas. Sin embargo, literatura menciona que la albura no es muy durable, y el duramen lo es mejor.
Trabajabilidad	Responde adecuadamente a cepillado, taladrado, enclavado

Fuente: (Remache F. 2017).

2.1.2.4. Propiedades físicas y mecánicas

Tabla 4. Propiedades físicas y mecánicas del Eucalipto.

Densidad aparente	450 a 550 Kg/m ³ -liviana
Dureza	300 a 500 blanda
Flexion	Resistente
Compresion	Muy resistente
Traccion	Resistente
Preservacion	Acepta preservantes sin dificultad

Fuente: (Remache F. 2017).

2.1.3. Infección y sintomatología de *R. solanacearum* en Eucalipto (*Eucalyptus urograndis*).

La colonización 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 (Remache F., 2018).

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 (Remache F., 2018).



Figura 2. Pus bacteriano *R. solanacearum* sobre Eucalipto
Fuente: (Remache F., 2018).

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 (Remache F., 2018).

Los síntomas de la enfermedad en el campo, inicialmente, se caracterizan por marchitez y deshojada basal de la planta. Cuando la fuente de inóculo son las plantas contaminadas, cortes perpendiculares del tallo evidencian oscurecimiento del leño desde la región central.

En cambio, para infecciones que ocurren después de la siembra, el oscurecimiento puede ser notado en el sentido de la cáscara hacia el interior del leño. En este último caso, las

grietas en la cáscara, causadas por la temperatura excesiva del suelo, el déficit hídrico y por ahogamiento de recolección, constituyen puertas de entrada a la bacteria. Generalmente, los árboles más afectados presentan problemas de malformación radicular, lo que dependiendo de la intensidad, causa subdesarrollo o muerte de las plantas. El diagnóstico de la enfermedad es fácilmente realizado por la prueba de exudación de pus bacteriano (Alfenas *et al.*, 2004; Ferreira & Milani, 2002).

Fragmentos del tejido enfermo, cuando se mantienen sumergidas en agua, evidencian después de algunos minutos, exudación de pus bacteriano, en forma de gotitas sobre la superficie. En la parte del tallo sumergido en el agua, se observa también la exudación de pus bacteriano, en forma de una niebla clara. La prueba de exudación también se puede realizar en gota de agua, con el auxilio de un microscopio de luz (Alfenas *et al.*, 2006).

2.1.4. Control de marchitez bacteriana provocada por *R. solanacearum*

El uso de la resistencia de plantas para el control de la marchitez bacteriana, tanto para especies agrícolas como forestales, es difícil, en virtud de la alta variabilidad en la población del patógeno y de interacciones con factores del ambiente. La expresión de la resistencia está fuertemente correlacionada con condiciones ambientales como temperaturas elevadas y altos niveles de humedad del suelo (Mew & Ho, 1977).

Recientemente, se ha encontrado un gen recesivo (RRS1-R), que confiere resistencia a *R. solanacearum* en *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.) (Deslandes *et al.*, (2002). Para eucalipto, Wu & Liang (1988) observaron variaciones en el nivel de resistencia para

ciertas procedencias, siendo el *E. grandis* x *E. urophylla*, *E. saligna*, *C. citriodora* e *E. exserta* F.Muell. más resistentes a la marchitez bacteriana.

El control de la marchitez bacteriana, para varios hospedantes, no ha sido efectivo. Los programas de mejoramiento para el control por resistencia de plantas no han alcanzado éxito en razón, entre otros factores, de la gran variabilidad de aislados del patógeno y de la interacción con diversos factores bióticos y abióticos (Javier, 1994).

Especies de rápido crecimiento como *E. urophylla*, *E. grandis*, *E. saligna* y los híbridos (*E. grandis* x *E. urophylla*) o (*E. urophylla* x *E. grandis*), con menos de dos años, son más susceptibles. A partir de observaciones de campo, fue comprobado que el híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*) más utilizado en la plantación es también altamente susceptible (Lin *et al.*, 1996).

El control biológico, aunque todavía necesita mayores estudios, ha surgido como una alternativa prometedora. El uso de *Streptomyces* sp. fue efectivo en el control de la marchitez en papa (*Solanum tuberosum*), en plátano (*Mussa* spp) y en tomate (*Solanum lycopersicum*) (Moura & Romeiro, 1999).

Hay evidencias experimentales de que el tratamiento de plantas de eucalipto con aislados específicos de *Pseudomonas fluorescens*, del tipo PGPR (rizobacterias) constituye una de las alternativas de control (Ran *et al.*, 2005; Mafia, 2004).

2.1.5. Aceites esenciales

Un aceite esencial es un líquido aromático de aspecto fluido o espeso y de color variable según las plantas de las que esté extraído. Es segregado por células especiales que se encuentran tanto en las hojas (menta piperita, albahaca linalol), como en las flores (lavanda, ylang ylang), la madera (cedro del Atlas, sándalo blanco), las raíces (jengibre, valeriana, vetiver) o las semillas (cilantro, anís verde, zanahoria). El tamaño de esas gotas es de unos pocos micrones, motivo por el cual no podemos verlas. Cuando se frota la planta aromática, las gotitas de aceite esencial se liberan en la atmósfera y nos llegan a la nariz. Los receptores olfativos de la nariz se activan y envían estímulos sensoriales a distintas zonas del cerebro (Arenas *et al.*, 2004).

Los aceites esenciales son mensajeros químicos que las plantas aromáticas utilizan para interactuar con su entorno. Los aceites esenciales permiten alejar las enfermedades y los parásitos, pero también tienen un papel protector frente a los rayos del sol. Los aceites esenciales tienen un papel importante en la reproducción y dispersión de las especies vegetales que permiten atraer a los insectos polinizadores (Arenas *et al.*, 2004).

2.1.6. Destilación por arrastre de vapor

Son varias las técnicas para la obtención de aceites esenciales a partir de hojas y flores. La destilación por vapor de agua, o arrastre por vapor de agua, es la técnica más habitual para obtener aceites esenciales. Es la única técnica autorizada por la Farmacopea

Europea, junto con el prensado en frío para extraer aceites esenciales de las cáscaras de los cítricos.

El alambique fue inventado por los Faraones y perfeccionado por la civilización árabe. Consiste en general en una cuba de metal inerte como el cobre o el acero inoxidable, con un tamiz en el fondo para que las plantas no entren en contacto directo con el agua.

El vapor generado atraviesa la planta y extrae las microgotas del aceite esencial. Este vapor de agua aromático se enfría en un serpentín mediante un circuito de agua fría. A la salida del serpentín, se obtiene una mezcla de agua aromática y aceite esencial. El aceite esencial, de menor densidad que el agua, flota, lo que permite recuperarlo por la diferencia de densidad mediante un vaso florentino o esenciero. El aceite esencial se separa del agua de destilación, el hidrolato (también llamado agua floral para las flores) (Arenas *et al.*, 2004).

2.1.7. Flor de muerto (*Tagetes spp*)

Muchos de los conocimientos que se tienen en Mesoamérica sobre la flor de muerto y sus usos datan de tiempos muy antiguos, precolombinos, y se han mantenido a través de las tradiciones culturales regionales, principalmente entre los grupos indígenas, en los que se encuentran arraigados los usos ceremoniales, medicinales y ornamentales.

En los tiempos actuales, la flor de muerto, en sus diferentes tipos, ha sido objeto de estudios diversos que contribuyen a ampliar sus formas de uso e impulsando su importancia económica.

Las diversas plantas conocidas con este nombre pertenecen al género *Tagetes*. Kaplan (1960) menciona que Fuchs fue el primero que aplicó el nombre *Tagetes*, el cual fue probablemente derivado de Tages, el nombre de un dios etrusco (Castro 1994).

El género *Tagetes* son hierbas perennes anuales, de 20 a 30 cm de altura, que pertenece a la familia de las *Asteraceae*. Esta planta originaria de norte y sur América pero con amplia distribución mundial, es usada en la medicina tradicional de muchas regiones del mundo. Existen cerca de 30 especies de *Tagetes*, las más estudiadas son *T. patula*, *T. minuta* y *T. erecta* (Xu et al., 2012).

Durante los últimos 20 años, las plantas de la familia *Asteraceae* se han identificado como fuentes promisorias de compuestos con propiedades plaguicidas (Serrato y Quijano 1993; Choi et al., 2003). En particular, algunas especies del género *Tagetes* han probado ser efectivas contra bacterias (Arenas et al., 2004), hongos (Zygodlo et al., 1994; Romagnoli et al., 2005), nematodos (Reynolds et al., 2000; Ball-Coelho et al. 2003), ácaros (Eguaras et al. 2005) e insectos como dípteros (Perich et al., 1994; Nivsarkar et al. 2001), piojos (Cestari et al., 2004), gorgojos de granos almacenados (Weaver et al., 1997), pulgones (Tomova et al., 2005), entre otros. Lo anterior se debe a que los extractos con principios activos como el trans-anetol, alilanisol, β -cariofileno y tagetona, han demostrado ser

tóxicos, repelentes e inhibidores de la reproducción y crecimiento (Saxena y Srivastava 1972; Weaver *et al.*, 1997; Cestari *et al.*, 2004; Tomova *et al.*, 2005).



Figura 3. Plantación de flor de muerto (*Tagetes* spp.)
Fuente: (Imagen agropecuaria, 2014).

Como resultado de estos estudios, se han descrito varios componentes de sus extractos y del aceite esencial, que incluyen: benzofuranos, carotenoides, flavonoides y tiofenos tales como: terpineol, (Z)-ocimeno, dihidrotagetona, (E)-ocimenona, (Z)-tagetona, and (Z) ocimenona, piperitona, que son biológicamente activos y potencialmente alelopáticos contra muchos organismos patógenos como hongos, bacterias, virus, nematodos, insectos, garrapatas entre otros (Xu *et al.*, 2012). Sin embargo, el rol de estos compuestos no ha sido plenamente caracterizado contra *R. solanacearum*, dado que el control de esta bacteria es problemático, hay necesidad de encontrar nuevas estrategias de control.

2.2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.2.1. Fitogeografía y ecología del género *Eucalyptus*

En este estudio se analiza el género *Eucalyptus*, que deriva su nombre de las palabras griegas eu, que significa bien, y kalypteim, que significa cubierto. Estas plantas desempeñan un papel importante en los bosques cerrados de Australia meridional, donde suelen ser árboles de hasta 200 años que constituyen una etapa de transición entre los bosques naturales más antiguos dañados por los incendios y los bosques pluviales cerrados. Los eucaliptos son originarios de Australia y algunos países de Asia sudoriental, donde crecen en condiciones muy diversas de pluviosidad y temperatura. Se conocen más de 500 especies de eucaliptos. Algunos árboles tienen una altura de hasta 90 m pero en zonas abiertas de vegetación baja y de escasa pluviosidad anual son muy corrientes las formas enanas de eucalipto, llamadas “mallees”, cuyo largo fuste subterráneo permite al árbol sobrevivir a los periodos de sequía. Cuando se planta fuera de su hábitat natural muchas especies de *Eucalyptus* han mostrado un alto grado de tolerancia a las latitudes y altitudes extremas. Las primeras grandes plantaciones se iniciaron en el Brasil en 1904. En la actualidad, ese país tiene más de un millón de hectáreas de plantaciones de eucaliptos. Más de 100 países por todo el mundo cultivan eucaliptos en plantaciones, países como México, España, Portugal, Marruecos, Argentina, los Estados Unidos y muchos otros.

2.2.2. Efecto de algunos aceites esenciales sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en condiciones de laboratorio

Entre los factores más limitantes del cultivo de papa se encuentra *Phytophthora infestans*, agente causal de la llamada “gota”. El control químico de esta enfermedad representa entre el 7 y el 10% de los costos totales del cultivo, y tiene un alto impacto ambiental por la contaminación que ocasiona. La búsqueda y aplicación de prácticas alternativas para el control de este patógeno es importante para disminuir tanto la utilización de fungicidas como los costos de producción del cultivo. Numerosos estudios realizados in vitro demuestran que algunos aceites esenciales tienen propiedades fungicidas y fungistáticas sobre diferentes patógenos. Por ello, el objetivo del presente estudio consistió en la evaluación de ocho aceites esenciales extraídos de algunas especies aromáticas de la familia Lamiaceae sobre el crecimiento de *P. infestans* en condiciones de laboratorio. Se evaluaron diferentes metodologías de aplicación de los productos en estudio, encontrándose que las más apropiadas son aquellas en que el aceite ejerce un efecto volátil. Los aceites esenciales fueron *Origanum vulgare*, *Mentha piperita*, *Salvia officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, *Thymus vulgaris* y *Pogostemon cablin* se evaluaron en su fase volátil, a través de su efecto sobre dos aislamientos de *P. infestans* (A13 y A15). Los aceites que mostraron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *P. infestans* fueron los de *T. vulgaris* y *M. piperita*, los cuales redujeron el crecimiento del hongo en 92.1 y 89.9%, respectivamente; y por ello pueden ser considerados promisorios para ser evaluados en campo (Carrillo *et al.*, 2010)

2.2.3. Efecto fungistático de extractos y aceites esenciales de *Lippia origanoides* HBK y *Thymus vulgaris* L. como alternativas de manejo de *Botrytis cinerea* en fresa.

El moho gris de la fresa causado por *Botrytis cinerea* es una enfermedad que produce importantes pérdidas poscosecha. En el estudio se evaluó el efecto fungistático de extractos y aceites esenciales de *Lippia origanoides* HBK y *Thymus vulgaris* L. en concentraciones de 128, 256 y 500 mg/lt sobre *B. cinerea* in vitro e in vivo. In vitro se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo. En estas condiciones se observó que el aceite esencial (AE) de *L. origanoides* presentó el porcentaje de control más alto (66.2%) sobre *B. cinerea*. In vivo, se observó que en bananos inoculados con *B. cinerea* después de 120 los AE controlaron eficientemente la incidencia de daño causado por el patógeno estudiado y no se encontraron diferencias significativas con el control químico utilizando el fungicida Benomil (Taborda *et al.*, 2014).

2.2.4. Efecto *in vitro* de aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer.

Este trabajo tuvo como objetivo determinar la actividad antifúngica in vitro de diez aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer, importante patógeno de las solanáceas. Se evaluó el efecto por contacto directo y por exposición a los vapores. Los bioensayos se realizaron según diseño completamente aleatorizado, se utilizó el método de discos de papel inoculados con los aceites, enfrentados a discos del fitopatógeno y se

evaluó el crecimiento radial del hongo. Todos los aceites, excepto *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (naranja dulce), inhibieron el crecimiento micelial hasta los 7 días. A los 14 días se observó inhibición total en los tratamientos con los aceites de *Pimpinella anisum* L. (anís), *Ocimum basilicum* L. (albahaca blanca), *Ocimum basilicum* L. variedad genovese (albahaca genovesa) y *Piper auritum* Kunth (caisimón de anís). Los metabolitos volátiles de los aceites no mostraron efecto fungicida; no obstante se observó inhibición del crecimiento micelial de *A. solani* en los tratamientos con los extractos de *Ruta chalepensis* L. (ruda) y *Piper auritum*. Los resultados abren nuevas perspectivas para el control de este patógeno (Duarte *et al.*, 2014).

2.2.5. Extractos de *Tagetes patula*, L. (Asteraceae): un potencial bactericida contra el MOKO

Ralstonia solanacearum raza 2 es la causante del Moko o marchitez bacteriana, produciendo grandes pérdidas económicas en cultivos como plátano, tabaco y tomate. Se han descrito varios componentes de los extractos y del aceite esencial (AE) de *Tagetes patula* L., que incluyen: benzofuranos, carotenoides, flavonoides y tiofenos que son biológicamente activos y potencialmente alelopáticos contra muchos organismos patógenos. Las investigaciones del efecto de los extractos y el AE de *T. patula* L. contra *R. solanacearum* son escasas. El objetivo de esta investigación fue analizar el potencial antioxidante y determinar el efecto de los extractos metanólicos de flores (EMF) y de hojas (EMH) y el AE sobre el crecimiento de la bacteria. El EMF de *T. patula* posee mayor capacidad captadora de radicales libres (DPPH) que el AE, posiblemente relacionado con su mayor contenido de fenoles. También el EMF tiene un alto contenido

en flavonoides y terpenoides. La composición química del AE fue determinada por cromatografía gas/masa, la cual reveló seis componentes mayores, los cuales representan más de 84% del AE: Indano 5.47%, D-limoneno 5.76%, Z-ocimeno 5.98%, terpinoleno 6.73%, Bervenona 19.98% y la piperitona con 40.4%. El EMF como el AE inhibieron el crecimiento de *R solanacearum* raza 2, pero el AE fue más efectivo (radio de inhibición 16 cm). Basados en estos resultados EMF y AE de flores y hojas de *T. patula* puede ser una opción para el control *R solanacearum* raza 2. (Soto, Rodríguez, Loango Chamorro, Landázuri 2018).

2.2.6. Efecto de prácticas ecológicas sobre la población de *Ralstonia solanacearum* Smith, causante de moko de plátano

Se inoculó suelo estéril de Montenegro (Quindío, Colombia), con *Ralstonia solanacearum* Raza 2, bacteria causante de Moko de plátano, bajo condiciones de invernadero, para evaluar el efecto de prácticas no contaminantes alternativas al formol, sobre la población de esta bacteria. En un arreglo de bloques completos al azar, con cinco repeticiones, se probaron los siguientes tratamientos: incorporación de “marigold” o flor de muerto, *Tagetes patula* (1 Kg/m²), incorporación de calfos (0.5 Kg/m²), fertilizante Fulvan® líquido (20 L/m²) y lixiviado de compostaje de plátano (2.7 L/m²), los cuales se compararon con formol 20% (9.3 L/m²). Como controles se utilizó suelo inoculado y estéril, sin tratamiento. La unidad experimental consistió en dos materos con 250 ml del suelo. La población bacteriana se evaluó semanalmente durante 51 días después del tratamiento. Mediante la incorporación de marigold se logró reducir en 84.7 % la población de bacteria, mientras que formol la redujo 100 %, siendo esta diferencia no

significativa (DMS $\alpha=5\%$). Además se lograron reducciones de 58.2 %, 50.80 % y 31.6 % con Fulvan®, calfos y lixiviado, respectivamente. Veinte días después de aplicados los tratamientos, marigold y Fulvan® fueron los más efectivos reduciendo la población hasta 80 % y 90 %, respectivamente. El calfos, por su baja solubilidad, tomó 20 días para actuar sobre la bacteria. Los resultados permitieron concluir que hay alternativas ecológicamente seguras y eficientes, para reducir la población del patógeno en el suelo (Arenas *et al.*, 2004).

2.2.7. 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 Fe, provincia de Los Ríos

Se evaluó el efecto de microorganismos antagonistas en el control de la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) presente en plantaciones de Eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*) en la hacienda Los Ángeles, cantón Buena Fe, provincia de los Ríos, La empresa NOVOPAN DEL ECUADOR S.A. al ver la necesidad de tener un programa sobre el control de plagas y enfermedades, se realizaron pruebas de patogenicidad en plantas de *Eucalyptus Urograndis* en condiciones semicontroladas utilizando cepas de *R. solanacearum* y además se evaluó la eficiencia de los productos comerciales bioprot y Biofung Se utilizó un diseño DCA con siete repeticiones y un control absoluto. Se utilizó un test inmunológico para comprobar que las plantas se encontraban sanas. Se inoculó tres dosis (10, 30 y 50) de caldo bacteriano y a los 37 días todas las plantas presentaron los mismos síntomas: Flacidez, amarillamiento y marchitez.

Se efectuaron dos medidas de antagonismo inhibición simultánea y cultivo dual con los productos comerciales frente a *R. solanacearum* donde no existió capacidad antagónica por ninguno de ellos. En base a esto el autor recomienda el uso de otras alternativas de control como el uso de microorganismos específicamente PGPR pertenecientes al género *Pseudomona* y hongos ectomicorrizicos.

2.3. FUNDAMENTACIÓN LEGAL

2.3.1. Constitución del Ecuador

El Capítulo segundo: Biodiversidad y recursos naturales en la sección primera:

Naturaleza y ambiente señala:

Art. 396.- El Estado adoptará las políticas y medidas oportunas que eviten los impactos ambientales negativos, cuando exista certidumbre de daño. En caso de duda sobre el impacto ambiental de alguna acción u omisión, aunque no exista evidencia científica del daño, el Estado adoptará medidas protectoras eficaces y oportunas.

Art. 397- literal 2: Establecer mecanismos efectivos de prevención y control de la contaminación ambiental, de recuperación de espacios naturales degradados y de manejo sustentable de los recursos naturales.

Art. 397- literal 4: Asegurar la intangibilidad de las áreas naturales protegidas, de tal forma que se garantice la conservación de la biodiversidad y el mantenimiento de las

funciones ecológicas de los ecosistemas. El manejo y administración de las áreas naturales protegidas estará a cargo del Estado.

Art. 398.- Toda decisión o autorización estatal que pueda afectar al ambiente deberá ser consultada a la comunidad, a la cual se informará amplia y oportunamente. El sujeto consultante será el Estado. La ley regulará la consulta previa, la participación ciudadana, los plazos, el sujeto consultado y los criterios de valoración y de objeción sobre la actividad sometida a consulta. El Estado valorará la opinión de la comunidad según los criterios establecidos en la ley y los instrumentos internacionales de derechos humanos. Si del referido proceso de consulta resulta una oposición mayoritaria de la comunidad respectiva, la decisión de ejecutar o no el proyecto será adoptada por resolución debidamente motivada de la instancia administrativa superior correspondiente de acuerdo con la ley.

El Capítulo segundo: Biodiversidad y recursos naturales en la sección segunda:
Biodiversidad señala:

Art. 400.- El Estado ejercerá la soberanía sobre la biodiversidad, cuya administración y gestión se realizará con responsabilidad intergeneracional. Se declara de interés público la conservación de la biodiversidad y todos sus componentes, en particular la biodiversidad agrícola y silvestre y el patrimonio genético del país.

Art. 401.- Se declara al Ecuador libre de cultivos y semillas transgénicas. Excepcionalmente, y sólo en caso de interés nacional debidamente fundamentado por la Presidencia de la República y aprobado por la Asamblea Nacional, se podrán introducir semillas y cultivos genéticamente modificados. El Estado regulará bajo estrictas normas de bioseguridad, el uso y el desarrollo de la biotecnología moderna y sus productos, así como su experimentación, uso y comercialización. Se prohíbe la aplicación de biotecnologías riesgosas o experimentales.

Art. 403.- El Estado no se comprometerá en convenios o acuerdos de cooperación que incluyan cláusulas que menoscaben la conservación y el manejo sustentable de la biodiversidad, la salud humana y los derechos colectivos y de la naturaleza.

El Capítulo segundo: Biodiversidad y recursos naturales en la sección tercera:

Patrimonio natural y ecosistemas señala:

Art. 404.- El patrimonio natural del Ecuador único e invaluable comprende, entre otras, las formaciones físicas, biológicas y geológicas cuyo valor desde el punto de vista ambiental, científico, cultural o paisajístico exige su protección, conservación, recuperación y promoción. Su gestión se sujetará a los principios y garantías consagrados en la Constitución y se llevará a cabo de acuerdo al ordenamiento territorial y una zonificación ecológica, de acuerdo con la ley.

Art. 405.- El sistema nacional de áreas protegidas garantizará la conservación de la biodiversidad y el mantenimiento de las funciones ecológicas. El sistema se integrará por los subsistemas estatal, autónomo descentralizado, comunitario y privado, y su rectoría y regulación será ejercida por el Estado. El Estado asignará los recursos económicos necesarios para la sostenibilidad financiera del sistema, y fomentará la participación de las comunidades, pueblos y nacionalidades que han habitado ancestralmente las áreas protegidas en su administración y gestión.

2.3.2. Reforma del libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria (2015)

Parágrafo II: Del Suelo incluido en el Acuerdo Ministerial No.061 establece.

Art. 212 Calidad de Suelos.- Para realizar una adecuada caracterización de este componente en los estudios ambientales, así como un adecuado control, se deberán realizar muestreos y monitoreos siguiendo las metodologías establecidas en el Anexo II y demás normativa correspondiente.

La Autoridad Ambiental Competente y las entidades del Sistema Nacional Descentralizado de Gestión Ambiental, en el marco de sus competencias, realizarán el control de la calidad del suelo de conformidad con las normas técnicas expedidas para el efecto. Constituyen normas de calidad del suelo, características físico-químicas y biológicas que establecen la composición del suelo y lo hacen aceptable para garantizar el equilibrio ecológico, la salud y el bienestar de la población.

Art. 213 Tratamiento de Suelos Contaminados.- Se lo ejecuta por medio de procedimientos validados por la Autoridad Ambiental Competente y acorde a la norma técnica de suelos, de desechos peligrosos y demás normativa aplicable. Los sitios de disposición temporal de suelos contaminados deberán tener medidas preventivas eficientes para evitar la dispersión de los contaminantes al ambiente.

Art. 214 Restricción.- Se restringe toda actividad que afecte la estabilidad del suelo y pueda provocar su erosión.

CAPITULO III
METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION

3.1. TIPO DE INVESTIGACION

La investigación a realizarse fue de tipo experimental pura, en la cual se determinó el rendimiento de extracción de hojas y flores por separado de dos especies de *Tagetes* spp. Además se midió el efecto de diferentes concentraciones de los aceites esenciales obtenidos A fin de establecer cuál de ellas inhiben el crecimiento bacteriano de *R. solanacearum* en condiciones *in vitro*.

3.2. METODO DE INVESTIGACION

En la investigación se hizo uso de los siguientes métodos:

Método inductivo: en la determinación de las variables de respuesta en base a los objetivos de la investigación.

Método deductivo: para el establecimiento de los efectos producidos por las diferentes concentraciones de los aceites esenciales sobre sobre el crecimiento de *R. solanacearum* así como la determinación de la dosificación de mejor respuesta en términos de inhibición de crecimiento.

Método analítico: en el análisis de los datos obtenidos para la posterior generación de resultados encaminados al cumplimiento de los objetivos planteados.

3.3. FUENTES DE RECOPIACION DE LA INFORMACION

➤ Fuentes primarias

En las fuentes primarias se hizo uso de libros, revistas científicas y de entretenimiento, periódicos, diarios, documentos oficiales de instituciones públicas, informes técnicos y de investigación de instituciones públicas o privadas, patentes, normas técnicas para que optimizar los recursos de la investigación y tratar en lo posible reducir los riesgos dentro del área de trabajo.

➤ Fuentes secundarias

En las fuentes o informaciones secundarias se usó enciclopedias, antologías, directorios, libros o artículos que interpretan otros trabajos que validen todos los procesos de la investigación.

3.4. INSTRUMENTO DE INVESTIGACION

➤ Ficha de laboratorio

En la misma se recolectó toda la información relativa a la identificación de microorganismos causantes de la enfermedad, aislamiento selección e identificación de los mismos, entre otros aspectos básicos de la investigación.

➤ **Ficha de monitoreo**

Sirve para el registro de la información relativa al monitoreo de los procesos de la investigación donde se evaluó: número de muestras, peso de las muestras, transporte y tiempo de almacenamiento de muestras, y demás aspectos relativos al monitoreo y desarrollo de los microorganismos.

➤ **Material virtual**

Se hizo uso de plataformas virtuales para el procesamiento de los datos y obtención de resultados.

3.5. MATERIAL GENÉTICO

Se trabajó con dos especies de flor de muerto (*Tagetes* spp.) una de región Costa y otra de Región Sierra, las muestras de plantas fueron colectadas y transportadas al laboratorio de microbiología y biotecnología vegetal en una hielera para conservarla fresca para su procesamiento.

La cepa de *R. solanacearum* caracterizada previamente fue cedida por la empresa NOVOPAN S.A. para el desarrollo de esta investigación. Esta fue transportada en una hielera incubada en medio de cultivo sólido Kelman en una placa petri.

3.6. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

La determinación de las UFC/ml se determinó mediante el programa informático Excel 2013. Para evaluar la influencia de la aplicación de los aceites esenciales frente a *R. solanacearum* se utilizó el software Statistica six sigma. La información se procesó en el programa estadístico InfoStat cada tratamiento evaluado será sometido a las pruebas de ANOVA y pruebas de rango múltiple de DUNCAN.

3.7. TRATAMIENTOS EVALUADOS

Para el establecimiento de los tratamientos se analizaron los aceites esenciales de *Tagetes* spp.:

- AE 2% de hojas planta costa
- AE 2% de flores planta costa
- AE 2% de hojas planta sierra
- AE 2% de flores planta sierra
- AE 3% de hojas planta costa
- AE 3% de flores planta costa
- AE 3% de hojas planta sierra
- AE 3% de flores planta sierra
- Estreptomicina 25mg/l
- Etanol 70%

Se evaluó la actividad bactericida del aceite esencial de la planta proveniente de la especie *Tagetes* spp. de diferentes orígenes (costa y sierra).

Para la realización de los tratamientos se estableció la actividad bactericida de dos especies de hojas y flores (fragmentos del cáliz) de la *Tagetes* spp. (flor de muerto). Evaluando dos concentraciones al 2 y 3% de AE y se usó estreptomicina como control positivo y etanol como control negativo.

3. 8. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la obtención de los aceites esenciales se utilizara DCA evaluando 4 tratamientos en 5 repeticiones.

La tabla describe los tratamientos evaluados en la obtención de los aceites esenciales de las dos especies evaluadas de flores y hojas.

Tabla 5. Esquema del análisis de la varianza para obtención de aceites esenciales

Fuente de variación	Grados de libertad
Error	16
Tratamientos	3
Total	19

Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Mínima Bactericida – MBC se empleará DCA los tratamientos estarán conformados por 4 diferentes aceites esenciales obtenidos a partir de: flores y hojas de las dos especies de *Tagetes* spp. consideradas en la investigación y 2 concentraciones de los Aceites esenciales obtenidos (1 y 3%) más dos testigos uno positivo conformado por

streptomicina con dosis de 25 mg/l y uno positivo el cual corresponde al solvente utilizado (etanol al 70%) sin aceite esencial para verificar que este no afecta la dinámica de crecimiento bacteriano. Todo esto evaluado en 3 repeticiones.

Tabla 6. Esquema del ADEVA para la MIC Y MIB

Fuente de variación	Grados de libertad
Error	23
Tratamientos	12
Total	35

3. 9. MANEJO DEL EXPERIMENTO

3. 9. 1 Obtención de las muestras

Las muestras de plantas de *Tagetes* sp. Utilizadas en este estudio procedían de dos zonas una típica de la región Costa y otra procedente de la región Sierra. Hojas e inflorescencias fueron recolectadas de manera masiva y transportada al laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), localizado en el campo universitario “Manuel Haz Álvarez” ubicado en el km 1.5 vía Quevedo – Santo Domingo. Se recolectó un total aproximado 10 Kg de cada especie.

3. 9. 2 Obtención de los aceites esenciales

Para los ensayos de extracción del aceite vegetal se establecieron cuatro tratamientos los cuales estarán conformados por hojas y flores con las dos especies de flor de muerto consideradas en este estudio. El material vegetal fue previamente lavado y secado a temperatura ambiente (23-24°C).

El contenido de humedad del material vegetal seco se determinó por el método AOAC (Association of Analytical Communities), procedimiento gravimétrico oficial que consiste en la pérdida de masa de las muestras desecadas a 105°C, hasta masa constante en estufa de aire.

Se tomaron las hojas y flores de ambas especies evaluadas que se consideraron sanas y se pesaron ambos órganos por separado. Se trituraron para aumentar la superficie de contacto; se pesaron 500g de material vegetal de las dos especies de *Tagetes* spp. consideradas en este estudio (flores y hojas individualmente) y se sometieron a hidrodestilación con 1000 ml agua destilada en una matraz tipo balón a una temperatura de 100 - 105⁰ C en un equipo de destilación por arrastre de vapor tipo Clevenger con modificaciones durante 2 horas. La muestra hidrolato - aceite fue condensada y luego separada empleando un embudo de decantación. Después de obtener los aceites esenciales, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se almacenaron en recipientes herméticos color ambar protegidos de la luz y bajo refrigeración a 4°C hasta su utilización. Con la cantidad de aceite esencial obtenidos se calculó el porcentaje de rendimiento de extracción mediante la siguiente fórmula (Granados, Yáñez & Acevedo 2013):

$$\text{Rendimiento\%} = \frac{M_1}{M_2} \times 100$$

Donde:

M₁: Masa final del aceite esencial

M₂: Masa inicial del follaje

100: Factor matemático

3. 9. 3 Pruebas cualitativas de comprobación de *R. solanacearum*

3.9.3.1. Tinción de Gram

Para la tinción de gram se siguió el siguiente procedimiento:

- 1) Cubrir el frotis fijo con la solución de cristal violeta y dejarlo actuar por sesenta segundos, lavar con agua corriente y adicionar lugol (para fijar el colorante primario) durante sesenta segundos, lavar con agua.
- 2) Agregar alcohol acetona para hacer una decoloración durante quince segundos y lavar con agua.
- 3) Cubrir con el colorante de contraste (safranina) durante treinta segundos, lavar la laminilla y esperar a que seque.
- 4) Observar al microscopio con objetivo de inmersión (100x). Las bacterias Gram positivas se tiñen de color azul violeta, las Gram negativas se tiñen de un color rojo.

3.9.3.2. Prueba de catalasa

Colonias de *R. solanacearum* crecidas en medio Kelman (Glucosa 2.4g; Bacto peptona 10g; Casamino acids 1g; cloruro de 2, 3,5 trifeniltetrazolio 0.1g; Agar 15g; Agua destilada 1000 ml; Granada, G. A., & Sequeira, L. 1983) fueron transferidas con un palillo estéril e incubadas en medio King-B sólido (agar 15g/ 1l), incubadas a 27 °C por 24 h. para la obtención de colonias puras.

Se colocó 2 µl de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en un porta objeto, se ubicó en el microscopio y se “pincharon” las colonias bacterianas, con ayuda del microscopio OLYMPUS 10x se observó un burbujeo (catalasa +).

3.9.3.3. Prueba de emisión de Fluorescencia bajo luz ultravioleta a 360 nm.

La espectroscopia de fluorescencia permite la diferenciación de cepas bacterianas que son capaces de emitir fluorescencia bajo luz ultravioleta, en el caso de *R. solanacearum* a diferencia de otras cepas similares del genero *Pseudomona*, esta no emite fluorescencia al ser sometida a luz ultravioleta a 360 nm lo cual sirve como un criterio de clasificación.

3.9.4. Determinación de la capacidad bactericida de los aceites esenciales de hojas y flores de *Tagetes* spp.

3.9.4.1. Cinética de crecimiento de *R. solanacearum*.

a) Preparación del pre-inóculo en medio King B

Para la preparación del pre inóculo se procedió a tomar con ayuda de una micropipeta de precisión 1 colonia de *R. solanacearum* crecida en medio Kelman procedente del laboratorio de biotecnología de la empresa NOVOPAN y se procedió a incubar en un matraz Erlenmeyer conteniendo 50 ml de medio de cultivo King B líquido, (King *et al.* 1954) [(g/L): peptona, 20.0; glicerol, 15 ml; K₂HPO₄, 1.5; MgSO₄ x 7H₂O, 1.5; agua destilada (pH 7.2)], esto se incubo en un shaker Benchmark incushaker® a 150 rpm en agitación constante a 26 °C por 16 horas.

b) Medición de la Densidad óptica (OD) y unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) de PGPR en medio King B.

Del pre inoculo obtenido en el punto anterior, se tomó con una micropipeta de precisión 1 ml del cultivo de *R. solanacearum* y se colocó en un matraz Erlenmeyer con 99 ml de medio de cultivo King B (1% v/v), (King *et al.* 1954) [(g/L): peptona, 20.0; glicerol, 15 ml; K₂HPO₄, 1.5; MgSO₄ x 7H₂O, 1.5; agua destilada (pH 7.2).

Se incubó la bacterias a 26⁰ C a 150 rpm en un shaker Benchmark incushaker® y se determinó la OD (Densidad óptica) y la concentración celular o células por mililitro (UFC unidades formadoras de colonia/ml) con intervalos de dos horas durante 24 horas.

La OD se determinó mediante el uso de un espectrofotómetro marca Unico® bw-54 a 600 nm de longitud de onda (OD_{600} nm), se utilizaron cubetas de cuarzo en las cuales en una cabina de flujo laminar se colocaron con la ayuda de una micropipeta 3 ml de la muestra del medio incubado, usando como control medio de cultivo King B sin inoculante. Se repitió este proceso para cada una de las bacterias en estudio.

Debido a que la determinación de la O.D. es un método indirecto que solo indica la presencia de crecimiento bacteriano pero no así la concentración celular, se realizó conteo de microorganismos viables en placa o determinación de las UFC/ml (unidades formadoras de colonia por mililitro), el cual se determinó mediante el método de recuento en placa por siembra de gotas en superficie descrito por (Miles y Misra, 1938; Sharpe y Kilsby, 1971) o técnica de la microgota, para lo cual se preparó una serie progresiva de diluciones, en donde se colocaron 270 μ l de H₂O estéril y 30 μ l del cultivo incubado en tubos eppendorf, y se repitió este procedimiento hasta el factor de dilución -6.

Las placas fueron divididas en 6 sectores numerados donde se colocó cada una de las diluciones. Se surtieron 10 μ l distribuidos en microgotas de cada una de las diluciones en una placa petri conteniendo 20 ml de medio de cultivo King B sólido (King *et al.* 1954) [(g/L): peptona, 20.0; glicerol, 15 ml; K₂HPO₄, 1.5; MgSO₄ x 7H₂O, 1.5; agua destilada, agar 15.0 (pH 7.2)].

La microgota se colocó desde una altura de 2.5 cm; y se dispersó aproximadamente en un área de 1.5 a 2.0 cm de diámetro. Este procedimiento se lo realizó por triplicado, las

placas se las dejó en incubación por 24 horas y se realizó el conteo de colonias en las diluciones que formaron entre 30 y 300 colonias. Para determinar el número de células viables por ml se usó la siguiente fórmula:

$$UFC = \frac{\text{Colonias enumeradas}}{\text{ml sembrados}} \times \text{Factor de dilución}$$

Se realizó la cinética de crecimiento en función de la OD, UFC/ml y las horas transcurridas, se correlacionaron los valores obtenidos entre los dos parámetros cinéticos empleados y mediante el método de mínimos cuadrados con el programa estadístico Excel 2013 se procedió a la elaboración de una curva de calibración entre ambos parámetros cinéticos.

Mediante el software Statistica six sigma y con el uso del modelo de la ecuación de Gompertz se determinó parámetros cinéticos como: velocidad específica de crecimiento (μ max) tiempo de generación (G), y duración de la fase de latencia (λ), Además de la concentración celular durante la fase estacionaria. Todo esto con el fin de saber hasta que número de horas se deberán tomar los datos de crecimiento una vez desarrollados los ensayos con los aceites esenciales, mientras que Las UFC/ml en fase estacionaria servirían para la determinación del porcentaje de inhibición de los aceites esenciales.

3.9.4.2. *Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria - MIC*

Para evaluar la actividad antimicrobiana se empleará el método de macrodilución en caldo.

En tubos con medio de cultivo King B líquido (King *et al.* 1954) [(g/L): peptona, 20.0; glicerol, 15 ml; K₂HPO₄, 1.5; MgSO₄ x 7H₂O, 1.5; agua destilada (pH 7.2)], se realizaron diluciones dobles seriadas del aceite esencial de las especies de flor de muerto en un rango de concentraciones entre 1, 2 y 3%; dichas diluciones fueron enfrentadas a inóculos de microorganismos ajustados entre 10⁵ y 10⁶ UFC/mL. Se empleó etanol como solvente para los aceites y se realizará una serie de blancos para corroborar que el solvente no interfiere en el crecimiento microbiano. Como control positivo se usó strptomocina en concentraciones de 25mg/l.

Los matraces inoculados se incubarán a 28 °C por el tiempo en que haya tardado la bacteria en llegar a fase estacionaria en el ensayo de cinética de crecimiento; se escogerá la dilución del Aceite esencial que no presente turbidez visible frente al control como la MIC.

3.9.4.3. *Determinación de la Concentración Mínima Bactericida - MBC*

Se realizaron subcultivos en medio de cultivo King B sólido y se incubaron a 28 °C por 24 horas, tiempo después se contaron las colonias bacterianas de cada placa de subcultivo. La MBC se reportará como la dilución de aceite esencial, la cual al subcultivarse reduzca el crecimiento el inóculo en un 99.9%. Es decir no exista crecimiento de colonias bacterianas. Para la realización de los subcultivos se siguió el procedimiento de la técnica de microgota descrito anteriormente. Para la determinación del porcentaje de control se empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Ufc \ ml control} - \text{Ufc \ ml tratamientos}}{\text{Ufc \ ml control}} \times 100$$

3.9.5. Variables a evaluar

- **Rendimiento:** Con la cantidad de aceite esencial obtenido se calculó el porcentaje de rendimiento de extracción.
- **Concentración Mínima Inhibitoria – MIC:** Se determinó la inhibición mediante la observación de los cultivos que no presenten turbidez, la turbidez en microbiología es señal de crecimiento de un determinado microorganismo, la ausencia de la misma en un medio líquido representa que no existió reproducción bacteriana.
- **Determinación de la Concentración Mínima Bactericida - MBC:** De los ensayos realizados en la concentración mínima inhibitoria se realizaron diluciones y plaqueo en medio sólido, se determinaron las UFC/ml y con estos datos se calculará la concentración mínima bactericida.

CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Contenido de humedad y Porcentajes de rendimiento de Aceite esencial de hojas y flores de dos especies de *Tagetes* spp.

Se determinó el contenido de humedad de las plantas en estudio, las muestras correspondientes a las hojas presentaron el mayor contenido de humedad con promedios de 92.73 y 90.4 para la planta costa y 2 respectivamente sin diferir estadísticamente entre ellas. El contenido de humedad de las flores fue menor con promedios de 89.62 para planta sierra y 87.5 % para la planta costa.

Al evaluar el rendimiento de extracción de aceite esencial de flores y hojas individualmente de dos especies de *Tagetes* spp. y extraer el aceite esencial por el método de hidrodestilación por el termino de 120 minutos, se constató que no existió diferencia estadística entre el rendimiento correspondiente al tejido foliar de ambas especies de *Tagetes* spp. evaluadas (Figura 4.) las cuales fueron estadísticamente iguales con promedios de rendimiento de 0.018 y 0.016% para la especie de la Región costa (planta costa) y Sierra (planta sierra) respectivamente.

El rendimiento de aceite esencial obtenido a partir de las inflorescencias y fragmentos de cáliz de las especies de *Tagetes* spp. Evaluadas difieren estadísticamente de los tratamientos correspondientes al tejido foliar de ambas especies presentando

rendimientos de extracción de 0.003 y 0.007 % para la especie de *Tagetes* spp. de la región Costa y la región Sierra respectivamente.

Tabla 7. Porcentaje de humedad y rendimiento de extracción de aceite esencial de hojas y flores de dos especies de *Tagetes* pp.

Tratamiento	% de humedad	%Rendimiento
planta1-hojas	90.4 a	0.0178 a
planta1-flores	87.5 b	0.00316 b
planta2-hojas	92.73 a	0.01576 a
planta2-flores	89.62 b	0.00684 b

Los valores con letras similares no representan diferencias estadísticas significativas al nivel de confianza del 95%, por el procedimiento de comparación múltiple de Duncan.

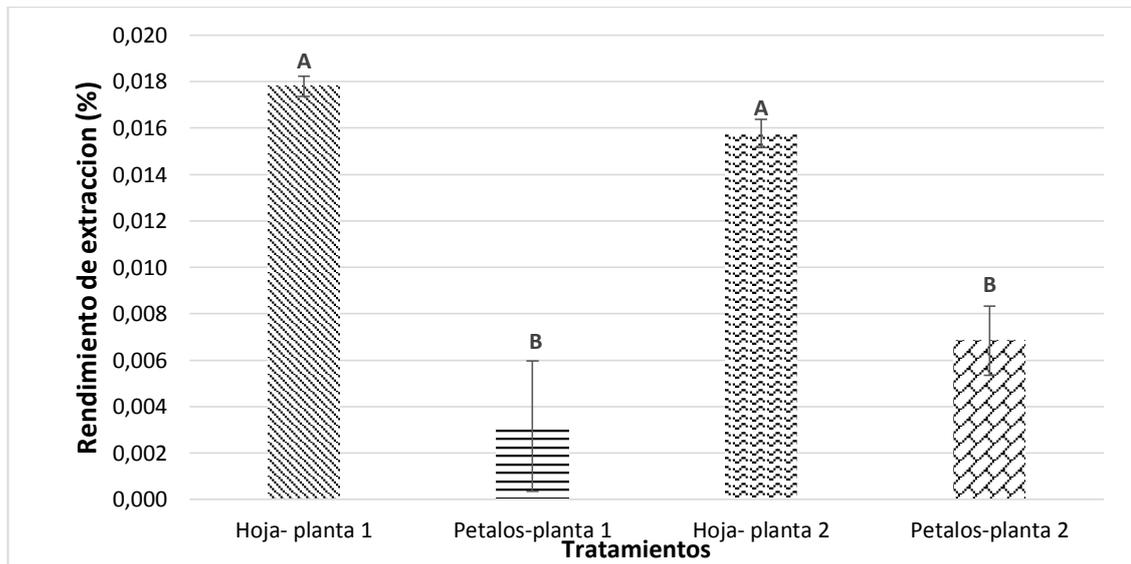


Figura 4. Rendimientos de extracción de aceite esencial de hojas y flores de dos especies de *Tagetes* spp. Las barras de error indican \pm ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Duncan).

4.1.2. Pruebas cualitativas para comprobación de *R. solanacearum*

4.1.2.1. Tinción de Gram.

Al realizar la técnica de tinción de Gram a la cepa de *R. solanacearum* cedida por la empresa NOVOPAN, dio como resultado que se tiñó de color rojo catalogándose como Gram negativa y compatibilizando con la descripción referente a *R. solanacearum* (Figura 5.)

La tinción de Gram es una técnica que revela detalles estructurales de las bacterias que ayuda a separarlas taxonómicamente en Gram positivas y Gram negativas, está basada en diferencias estructurales de las capas externas de las paredes celulares bacterianas, en forma universal se aplica como primer paso de identificación bacteriana.

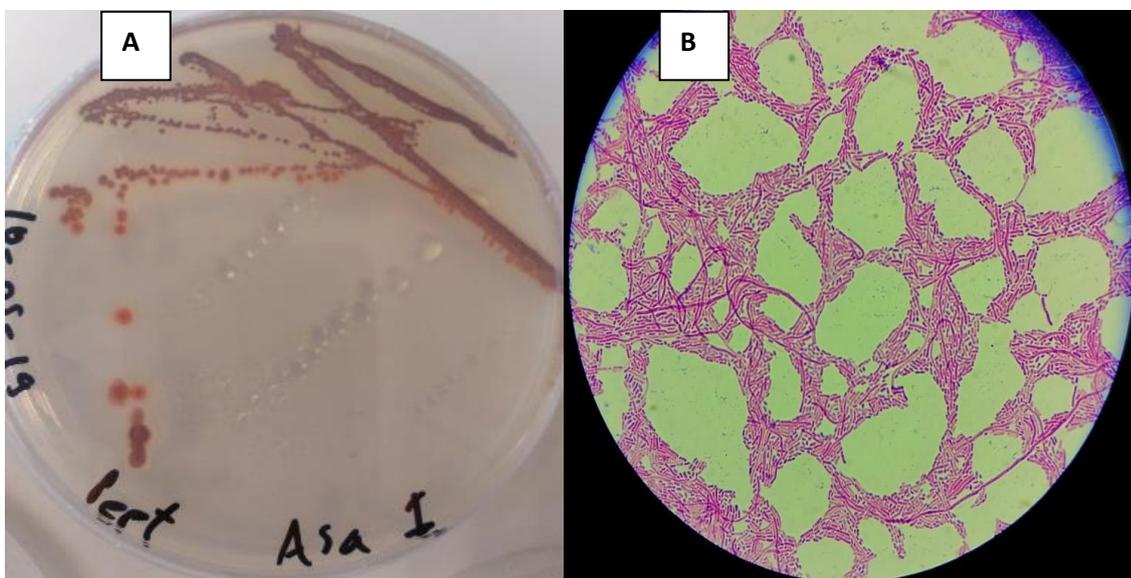


Figura 5. A. colonias de *R. solanacearum* tras 72 horas de incubación en medio de cultivo TZC (Kelman). B. resultados de tinción de gram de *R. solanacearum* (Magnificación 40x)

4.1.2.2. Prueba de catalasa

La enzima catalasa está presente en cepas bacterianas de reacción positiva con el fin de protegerse del efecto tóxico del peróxido de hidrógeno. *R. solanacearum* es una bacteria aeróbica estricta, catalasa positiva la cual tiene la capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno, resultado del metabolismo aerobio de los azúcares.

Realizada la prueba de catalasa, esta dio como resultado que las colonias repicadas en medio de cultivo King B sometidas a esta prueba fueron catalasa positivas, emitiendo la efervescencia típica de este tipo de reacción, y mediante esta prueba verificando la pertenencia de este atributo a la bacteria en estudio. Como lo muestra la figura 6.

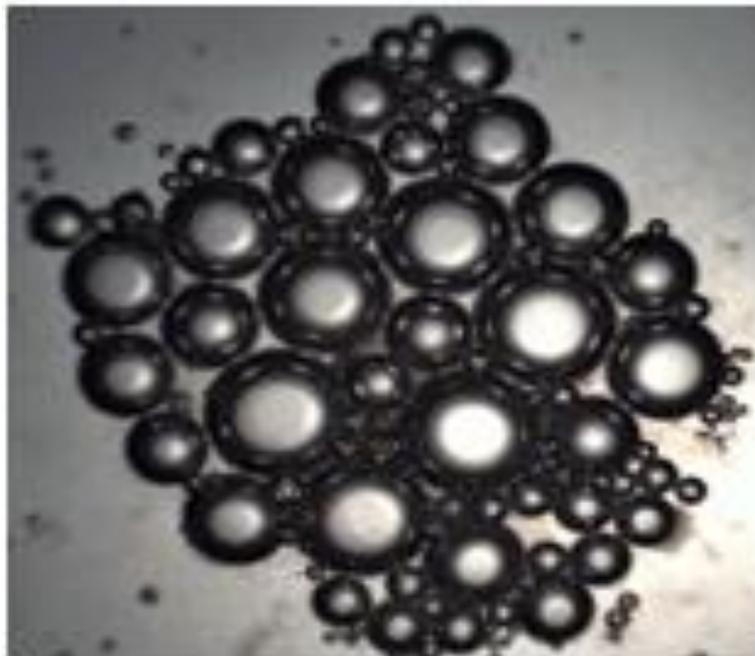


Figura 6. Resultado de prueba de Catalasa de *R. solanacearum* (Magnificación 10x).

4.1.2.3. Prueba de emisión de Fluorescencia a UV de 360 nm.

Al realizar la prueba de emisión de fluorescencia en luz ultravioleta con *R. solanacearum* incubada en agitación constante a 150 rpm por 24 horas en medio King B líquido, se obtuvo como resultado que la cepa correspondiente a *R. solanacearum* no presentó emisión de Fluorescencia, la cepa control correspondiente a *P. fluorescens* presentó una normal emisión de Fluorescencia.

El medio de cultivo King B permite la producción de fluoresceína (o pioverdina), un pigmento amarillo-verdoso que es fluorescente bajo luz ultravioleta en algunas cepas de *Pseudomonas*, por su parte *R. solanacearum* no posee la capacidad de producir dicho pigmento por lo cual se utiliza este medio de cultivo y cepas fluorescentes (+) para dicha prueba, como se representa en la figura 7.

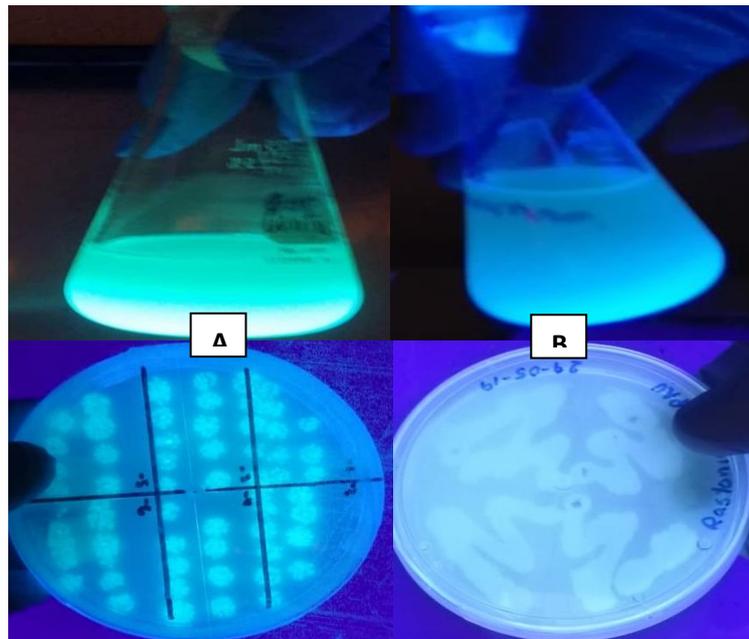


Figura 7. Prueba de emisión de Fluorescencia bajo luz UV a 360 nm **A.** Cepa de *P. Fluorescens* en medio líquido y solido sobre sobre transluminador **B.** *R. solanacearum* en medio líquido y solido sobre transluminador. Se evidencia la emisión de fluorescencia por parte de la cepa control mientras que *R. solanacearum* no fluorescente en medio King B.

4.1.3. Determinación de la capacidad bactericida de los aceites esenciales de hojas y flores de *Tagetes* spp.

*4.1.3.1. Cinética de crecimiento de *R. solanacearum* en medio de cultivo King B*

Se determinó la cinética de crecimiento de *R. solanacearum* en medio de cultivo King B, Mediante la determinación de densidad óptica a 600 nm (D.O.) y concentración celular UFC/ml (Figura 8). Adicional a esto se realizó la determinación de la cinética de crecimiento de *R. solanacearum* con etanol al 70% (3% v/v) verificando que la adición del mismo no alteró la dinámica de crecimiento de la bacteria, con esta comprobación se usó como solvente de los aceites esenciales. (Figura 9).

La mayor concentración celular al inicio de la fase estacionaria en medio King B fue de 1.53×10^9 UFC/ml, mientras que en el medio en el cual se adiciono etanol fue de 1.45×10^9 . Dichas concentraciones se alcanzaron luego de 12 horas de incubación, este tiempo se estableció para la realización de los ensayos de inhibición con aceite esencial. Cabe destacar que dichas concentraciones no difirieron estadísticamente.

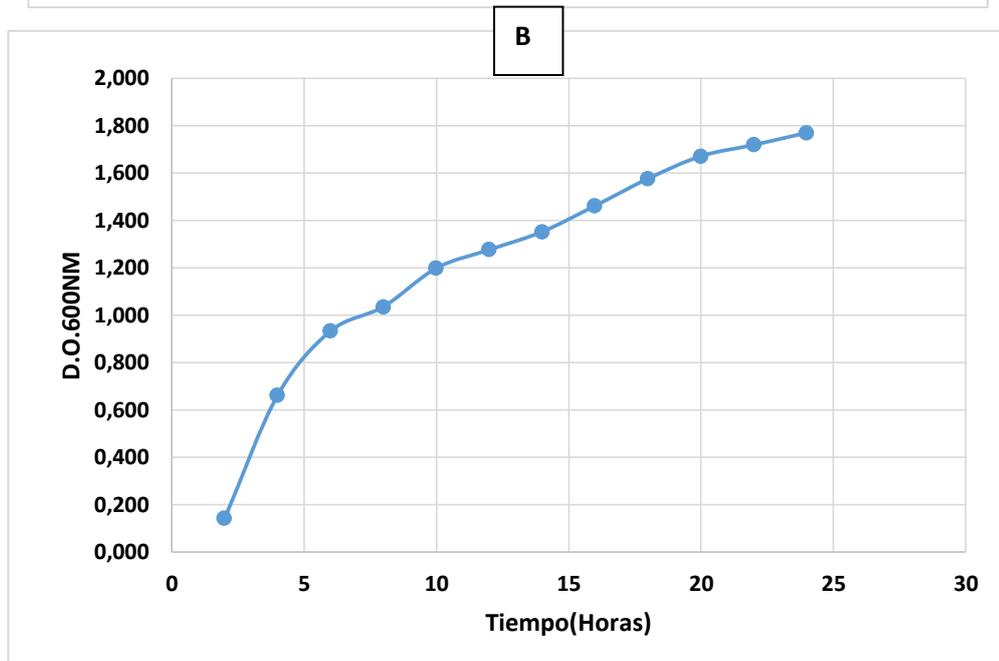
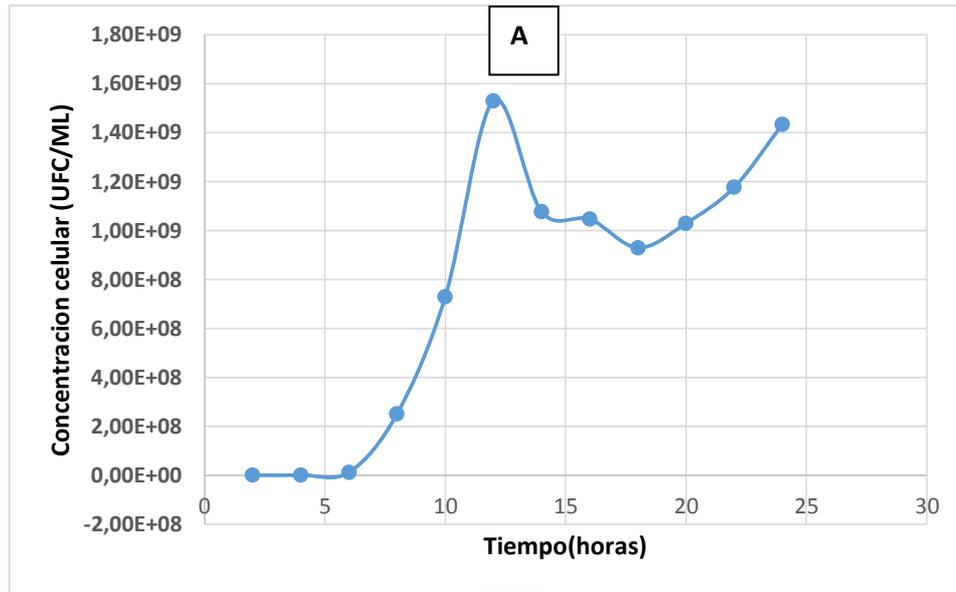


Figura 8. Cinética de crecimiento de *R. solanacearum* en medio de cultivo King B. **A.** concentración celular. **B.** Densidad óptica a 600 NM. el eje de las (y)= Concentración celular y densidad optica; (x)= Horas transcurridas.

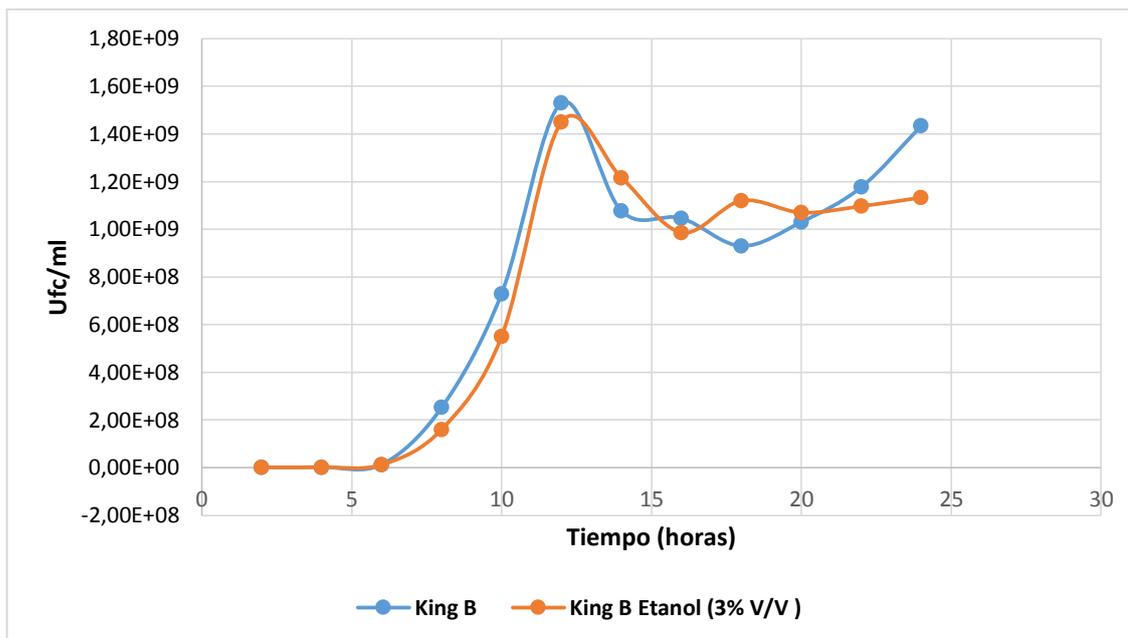


Figura 9. Cinética de crecimiento de *R. solanacearum* en medio de cultivo King B. y King B suplementado con etanol al 70% (3% V/V).

Se realizó una curva de calibración de *R. solanacearum* mediante el método de mínimos cuadrados de los parámetros D.O. y UFC/ml, obteniéndose una correlación con valores de R^2 de 0.69 (Anexo 6).

Mediante la determinación de los parámetros cinéticos se obtuvo que La fase de latencia de *R. solanacearum* en medio de cultivo King B λ (h) que corresponde a la adaptabilidad de la bacteria al medio de cultivo y el tiempo en que inicia la fase exponencial obtuvo una duración de 4.13 horas mientras que para el medio con adición de etanol al 70% (3% V/V) fue de 4.15 horas. Para el caso de la velocidad específica de crecimiento que corresponde al número de generaciones bacterianas que se obtienen en una hora de incubación fue de 1.83 en King B mientras que en el medio con la adición de etanol fue de $1.80 \mu \text{ max (h}^{-1}\text{)}$ El tiempo de generación que define el periodo de tiempo en que una bacteria tarda en duplicarse fue de 0.38 y 0.41 (G) para King B y medio suplementado

con etanol. Cabe destacar que no hubieron diferencias estadísticas entre cada uno de los parámetros que definen el crecimiento bacteriano (Tabla 8).

Tabla 8. Parámetros cinéticos de *R. solanacearum* en medios King B y King B con etanol al 70% (3% V/V)

Medio	μ max (h⁻¹)	λ (h)	G(h)	UFC/ml fase estacionaria
King B	1.83 a	4.13 a	0.38 a	1.53 x 10 ⁹ a
King				
B.Etanol(3% V/V)	1.80 a	4.15 a	0.41 a	1.45 x 10 ⁹ a

4.1.3.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria – MIC

Al realizar los ensayos de inhibición de crecimiento bacteriano se obtuvo que ninguno de las concentraciones de aceite esencial evaluados limitaron la turbidez correspondiente al crecimiento de *R.solanacearum* observándose una turbidez similar en todos los tratamientos incluido el control correspondiente a Streptomycin (25mg/l) y el control absoluto el cual solo contenía el solvente que correspondía a etanol por lo cual no existió concentración mínima inhibitoria (MIC).

4.1.3.3. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida – MBC

En todos los tratamientos evaluados no existió concentración mínima bactericida, ya que los subcultivos en medio de cultivo King B solido incubados por 16 horas presentaban colonias visibles, sin embargo al realizar las curvas de crecimiento y determinar las

UFC/ml se determinó reducción de la concentración celular a lo largo del tiempo evaluado, el cual fue de 12 horas según la cinética realizada en medio King B. Todos los aceites esenciales evaluados en todas las concentraciones provocaron una alteración de los parámetros que definen el crecimiento de la bacteria, estos indujeron al aumento del tiempo de generación y a la reducción de la velocidad específica de crecimiento.

La adición de aceite esencial obtenido a partir de hojas de la planta sierra indujo a retrasar la reproducción de *R. solanacearum* al afectar su tiempo de generación (G) con una duración de 3 horas, por ende afectó la velocidad específica de crecimiento reduciéndola drásticamente a 0,27 generaciones bacterianas por hora μ_{max} (h⁻¹) estos valores fueron incluso más bajos que los provocados por el control positivo correspondiente a la adición de estreptomicina en dosis de 25mg/l cuyos valores fueron de 1.44 y 0.48 para el tiempo de generación y velocidad específica de crecimiento respectivamente. Para el control negativo conformado por la adición de Etanol al 70% se encontraron valores de 0.38 para el tiempo de generación y 1.83 para la velocidad específica de crecimiento respectivamente.

El tratamiento conformado por la aplicación de aceite esencial al 3% de aceite obtenido de las flores de la planta costa presentó el más alto porcentaje de inhibición con 90.13% de reducción del crecimiento superando incluso al control correspondiente a estreptomicina 25mg/l cuyo porcentaje de inhibición fue de 89.48%. No obstante todos los tratamientos evaluados redujeron el crecimiento de *R. solanacearum* encontrándose mayor efecto en el obtenido a partir de las flores de las dos especies de *Tagetes* spp. Cuyos

promedios oscilaron entre 82.16 y 90.13 % mientras que los correspondientes al obtenido de hojas oscilaron entre 76.27 y 81.24 % respectivamente.

Tabla 9. Parámetros cinéticos y porcentaje de control de *R. solanacearum* en medio de cultivo King B líquido mediante la aplicación de 2 concentraciones de aceite esencial obtenido de dos especies de *Tagetes* spp.

Tratamiento	μ max (h ⁻¹)	λ (h)	G(h)	UFC/ml fase estacionaria	% de inhibición
AE 2% de hojas planta costa	1.23 d	0.81 a	0.56 ab	3.63E+08 h	76.27 g
AE 2% de flores planta costa	1.54 f	1.14 c	0.45 ab	2.73E+08 e	82.16 d
AE 2% de hojas planta sierra	1.30 e	1.10 bc	0.61 ab	2.83E+08 f	81.50 e
AE 2% de flores planta sierra	1.62 g	1.19 bc	0.59 a	2.50E+08 d	83.66 c
AE 3% de hojas planta costa	0.24 a	2.81 e	2.88 b	3.63E+08 h	76.27 g
AE 3% de flores planta costa	1.19 d	4.24 f	0.58 a	1.51E+08 b	90.13 a
AE 3% de hojas planta sierra	0.27 a	3.00 e	3.00 b	2.87E+08 g	81.24 f
AE 3% de flores planta sierra	1.11 c	5.90 g	0.62 a	1.30E+08 a	89.00 b
Streptomycina 25mg/l	0.48 b	2.17 d	1.44 ab	1.61E+08 c	89.48 b
Etanol 70%	1.83 h	4.13 f	0.38 a	1.53E+09 i	00.00 h

Los valores con letras similares no representan diferencias estadísticas significativas al nivel de confianza del 95%, por el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. μ max (h⁻¹)= Velocidad específica de crecimiento, λ (h)=duración de la fase de latencia, G(h)=Tiempo de generación, UFC/ml fase estacionaria=Unidades formadoras de colonias por mililitro

4.2. DISCUSIÓN.

La evaluación del rendimiento de extracción de aceite esencial de flores y hojas de *Tagetes* spp. por el método de hidrodestilación obtuvo como resultado que el tejido foliar de ambas especies de *Tagetes* spp. dieron rendimientos de extracción 0.018 y 0.016% , para la especie de Región Costa etiquetada en esta investigación como planta costa y la de Región Sierra etiquetada como planta sierra respectivamente. Dichos rendimientos de extracción fueron estadísticamente superiores a los obtenidos a partir de flores y cáliz de las especies evaluadas cuyos rendimientos fueron de 0.003 y 0.007 %. Cabe mencionar que son escasas las investigaciones que evalúen los rendimientos de extracción de aceite esencial de *Tagetes* spp. Por separado sino más bien las investigaciones realizadas hacen énfasis en el uso de toda la planta. Con respecto a los rendimientos de extracción, Serrato y Zapata (2015) al evaluar 4 especies diferentes de *Tagetes* spp. Con énfasis a la producción de bioplaguicidas utilizando toda la planta obtuvieron rendimientos comprendidos entre 0.0025 y 0.00125% rendimientos inferiores a los obtenidos en esta investigación sin embargo el método de extracción influye en el rendimiento puesto que dichos autores utilizaron un equipo macro de acero inoxidable de 200kg de capacidad en el cual los rendimientos disminuyeron.

Por otra parte Cedillo, Cruz, Arce & De la Luz (2012) obtuvieron rendimientos de 2.5% de aceite esencial, porcentajes de rendimientos relativamente altos y superiores a los obtenidos en este estudio considerando que se utilizó el mismo método de extracción el cual corresponde a hidrodestilación, sin embargo según los resultados la especie utilizada influye en la cantidad de aceite esencial obtenido. A este respecto Coñas (2012). Al extraer y caracterizar aceite esencial de chik chimpay (*Tagetes terniflora*) obtuvo rendimientos de 0.129%. El cual es superior a todos los porcentajes de rendimiento de los

tratamientos desarrollados en este estudio, sin embargo cabe destacar que el autor utilizó la técnica de fluido de arrastre hidrotérmico la cual difiere de esta investigación.

Cofre Santo (2012) al obtener aceites esenciales de *Tagetes minuta* por arrastre de vapor con énfasis en el control de *Drosophila melanogaster* obtuvo rendimientos de 0,38% promedios que superan a lo obtenido en esta investigación.

Lamichane y Varvaro, (2013) detalla que el medio B-King permite distinguir a las bacterias *Pseudomonas* spp. Debido a que éstas generan fluorescencia al ser expuestas a una longitud UV de 360 nm, mientras que *R. solanacearum* no fluorescente.

Inicialmente las colonias fueron sembradas en medio Kelman el cual es selectivo para el crecimiento de *R. solanacearum*, al ser repicadas en medio King B y ser sometidas a luz ultravioleta a 360 nm en un transluminador frente a una cepa control perteneciente a *P. fluorescens* cha0, esta no emitió fluorescencia esta característica coincide con el autor mencionado.

Mediante la realización de la prueba de Catalasa, se obtuvo que la cepa en estudio es catalasa positiva, mientras que al realizar la prueba de tinción de Gram se obtuvo que la reacción es Gram negativa. A este respecto (Yabuuchi *et al.*, 1995) al realizar la caracterización de *R. solnacearum* menciona que dicha bacteria es Catalasa positiva y

Gram negativa independientemente del Biovar, estas características coinciden con lo encontrado en esta investigación.

El uso de especies de *Tagetes* spp. Para el control de moko bacteriano provocado por *R. solanacearum* está cada vez más extendido. Esto se corrobora por las investigaciones publicadas recientemente. El tratamiento conformado por la aplicación de aceite esencial al 3% de aceite obtenido de las flores de la planta costa presentó el más alto porcentaje de inhibición con 90.13% de reducción del crecimiento superando incluso al control correspondiente a estreptomycin 25mg/l cuyo porcentaje de inhibición fue de 89.48%. No obstante todos los tratamientos evaluados redujeron el crecimiento de *R. solanacearum* encontrándose mayor efecto en el obtenido a partir de las flores de las dos especies de *Tagetes* spp. Cuyos promedios oscilaron entre 82.16 y 90.13 % mientras que los correspondientes al obtenido de hojas oscilaron entre 76.27 y 81.24 % respectivamente. En base a lo encontrado en esta investigación, las especies evaluadas ejercen cierto control a *R. solanacearum* encontrándose que el uso de aceite esencial obtenido a partir de cáliz y flores de especies de *Tagetes* spp. es de mayor eficacia para la reducción de inóculo de *R. solanacearum*.

A este respecto (Soto *et al.*, 2018) al evaluar aceites esenciales de hojas y flores de *Tagetes patula* además de extractos metánolicos extractos de hojas y flores reporta que los extractos y aceites obtenidos a partir de cáliz y flores de estas especies de *Tagetes* es mucho más efectivo en la reducción de crecimiento de *R. solanacearum*, sin embargo la metodología empleada en esta investigación no permitió evaluar en términos de

porcentaje la reducción del crecimiento. Por otra parte (Arenas *et al.*, 2004) reporta que mediante la incorporación de *Tagetes patula* a razón de 1Kg/m² para el control de *R. solanacearum* raza 2 en el cultivo de plátano, reporto una reducción de 84.7% de la población inicial del patógeno. Sin embargo Soto *et al* (2018) menciona que el método de obtención aceite esencial influye en gran manera en la calidad y efectividad del mismo puesto que mediante hidrodestilación se reporta una reducción de ciertos compuestos con potencial bactericida y se define como un método menos eficiente en cuanto a la calidad del aceite esencial obtenido.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Los rendimientos de extracción fueron superiores cuando se obtuvieron a partir de las hojas de las especies de *Tagetes* evaluadas con rendimientos de 100% para la especie de Region Costa y Region Sierra respectivamente.

- Los aceites esenciales de *Tagetes* spp. evaluados provocan alteraciones en los parámetros que definen el crecimiento de *R. solanacearum* reduciendo su velocidad de crecimiento y el tiempo que tarda en duplicarse.
- La aplicación de aceite esencial obtenido a partir de flores de *Tagetes* spp. en dosis de 3% es más efectiva en la inhibición de crecimiento con control de 90.13 y 89% para planta costa y 2 respectivamente.

5.2. RECOMENDACIONES

- Evaluar otros métodos de extracción de aceite esencial que hagan énfasis en la conservación de compuestos sensibles al método de extracción por hidrodestilación.
- Determinar los rendimientos de extracción mediante la aplicación de otros métodos de extracción.
- Evaluar mayores concentraciones de aceite esencial en la inhibición de crecimiento de *R. solanacearum*.
- Realizar la determinación de inhibición de crecimiento mediante método de difusión en Agar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alfenas, A. C., Zauza, E. A, V., Mafia, R. G. & Assis, T. F. (2004). Clonagem e doenças do eucalipto. Imprensa Universitária. p. 442. Recuperado el 18 de enero del 2018, Disponible en: <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp082045.pdf>

- Álvarez, E., Pantoja, A., Gañan, L., & Ceballos, G. (2015). Current status of Moko disease and black Sigatoka in Latin America and the Caribbean, and options for managing them.
- Arenas, A.; López, D.; Álvarez, E.; Llano, G.; Loke, J. 2004. Efecto de prácticas ecológicas sobre la población de *Ralstonia solanacearum* Smith, causante de Moko de plátano. *Fitopatología Colombiana* 28 (2): 76-80.
- Cardozo C, Rodríguez P, Cotes JM y Marín M. 2010. Variabilidad genética de la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Burkholderiales: Burkholderiaceae) en la zona bananera de Urabá (Colombia). Genetic variability of the bacterium *Ralstonia solanacearum* (Burkholderiales: Burkholderiaceae) in the banana-growing region of Uraba (Colombia). *Revista de Biología Tropical* 58:31-44. <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v58i1.5192>.
- Carrillo, Y. A., Gómez, M. I., Cotes, J. M., & Nústez, C. E. (2010). Efecto de algunos aceites esenciales sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en condiciones de laboratorio. *Agronomía Colombiana*, 38(2), 245-253.
- Castro, R. A. E. (1994). Origen, naturaleza y usos del cempoalxóchitl. *Revista Geografía Agrícola*, 20, 179-190.
- Cedillo, F. D., Cruz, M. A. S., Arce-Montoya, M., & de la Luz, J. L. L. (2012). Composición del aceite esencial de *Tagetes lacera*, planta endémica de Baja California Sur, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 83(2), 543-547.
- Cestari, I. M.; Sarti, S. J.; Waib, C. M.; Castello, A. 2004. Evaluation of the potential insecticide activity of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil against the head lice

- Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). Scientific Note, Neotropical Entomology 33 (6): 805-807.
- Choi, W. I.; Lee, E. H.; Choi, B. R.; Park, H. M.; Ahn, Y. J. 2003. Toxicity of plant essential oils to *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). Journal of Economic Entomology 96 (5): 1479-1484.
- Cofre Santo, C. D. (2012). Determinación de la Actividad Insecticida y/o Anti Alimentario del Aceite Esencial de *Tzinsu Tagetes minuta* en *Drosophila melanogaster* (Bachelor's thesis).
- Coñas Antezana, W. (2012). Extracción y caracterización de aceite esencial de Chikchimpay (*Tagetes terniflora* HBK).
- Duarte, Y., Pino, O., Infante, D., Sánchez, Y., Travieso, M. D. C., & Martínez, B. (2013). Efecto in vitro de aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer. Revista de Protección Vegetal, 28(1), 54-59.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization. (2004). *Ralstonia solanacearum*. Diagnostic protocols for regulated pests. OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 34:173-178. Disponible en: <file:///C:/Users/comer/Downloads/pm7-021-1-en.pdf>
- Fegan M and Prior P. 2005. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”. Pp 1-15. In: Allen C, Prior P, Hayward AC (eds). Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. Minnesota, American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minn., USA. 386p.

- Geilfus, F. (1994). El Árbol al servicio del Agricultor. Manual de Agroforestería para el Desarrollo Rural, Turrialba, Costa Rica. Volumen 2. Guía de Especies.
- Granados-Sánchez, D., & López-Ríos, G. F. (2013). Fitogeografía y ecología del género *Eucalyptus*. Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente, 13(2), 143-156.
- Gutarra, E. R. F. L., Aley, P. & Elphinstone, J. (1995). Methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato crops. In: Hardy, B., French, E.R. (Eds.). Integrated Management of Bacterial Wilt. Proceedings of an International Workshop held in New Delhi, India. 11-16, 195p. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.866.5972&rep=rep1&type=pdf>
- Hayward, A. C. (1991). The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*, 9-24.
- He, L. Y., Sequeira, L., y Kelman A. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. Plant Dis. 67:1357-1361.
- Imagen agropecuaria. (29 de octubre de 2014). <http://imagenagropecuaria.com>. Obtenido de <http://imagenagropecuaria.com/2014/abastecen-floricultores-demanda-de-la-flor-de-muerto>.
- Inec, I. N. (2010). Instituto Nacional de estadísticas y Censos. Obtenido de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/institucional/home>.

- Javier, E. Q. (1994). Foreword. In: Bacterial Wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. (Hayward, A.C., Hartman, G.L. Eds.). Wallingford, UK: CABI, p.xi-xii. 1994.
- Kelman, A. (1954). The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693-695. Recuperado el 18 de enero del 2018, Disponible en: <http://garfield.library.upenn.edu/classics1983/A1983QM45400001.pdf>
- King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2), 301–307. <https://doi.org/10.5555/URI:PII:002221435490222X>
- Kullan, A. R. K., Van Dyk, M. M., Hefer, C. A., Jones, N., Kanzler, A., & Myburg, A. A. (2012). Genetic dissection of growth, wood basic density and gene expression in interspecific backcrosses of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *BMC genetics*, 13(1), 60.
- Leonardi, G. D. A., Carlos, N. A., Mazzafera, P., & Balbuena, T. S. (2015). *Eucalyptus urograndis* stem proteome is responsive to short-term cold stress. *Genetics and molecular biology*, 38(2), 191-198
- Lin, X. P., Lin, X. J., Wu, G. J., Li, X. X., Cai, J. S. & Su, S. C. (1996). The epidemic law of bacterial wilt in *Eucalyptus*. *Journal Central South Forestry University* 16:49-55.
- Mafia, R. G. (2006) 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. 105p. Recuperado el 10 de enero del 2018, Disponible en:
[http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/1039/texto%20completo.p
df?sequence=1](http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/1039/texto%20completo.pdf?sequence=1)

Mew, T. W. & Ho, W. C. (1977). Effect of soil temperature on resistance of tomato cultivars to bacterial wilt. *Phytopathology* 67:909-911. Recuperado el 19 de enero del 2018, Disponible en:

[https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/197
7Abstracts/Phyto67_909.htm](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1977Abstracts/Phyto67_909.htm)

Miles, A. A., Misra, S. S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology & Infection*, 38(6), 732-749.

Moura, A. G. & Romeiro, R. S. (1999). Avaliação in vitro de actinomicetos como antagonistas a *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896). *Ciência e Agrotécnica*. 23:281-288. Recuperado el 09 de enero del 2018, Disponible en:
file:///C:/Users/comer/Downloads/23-2-1999_05.pdf

Naidoo S, J Fouché-Weich, P Law, KL Denby, Y Marco, DK Berger. 2014. A Eucalyptus bacterial wilt isolate from South Africa is pathogenic on Arabidopsis and manipulates host defenses. *Forest Pathology* 41(2):101-113

Nesmith, W.C., y Jenkins, S. F. 1985. Influence of antagonists and controlled matrix potential on the survival of *Pseudomonas solanacearum* in four North Carolina soils. *Phytopathology* 75, 1182-1187

Nivsarkar, M.; Cheruan, B.;melgar Padh, H. 2001. Alpha-terthienyl: A plant-derived new generation insecticide. *Current Science* 81 (6): 667-672.

- NOVOPAN. (s.f.). <http://www.novopan.com.ec/>. Obtenido de <http://www.novopan.com.ec/>: <http://www.novopan.com.ec/>
- Ono, K., Hara, H., y 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 No. 43, pp. 41-46
- Perich, M. J.; Wells, C.; Bertsch, W.; Tredway, K. E. 1994. Toxicity of extracts from three *Tagetes* against adults and larvae of yellow fever mosquito and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology 31 (6): 833-837.
- Prior P, Ailloud F, Dalsing BL, Remenant B, Sanchez B and Allen C. 2016. Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. BMC Genomics 17:1-11. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-016-2413-z>
- Ran, L. S., Liu, C. Y., Wu, G. J., Van Loon, L. C. & Bakker, P.A.H.M. (2005). Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China. Biological Control 32:111-120.
- Remache Reinoso, F. M. (2018). Evaluación del efecto de microorganismos antagonistas en el control de la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum* EF Smith), presente en plantaciones de Eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*) en la Hacienda Los Ángeles, cantón Buena Fe, provincia de Los Ríos (Bachelor's thesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo).
- Rokich, D. P.; Bell, D. T. 1995. Light quality and intensity effects on the germination of species from the jarrah (*Eucalyptus marginata*) forest of Western Australia. Australian Journal of Botany 43: 169-79.

- Romagnoli, C.; Bruni, R.; Andreotti, E.; Rai, M. K.; Viventin, C. B.; Mares, D. 2005. Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L. *Protoplasma* 225 (1-2): 57-65
- Rueda-Puente, E. O., Hernández-Montiel, L. G., Holguín-Peña, R. J., Franciso, H., López Elías, J., Huez Lopez, M. A., & Ortega-García, J. (2014). *Ralstonia solanacearum*: Una enfermedad bacteriana de importancia cuarentenaria en el cultivo de *Solanum tuberosum* L.
- Safni I, Cleenwerck I, De Vos P, Fegan M, Sly L and Kappler U. 2014. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:3087-3103. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.066712-0>
- Saxena, B.; Srivastava, J. B. 1972. *Tagetes minuta* L. oil- A new source of juvenile hormone mimicking substance. *Indian Journal of Experimental Biology* 11: 56-58.
- Serrato, M. A.; Quijano, M. L. 1993. Usos de algunas especies de *Tagetes* spp.: Revisión bibliográfica (1984-1992). p. 228- 238. En: Memorias I Simposio Internacional y II Reunión Nacional sobre Agricultura Sostenible: Importancia y Contribución de la Agricultura Tradicional. Comisión de Estudios Ambientales y Centro de Enseñanza,

Investigación y Capacitación para el Desarrollo Agrícola Regional (CEICADAR, Puebla), del Colegio de Postgraduados. México.

Soto Rueda, E. M., Rodríguez Ruiz, Y. L., Loango Chamorro, N., & Landázuri, P. (2018). Extractos de *Tagetes patula* L.(Asteraceae): un potencial bactericida contra el Moko. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 9(5), 949-959.

Supriadi, Karden, M. & Sitepu, D. (2001) Bacterial wilt disease of woody trees caused by *Pseudomonas solanacearum*: a review. Jurnal Litbang Pertanian. 20(3): 106112.
Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/262762990_Characterization_of_isolates_of_Ralstonia_solanacearum_biovar_2_pathogenic_to_Eucalyptus_urograndis_hybrids

Taborda Andrade, L. A., Sanchez Orozco, M. S., Bonilla Correa, C. R., & Huertas Davey, C. (2015). Efecto fungistático de extractos y aceites esenciales de *Lippia organoides* HBK y *Thymus vulgaris* L. como alternativas de manejo de *Botrytis cinerea* en fresa. Acta agronómica, 64(1), 93-99.

Tomova, B. S., Waterhouse, J. S.; Doberski, J. 2005. The effect of fractionated *Tagetes* oil volatiles on aphid reproduction. Entomologia Experimentalis et Applicata 115 (1): 153-159.

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 enero del 2018, Disponible en:

[https://www.apsnet.org/publications/mpmi/BackIssues/Documents/1995Articles/
Microbe08-241.pdf](https://www.apsnet.org/publications/mpmi/BackIssues/Documents/1995Articles/Microbe08-241.pdf)

Weaver, D. K.; Zettler, J. L.; Wells, C. D.; Baker, J. E.; Bertsch, W.; Throne, J. E. 1997. Toxicity of fractionated and degraded Mexican marigold floral extract to adult *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology* 90 (6): 1678-1683.

Wu, Q. P. & Liang, Z. C. (1988). Selection of species and provenance of *Eucalyptus* for resistance to bacterial wilt. *Journal South China Agriculture University*. 9:41-45.

Xu, J., Zheng, H. J., Liu, L., Pan, Z. C., Prior, P., Tang, B. & Feng, J. (2011). Complete genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* strain Po82.

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. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) Comb. Nov. *Microbiology and immunology*, 39(11), 897-904.

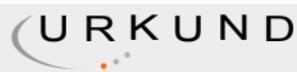
Zygadlo, J. A.; Guzmán, C. A.; Grosso, N. R. 1994. Antifungal properties of the leaf oils of *Tagetes minuta* L. and *T. filifolia* Lag. *Journal of Essential Oil Research* 6 (6): 617-621.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado URKUND del reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico.

**REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCID
Y/O PLAGIO ACADÉMICO**

El suscrito, Dr. **Hayron Fabricio Canchignia Martínez**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, en calidad de Director del Proyecto de Investigación titulado **ACEITES ESENCIALES DE *TAGETES* spp. (FLOR DE MUERTO) Y SU EFECTO BACTERICIDA A *Ralstonia solanacearum* EN CONDICIONES *IN VITRO***, previo a la obtención del grado académico de Magister en Manejo Forestal Sostenible, perteneciente al Ingeniero Forestal **Edgar Mesias Quintana Álava**, CERTIFICA: el cumplimiento de los parámetros establecidos por el SENESCYT, y se evidencia el reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico (URKUND) con un porcentaje de coincidencia del 5 %.

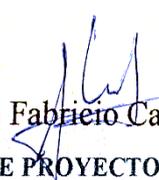


Urkund Analysis Result

Analysed Document: tesis final quintana.docx (D56193658)
Submitted: 29/09/2019 16:19:00
Submitted By: hcanchignia@uteq.edu.ec
Significance: 5 %

Sources included in the report:

GADEA_PALLAS_DP02403_20180703_1100_c007.pdf (D40565237)
Jorge Luis Rodríguez.docx (D42727898)
https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/rt/printerFriendly/43121/45819
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2168212/>
<https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/44289>


Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Anexo 2. Razas y biovariedades de *R. solanacearum*

Raza	Anfitrión Distancia	Distribución geográfica	Biovar
1	Amplio	Asia, Australia América	3,4 1
2	Plátano, otras <i>Musa spp.</i>	Caribe, Brasil, en todo el mundo	1
3	Papa (<i>Solanum tuberosum</i>), geranio (<i>Geranium spp</i>), algunas otras especies.	En todo el mundo, excepto en Canadá	2
4	Jengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	Asia	3,4
5	Mora (<i>Rubus ulmifolius</i>)	China	5

Fuente: (Adaptado de Daughtrey 2003)

Anexo 3. Flores de *Tagetes spp.* procedentes de región costa (planta costa)



Anexo 4. Flores de *Tagettes* sp. Región Sierra(planta2)



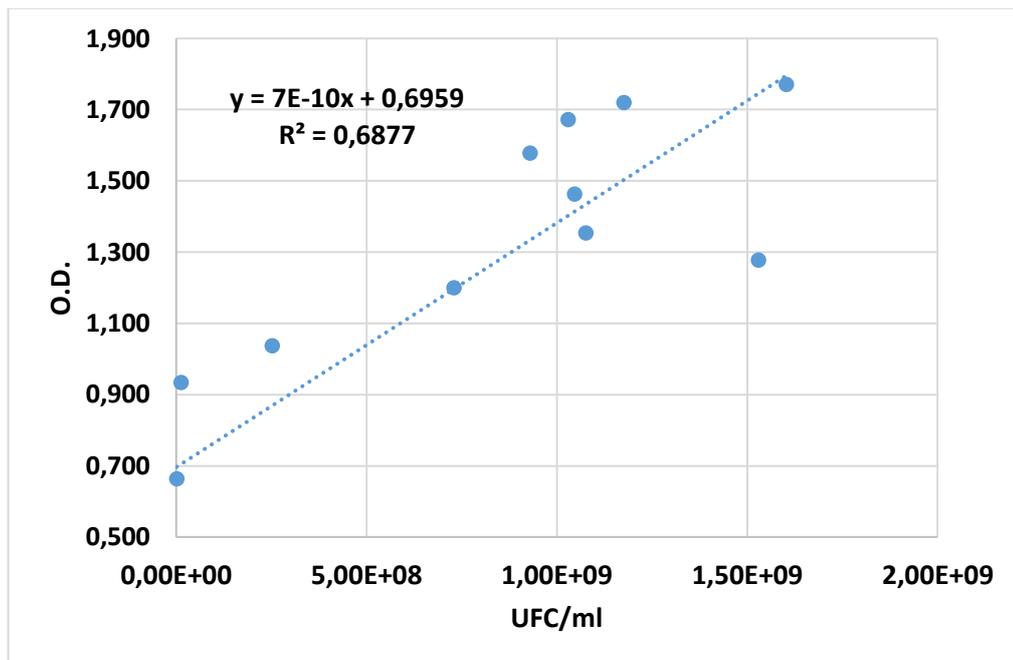
Anexo 5. Pesaje del tejido para determinación del porcentaje de humedad.



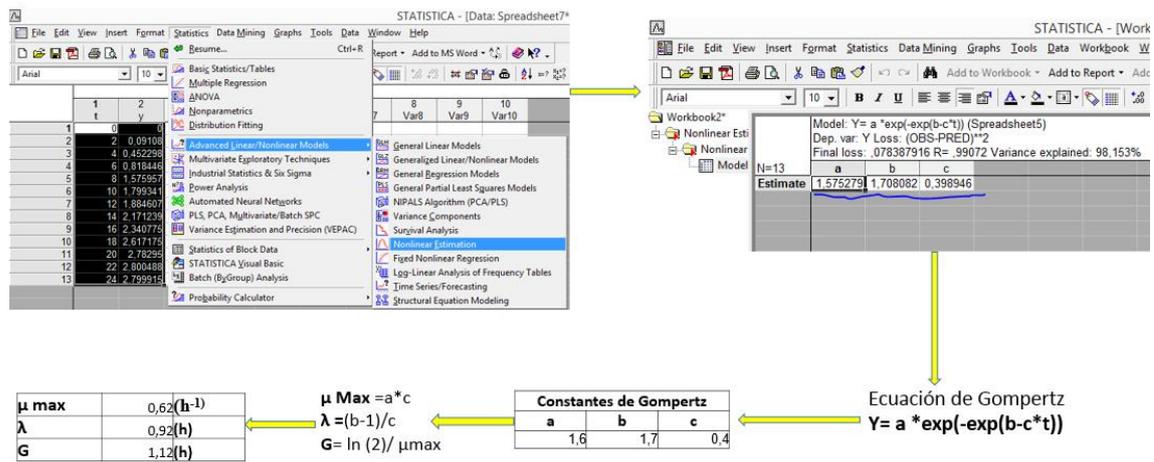
Anexo 6. Equipo de hidrodestilación utilizado para realización de ensayos de extracción



Anexo 7. Curva de calibración Densidad óptica (D.O.) y concentración celular (UFC/ml) de *R. solanacearum* incubada en King B.



Anexo 8. Determinación de parámetros cinéticos mediante Software Estadística y modelo matemático de Gompertz.



Anexo 9. Disminución del número de colonias bacterianas por efecto de Aceite esencial de flores al 3%. A. control B. Aceite esencial planta uno 3%. C. aceite esencial planta dos al 3%

