



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

**DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL EXTRACTO**  
**ALCOHÓLICO Y LA MACERACIÓN DE LA FLOR DE MUERTO**  
**(*Tagetes erecta* L.) EN EL MANEJO DE LA MARCHITEZ**  
**BACTERIANA (*Ralstonia solanacearum* Smith.) EN EUCALIPTO**  
**TROPICAL (*Eucalyptus urograndis*)**

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

**ANA ALEXANDRA REYES ROBALINO**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2019**

## HOJA DE CERTIFICACIÓN

EL TRIBUNAL DE TRABAJO DE TITULACIÓN CERTIFICA, que el trabajo de investigación titulado: **DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO Y LA MACERACIÓN DE LA FLOR DE MUERTO (*Tagetes erecta* L.) EN EL MANEJO DE LA MARCHITEZ BACTERIANA (*Ralstonia solanacearum* Smith.) EN EUCALIPTO TROPICAL (*Eucalyptus urograndis*)** de responsabilidad de la señorita Ana Alexandra Reyes Robalino ha sido prolijamente revisado, quedando autorizada su presentación.

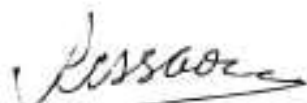
### TRIBUNAL DE TRABAJO DE TITULACIÓN



Ing. Carlos Francisco Carpio Coba  
**DIRECTOR**

10/12/2013

**Fecha**



Dra. Rosa del Pilar Castro Gómez  
**MIEMBRO**

10/12/2019

**Fecha**

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Ana Alexandra Reyes Robalino, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

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

Riobamba, 10 de diciembre de 2019.



.....  
Ana Alexandra Reyes Robalino

060367410-2

## AUTORÍA

La autoría del presente trabajo de investigación es de propiedad intelectual del autor y de la empresa NOVOPAN DEL ECUADOR S.A. conjuntamente con la Escuela de Ingeniería Forestal y de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.



.....

Ana Alexandra Reyes Robalino

060367410-2

## DEDICATORIA

*A mi Divino Niño, por cuidarme durante todos estos años y los que vienen, que excelente labor que hace.*

*A mis ángeles en el cielo, por cuidarme, guiarme y corregirme en cada paso que doy. Les he amado todos los años que estuvieron conmigo, y les sigo amando todos los que no están.*

*A mis padres, Luis y Ana por ser mis mejores amigos, por estar conmigo en cada derrota y triunfo, por ser tan incondicionales, ojalá y sean eternos. ¡LOS AMO TANTO!*

*A mi hermano, Jorge por ser un grandioso ejemplo de hermanito mayor, gracias por todo.  
TE AMO.*

*A ti, por llegar, enseñarme tantas cosas lindas de la vida, cuidarme y quedarte siempre a mi lado, mi eterno 21.*

*A mi hija de cuatro patas, mi fiel y eterna compañera Kira, por llegar a rescatarme, cuidarme y salvarme de tanto en la vida. ¡Eres la mejor!*

## AGRADECIMIENTOS

*A mis padres Luis y Ana, hermano de sangre Jorge, a mi hermano de años Kevin y familia por tanto apoyo y amor incondicional.*

*A mis amigos y amigas, los que se quedaron, los que se fueron y a los que seguirán gracias por estar conmigo en cada paso y hacerme la persona más feliz.*

*Al Ing. Carlos Carpio como director de la investigación y a la Dra. Rosita Castro como miembro, por su ayuda, tiempo y paciencia durante el desarrollo del trabajo y durante toda la carrera.*

*A mis profesores, a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por todas las enseñanzas brindadas durante estos años.*

*A los profesores de la Facultad de Ciencias por su paciencia y enseñanzas.*

***¡GRACIAS MIS PERSONAS BONITAS!***

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
TABLA DE CONTENIDOS	vii – viii
LISTA DE TABLAS	ix – xi
LISTA DE FIGURAS	xii – xiv
LISTA DE ANEXOS	xv – xvi
I. DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO Y LA MACERACIÓN DE LA FLOR DE MUERTO ( <i>Tagetes erecta</i> L.) EN EL MANEJO DE LA MARCHITEZ BACTERIANA ( <i>Ralstonia solanacearum</i> Smith.) EN EUCALIPTO TROPICAL ( <i>Eucalyptus urograndis</i> )	1
II. INTRODUCCIÓN	1 – 2
A. JUSTIFICACIÓN	2 – 3
B. OBJETIVOS	3
C. HIPÓTESIS	3
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4 – 28
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	29 – 58
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59 – 74
VI. CONCLUSIONES	75
VII. RECOMENDACIONES	76

VIII.	RESUMEN	77
IX.	SUMMARY	78
X.	BIBLIOGRAFÍA	79 – 86
XI.	ANEXOS	87 – 95



## LISTA DE TABLAS

Contenido	Página
<b>Tabla N° 1.</b> Clasificación taxonómica del Eucalipto Tropical ( <i>Eucalyptus urograndis</i> ).	4
<b>Tabla N° 2.</b> Muestra los requerimientos del Eucalipto Tropical ( <i>Eucalyptus urograndis</i> ).	8
<b>Tabla N° 3.</b> Clasificación taxonómica de la Marchitez Bacteriana ( <i>Ralstonia solanacearum</i> ).	11
<b>Tabla N° 4.</b> Clasificación taxonómica de la Flor de Muerto ( <i>Tagetes erecta</i> ).	23
<b>Tabla N° 5.</b> Características Climáticas del Cantón Riobamba.	30
<b>Tabla N° 6.</b> Características Climáticas del Cantón Buena Fe.	31
<b>Tabla N° 7:</b> Tratamientos evaluados en el ensayo 1 (momento 1).	41
<b>Tabla N° 8:</b> Preparación de los tratamientos evaluados en el ensayo 1 (momento 1).	42
<b>Tabla N° 9.</b> Escala para evaluación del porcentaje de inhibición de la bacteria.	44
<b>Tabla N° 10:</b> Tratamientos evaluados en el ensayo 2 (momento 2).	45
<b>Tabla N° 11.</b> Preparación de las concentraciones de los extractos y de los testigos evaluados en la primera parte del ensayo 2 (momento 2).	48
<b>Tabla N° 12.</b> Preparación de las concentraciones de los testigos evaluados en la segunda parte del ensayo 2 (momento 2).	50
<b>Tabla N° 13.</b> Ensayos realizados en el tamizaje fitoquímico con los extractos alcohólicos.	56
<b>Tabla N° 14:</b> Análisis de Varianza del porcentaje de inhibición del efecto de los tratamientos evaluados sobre <i>Ralstonia solanacearum</i> a las 24 horas. En ensayos realizados entre el 16 y 27 de mayo de 2019.	60

<b>Tabla N° 15:</b> Análisis de Varianza del porcentaje de inhibición del efecto de los tratamientos evaluados sobre <i>Ralstonia solanacearum</i> a las 48 horas. En ensayos realizados entre el 16 y 27 de mayo de 2019.	61
<b>Tabla N° 16:</b> Análisis de Varianza del porcentaje de inhibición del efecto de los tratamientos evaluados sobre <i>Ralstonia solanacearum</i> a las 72 horas. En ensayos realizados entre el 16 y 27 de mayo de 2019.	61
<b>Tabla N° 17:</b> Análisis de Varianza del porcentaje de inhibición del efecto de los tratamientos evaluados sobre <i>Ralstonia solanacearum</i> a las 96 horas. En ensayos realizados entre el 16 y 27 de mayo de 2019.	62
<b>Tabla N° 18:</b> Prueba de Tukey al 5% del porcentaje de inhibición del efecto de los tratamientos evaluados sobre <i>Ralstonia solanacearum</i> a las 96 horas. En ensayos realizados entre el 16 y 27 de mayo de 2019.	62
<b>Tabla N° 19:</b> Análisis de Varianza del porcentaje de inhibición del efecto de los tratamientos evaluados sobre <i>Ralstonia solanacearum</i> a las 120 horas. En ensayos realizados entre el 16 y 27 de mayo de 2019.	63
<b>Tabla N° 20:</b> Prueba de Tukey al 5% del porcentaje de inhibición del efecto de los tratamientos evaluados sobre <i>Ralstonia solanacearum</i> a las 120 horas. En ensayos realizados entre el 16 y 27 de mayo de 2019.	63
<b>Tabla N° 21:</b> Análisis de Varianza de los halos de inhibición resultantes del efecto de los tratamientos evaluados sobre <i>Ralstonia solanacearum</i> . En ensayos realizados entre el 19 y 21 de junio de 2019 (Primera Parte).	65
<b>Tabla N° 22:</b> Prueba de Tukey al 5% de los halos de inhibición resultantes del efecto de los tratamientos evaluados sobre <i>Ralstonia solanacearum</i> . En ensayos realizados entre el 19 y 21 de junio de 2019 (Primera Parte).	65
<b>Tabla N° 23:</b> Análisis de Varianza de los halos de inhibición resultantes del efecto de los tratamientos evaluados sobre <i>Ralstonia solanacearum</i> . En ensayos realizados entre el 2 y 4 de julio de 2019 (Segunda Parte).	67

<b>Tabla N° 24:</b> Prueba de Tukey al 5% de los halos de inhibición resultantes del efecto de los tratamientos evaluados sobre <i>Ralstonia solanacearum</i> . En ensayos realizados entre el 2 y 4 de julio de 2019 (Segunda Parte).	67
<b>Tabla N° 25.</b> Resultados del análisis del Tamizaje Fitoquímico del Extracto Alcohólico de <i>Tagetes erecta</i> .	71

## LISTA DE FIGURAS

Contenido	Página
<b>Figura N° 1.</b> Árboles de Eucalipto Tropical ( <i>Eucalyptus urograndis</i> ).	5
<b>Figura N° 2.</b> Bacilos Gram Positivos.	10
<b>Figura N° 3.</b> Bacilos Gram Negativos.	10
<b>Figura N° 4.</b> Cocos Gram Positivos.	10
<b>Figura N° 5.</b> Cocos Gram Negativos.	10
<b>Figura N° 6.</b> Tinción GRAM de <i>Ralstonia solanacearum</i> .	10
<b>Figura N° 7.</b> Bacteria <i>Ralstonia solanacearum</i> .	12
<b>Figura N° 8.</b> Síntomas de <i>Ralstonia solanacearum</i> en Eucalipto.	15
<b>Figura N° 9.</b> Aislamiento de <i>Ralstonia solanacearum</i> color blanquecino.	17
<b>Figura N° 10.</b> Aislamiento de <i>Ralstonia solanacearum</i> color rojizo.	17
<b>Figura N° 11.</b> Muestra la Bipartición o fisión binaria	18
<b>Figura N° 12.</b> Especies Arbóreas Hospederas de <i>Ralstonia solanacearum</i> .	19
<b>Figura N° 13.</b> Extractos vegetales de <i>Tagetes erecta</i> .	22
<b>Figura N° 14.</b> Flor de Muerto ( <i>Tagetes erecta</i> ).	25
<b>Figura N° 15.</b> Luteína Extraída de la Flor de Muerto ( <i>Tagetes erecta</i> ).	27
<b>Figura N° 16.</b> Muestra la estructura de la Luteína.	27
<b>Figura N° 17.</b> Muestra la estructura del Isopreno.	28
<b>Figura N° 18.</b> Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólicos de <i>Tagetes erecta</i> .	28
<b>Figura N° 19.</b> Ubicación de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y de los laboratorios utilizados.	29
<b>Figura N° 20:</b> Ubicación de la Hacienda “La Chelita” en el Recinto Los Ángeles – Los Ríos.	31
<b>Figura N° 21:</b> Recolección de la bacteria.	32
<b>Figura N° 22:</b> Muestra lavada.	33

<b>Figura N° 23:</b> Muestra prensada para herborizar.	33
<b>Figura N° 24:</b> Muestra herborizada en comparación para su identificación.	33
<b>Figura N° 25:</b> Esterilización de los medios de cultivo.	35
<b>Figura N° 26:</b> Dispersión de los medios de cultivo en las cajas Petri.	35
<b>Figura N° 27:</b> Siembra de la bacteria.	35
<b>Figura N° 28:</b> Incubación de la bacteria.	35
<b>Figura N° 29:</b> Bacteria sembrada por estrías.	35
<b>Figura N° 30:</b> Preparación del frotis de <i>Ralstonia solanacearum</i> .	37
<b>Figura N° 31:</b> Frotis seco, listo para las tinciones.	37
<b>Figura N° 32:</b> Frotis seco, listo para la observación.	37
<b>Figura N° 33:</b> Observación en el microscopio con aceite de inmersión.	37
<b>Figura N° 34:</b> Plantas lavadas y sin raíz	39
<b>Figura N° 35:</b> Flores separadas y cortadas.	39
<b>Figura N° 36:</b> Cáliz separados y cortados.	39
<b>Figura N° 37:</b> Tallos separados y cortados.	39
<b>Figura N° 38:</b> Hojas separadas y cortadas.	39
<b>Figura N° 39:</b> Estufa de secado.	39
<b>Figura N° 40:</b> Tallos y hojas cortados en la estufa.	39
<b>Figura N° 41:</b> Flores y cáliz cortados en la estufa.	39
<b>Figura N° 42:</b> Planta seca lista para moler.	40
<b>Figura N° 43:</b> Molino para planta.	40
<b>Figura N° 44:</b> Planta molida.	40
<b>Figura N° 45:</b> Preparación de los extractos.	40
<b>Figura N° 46:</b> Filtrado de los extractos.	40
<b>Figura N° 47:</b> Filtrado de los extractos.	40
<b>Figura N° 48:</b> Concentración de los extractos alcohólicos en el rotavapor.	40
<b>Figura N° 49:</b> Preparación de las concentraciones 25, 50 y 100 % de los extractos alcohólicos.	43
<b>Figura N° 50:</b> Bacteria inoculada en las concentraciones de metanol.	43
<b>Figura N° 51:</b> Bacteria inoculada en las concentraciones de etanol.	43

<b>Figura N° 52:</b> Bacteria inoculada en los testigos.	43
<b>Figura N° 53:</b> Bacteria inoculada en los diferentes medios y concentraciones en la incubadora.	44
<b>Figura N° 54:</b> Preparación de los materiales para esterilizar.	51
<b>Figura N° 55:</b> Plaqueó del medio en las cajas.	51
<b>Figura N° 56:</b> Preparación de las concentraciones.	51
<b>Figura N° 57:</b> Preparación de la bacteria (escala de McFarland).	51
<b>Figura N° 58:</b> Colocación de los discos en el medio gelificado.	51
<b>Figura N° 59:</b> Aplicación de las concentraciones en los discos y sellado.	51
<b>Figura N° 60:</b> Extractos alcohólicos en tubos de ensayo.	55
<b>Figura N° 61:</b> Extractos alcohólicos en la cocineta de laboratorio.	55
<b>Figura N° 62:</b> Algunos de los reactivos usados para el tamizaje fitoquímico de los extractos.	55
<b>Figura N° 63:</b> Preparación de los extractos alcohólicos con los reactivos.	55
<b>Figura N° 64:</b> Resultados de la Tinción GRAM.	59
<b>Figura N° 65:</b> Resultados de la Tinción GRAM.	59
<b>Figura N° 66:</b> Porcentaje de inhibición del testigo blanco metanol al 100 %.	64
<b>Figura N° 67:</b> Porcentaje de inhibición del testigo blanco etanol al 100 %.	64
<b>Figura N° 68:</b> Halos de inhibición con Sulfato de Estreptomicina.	71
<b>Figura N° 69:</b> Halos de inhibición con Sulfato de Cobre Pentahidratado.	71
<b>Figura N° 70:</b> Resultados del Tamizaje Fitoquímico de los extractos alcohólicos (Etanol y Metanol) de <i>Tagetes erecta</i> .	74

## LISTA DE ANEXOS

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>Anexo N° 1:</b> Muestras de la colonia de <i>Ralstonia solanacearum</i> coloreadas con tinción de Gram.	87
<b>Anexo N° 2:</b> Muestras de la colonia de <i>Ralstonia solanacearum</i> coloreadas con tinción de Gram.	87
<b>Anexo N° 3:</b> Extractos alcoholicos de <i>Tagetes erecta</i> .	87
<b>Anexo N° 4:</b> Extractos oleosos de <i>Tagetes erecta</i> .	87
<b>Anexo N° 5:</b> Ubicación del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales.	87
<b>Anexo N° 6:</b> Ubicación del Laboratorio de Ecología Natural y Aplicada de la Facultad de Ciencias.	87
<b>Anexo N° 7:</b> Ubicación de los Laboratorios de Productos Naturales, de Tecnología Farmacéutica y de Análisis Bioquímico y Bacteriológico de la Facultad de Ciencias.	88
<b>Anexo N° 8:</b> Muestra herborizada.	88
<b>Anexo N° 9:</b> Árbol infectado con <i>R solanacearum</i> .	88
<b>Anexo N° 10:</b> Certificado de identificación de <i>Tagetes erecta</i> .	89
<b>Anexo N° 11:</b> Tabla del porcentaje de inhibición a las 24 horas (Ensayo 1. Momento 1).	90
<b>Anexo N° 12:</b> Tabla del porcentaje de inhibición a las 48 horas (Ensayo 1. Momento 1).	90
<b>Anexo N° 13:</b> Tabla del porcentaje de inhibición a las 72 horas (Ensayo 1. Momento 1).	91
<b>Anexo N° 14:</b> Tabla del porcentaje de inhibición a las 96 horas (Ensayo 1. Momento 1).	92
<b>Anexo N° 15:</b> Tabla del porcentaje de inhibición a las 120 horas (Ensayo 1. Momento 1).	92

<b>Anexo N° 16:</b> Tabla de milímetros de inhibición a las 24 horas (Ensayo 2. Momento 2: Primera Parte).	93
<b>Anexo N° 17:</b> Tabla de milímetros de inhibición a las 24 horas (Ensayo 2. Momento 2: Segunda Parte).	94



# **I. DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO Y LA MACERACIÓN DE LA FLOR DE MUERTO (*Tagetes erecta* L.) EN EL MANEJO DE LA MARCHITEZ BACTERIANA (*Ralstonia solanacearum* Smith.) EN EUCALIPTO TROPICAL (*Eucalyptus urograndis*)**

## **II. INTRODUCCIÓN**

En los últimos años se han observado problemas con la sanidad de las plantas alrededor del mundo, principalmente enfermedades causadas por hongos y bacterias que si no se controlan pueden llegar a causar pérdidas para las empresas o propietarios, NOVOPAN DEL ECUADOR S.A. posee un patrimonio forestal de más de 7400 hectáreas (Ha) establecidas con Pino (*Pinus radiata*) y Eucalipto (*Eucalyptus* sp.), mismas que se encuentran en proyectos propios y bajo modalidad de convenio distribuidas en cuatro zonas produciendo más de 2 000000 de plantas anuales (NOVOPAN, 2018).

La marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* Smith Yabuuchi. es una devastadora enfermedad que afecta a varios cultivos, cerca de 54 familias de importancia económica a nivel mundial (Naranjo & Martínez, 2013). Las enfermedades causadas por *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas* sp y *Quambalaria eucalypti* son consideradas las enfermedades más importantes para el género *Eucalyptus* dentro de los viveros en zonas cálidas ya que las altas temperaturas favorecen al desarrollo de estas (Alfenas *et al.*, 2004).

La flor de muerto (*Tagetes erecta*), se reconoce como una planta antagonista, debido a sus propiedades, ya que al rotar e incorporar residuos de su flor o al asociarla con cultivos reducen especies de nemátodos y fitoparásitos (UNAM s.f.).

Los extractos botánicos son aquellos obtenidos de las partes de las plantas como: tallos, hojas, flores, frutos, raíces y cortezas, pudiendo utilizar toda la planta o solo una parte específica de la misma, los cuales presentan metabolitos secundarios con cierta actividad antibacteriana y antifúngica.

Las extracciones alcohólicas son usadas generalmente en mezclas hidroalcohólicas, es uno de los elementos más utilizados debido a su actividad antimicrobiana y a la inactivación de enzimas. La maceración ha sido usada para extraer los principios activos de las plantas. Es

empleada para extracciones sólido – líquido, usando como fase líquida distintos tipos de elementos. La maceración en aceites también llamadas oleatos o extractos oleosos son un método de extracción de los aceites esenciales y principios activos que contienen las plantas.

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta mediante reactivos con solventes apropiados que nos dan un color o precipitación con una evaluación rápida para orientarnos a los grupos de mayor interés presentes.

## A. JUSTIFICACIÓN

La afectación a los clones y a las plantaciones por diversos patógenos con el paso del tiempo disminuye la producción generando pérdidas, la principal enfermedad es causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum* Smith. que causa marchitez, obstruyendo los tejidos conductores en las plantas. La empresa NOVOPAN DEL ECUADOR S.A. ha implementado diversos estudios y métodos para controlar esta marchitez, sin obtener resultados satisfactorios. Actualmente, como una alternativa de solución se evaluó maceraciones de *Tagetes erecta* L. conocida como Flor de Muerto.

NOVOPAN DEL ECUADOR S.A. es una empresa forestal autosustentable que va camino a la excelencia, dedicada a la producción de madera de alta calidad y valor agregado, generando, procesando y optimizando el recurso natural con una alta tecnología que satisface las necesidades de los clientes.

Al ser una empresa que cuenta con sus propios viveros y plantaciones han diseñado algunos ámbitos de investigación para el control y manejo de plagas que ocasionan pérdidas dentro de vivero y plantaciones, en especial para la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum* Smith.), misma que es una enfermedad distribuida a nivel mundial siendo considerada una de las bacterias fitopatógenas más importantes por su dificultad de control, perjuicios económicos que causa y por su amplio rango de hospederos.

Buscando soluciones para reducir el uso de productos químicos como alternativa de control, en este proceso de investigación se trató de encontrar un método de control biológico con la finalidad de reducir la cantidad de plantas afectadas por la Marchitez Bacteriana (*Ralstonia*

solanacearum) utilizando un extracto alcohólico y un extracto oleoso de la Flor de Muerto (*Tagetes erecta* L.), y comparando su efectividad con algunos productos químicos que las empresas y propietarios usan como alternativa de control.

## **B. OBJETIVOS**

### **1. General**

Determinar la eficiencia de la extracción alcohólica y la maceración de la Flor de Muerto (*Tagetes erecta* L.) para el manejo de la Marchitez Bacteriana (*Ralstonia solanacearum* Smith.) en Eucalipto Tropical (*Eucalyptus urograndis*).

### **2. Específicos**

- Evaluar diferentes dosis de extracción alcohólica y maceración de la Flor de Muerto *T. erecta* L. en el control de *Ralstonia solanacearum* Smith en laboratorio.
- Caracterizar los extractos mediante un Tamizaje Fitoquímico.

## **C. HIPÓTESIS**

### **1. HIPÓTESIS NULA – H<sub>0</sub>**

Las diferentes dosis de los extractos de la Flor de Muerto (*Tagetes erecta* L.) no tienen efecto en el control de la Marchitez Bacteriana (*Ralstonia solanacearum* Smith.).

### **2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA – H<sub>1</sub>**

Al menos una de las dosis de los extractos de la Flor de Muerto (*Tagetes erecta* L.) tienen efecto en el control de la Marchitez Bacteriana (*Ralstonia solanacearum* Smith.).

### III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

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

##### 1. Taxonomía

Según Mendoza, (2015) & P&C Maderas, (2013); la taxonomía del Eucalipto Tropical (**Tabla 1**), es:

**Tabla N° 1.** Clasificación taxonómica del Eucalipto Tropical (*Eucalyptus urograndis*).

<i>Eucalyptus urophylla</i> X <i>Eucalyptus</i>	
Nombre Científico	<i>grandis</i> o <i>Eucalyptus urograndis</i> H.B.K.
Nombre Común	Eucalipto Tropical
<b>Reino</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase:</b>	Rosidae
<b>Orden:</b>	Myrtales
<b>Familia:</b>	Myrtaceae
<b>Subfamilia:</b>	Myrtoideae
<b>Tribu:</b>	Eucalypteae
<b>Género:</b>	Eucalyptus
<b>Especie</b>	<i>E. urophylla</i> X <i>E. grandis</i> o <i>E. urograndis</i>

Fuente: (Mendoza, 2015 & P&C Maderas, 2013).

##### 2. Descripción Botánica

El *Eucalipto urograndis* H.B.K. Es un híbrido de *Eucalyptus urophylla* y *Eucalyptus grandis*. Considerada una especie de rápido crecimiento (mayor a 45 m<sup>3</sup>/Ha/año). Crece normalmente 35 metros de altura, en ocasiones alcanza los 50 metros con diámetros de 30 cm a 1.5 metros (Mendoza, 2015).

Los híbridos heredan las características de sus padres de una manera intermedia. Dado que se hereda tanto lo bueno como lo malo, es muy recomendable utilizar los mejores genotipos como padres. Asociado aparece el concepto de superioridad híbrida, término usado en producción animal para indicar complementariedad (debido a genes de acción aditiva), cuando el híbrido

combina características deseadas de ambos padres y heterosis o vigor híbrido (debida a genes de acción no aditiva), toda vez que el híbrido es superior, generalmente en términos de crecimiento, a la medida de los padres (Vargas, 1982).

### 3. Características de la Planta

Es un árbol alto con suave corteza, áspera en la base fibrosa o escamosa, de color gris a gris-marrón. En la madurez, que alcanza los 50 metros de alto, aunque los ejemplares más grandes pueden superar los 80 de altura (Rivera, 2015) (**Figura N° 1**).

Esta especie florece entre abril y mayo. Aproximadamente 3' 000 000 de semillas por kilogramo. Empiezan a germinar a los 5 días con un 60% de porcentaje de germinación (Rivera, 2015).



**Figura N° 1.** Árboles de Eucalipto Tropical (*Eucalyptus urograndis*).

**Fuente:** (Ecuadorforestal, 2012).

### 4. Desarrollo de la Planta

Se encuentra principalmente en terrenos planos y laderas más bajas, donde es el árbol dominante de los bosques húmedos y en los márgenes de las selvas tropicales. Precipitación anual varía desde 1100 hasta 3500 mm. Se da mejor en suelos limo fértil o franco-arcilloso, pero también se desempeñará bien en suelos arenosos ligeros, siempre que estos son lo suficientemente profundas (Rivera, 2015).

## 5. Distribución Geográfica

En el Ecuador el *Eucalyptus urograndis* se encuentra plantado en la provincia de Esmeraldas en una superficie inicial de 1 000 ha en la zona de Muisne, Tonchigue y Sua (Ecuadorforestal, 2012).

Originario de Australia y Tasmania, es un grupo de rápido crecimiento, en el que se cuentan cerca de 700 especies distribuidas en regiones, especialmente de climas mediterráneos, tropicales o subtropicales, Se localiza también en México, Brasil, Guatemala, Nicaragua, Costa Rica, Colombia, Ecuador y Chile (P&CMaderas, 2013).

## 6. Usos

Productos especializados: Las flores producen néctar para la producción de miel o polen tiene valor para la apicultura. Uso urbano: una buena planta ornamental. Productos de madera: madera para pulpa (astillas de madera para pasta de papel) o rayón, construcción de barcos, cajas, jaulas, suelos (incluyendo parquet), construcción pesada, la leña de alta calidad, el carbón industrial, paneles, postes (construcción, transporte, apilamiento), especialidad de la madera para los muebles de calidad (Rivera, 2015).

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

## 7. Propiedades Organolépticas de la Madera

Según Ecuadorforestal (2012).

- \* **Color:** amarillo pálido.
- \* **Veteado:** poco diferenciado.
- \* **Textura:** mediana.
- \* **Grano:** recto a entrecruzado.
- \* **Olor:** no distintivo, algo parecido a tanino.
- \* **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.

## 8. Propiedades Físicas y Mecánicas

Según Ecuadorforestal (2012).

- \* **Densidad aparente:** de 450 a 550 kg/m<sup>3</sup> – liviana.
- \* **Dureza:** 300 a 500-blanda.
- \* **Flexión:** resistente.
- \* **Compresión:** muy resistente.
- \* **Tracción:** resistente.
- \* **Arrancamiento de clavos y tornillos:** muy bueno.
- \* **Pulido:** necesita cuidado.
- \* **Preservación:** acepta preservantes sin mayor dificultad.
- \* Buen comportamiento y resistencia al fuego.
- \* Acepta tintes - adhesivos - no mancha azul, no muy susceptible al taladrador (*Hylotrupes bajulus*).

## 9. Requerimientos Climáticos y Edáficos

Según Ecuadorforestal (2012). Los requerimientos del Eucalipto Tropical (*Eucalyptus urograndis*) (Tabla N° 2) son:

**Tabla N° 2.** Muestra los requerimientos del Eucalipto Tropical (*Eucalyptus urograndis*).

<b>Altitud</b>	0 – 2 000 msnm
<b>Precipitación</b>	800 – 1 200 mm
<b>Temperatura</b>	24° C
<b>Requerimientos Edáficos.</b>	Requiere suelos franco – arcillosos, no compactados, profundos, que mantengan buen drenaje.

**Fuente:** (Ecuadorforestal, 2012).

## 10. Plagas y Enfermedades

Varias enfermedades atacan al cultivo de eucalipto, prevaleciendo aquellas causadas por hongos. Las enfermedades causadas por bacterias han incrementado su importancia a nivel mundial. Las bacterias fitopatógenas en eucalipto pueden causar: I) manchas foliares, II) tizón apical y III) marchitamiento vascular (Palladino, Pérez, & Pérez, 2016).

Estas enfermedades representan un riesgo potencial en la producción forestal, han sido reportadas en diversas zonas climáticas del mundo causando graves pérdidas económicas, tanto en vivero como en campo (Palladino, Pérez, & Pérez, 2016).

Las manchas foliares bacterianas han sido asociadas a los géneros: *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Pantoea* y *Rhizobiaceae*, siendo *Xanthomonas axonopodis* la especie predominante. El tizón bacteriano puede ser causado por distintas especies bacterianas: *Erwinia psidii*, *Pantoea ananatis*, *Enterobacter cowanii*, *Xanthomonas campestris* y *X. vasicola*. Mientras que el marchitamiento vascular ha sido asociado a *Ralstonia solanacearum* y *Erwinia psidii* (Palladino, Pérez, & Pérez, 2016).



## **B. BACTERIAS**

Las bacterias o procariotas, son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria (división simple). Muchos tienen vida libre. Contienen información genética, sistemas de producción de energía y sistemas biosintéticos necesarios para el crecimiento y reproducción (Pírez, 2002).

Las bacterias presentan una amplia diversidad de tamaños, que va desde 0.5 a 2 micrómetros y algunas pueden llegar a 10 micras. No son visibles por supuesto al ojo humano y se visualizan con microscopio óptico (MO) o electrónico (ME) (Pírez, 2002).

En cuanto a morfología pueden ser observadas dos clases de colonias: una es fluida (mucoide) debido a su abundante producción de polisacárido extracelular (EPS), lisa, irregular y redonda; mientras que la otra es una colonia mutante de apariencia seca, redonda, translúcida, rugosa y no fluida (Kelman, 1954).

Las diferencias entre los tipos de colonias y niveles de virulencia están relacionadas con la presencia y cantidad del mucopolisacárido extracelular que produce la bacteria (Kelman., Sequeira, 1965).

### **1. Bacterias Gram Positivas**

Son aquellas que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram. Esta característica química está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular, por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana (Montero, 2019) (**Figura N° 2 y Figura N° 4**).

Las bacterias Gram positivas poseen una pared celular interna y una pared de peptidocluo, no cuentan con una membrana externa, no tienen espacio periplasmático ni lipopolisacárido, y son capaces de retener la tinción azul (Montero, 2019).

### **2. Bacterias Gram Negativas**

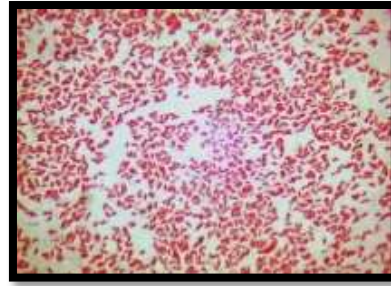
Son aquellas que no se tiñen de azul oscuro o de violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue (Aosbot, 2019) (**Figura N° 3 y Figura N° 5**).

Poseen una pared celular más completa, tienen membrana externa que forma un saco rígido alrededor de la bacteria, tienen espacio periplasmático entre la superficie externa de la membrana citoplasmática y la interna de la membrana externa y contiene lipopolisacárido. Las Gram negativas quedan decoloradas (Montero, 2019).



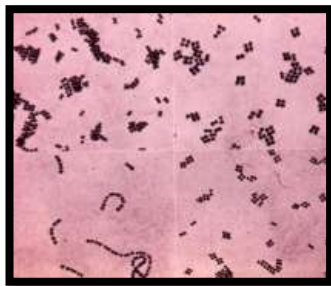
**Figura N° 2.** Bacilos Gram Positivos.

Fuente: Aparicio, 2014.



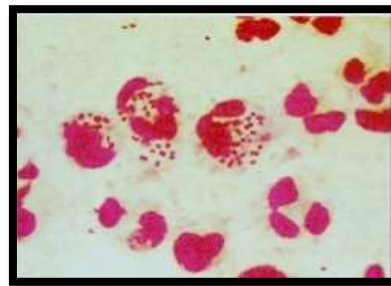
**Figura N° 3.** Bacilos Gram Negativos.

Fuente: Aparicio, 2014.



**Figura N° 4.** Cocos Gram Positivos.

Fuente: Aparicio, 2014.

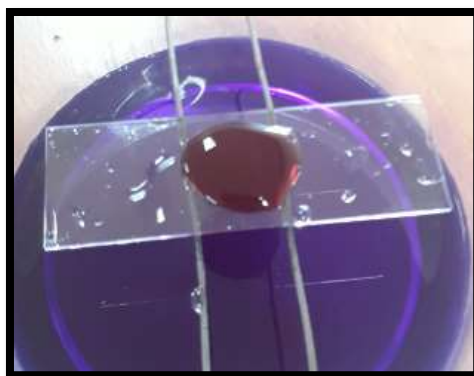


**Figura N° 5.** Cocos Gram Negativos.

Fuente: Aparicio, 2014.

### C. TINCIÓN GRAM

La tinción de Gram o coloración de Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en bacteriología para la visualización de bacterias (**Figura N° 6**). Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana, como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose bacterias grampositivas a las que se visualizan de color morado, y bacterias gramnegativas a las que se visualizan de color rosa, rojo o grosella (Aosbot, 2019) (**Anexo N° 1 y Anexo N° 2**).



**Figura N° 6.** Tinción GRAM de *Ralstonia solanacearum*.

Fotografía: (Reyes, 2019).

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

### 1. Taxonomía

Según MAGAP (2013). La taxonomía de la Marchitez Bacteriana (**Tabla N° 3**), es:

**Tabla N° 3.** Clasificación taxonómica de la Marchitez Bacteriana (*Ralstonia solanacearum*).

<b>Dominio</b>	Bacteria
<b>Filo</b>	Proteobacteria
<b>Clase</b>	Beta Proteobacteria
<b>Orden</b>	Burkholderiales
<b>Familia</b>	Ralstoniaceae
<b>Género</b>	Ralstonia
<b>Especie</b>	<i>Ralstonia solanacearum</i> race 2 (Smith 1896) Yabuuchi <i>et al.</i> , 1996
<b>Nombre Común</b>	Enfermedad del Moko

Fuente: (MAGAP, 2013).

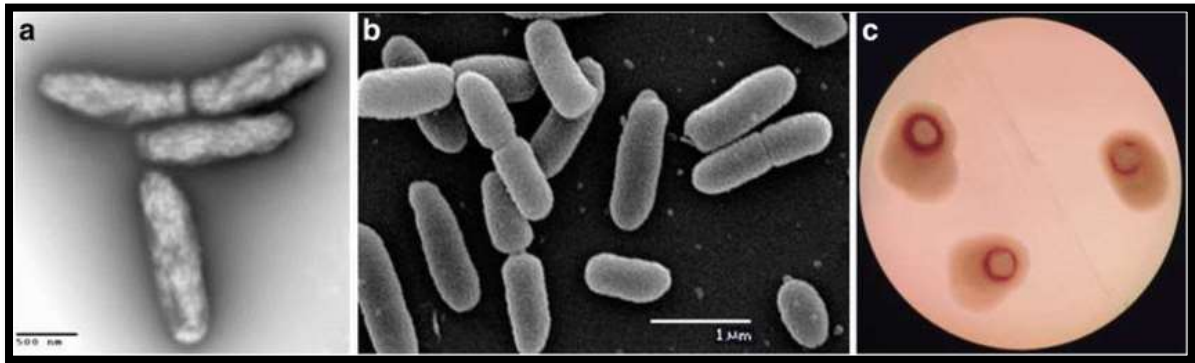
### 2. Características de la Bacteria

Es una bacteria de suelo Gram-negativa patógena de las plantas. Coloniza el xilema, causando una marchitez bacteriana o pudrición parda en una amplia gama de plantas huésped (Francisco, 2008.).

Es una bacteria Gram-negativa, no fluorescente. Si bien las colonias no son fluorescentes pueden presentar un pigmento castaño en medios de cultivo complejos (Denny y Hayward, 2001).

No hidroliza gelatina o lo hace muy débilmente, ni almidón, reduce nitratos, produce gas, oxida glucosa, no crece a 4° C o a más de 40° C, no crece a pH 4 o 9. Es oxidasa y catalasa positiva (EPPO, 2004).

*Ralstonia solanacearum* es un bacilo móvil de 0,5- 0,7  $\mu\text{m}$  x 1,5-2,5  $\mu\text{m}$  con flagelo polar (uno o cuatros cuando se presentan), aeróbicos estrictos. La bacteria se multiplica fácilmente en el hospedante, pero es de lento crecimiento *in vitro*, en relación con otros patógenos bacterianos. Pierde fácilmente patogenicidad en medios de cultivos (French *et al.*, 1995). Sin embargo, el organismo se puede mantener por años en agua destilada estéril a temperatura ambiente (Shew & Lucas, 1991) (**Figura N° 7**).



**Figura N° 7.** Bacteria *Ralstonia solanacearum*.

**Fuente:** (Guarisch-Sousa *et al.*, 2016).

### 3. Descripción Morfológica

El moko bacteriano causado por la bacteria *Ralstonia solanacearum* raza 2 Smith, es una bacteria Gram-negativa, en forma de bacilo, con dimensiones de 0.5 a 0.7  $\mu\text{m}$ . x 1.5 a 2.5  $\mu\text{m}$ , móvil, con uno a cuatro flagelos de las cepas, varía con el tipo de colonia y edad del cultivo (MAGAP, 2013).

El organismo causal de esta enfermedad llamada marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) (ex *Pseudomonas solanacearum*) o podredumbre parda, es un bacilo Gram negativo con un flagelo polar. Esta bacteria vive en el suelo (Smith *et al.*, 1995).

### 4. Epidemiología

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 (Gabor & Wiebe, 1997).

La bacteria patógena afecta al sistema vascular de la planta, al tener la capacidad de distribuirse en forma sistémica desde el rizoma infectado hasta la flor masculina. El moko puede iniciarse en una plantación determinada, cuando el patógeno es introducido a través de rizomas

enfermos. Las plantas que se desarrollan a partir de dicho material enfermo, pueden llegar a producir racimos, donde la flor masculina contiene gran cantidad de bacterias que fluyen a través de las heridas que dejan las brácteas de las bellotas al caerse. Este flujo de látex contaminado puede ser adquirido por los insectos que lo transportan desde las plantas enfermas hacia flores de plantas sanas (MAGAP, 2013).

En este caso, la infección se inicia a partir de las flores hasta llegar a alcanzar el pseudotallo, rizoma y finalmente las raíces. La transmisión de moko puede ocurrir también cuando las raíces enfermas se entrecruzan con las plantas sanas o por medio de las herramientas contaminadas que se emplean en las diferentes labores culturales, como deshoje y deshije principalmente (MAGAP, 2013).

La bacteria puede sobrevivir en suelo meses e incluso varios años, en las raíces de los hospederos, esto depende de las condiciones ecológicas y flora prevalente en cada sitio. Es necesario tener en cuenta que puede haber un gran número de arvenses en el lote infectadas por la bacteria, pero con reacción asintomática (MAGAP, 2013).

## 5. Afección

La marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* Smith Yabuuchi, es una enfermedad que se encuentra distribuida a nivel mundial y afecta a cientos de especies de plantas en 54 familias (Naranjo & Martínez, 2013).

El marchitamiento vascular bacteriano fue reportado por primera vez en Brasil en 1983 (Palladino, Pérez, & Pérez, 2016).

Esta especie es considerada una de las bacterias fitopatógenas más importantes del mundo debido a los grandes perjuicios económicos que causa, la dificultad de control, su amplia distribución geográfica, y al amplio rango de hospederos que posee (Hayward, 2000).

*Ralstonia solanacearum* es afectada por la temperatura, la humedad del suelo y otros factores físicos y químicos del suelo, siendo más favorables las temperaturas altas de 28 °C a 35°C (Iglesia, 2008). En climas fríos (menos de 18°C), y en altitudes superiores a 2 500 msnm, la bacteria crece muy lentamente y convive en el cultivo, como infección latente, sin ocasionar daños aparentes ni presentar síntomas visibles (Delgado *et al.*, 1999).

Situación similar se genera en el microclima de viveros clonales, donde se alternan períodos de altas temperaturas con riegos frecuentes, lo que es ideal para la supervivencia y

multiplicación de las bacterias, desarrollándose así varios ciclos de la enfermedad (Mafia *et al.*, 2012).

La marchitez bacteriana ocasionada por *R. solanacearum* presenta una amplia distribución geográfica, es generalizada en todas las regiones templadas, tropicales, subtropicales y cálidas del mundo (Mafia *et al.*, 2012).

*Ralstonia solanacearum* presenta un amplio rango de hospederos, siendo capaz de causar enfermedad en más de 200 especies de plantas, englobando aproximadamente 50 familias botánicas (Hayward, 2000 & Mafia *et al.*, 2012).

## **6. Sintomatología**

Los síntomas iniciales de amarillamiento leve se observan primero en un solo lado de la hoja o en una rama y no en la siguiente (Francisco, 2008).

Los síntomas avanzados son la marchitez severa y la sequedad, que preceden a la muerte de la planta. Los haces vasculares se oscurecen (Francisco, 2008) (**Figura N° 8**).

*Ralstonia solanacearum*, se manifiesta con un amarillamiento previo a un enrollamiento en las horas más cálidas del día; los pecioloos se encorvan hacia abajo como si la marchitez fuera debida a la falta de agua; la enfermedad al evolucionar, la marchitez de la parte aérea es en un principio unilateral identificando una coloración parda de los tejidos vasculares al realizar un corte trasversal en el tallo. Es importante señalar que esta marchitez puede ser confundida con los síntomas provocados por la bacteria Gram positiva *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicum* (Podredumbre anular). Sin embargo, se puede diferenciar ya que *R. solanacearum* produce la marchitez del follaje verde, mientras que *C. michiganensis*, induce la marchitez de un follaje clorótico amarillento (Bowman *et al.*, 1982).



**Figura N° 8.** Síntomas de *Ralstonia solanacearum* en Eucalipto.

**Fuente:** (Palladino, Pérez, & Pérez, 2016).

## 7. Ciclo de la Enfermedad

*Ralstonia solanacearum* es capaz de sobrevivir en el suelo o en residuos de la rotación previa. Esta bacteria puede diseminarse a largas distancias por medio de material propagativo infectado, o diseminarse a cortas distancias por herramientas e insectos (Mafia *et al.*, 2012).

La infección ocurre a través de heridas en el sistema radicular, siendo favorecida por alta temperatura y humedad en el suelo. Por esta razón, la mayor intensidad de la enfermedad ocurre en veranos lluviosos (Alfenas *et al.*, 2009).

*Ralstonia solanacearum*, infecta una planta y penetra por el sistema de absorción radicular y entra en el sistema vascular, distribuyéndose a los vasos del tejido xilémico (tubo conductor) de forma vertical u horizontal (Watanebe, 2006). La bacteria se dispersa principalmente a través del suelo, sobreviviendo en este medio por largos periodos de tiempo. Además, es posible su transmisión por medio del agua, equipo o por materiales infectados. El desarrollo de la enfermedad depende de (temperatura y de humedad), las temperaturas de 25° C favorecen la multiplicación bacteriana (Rueda *et al.*, 2014).

## 8. Manejo de la Enfermedad

En la práctica las enfermedades son controladas con productos químicos con base en hidróxido de cobre (Torres *et al.*, 2014).

El uso de semilla sana y la siembra en suelos libres del patógeno son los principales componentes para controlar y erradicar la marchitez bacteriana. Una estrategia de control

integrado puede tener éxito para reducir la incidencia de la *R. solanacearum*, e incluso erradicarla. (Rueda *et al.*, 2014).

Si un cultivo ha sido infectado con *R. solanacearum*, se debe evitar la siembra de cultivos hospedantes por lo menos durante dos años. Se puede efectuar una rotación con cereales o pastos para eliminar el inóculo del suelo. La duración de la rotación necesaria para eliminar el inóculo varía, ya que la supervivencia de *R. solanacearum* en el suelo depende de las condiciones ambientales (temperatura, humedad) y de las características del suelo (factores bióticos y abióticos) (Rueda *et al.*, 2014).

## 9. Fisiología

*R. solanacearum* E.F. Smith es muy sensible a la desecación y es inhibida en cultivo de bacterias con concentraciones bajas (2%) de cloruro de sodio (NaCl). Para la mayoría de las cepas, la temperatura óptima de crecimiento es entre 28 y 32° C; sin embargo, algunas cepas tienen una temperatura óptima de crecimiento más baja de 27° C (Champoiseau, 2009). A través de las pruebas de tinción de Gram y KOH al 3% se determina y confirma que *R. solanacearum* es una bacteria Gram negativa (López, Segovia, & Morán, 2016).

## 10. Métodos de Control

El marchitamiento bacteriano por la naturaleza sistémica de las infecciones dificulta su control. Una vez establecida la enfermedad en el campo, el control del patógeno es difícil (Palladino, Pérez, & Pérez, 2016).

## 11. Transmisión

La bacteria se transmite por:

- El agua que fluye entre los surcos y de un campo a otro y también por contacto entre raíces (Francisco, 2008).
- Material vegetativo: El movimiento de cormos, rebrotes o hijos para resiembra pueden fácilmente dispersar la enfermedad (MAGAP, 2013).
- Insectos vectores: Llegan a las frutas afectadas y trasladan el inóculo a plantas sanas (MAGAP, 2013).
- Suelo contaminado: En zapatos, botas e inclusive maquinaria, se puede trasladar suelo contaminado con la bacteria hacia sitios libres de la enfermedad (MAGAP, 2013).
- Agua: Se transporta eficientemente por aguas de escorrentía, drenajes e inundaciones



(MAGAP, 2013).

- Herramientas: Los machetes, chuzas de deshoja, chuzo de apuntalar y cuchillos, pueden transmitir el patógeno (MAGAP, 2013).
- Malezas: Algunas malezas son excelentes hospederos alternos de la bacteria y pueden contribuir con su supervivencia y dispersión (MAGAP, 2013).

## 12. Medios de cultivo de la bacteria

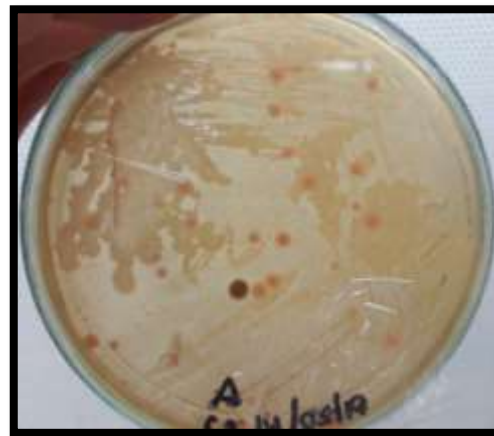
Al aislar la bacteria en medios de cultivos sólidos, se puede observar dos clases de colonias; las colonias de tipo normal o virulento que son blancas o color crema, irregularmente redondas, fluidas, y opacas; y las colonias de tipo mutante o no virulentas que son uniformemente redondas, más pequeñas y secas. La diferencia entre las clases de colonias y niveles de virulencia es debido a la presencia y cantidad de polisacárido extracelular producido por la bacteria (López, Segovia, & Morán, 2016).

Para aislar la bacteria *in vitro* se debe recurrir a medios de tetrazolio. Las técnicas de metabolismo con disacáridos y alcoholes hexosa son una excelente estrategia para caracterizar al patógeno con relación al biovar (Vivas *et al.*, 2009).



**Figura N° 9.** Aislamiento de *Ralstonia solanacearum* color blanquecino.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 10.** Aislamiento de *Ralstonia solanacearum* color rojizo.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).

Medio de Kelman, Agar Nutritivo, Caldo Papa Dextrosa (Remache, 2018).

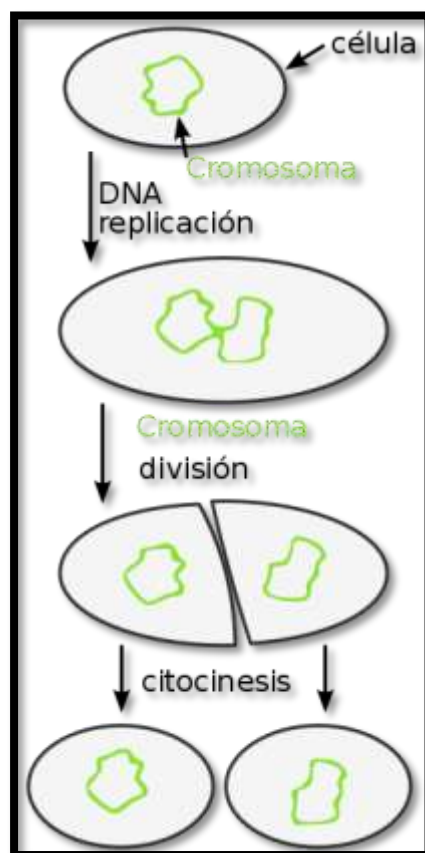
En medio PDA (Papa-Dextrosa-Agar), las colonias aisladas de *R. solanacearum* son de color crema o blanquecinas (Loarca, 1987) (**Figura N° 9**).

El medio de cloruro de tetrazolio (TZC) permite diferenciar las dos clases de colonias, en el cuál colonia virulenta aparecen color blanco con centros rosa y colonias no virulentas aparecen de color rojo oscuro (Champoiseau, 2009) (**Figura N° 10**).

### 13. Fisión Binaria

Es una manera de reproducción asexual que se lleva a cabo en arqueas y bacterias. Consiste en la duplicación del ADN, seguida de la división del citoplasma (citocinesis), dando lugar a dos células hijas. La mayor parte de las bacterias se reproducen por bipartición, lo que produce una tasa de crecimiento exponencial (Ortisa, 2019) (**Figura N° 11**).

El ADN bacteriano tiene tasas de mutación elevadas. De esta manera, la rápida reproducción bacteriana da amplias oportunidades para que se produzcan nuevas cepas capaces de desarrollar resistencia a antibióticos y les ayuda a proliferar en una gran variedad de ambientes (Ortisa, 2019).



**Figura N° 11.** Muestra la Bipartición o fisión binaria.

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

#### 14. Especies Arbóreas Hospederas de *Ralstonia solanacearum*

Hospedero	Familia Botánica	Nombre Común	Síntomas	Biovar	País	Referencia
<i>Archontophoenix alexandrae</i> H. Wendl & Drude	Arecaceae	Palmera real de Australia	Secado de hojas, decoloración de tejidos, marchitez	3	Queensland (Australia)	Akiew (1990).
<i>Anacardium occidentale</i> L.	Anacardiaceae	Cajú	Pudrición radicular, caída de hojas	3	Indonesia	Shiomi <i>et al.</i> , 1989
<i>Syzygium aromaticum</i> L. Merr. & Perry	Myrtaceae	Clavero de la India	Pudrición de raíces, Infecciones limitadas en la base del vástago; patógenos secundarios	-	Indonesia	Eden-Green & Adhi, 1986.
<i>Annona squamosa</i> L. e A. cherimola Mill.	Annonaceae	Anón	Muerte súbita de árboles jóvenes y declive de árboles adultos	3	Queensland (Australia), Taiwan	Mayers & Hutton (1987); Hsu (1991).
<i>Eucalyptus</i> spp.	Myrtaceae	Eucalipto	Marchitez	1,3,3,3	Brasil, China, África do Sul, Australia.	Dianese & Dristig (1993); Wu & Liang (1988); Coutinho <i>et al</i> (2000); Askiew & Tevorrow, 1994.
<i>Cassuarina equisetifolia</i> L.	Casuarinaceae	Casuarina	Marchitez	3,4	China	He (1986); Liang & Guo (1992).
<i>Moringa oleifera</i> Lam.	Moringaceae	Moringa	Pérdida de turgencia y desfoliado	-	India	Estelitta <i>et al.</i> (1997)
<i>Leucaena glauca</i> Benth.	Mimosaceae	Leucena	-	-	-	Bradbury (1987).
<i>Pongamia pinnata</i> (L.) Pierre	Leguminosae	Pongamia	-	-	-	Bradbury (1987).
<i>Morus alba</i> L.	Moraceae	Morera	Marchitez, amarillamiento y necrosis de hojas, desfoliado y daños en las raíces.	3,5	China, India	He (1986); Mathews <i>et al.</i> (1993).
<i>Azadirachta indica</i> Juss.	Meliaceae	Neem	Marchitez y pudrición de raíces.	3	Queensland (Australia)	Diatloff <i>et al.</i> 1993)
<i>Myristica fragrans</i> L.	Myristicaceae	Árbol de nuez	Oscurecimiento y secado de hojas, daños en el sistema radicular.	-	Kerala (India)	Mathews <i>et al.</i> (1993)
<i>Olea europea</i> L.	Oleaceae	Olivo	-	3,4	China	He (1986)
<i>Tectona grandis</i> L.	Verbenaceae	Teca	-	3	Malasia, Indonesia	Hayward (1964); Mitchell (1962)
<i>Eugenia javanica</i> Lam.	Myrtaceae	Jambo rosa	-	-	Taiwan	Hayward (1994)

Figura N° 12. Especies Arbóreas Hospederas de *Ralstonia solanacearum*.

Fuente: (Remache, 2018).

## **E. MEDIDAS FITOSANITARIAS PARA EL CONTROL DE LA MARCHITEZ BACTERIANA**

El concepto de medida fitosanitaria representa el conjunto de actividades utilizadas para eliminar o controlar las plagas (virus, bacterias, hongos, insectos, nematodos) en los cultivos (Rivas & Flores, 2012).

La marchitez bacteriana es difícil de controlar ya que no se conocen actualmente productos químicos que, aplicados en las plantas antes o después de ocurrida la infección por la bacteria, eviten el desarrollo de la misma. Los únicos productos disponibles son antibiótico y fumigantes que, aplicados al suelo antes de sembrar el cultivo, reducen la incidencia de la enfermedad. Es necesaria la aplicación integrada de estrategias de combate que sea práctico y razonable utilizarlas para mejorar los niveles esperados de control (FHIA *et al.*, 2014).

### **1. CONTROL QUÍMICO**

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

- \* Bactericidas y fumigantes.
- \* Hipoclorito de sodio.

### **2. CONTROL FÍSICO**

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

### 3. CONTROL BIOLÓGICO

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

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

### F. EXTRACTOS VEGETALES

Son sustancias que se extraen de la planta seca y que, en forma concentrada, poseen su virtud característica. De manera informativa equivale a preparar un jugo, en el que se adiciona agua destilada u otro medio y las plantas medicinales. (**Figura N° 13**). Por lo general se consideran tres tipos de extractos (SENA, 2006):

- Los extractos fluidos que son aquellos en los que el volumen del líquido del extracto es igual al volumen de la planta seca que se haya usado (SENA, 2006).
- Los extractos blandos son a los que se les ha retirado el agua parcialmente hasta tener una consistencia de unguento (SENA, 2006).
- Los extractos secos que son a los que se les ha retirado en su totalidad el agua y su apariencia es la de un polvo muy fino (SENA, 2006).



**Figura N° 13.** Extractos vegetales de *Tagetes erecta*.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).

## 1. Maceración

La maceración es un proceso de extracción sólido – líquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción que son los que se pretenden extraer (López, s.f).

Con mortero o piedra y luego se mezcla con el alcohol o el licor. Finalmente, decantar, filtrar y envasar (SENA, 2006).

Proceso que se asemeja a la extracción por disolvente, la diferencia es que el material permanece varios días sumergido (Rosales, 2014).

Generalmente el agente que se utiliza como extractante es el agua, aunque pueden ser empleado en dicho proceso otros líquidos, como el vinagre, alcohol (etanol), vinos, jugos, aceites vegetales solos o aderezados con otros ingredientes que enriquecen y otorgan características especiales a la extracción de la materia prima en el líquido (Balles, 2019).

## 2. Alcohólica

El producto más selectivo para extracciones es el alcohol debido a actividad antimicrobiana y a la inactivación de enzimas, es usado en especial para mezclas hidroalcohólicas (Tapia, s.f.). Se obtiene macerando plantas frescas en alcohol (**Anexo N° 3**) (SENA, 2006).

El alcohol disuelve glicósidos, aceites esenciales, resinas, alcaloides, bálsamos, etc., pero no disuelve proteínas, pectinas, gomas, azúcares, etc. (Tapia, s.f.).

### 3. Oleosos

Un oleato es un método de extracción de los aceites esenciales y principios activos que contienen las plantas aromáticas y medicinales utilizando la maceración en diferentes clases de aceites (**Anexo N° 4**) (Jana, 2017).

Los más usados suelen ser el aceite de oliva, aceite de almendras dulces y aceite de girasol. Dependiendo del producto que se quiera conseguir se usará un aceite u otro (Jana, 2017).

## G. FLOR DE MUERTO (*Tagetes erecta* L.)

### 1. Taxonomía

Según Ricardogs (2005). La taxonomía de la Flor de Muerto (**Tabla 4**), es:

**Tabla N° 4.** Clasificación taxonómica de la Flor de Muerto (*Tagetes erecta*).

<b>Reino</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase:</b>	Rosidae
<b>Orden:</b>	Asterales
<b>Familia:</b>	Asteraceae
<b>Subfamilia:</b>	Asteroideae
<b>Tribu:</b>	Tageteae
<b>Género:</b>	Tagetes
<b>Especie</b>	<i>Tagetes erecta</i> L., 1753

**Fuente:** (Ricardogs, 2005).

### 2. Nombres Comunes de la Flor de Muerto

Se la conoce como: Tagete, Clavel de moro, Clavelón africano, Clavelón de la India, Clavelón, Claveles de las Indias, Rosa de la India, Clavel chino, Damasquino, Damasquina, Clavel de China, Clavel turco, Marigold, Cempasúchil (Infojardin, 2017).

### 3. Características de la Planta

Es una especie de la familia Asteraceae, nativa de México, donde se encuentra en estado silvestre principalmente en los estados de Chiapas, México, Morelos, Puebla, San Luis

Potosí, Sinaloa, Tlaxcala, Oaxaca, Jalisco y Veracruz. También se encuentra en los otros países de América Central. Pese a su origen americano, en inglés es conocida como African Marigold (Ricardogs, 2005) (**Figura N° 14**).

Planta herbácea anual o perenne, de días cortos cuya altura oscila entre 30 hasta 110 cm. La raíz es cilíndrica, pivotante, con un sistema ramificado fibroso y poco profundo. El tallo es estriado a veces acostillado, liso o ligeramente con vellosidades, cilíndrico, ovalado y de herbáceo a ligeramente maderable, con canales de resina en la corteza, son aromáticos al estrujarse. Hojas opuestas en la parte inferior, alternas en la parte superior, hasta de 20 cm de largo, pinnadas, compuestas de 11 a 17 foliolos, lanceolados a linear-lanceolados, de hasta 5 cm de largo y 1,5 cm de ancho, agudos a acuminados, aserrados a subenteros, los inferiores de cada hoja frecuentemente setiforme (en forma de hilos), los superiores a veces completamente setiformes; con glándulas redondas abundantes (Ricardogs, 2005).

La principal característica de las flores es que están agrupadas en cabezuelas o en inflorescencias solitarias, sobre pedúnculos de hasta 15 cm de largo, son liguladas de colores amarillo a rojo. En las flores del disco: 150 a 250 en las cabezuelas sencillas, en las «dobles» muestra diferentes grados de transformación en lígulas, corolas amarillas a anaranjadas, de 8 a 10 mm de largo. Los frutos y semillas son: aquenios lineares de 7 a 10 mm de largo, lisos o ligeramente cubierto de pelitos rígidos en los ángulos. Posee un largo periodo de floración que se extiende durante todo el verano y el otoño. Se reproduce fácilmente por semillas (Ricardogs, 2005).

#### **4. Necesidades**

La especie *Tagetes erecta* se desarrolla mejor en suelos con pH ácido, neutro o alcalino. Su parte subterránea crece con vigor en soportes con textura arenosa, franca, arcillosa o muy arcillosa, éstos se pueden mantener generalmente secos o húmedos. Teniendo en cuenta la información anterior, tendremos que adecuar los riegos a un punto intermedio (intentando mantener la humedad del suelo estable) teniendo en cuenta factores tales como: temperatura, exposición al sol, humedad ambiental, textura del soporte, etc. No tolera los encharcamientos, por lo que la zona de plantación debe estar muy bien drenada (Pérez, 2013).

En cuanto a sus necesidades lumínicas, podemos aseverar que es muy exigente, sólo puede situarse en un lugar con exposición directa al sol para no repercutir negativamente en su crecimiento de forma normal (Pérez, 2013).



Con respecto a su dureza contra condiciones adversas podemos decir que los rangos mínimos de temperaturas son de  $-7^{\circ}\text{C}$  ( $20^{\circ}\text{F}$ ) a  $-1^{\circ}\text{C}$  ( $30^{\circ}\text{F}$ ), no llegando a sobrevivir a las heladas y su tasa de crecimiento en condiciones óptimas es media (Pérez, 2013).



**Figura N° 14.** Flor de Muerto (*Tagetes erecta*).

**Fotografía:** (Reyes, 2019).

## 5. Usos

Posee usos decorativos, medicinales, alimenticios. A nivel industrial, destaca el uso de la flor de cempasúchil para la obtención de colorantes, a partir de los carotenos presentes en las flores (UNAM, s.f.).

Los usos medicinales son los siguientes: aromaterapéuticos, digestivos, diuréticos, emenagogo (que provoca o favorece la menstruación), laxante, sedante, tratamientos estomacales, vermífugos (antiparasitario) (Pérez, 2013).

Sirve para enfermedades de tipo respiratorias como tos, fiebre, gripe y bronquitis. Todas las patologías se combaten con esta planta elaborando infusiones de sus flores y raíces (Mederos, 2019).

Poseen propiedades naturales de repulsión de insectos y nemátodos. También pueden elaborarse insecticidas caseros a partir de esta planta que pueden ser utilizados para la fumigación de plantas atacadas por plagas (Mederos, 2019).

(Gómez & Zavaleta, 2001) la asociación de cultivos con la “flor de muerto”, como se le conoce vulgarmente, ha resultado en reducciones significativas de varios problemas fitosanitarios en diversos cultivos.

## 6. Distribución y Hábitat

El área de origen de *Tagetes erecta* es Mesoamérica entre México y Centroamérica. En México, se encuentra en estado silvestre principalmente en los estados de: Aguascalientes, Chiapas, Campeche, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Morelos, Nayarit, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas Tlaxcala, Oaxaca, Veracruz, Yucatán y Zacatecas. También se encuentra en los países de América Central y el Caribe: Belice, Bolivia, Colombia, Costa Rica, Cuba, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Guyana, Honduras, Jamaica, Nicaragua, Panamá, Puerto Rico y Venezuela (Ricardogs, 2005).

En su forma silvestre se encuentran en la cuenca del Balsas y el occidente de México y habita en diversos tipos de ecosistemas, como selvas tropicales de hoja caduca, bosques espinosos, bosques de niebla y bosques de pino-encino. En estado silvestre se le encuentra como escapada de cultivo en lugares fuertemente perturbados en altitudes de 800-2300 m. Como especie introducida (cultivada) se puede encontrar en China, India, Zambia, Sudáfrica y Australia (Ricardogs, 2005).

## 7. Importancia de *Tagetes erecta*

Es una especie de notable importancia económica, de sus flores secas y reducidas a polvo se obtiene un colorante para alimentos mediante extracción con solvente. El aceite esencial que se obtiene de la planta, de olor penetrante, se utiliza en pequeñas cantidades, en variados alimentos como aromatizante y exaltador de sabores, y también en la industria de los cosméticos (Puccio, s.f.).

El componente económicamente más importante obtenido de las flores, es la luteína, un carotenoide del cual esta especie es la principal fuente y del cual son conocidas las propiedades antioxidantes y protectoras de la vista (Puccio, s.f.) (**Figura N° 17**).

Otro uso de la *Tagetes erecta* es como antiparasitario natural, particularmente eficaz contra los nematodos que infectan el terreno y provocan graves daños a la agricultura; intercalar un cultivo de *Tagetes* puede abatir la población de nematodos en más del 90%. Las raíces a su vez exudan una sustancia que atrae a varias especies de nematodos que, una vez penetrados, mueren por las toxinas (tiofenos) a base de azufre con acción nematicida contenida en ella (Puccio, s.f.).

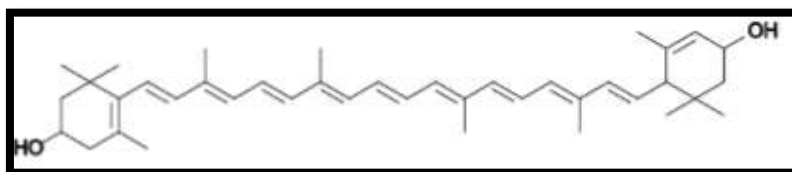


**Figura N° 15.** Luteína Extraída de la Flor de Muerto (*Tagetes erecta*).

**Fuente:** (MT Healthcare, 2019).

## 8. Química de la Flor de Muerto

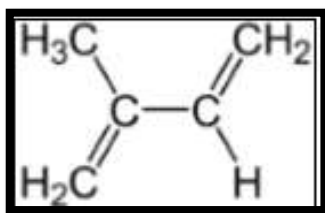
Los pétalos de las flores de cempasúchil son ricos en carotenoides, pigmentos naturales que van del amarillo al rojo. La estructura química de los carotenoides está formada de un esqueleto de 40 carbonos, conformado por unidades de isopreno. Los carotenoides hidrocarbonados se llaman carotenos, en tanto que los derivados oxigenados se denominan xantofilas. Una xantofila presente en los pétalos de cempasúchil es la luteína, con amplio poder antioxidante (UNAM, s.f.) (**Figura N° 15**).



**Figura N° 16.** Muestra la estructura de la Luteína.

**Fuente:** (UNAM, s.f.).

Asimismo, el aceite esencial de la planta *Tagetes erecta* es rico en monoterpenos, compuestos químicos caracterizados por presentar diez átomos de carbono, y por lo tanto, dos unidades de isopreno (UNAM, s.f.) (Figura N° 16).



**Figura N° 17.** Muestra la estructura del Isopreno.

**Fuente:** (UNAM, s.f.).

## H. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos en una planta y orientar la extracción y/o el fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés (Guerrero, 2014) (Figura N° 18).



**Figura N° 18.** Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólicos de *Tagetes erecta*.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### A) CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR

#### 1. Localización del Estudio

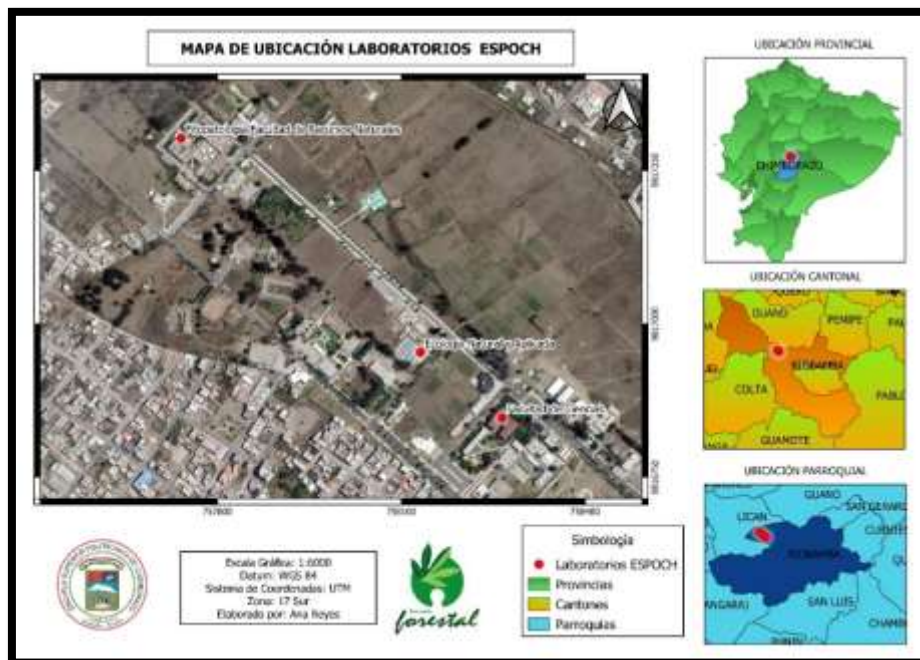
Los ensayos de la investigación se realizaron en el laboratorio de fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales, en los laboratorios de Ecología Natural y Aplicada, de Productos Naturales, de Tecnología Farmacéutica y de Análisis Bioquímico y Bacteriológico de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

#### 2. Ubicación Geográfica

La Escuela Superior Politécnica de Chimborazo se encuentra ubicada en la Panamericana Sur km 1 ½ Riobamba – Ecuador (**Figura N° 19**).

El laboratorio de la Facultad de Recursos Naturales se ubica a 2831 msnm, 1°39'05"S, 78°41'00"W (**Anexo N° 5**).

Los laboratorios de la Facultad de Ciencias se ubican a 2817 msnm, 1°39'20"S, 78°40'42"W (**Anexo N° 6 y Anexo N° 7**).



**Figura N° 19.** Ubicación de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y de los laboratorios utilizados.

**Elaborado por:** (Reyes, 2019).

### 3. Condiciones Climáticas

Según la Estación Meteorológica ESPOCH (2018). Las características climáticas del cantón Riobamba (Tabla N° 5), son:

**Tabla N° 5.** Características Climáticas del Cantón Riobamba.

<b>Velocidad del viento:</b>	2,2 m/s
<b>Precipitación promedio anual:</b>	565,2 mm H <sub>2</sub> O
<b>Presión Atmosférica promedio anual:</b>	546,2 mmHg
<b>Temperatura promedio anual:</b>	13,4° C
<b>Humedad Relativa:</b>	74,4 %
<b>Heliófila:</b>	43,6 %
<b>Tensión de Vapor:</b>	11,2 mlb
<b>Punto de Rocío:</b>	8,5° C

**Fuente:** (Estación meteorológica ESPOCH, 2018).

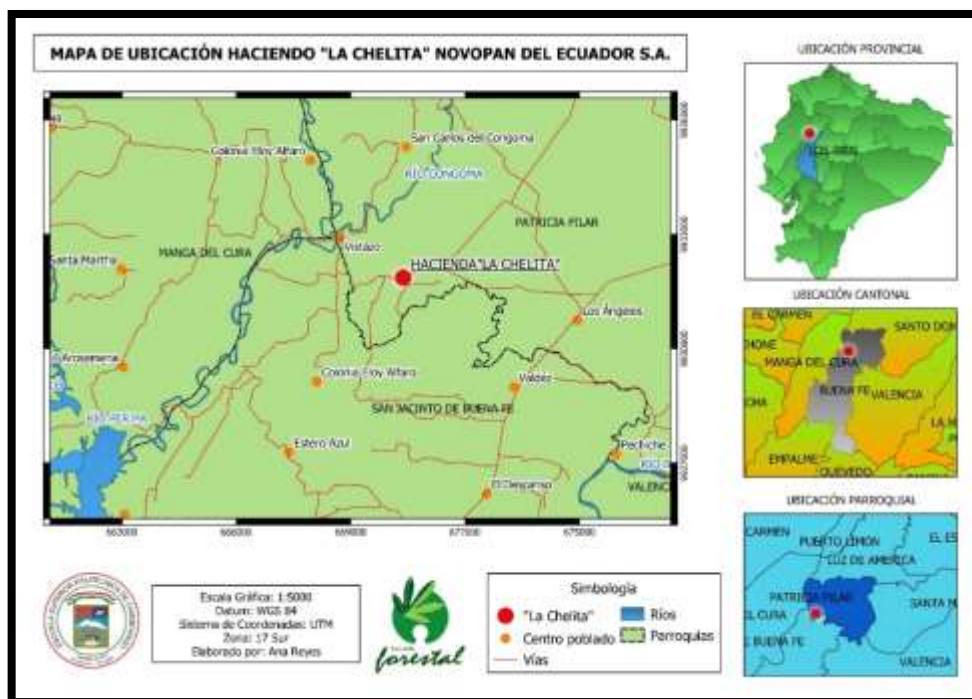
### 4. Localización del Lugar de Obtención del Material Biológico

La Bacteria (*Ralstonia solanacearum*) fue obtenida de la Hacienda “La Chelita” ubicada en el recinto Los Ángeles, en la Parroquia Patricia Pilar, Cantón Buena Fe, Provincia de Los Ríos, de la empresa NOVOPAN DEL ECUADOR S.A.

La Flor de Muerto (*Tagetes erecta*) fue obtenida en la Parroquia Nayón, Cantón, Provincia de Pichincha.

### 5. Ubicación Geográfica

El Recinto Los Ángeles se encuentra en la Parroquia Patricia Pilar del Cantón Buena Fe, Provincia de Los Ríos en la zona 5. A 3258 msnm, 0°37'13"S 79° 25'36"W (Figura N° 20).



**Figura N° 20:** Ubicación de la Hacienda “La Chelita” en el Recinto Los Ángeles – Los Ríos.  
Elaborado por: (Reyes, 2019).

## 6. Condiciones Climáticas

Según Anuarios Meteorológicos del INAMHI-PDOT (2018); las características climáticas del cantón Buena Fe (**Tabla N° 6**), son:

**Tabla N° 6.** Características Climáticas del Cantón Buena Fe.

<b>Temperatura promedio anual:</b>	25,2° C
<b>Velocidad del viento:</b>	22,5 Km/h
<b>Precipitación promedio anual:</b>	2162 mm
<b>Humedad Relativa</b>	78 %
<b>Horas de Luz Natural:</b>	12 horas 11 minutos

**Fuente:** (Anuarios Meteorológicos del INAMHI-PDOT, 2018).

## B) MATERIALES Y MÉTODOS

### ✓ INSUMOS PARA LOS ENSAYOS

#### 1) Recolección de la Bacteria (*Ralstonia solanacearum*)

La bacteria (*Ralstonia solanacearum*) se recolectó en la hacienda “La Chelita” (**Figura N° 21**) de la empresa NOVOPAN DEL ECUADOR S.A., perteneciente a la Parroquia Patricia Pilar del Cantón Buena Fe, Provincia de Los Ríos en la zona 5, siguiendo el siguiente protocolo:

- Se identificaron varios árboles con sintomatología de marchitez bacteriana (**Anexo N° 9**).
- Se desinfectó el machete con alcohol.
- Se procedió a derribar algunos árboles.
- Se esperó varios minutos y se recolectó en fundas ziploc.
- Se etiquetaron las fundas (Bacteria: *Ralstonia solanacearum*, Lugar de recolección: Hacienda “La Chelita”, Fecha de recolección: 26 de marzo de 2019).
- Se las mantuvo en refrigeración a 10° C.
- Se las transportó en un cooler previamente etiquetado, con hielo y sellado con cinta.
- Se mantuvo el cooler en refrigeración a 10° C hasta su uso.



**Figura N° 21:** Recolección de la bacteria.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



## 2) Identificación de la Flor de Muerto (*Tagetes erecta*)

Para poder trabajar con los extractos se identificó la planta en el Herbario (CHEP) de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo utilizando el siguiente protocolo:

- Se obtuvo la muestra en Nayón (Pichincha).
- Se lavó bien la muestra (**Figura N° 22**).
- Se la fijó en un formato A3.
- Se prensó con cartones y se amarró (**Figura N° 23**).
- Se puso a herborizar por 8 días en el herbario.
- Una vez herborizada la muestra se la tomó con cuidado para sacarle de la prensa (**Anexo N° 8**).
- Finalmente, se comparó e identificó con otras muestras del herbario y con una guía botánica (Konemann del año 2003), se comprobó que es *Tagetes erecta* (**Figura N° 24**) (**Anexo N° 10**).



**Figura N° 22:** Muestra lavada.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 23:** Muestra prensada para herborizar.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 24:** Muestra herborizada en comparación para su identificación.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).

### 3) Aislamiento de la Bacteria (*Ralstonia solanacearum*)

Para el primer aislamiento lo realizamos en dos medios “Bacto Agar” y “Agar Nutriente” utilizando el siguiente protocolo:

- Se utilizó una balanza analítica digital (RADWAG AS 220.R2, Poland, 2013) para pesar 2,8 g de Agar Nutriente y 4,5 g de Bacto Agar.
- Se utilizaron 2 frascos BOECO de 500 ml, uno con 100 ml de agua destilada para Agar Nutriente y el otro con 150 ml de agua destilada para Bacto Agar.
- Se añadió el Agar Nutriente y el Bacto Agar al agua destilada en los frascos respectivos.
- Se los puso en el agitador orbital con plancha calefactor (COLE-PARMER, China, 2013) para mezclar los materiales.
- Se los llevó a la autoclave (Shandong, 2017) para su esterilización a una temperatura de 125°C por 90 minutos aproximadamente (**Figura N° 25**).
- Una vez terminado el proceso de esterilización se trasladaron los frascos con el medio de cultivo a la cámara de flujo laminar (BIOBASE, Shandong, 2017).
- Donde en condiciones totales de asepsia se dispensaron los medios en 10 cajas Petri plásticas con su respectivo etiquetado para su posterior solidificación (**Figura N° 26**).
- Una vez solidificado los medios de cultivo, con ayuda de un asa de transferencia se realizó la siembra de la bacteria utilizando el método de cultivo por estrías (**Figura N° 27 y Figura N° 29**).
- Se dejó en la incubadora (MEMMERT, Alemania, 2007) a una temperatura promedio de 28°C durante 5 días (**Figura N° 28**).



**Figura N° 25:** Esterilización de los medios de cultivo.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 26:** Dispersión de los medios de cultivo en las cajas Petri.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



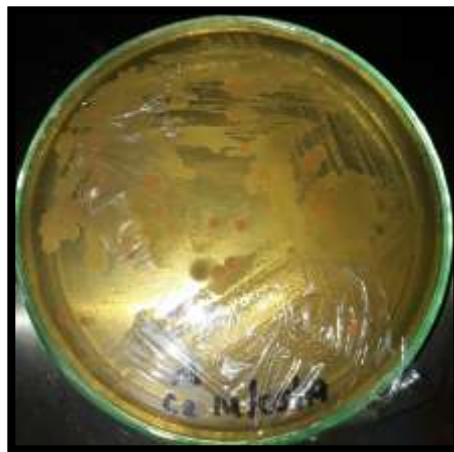
**Figura N° 27:** Siembra de la bacteria.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 28:** Incubación de la bacteria.

**Fotografía:** (Reyes, 2019.)



**Figura N° 29:** Bacteria sembrada por estrías.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).

#### 4) Identificación de la Bacteria (*Ralstonia solanacearum*)

Para la identificación de la bacteria se utilizó la tinción Gram siguiendo el siguiente protocolo:

- Se preparó el frotis de la bacteria *Ralstonia solanacearum* (**Figura N° 30**).

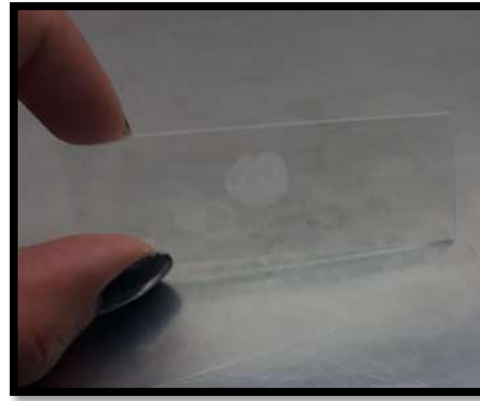
Frotis: Con el asa de transferencia esterilizada tomar una mínima cantidad de bacteria y ponerlo en un portaobjetos, añadir una gota de agua destilada.

- Se secó el frotis al aire y luego pasarlo una sola vez sobre la llama de un mechero o lámpara de alcohol (**Figura N° 31**).
- Se inició el procedimiento de Tinción.
- Se cubrió el frotis con solución de violeta de cristal, por 1 minuto.
- Se enjuagó suavemente con agua destilada.
- Se cubrió el frotis con solución de yodo, por 1 minuto.
- Se enjuagó suavemente con agua destilada.
- Se decoloró el frotis utilizando una solución de alcohol/cetona, por 1 minuto.
- Se enjuagó suavemente con agua destilada.
- Se cubrió el frotis con safranina, por 5 minutos.
- Se enjuagó suavemente con agua destilada.
- Se dejó secar al aire (**Figura N° 32**).
- Se añadió aceite de inmersión a la placa seca.
- Se observó el frotis con ayuda del lente de inmersión del microscopio óptico (COMECTA-IVYMEN, España, 2008) (40 y 100x) (**Figura N° 33**).
- Se determinó la morfología y la reacción Gram.
- La identificación fue realizada por el Ingeniero Álvaro Rivera, técnico docente del laboratorio de fitopatología de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, y comparando con varios artículos y páginas de internet.



**Figura N° 30:** Preparación del frotis de *Ralstonia solanacearum*.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 31:** Frotis seco, listo para las tinciones.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 32:** Frotis seco, listo para la observación.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 33:** Observación en el microscopio con aceite de inmersión.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).

## 5) Réplicas de la Bacteria (*Ralstonia solanacearum*)

Una vez obtenida la identificación del herbario que confirma que es *T. erecta* y la tinción que confirma que es *R. solanacearum* se procedió a replicar en Agar Nutriente Difco™.

## 6) Preparación de los Extractos Alcohólicos

La flor de muerto (*Tagetes erecta*) se adquirió en la parroquia Nayón perteneciente a la Provincia de Pichincha en la zona 2.

- Se cortó la raíz de las plantas de *Tagetes erecta* (**Figura N° 34**).
- Se lavó y separó a la planta (Tallo, hojas, pétalos, cáliz) y se la cortó en partes pequeñas (**Figura N° 35, Figura N° 36, Figura N° 37 y Figura N° 38**).

- Se puso en una estufa (STF-N, Madrid, 2008) a una temperatura promedio de 50°C por 24 horas (**Figura N° 39, Figura N° 40 y Figura N° 41**).
- Una vez seca la planta se procedió a moler y pesar (Sartorius 1507B, Polonia, 2012) (**Figura N° 42 y Figura N° 43**).
- Se pesó 200 g de planta seca y molida y se colocó en dos frascos color ámbar de 1000 ml, 100 g en cada uno (**Figura N° 44**).
- Posteriormente se añadió 1000 ml de alcohol etanol al 96% y 1000 ml de alcohol metanol al 96% respectivamente (**Figura N° 45**).
- Se dejó macerar bien sellado y en un lugar oscuro por 3 días.
- Con papel filtro y embudos se filtraron los dos extractos (**Figura N° 46 y Figura N° 47**).
- Finalmente se colocaron en el rotavapor (BÜCHI 461 Water Bath, Canadá) para concentrar los extractos alcohólicos (**Figura N° 48**).

## 7) Preparación de los Extractos Oleosos

La flor de muerto (*Tagetes erecta*) se adquirió en la parroquia Nayón perteneciente a la Provincia de Pichincha en la zona 2.

- Se cortó la raíz de las plantas de *Tagetes erecta* (**Figura N° 34**).
- Se lavó y separó a la planta (Tallo, hojas, pétalos, cáliz) y se la cortó en partes pequeñas (**Figura N° 35, Figura N° 36, Figura N° 37 y Figura N° 38**).
- Se puso en una estufa (STF-N, Madrid, 2008) a una temperatura promedio de 50°C por 24 horas (**Figura N° 39, Figura N° 40 y Figura N° 41**).
- Una vez seca la planta se procedió a moler y pesar (Sartorius 1507B, Polonia, 2012) (**Figura N° 42 y Figura N° 43**).
- Se pesó 100 g de planta seca y molida y se colocó en dos frascos color ámbar de 1000 ml, 50 g en cada uno (**Figura N° 44**).
- Posteriormente se añadió 500 ml de aceite de oliva y 500 ml de aceite vegetal de girasol respectivamente (**Figura N° 45**).
- Se dejó macerar bien sellados y en un lugar oscuro por 3 días.
- Finalmente usando papel filtro y embudos se filtraron los dos extractos (**Figura N° 46 y Figura N° 47**).



**Figura N° 34:** Plantas lavadas y sin raíz.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 35 y 36:** Flores y cáliz separadas y cortadas.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 37 y 38:** Tallos y hojas separados y cortados.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 39:** Estufa de secado.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 40:** Tallos y hojas cortados en la estufa.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 41:** Flores y cáliz cortados en la estufa.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 42:** Planta seca lista para moler.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 43:** Molino para planta.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 44:** Planta molida.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 45:** Preparación de los extractos.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 46 y 47:** Filtrado de los extractos.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 48:** Concentración de los extractos alcohólicos en el rotavapor.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



✓ **EVALUACIÓN DE LAS DIFERENTES DOSIS DE EXTRACCIÓN ALCOHÓLICA Y MACERACIÓN DE LA FLOR DE MUERTO *T. erecta* L. EN EL CONTROL DE *Ralstonia solanacearum* SMITH EN LABORATORIO**

**Ensayo 1 (Momento 1)**

**1) Tratamientos y Diseño Experimental**

**1.1) Tratamientos**

En el ensayo 1 (momento 1) se utilizaron 11 tratamientos (**Tabla N° 7**) entre extractos y testigos.

**Tabla N° 7:** Tratamientos evaluados en el ensayo 1 (momento 1).

<b>Extractos</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Testigos</b>	<b>Tratamiento</b>
Extracto Metanol 25 %	1	Testigo Blanco (Metanol 100 %)	7
Extracto Metanol 50 %	2	Testigo Blanco (Etanol 100 %)	8
Extracto Metanol 100 %	3	Testigo Positivo (Hidróxido de Cobre)	9
Extracto Etanol 25 %	4	Testigo Negativo (Agua)	10
Extracto Etanol 50 %	5	Testigo Neutro (Agar)	11
Extracto Etanol 100 %	6		

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

**1.2) Diseño Experimental**

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con cinco repeticiones para cada concentración, con tres concentraciones de extractos alcohólicos (Etanol 96 % y Metanol 96 %) al 25, 50, 100 %, una concentración de testigos blancos de alcoholes (Etanol 96 % y Metanol 96 %) al 100 %, un grupo testigos: un positivo (Hidróxido de Cobre), un neutro (Agar Nutriente) y un testigo negativo (Agua Destilada) (**Tabla N° 7**).

## 2) Manejo del Experimento

Para realizar el ensayo 1 se siguió el siguiente protocolo:

- Se utilizó una balanza analítica digital (Sartorius 1507B, Polonia, 2012) para pesar 2,8 g de Agar Nutriente Difco <sup>TM</sup>.
- Se utilizó un Erlenmeyer de 250 ml con 70 ml de agua destilada.
- Se añadió el Agar Nutriente al agua destilada.
- Se los puso en el agitador orbital con plancha calefactor (COLE-PARMER, China, 2013) para mezclar los materiales.
- Se lo llevó a la autoclave (BIOBASE, Shandong, 2017) para su esterilización a una temperatura de 125°C por 90 minutos aproximadamente.
- Una vez terminado el proceso de esterilización se trasladó el Erlenmeyer con el medio de cultivo a la cámara de flujo laminar (BIOBASE, Shandong, 2017).
- Donde en condiciones totales de asepsia se dispensaron las concentraciones y los testigos (**Tabla N° 8**) en 5 cajas Petri de vidrio cada extracto con su respectivo etiquetado para su posterior solidificación.

**Tabla N° 8:** Preparación de los tratamientos evaluados en el ensayo 1 (momento 1).

<b>Extractos Alcohólicos (Etanol y Metanol)</b>	
Concentración 100 %	* 30 ml de extracto etanólico
<b>(Figura N° 49)</b>	* 30 ml de extracto metílico
Concentración 50 %	* 15 ml de extracto etanólico y 15 ml de agua destilada
<b>(Figura N° 49)</b>	* 15 ml de extracto metílico y 15 ml de agua destilada
Concentración 25 %	* 7,5 ml de extracto etanólico y 22,5 ml de agua destilada
<b>(Figura N° 49)</b>	* 7,5 ml de extracto metílico y 22,5 ml de agua destilada
<b>Testigos</b>	
Testigo Positivo	* 0,5 g de Hidróxido de Cobre
	* 100 ml con agua destilada
	* Se mezcló y se añadió al medio los 30 ml del químico preparado
Testigo Negativo	* 30 ml de agua destilada
Testigo Neutro	* Se plaqueó el medio preparado

Testigo Blanco Etanol \* 30 ml de alcohol etanol al 96%

Testigo Blanco Metanol \* 30 ml de alcohol metanol al 96%

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

- Una vez solidificado el medio de cultivo con el extracto y con los testigos, con ayuda de un asa de transferencia se realizó la siembra de la bacteria utilizando el método de cultivo por estrías (**Figura N° 50, Figura N° 51 y Figura N° 52**).
- Se sellaron las cajas.
- Se dejó en la incubadora (MEMMERT, Alemania, 2007) a una temperatura promedio de 28°C (**Figura N° 53**).
- Se evaluó el porcentaje de inhibición durante 5 días.



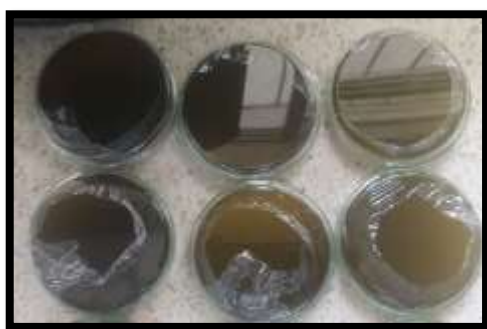
**Figura N° 49:** Preparación de las concentraciones 25, 50 y 100 % de los extractos alcohólicos.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 50:** Bacteria inoculada en las concentraciones de metanol.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 51:** Bacteria inoculada en las concentraciones de etanol.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 52:** Bacteria inoculada en los testigos.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 53:** Bacteria inoculada en los diferentes medios y concentraciones en la incubadora.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).

### 3) Evaluación del Ensayo

El ensayo 1 fue vertido en placa y se evaluó mediante el porcentaje de inhibición de la bacteria.

#### **Evaluación de la Capacidad Biocontroladora**

Para la evaluación del porcentaje de inhibición de la bacteria se empleó la escala utilizada por (Ezziyyani *et al.*, 2004 & Pérez *et al.*, 2004) (**Tabla N° 10**). Posteriormente se usó la transformación angular o de Bliss.

**Tabla N° 9.** Escala para evaluación del porcentaje de inhibición de la bacteria.

<b>Grado o Clase</b>	<b>Capacidad de Inhibición</b>	<b>Potencial Controlador</b>	<b>% de Inhibición</b>
0	Ninguna inhibición en la superficie.	Muy malo	0 a 10
1	¼ de inhibición en la superficie.	Malo	10,1 a 30
2	½ de inhibición en la superficie.	Deficiente	30,1 a 50
3	¾ de inhibición en la superficie.	Bueno	50,1 a 70
4	Total inhibición en la superficie.	Muy bueno	> 70

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

La transformación angular o de Bliss se efectúa para analizar datos de porcentajes, en los cuales, de modo natural, la varianza no es homogénea. Se saca raíz de la proporción (no del porcentaje) y se saca seno inverso del resultado (Briones, 2005).

\*Porcentaje: El porcentaje de inhibición dividir para 100.

\* Raíz cuadrada del resultado del porcentaje.

\*Aseno del resultado de la raíz.

\*Formula del seno inverso =  $\text{ASENO}(X) \cdot 180/\text{PI}()$

\***ASENO:** Devuelve el seno inverso, de un número.

#### 4) Análisis de los Resultados

Para el ensayo vertido en placa la variable porcentaje de inhibición se utilizó una transformación angular o de Bliss, con los valores obtenidos se aplicó un análisis de varianza (ADEVA) cada 24 horas de evaluación durante 120 horas, posterior a eso se utilizó una prueba de Tukey al 5 %. El programa utilizado para el análisis estadístico en la investigación fue InfoStat.

#### Ensayo 2 (Momento 2)

##### 1) Tratamientos y Diseño Experimental

##### 1.1) Tratamientos

El ensayo 2 (momento 2) se realizó en dos partes, se utilizaron 43 tratamientos: 21 tratamientos y 22 tratamientos respectivamente (**Tabla N° 10**) entre extractos y testigos.

**Tabla N° 10:** Tratamientos evaluados en el ensayo 2 (momento 2).

Primera Parte	Tratamiento	Segunda Parte	Tratamiento
Extracto Etanol 10 %	1	Aceite de Oliva 5 %	1
Extracto Etanol 20 %	2	Aceite de Oliva 10 %	2
Extracto Etanol 30 %	3	Aceite de Oliva 15 %	3
Extracto Metanol 10 %	4	Aceite de Oliva 20 %	4
Extracto Metanol 20 %	5	Aceite de Oliva 30 %	5
Extracto Metanol 30 %	6	A. Oliva + Polyether 5 %	6
Extracto Aceite de Oliva 10 %	7	A. Oliva + Polyether 10 %	7
Extracto Aceite de Oliva 20 %	8	A. Oliva + Polyether 15 %	8

Extracto Aceite de Oliva 30 %	9	A. Oliva + Polyether 20 %	9
Testigo Etanol 10 %	10	A. Oliva + Polyether 30 %	10
Testigo Etanol 20 %	11	Aceite Vegetal 5 %	11
Testigo Etanol 30 %	12	Aceite Vegetal 10 %	12
Testigo Metanol 10 %	13	Aceite Vegetal 15 %	13
Testigo Metanol 20 %	14	Aceite Vegetal 20 %	14
Testigo Metanol 30 %	15	Aceite Vegetal 30 %	15
Testigo Aceite de Oliva 10 %	16	A. Vegetal + Polyether 5 %	16
Testigo Aceite de Oliva 20 %	17	A. Vegetal + Polyether 10 %	17
Testigo Aceite de Oliva 30 %	18	A. Vegetal + Polyether 15 %	18
Testigo Negativo (Agua)	19	A. Vegetal + Polyether 20 %	19
Testigo Positivo (Hidróxido de Cobre)	20	A. Vegetal + Polyether 30 %	20
Testigo Positivo (Carbendazim)	21	Testigo Positivo (Sulfato de Cobre Pentahidratado)	21
		Testigo Positivo (Sulfato de Estreptomicina)	22

---

Fuente: (Reyes, 2019).

## 1.2) Diseño Experimental

### Primera Parte:

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con cinco repeticiones para cada concentración, con tres concentraciones de extractos alcohólicos (Etanol 96 % y Metanol 96 %) al 10, 20, 30 % y extracto oleoso (Aceite de Oliva) al 10, 20, 30 %, tres concentraciones de testigos blancos de alcoholes (Etanol 96 % y Metanol 96 %) al 10, 20, 30 % y tres concentraciones de testigo blanco de aceite (Aceite de Oliva) al 10, 20, 30 %; dos testigos

positivos (Hidróxido de Cobre y Carbendazim) y un testigo negativo (Agua Destilada) (**Tabla N° 10, Primera parte**).

### **Segunda Parte:**

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con cinco repeticiones para cada concentración, con cinco concentraciones de testigos blancos de aceites (Aceite de Oliva y Aceite Vegetal de Girasol) al 5, 10, 15, 20, 30 %; cinco concentraciones de testigos blancos de aceites con surfactante (Aceite de Oliva + Polyether y Aceite Vegetal de Girasol + Polyether) al 5, 10, 15, 20, 30 %; dos testigos positivos: uno con químico (Sulfato de Cobre Pentahidratado) y uno con antibiótico (Sulfato de Estreptomicina) (**Tabla N° 10, Segunda parte**).

## **2) Manejo del Experimento**

Para sembrar la bacteria se utilizó la escala de McFarland que consta de patrones de turbidez que van de 0,5 hasta 10, para saber el número de bacterias por ml.

Se usó  $0,5 \times 10^8$  (estándar).

### **2.1) Primera Parte**

- Se utilizó una balanza analítica digital (RADWAG AS 220.R2, Poland, 2013) para pesar 9,4 g de Agar Nutriente Difco™.
- Se utilizó dos Erlenmeyer de 250 ml con 200 ml de agua destilada cada uno.
- Se añadió el Agar Nutriente al agua destilada.
- Se los puso en el agitador orbital con plancha calefactor (COLE-PARMER, China, 2013) para mezclar los materiales.
- Adicionalmente se utilizó tubos de ensayo con agua destilada pura, un vaso de 500 ml con agua destilada, 22 tubos de ensayo vacíos. hisopos largos, pinzas, puntas azules y amarillas.
- Todo esto se lo llevó a la autoclave (BIOBASE, Shandong, 2017) para su esterilización a una temperatura de 125°C por 60 minutos aproximadamente (**Figura N° 54**).
- Una vez terminado el proceso de esterilización se trasladó el Erlenmeyer con el medio de cultivo y los materiales a la cámara de flujo laminar (BIOBASE, Shandong, 2017).
- Donde en condiciones totales de asepsia se plaqueó el medio en 27 cajas Petri de vidrio con su respectivo etiquetado para su posterior solidificación (**Figura N° 55**).
- Se prepararon las concentraciones (**Tabla N° 11**) de los extractos y de los testigos en los

tubos de ensayo vacíos usando los extractos y agua destilada estéril (**Figura N° 56**).

**Tabla N° 11.** Preparación de las concentraciones de los extractos y de los testigos evaluados en la primera parte del ensayo 2 (momento 2).

<b>Extractos Alcohólicos (Etanol y Metanol) y Extracto Oleoso (Aceite de Oliva)</b>	
Extracto Alcohol Metanol	* 10%: 1000 microlitros de extracto con 9000 microlitros de agua destilada estéril.
Extracto Alcohol Etanol	* 20%: 2000 microlitros de extracto con 8000 microlitros de agua destilada estéril.
Extracto Aceite de Oliva	* 30%: 3000 microlitros con 7000 microlitros de agua destilada estéril
<b>Testigos</b>	
Testigo Blanco Etanol	* 10%: 1000 microlitros del testigo con 9000 microlitros de agua destilada estéril.
Testigo Blanco Metanol	
Testigo Blanco Aceite de Oliva	* 20%: 2000 microlitros del testigo con 8000 microlitros de agua destilada estéril. * 30%: 3000 microlitros del testigo con 7000 microlitros de agua destilada estéril
Testigo Positivo (Hidróxido de Cobre)	* 0,5 g de Hidróxido de Cobre. * 100 ml de agua destilada. * Se añadió el químico al disco.
Testigo Positivo (Cabendazim)	* 0,25 g de Carbendazim. * 100 ml de agua destilada. * Se añadió el químico al disco.
Testigo Negativo (Agua Destilada)	* Se añadió al disco.

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

- Con la ayuda de un asa de transferencia se tomó un poco de bacteria y se agregó al tubo de ensayo con el agua destilada estéril para la escala de McFarland (una turbidez de  $0,5 \times 10^8$ ) (**Figura N° 57**).
- Una vez solidificado el medio de cultivo con la ayuda de los hisopos largos se tomó bacteria del tubo y se dispensó en las cajas.



- Posteriormente utilizando una pinza se añadió los discos en blanco para antibiogramas con su respectivo etiquetado en cada cuadrante de la caja (usando 4 discos por caja) (**Figura N° 58**).
- Con la ayuda de las puntas y las micropipetas se añadió una concentración de cada extracto por disco con 5 repeticiones cada concentración de cada extracto. Aplicación de 20 microlitros de las concentraciones en cada disco (**Figura N° 59**).
- Se sellaron las cajas.
- Se dejó en la incubadora (MEMMERT, Alemania, 2007) a una temperatura promedio de 30°C.
- Se evaluó el diámetro del halo de inhibición en 24 horas.

## 2.2) Segunda Parte

- Se utilizó una balanza analítica digital (RADWAG AS 220.R2, Poland, 2013) para pesar 9,7 g de Agar Nutriente Difco <sup>TM</sup>.
- Se utilizó un vaso de 500 ml con 420 ml de agua destilada.
- Se añadió el Agar Nutriente al agua destilada.
- Se los puso en el agitador orbital con plancha calefactor (COLE-PARMER, China, 2013) para mezclar los materiales.
- Adicionalmente se utilizó tubos de ensayo con agua destilada pura, un vaso de 500 ml con agua destilada, 22 tubos de ensayo vacíos. hisopos largos, pinzas, puntas azules y amarillas.
- Todo esto se lo llevó a la autoclave (BIOBASE, Shandong, 2017) para su esterilización a una temperatura de 125°C por 60 minutos aproximadamente (**Figura N° 54**).
- Una vez terminado el proceso de esterilización se trasladó el vaso con el medio de cultivo y los materiales a la cámara de flujo laminar (BIOBASE, Shandong, 2017).
- Donde en condiciones totales de asepsia se plaqueó el medio en 28 cajas Petri de vidrio con su respectivo etiquetado para su posterior solidificación (**Figura N° 55**).
- Se prepararon las concentraciones (**Tabla N° 12**) de los testigos en los tubos de ensayo vacíos usando los productos y agua destilada estéril (**Figura N° 56**).

**Tabla N° 12.** Preparación de las concentraciones de los testigos evaluados en la segunda parte del ensayo 2 (momento 2).

<b>Testigos</b>	
Testigo Blanco Aceite de Oliva	* 5%: 500 microlitros con 9500 microlitros de agua destilada estéril.
Testigo Blanco Aceite Vegetal de Girasol	* 10%: 1000 microlitros con 9000 microlitros de agua destilada estéril.
Testigo Blanco Aceite de Oliva + Polyether	* 15%: 1500 microlitros con 8500 microlitros de agua destilada estéril
Testigo Blanco Aceite Vegetal de Girasol + Polyether	* 20%: 2000 microlitros con 8000 microlitros de agua destilada estéril. * 30%: 3000 microlitros con 7000 microlitros de agua destilada estéril.
<b>Sulfactante (Polyether): 0,05 CC en 100 ml</b>	
Testigo Positivo (Sulfato de Cobre Pentahidratado)	* 0,5 ml de Sulfato de Cobre Pentahidratado. * 200 ml de agua destilada. * Se añadió el químico al disco.
Testigo Positivo (Sulfato de Estreptomicina)	* 1 g de Sulfato de Estreptomicina. * 100 ml de agua destilada. * Se añadió el químico al disco.

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

- Con la ayuda de un asa de transferencia se tomó un poco de bacteria y se agregó al tubo de ensayo con el agua destilada estéril para la escala de McFarland (una turbidez de  $0,5 \times 10^8$ ) (**Figura N° 57**).
- Una vez solidificado el medio de cultivo con la ayuda de los hisopos largos se tomó bacteria del tubo y se dispensó en las cajas.
- Posteriormente utilizando una pinza se añadió los discos en blanco para antibiogramas con su respectivo etiquetado en cada cuadrante de la caja (usando 4 discos por caja) (**Figura N° 58**).
- Con la ayuda de las puntas y las micropipetas se añadió una concentración de cada testigo por disco con 5 repeticiones cada concentración de cada uno. Aplicación de 20 microlitros de las concentraciones en cada disco (**Figura N° 59**).

- Se sellaron las cajas.
- Se dejó en la incubadora (MEMMERT, Alemania, 2007) a una temperatura promedio de 30°C.
- Se evaluó el diámetro del halo de inhibición en 24 horas.



**Figura N° 54:** Preparación de los materiales para esterilizar.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 55:** Plaqueó del medio en las cajas.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 56:** Preparación de las concentraciones.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 57:** Preparación de la bacteria (escala de McFarland).

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 58:** Colocación de los discos en el medio gelificado.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 59:** Aplicación de las concentraciones en los discos y sellado.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).

### **3) Evaluación del Ensayo**

El ensayo 2 fue con discos de antibiograma de 6 mm cada disco, en 4 cuadrantes y se evaluó mediante milímetros (mm) de inhibición de la bacteria.

### **4) Análisis de los Resultados**

Para el ensayo con disco de antibiograma de 6 mm cada disco, en 4 cuadrantes la variable milímetros de inhibición se utilizó un análisis de varianza (ADEVA) a las 24 horas de evaluación, posterior a eso se utilizó una prueba de Tukey al 5 %. El programa utilizado para el análisis estadístico en la investigación fue InfoStat.

## **Químicos y Antibiótico Utilizados en el Ensayo 1 y en el Ensayo 2**

### **• HIDRÓXIDO DE COBRE**

Es un fungicida bactericida protector de contacto, para control de hongos y bacterias sensibles al cobre en varios cultivos. Inhibe la respiración eliminando esporas (Correa, 2019).

El cobre actúa inactivando la mayoría de las enzimas, coenzimas y desnaturalizando las proteínas y de esta manera el metabolismo del patógeno (Toledo, 2017).

### **• CARBENDAZIM**

Es un fungicida sistémico. Eficaz para el control de enfermedades causadas por hongos ascomicetos, hongos imperfectos y basidiomicetos, inhibiendo el desarrollo micelial tanto interno como externo, disminuyendo la germinación de las esporas o conidias del hongo (Toledo, 2017).

Fungicida de doble acción es absorbido por la raíz y tejido verde de las plantas, para ser transportado por la savia hacia las partes afectadas donde detiene el desarrollo de la enfermedad y protege de nuevas infecciones (Toledo, 2017).

- **SULFATO DE COBRE PENTAHIDRATADO**

Es un bactericida y fungicida sistémico, de doble acción preventiva y curativa que controla una amplia gama de enfermedades foliares y radicales de flores y frutos, causadas por bacterias y hongos (Toledo, 2017).

Tiene una fórmula patentada a base de un complejo de Sulfato de Cobre Pentahidratado en combinación con un pool de ácidos orgánicos (complejo formato de amonio tánico cúprico) que permiten a la molécula de cobre ser absorbida y transportada sistémicamente vía floema y xilema (basipetal y acropetal) hacia todos los tejidos de la planta (Toledo, 2017).

El Sulfato de Cobre Pentahidratado interfiere en los procesos reproductivos de hongos y bacterias, específicamente a nivel de pared celular; no afecta el núcleo del patógeno por lo cual no genera resistencia (Toledo, 2017).

- **SULFATO DE ESTREPTOMICINA**

Antibiótico sistémico con actividad bactericida y fungicida. Inhibe la síntesis proteica bacteriana. Se obtiene por fermentación de *Streptomyces griseus*. Su efecto depende de la concentración. Inhibidor de la función ribosómica, actúa inhibiendo la biosíntesis de las proteínas, interfiriendo la elongación de la cadena peptídica. Se considera poco persistente Una vez dentro de la célula se une de manera irreversible al ribosoma bacteriano en las subunidades 30S y 50S (Martínez, 2017).

Entre otras consecuencias produce lecturas incorrectas del código genético lo que induce la síntesis de proteínas anómalas. Algunas de éstas son proteínas de membrana que intervienen en la formación de canales que permiten la entrada de más antibiótico a la célula. La inhibición de la síntesis de proteínas se puede producir por los siguientes mecanismos (Martínez, 2017):

- 1) Bloqueo del inicio de la síntesis proteica (Martínez, 2017).
- 2) lectura incompleta debida a un bloqueo prematuro de la traducción y la consecuente producción de polipéptidos incompletos (Martínez, 2017).
- 3) Incorporación de aminoácidos incorrectos y producción de polipéptidos anormales (Martínez, 2017).

- **POLYETHER**

Es el mejor humectante, dispersante y penetrante de alto desempeño que mejora y hace más eficientes las aplicaciones de agroquímicos. Es una nueva generación de coadyuvantes basados en la tecnología de compuestos órgano siloxanos modificados para ser usados en mezcla de productos plaguicidas y fertilizantes foliares que se aplican con agua. Es un coadyuvante no iónico. Reduce la tensión superficial del agua y permite que las partículas de los plaguicidas aplicados penetren en las hojas o insectos, así como una distribución uniforme de los plaguicidas y fertilizantes foliares en aspersión debido a sus cualidades dispersantes. (BASF, 2019).

✓ **CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS MEDIANTE UN TAMIZAJE FITOQUÍMICO.**

**1) Preparación de los Extractos Alcohólicos con los Reactivos (Figura N° 63).**

- Usamos 24 tubos de ensayo, 12 para cada extracto.
- Una vez filtrados los extractos separamos en un vaso de 250 ml aproximadamente 12 ml del extracto etanólico y 12 ml del extracto metanólico.
- Se colocó 1ml del extracto etanólico en cada tubo de ensayo y 1 ml del extracto metanólico en cada tubo de ensayo (**Figura N° 60**).
- Se procedió a poner los tubos de ensayo en vasos de 600 ml separándolos por extractos a baño maría en dos cocinetas de laboratorio (**Figura N° 61**).
- Se esperó hasta que hiervan.
- Se añadió los diferentes reactivos y se los agitó (**Figura N° 62**).
- Se calentó en agua a baño maría hasta la evaporación del solvente.
- Se observó e identificó las características que los extractos presentaban.



**Figura N° 60:** Extractos alcohólicos en tubos de ensayo.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



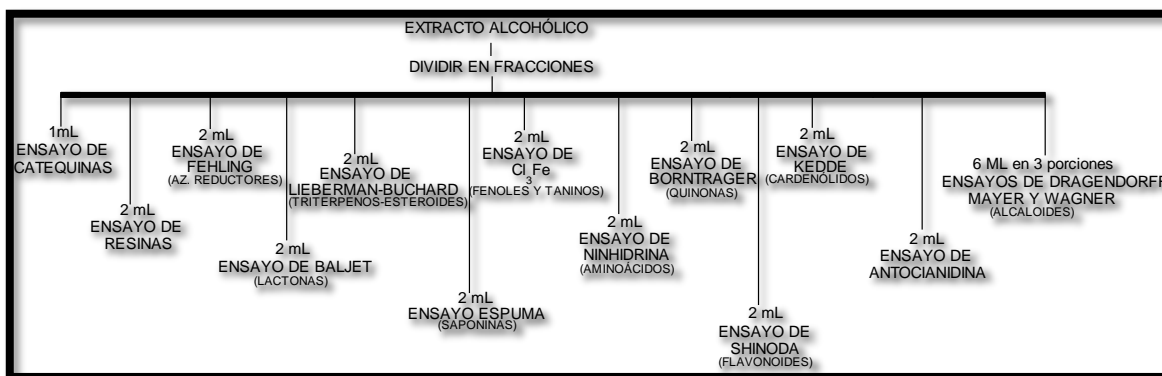
**Figura N° 61:** Extractos alcohólicos en la cocineta de laboratorio.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 62:** Algunos de los reactivos usados para el tamizaje fitoquímico de los extractos.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 63:** Preparación de los extractos alcohólicos con los reactivos.

**Fuente:** (Facultad de Ciencias – ESPOCH, 2019).

Para los reactivos del tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólicos se utilizó la tabla de (Olga Lock, 1994) y (Facultad de Ciencias – ESPOCH, 2019), que se resumió en la (**Tabla N° 13**). A cada extracto se realizaron las pruebas para el cribado fitoquímico y de esta manera, por colorimetría, se identificaron cualitativamente la presencia o no del metabolito en "+++" (abundante), "++" (moderado), "+" (leve) y "-" (ausencia) (Lock, 1994).

**Tabla N° 13.** Ensayos realizados en el tamizaje fitoquímico con los extractos alcohólicos.

<b>Ensayo</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Color / Precipitado</b>	<b>Presencia</b>
<b>Sudan</b>	Sudan III o Sudan IV, Escarlata y Hematoxilina	Presencia de grasas o coloración roja o anaranjada.	Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos.
<b>Fehling</b>	Sulfato Cúprico y Sal de Seignette	Se considera positivo si aparece coloración o precipitado rojo.	Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores.
<b>Mayer</b>	Cloruro Mercúrico y Yoduro de Potasio	Un precipitado blanco o amarillo claro, amorfo o cristalino. Opalescencia (+), Turbidez definida (++) , Precipitado coposo (+++).	Permite reconocer en un extracto la presencia no específica de alcaloides.
<b>Catequinas</b>	Carbonato de Sodio	La aparición de una mancha verde o carmelita a la luz UV, indica un ensayo positivo.	Permite reconocer en un extracto la presencia de catequinas.
<b>Wagner</b>	Ácido Clorhídrico.	Opalescencia (+), Turbidez definida (++) , Precipitado coposo (+++).	Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides.
<b>Dragendorff</b>	Solución de potasio, Yoduro de Bismuto y Ácido	Opalescencia (+), Turbidez definida (++) , Precipitado coposo (+++).	Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides.



	Clorhídrico		
<b>Baljet</b>	<i>Solución A:</i> Coloración roja (++) Ácido Pírico precipitado rojo (+++). y Etanol.	Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular Coumarinas.	
	<i>Solución B:</i> Hidróxido de Sodio y Agua.		
<b>Buchard</b>	Cloroformo, Anhídrido Acético y Ácido Sulfúrico Concentrado.	Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración: 1- Rosado-azul muy rápido. 2- Verde intenso-visible, aunque rápido. 3- Verde oscuro-negro-final de la reacción.	Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides.
<b>Cloruro Férrico</b>	Solución de Tricloruro Férrico y Solución Salina Fisiológica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.</li> <li>• Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.</li> <li>• Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.</li> </ul>	Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y taninos.
<b>Borntrager</b>	Hidróxido de Potasio e	Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de	Permite reconocer en un extracto la presencia de

	Hidróxido de Amonio.	rosado o rojo, el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (++) , coloración roja (+++).	quinonas.
<b>Shinoda</b>	Ácido Clorhídrico Concentrado, un pedacito de Cinta de Magnesio Metálico y Alcohol Amílico,	El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de naranja, carmelita o rojo; intensos en todos los casos.	Permite reconocer la presencia de flavonoides.
<b>Resinas</b>	Solución Alcohólica y Agua Destilada.	La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo.	Permite reconocer en un extracto la presencia de resinas.

---

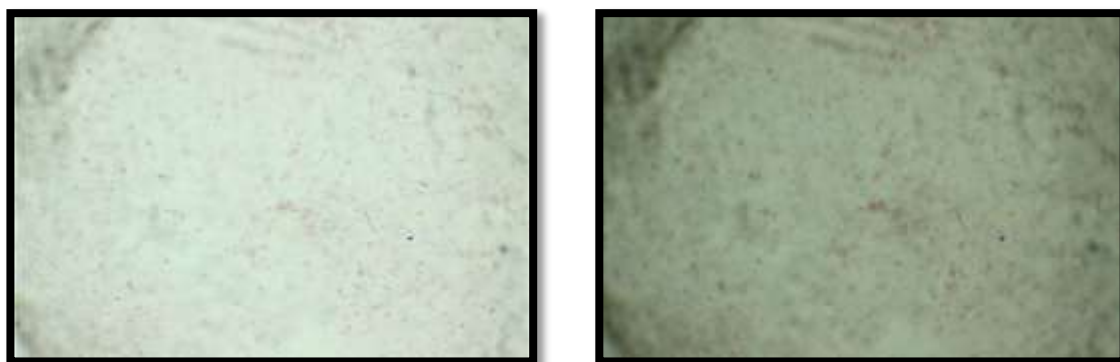
**Fuente:** (Olga Lock, 1994) y (Facultad de Ciencias – ESPOCH, 2019).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. INSUMOS PARA LOS ENSAYOS

#### Identificación de la Bacteria (*Ralstonia solanacearum*): Tinción GRAM

De acuerdo a la tinción GRAM de nuestras muestras de *Ralstonia solanacearum* dieron como resultado que es una bacteria Gram negativa, la tinción Gram es de color rosado tenue y se presenta en forma de bacilos como se muestran en las **Figuras N° 61 y 62** estos resultados son similares a los planteados por Vivas *et al.*, (2009), en su investigación “Caracterización e incidencia de *Ralstonia solanacearum* Smith en plantas de Musa AAB en el Sector “El Roble”, Sur del Lago de Maracaibo, Venezuela” ellos encontraron que la tinción de Gram de *R. solanacearum* clasifica a la colonia como Gram negativa, de colonias rojizas, propio de muchas bacterias fitopatógenas (**Anexo N° 3 y Anexo N° 4**).



**Figura N° 64 y 65:** Resultados de la Tinción GRAM.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).

## 2. EVALUACIÓN DE LAS DIFERENTES DOSIS DE EXTRACCIÓN ALCOHÓLICA Y MACERACIÓN DE LA FLOR DE MUERTO *T. erecta* L. EN EL CONTROL DE *Ralstonia solanacearum* SMITH EN LABORATORIO

En el primer aislamiento la bacteria creció mejor en el medio de cultivo “Agar Nutriente” que en el medio “Bacto Agar”.

### 2.1) Ensayo 1 (Momento 1)

Para la evaluación de los resultados en el momento 1 se ha tomado en consideración los siguientes tratamientos (**Tabla N° 7**) realizando Análisis de Varianza y Pruebas de Tukey al 5% por cada 24 horas de evaluación del porcentaje de inhibición (**Tabla N° 14, Tabla N° 15, Tabla N° 16, Tabla N° 17, Tabla N° 18, Tabla N° 19 y Tabla N° 20**):

**Tabla N° 14:** Análisis de Varianza del porcentaje de inhibición del efecto de los tratamientos evaluados sobre *Ralstonia solanacearum* a las 24 horas (**Anexo N° 11**). En ensayos realizados entre el 16 y 27 de mayo de 2019.

Fuente de Variación (FV)	Suma de Cuadrados (SC)	Grados de Libertad (gl)	Cuadrado Medio (CM)	p-valor
<b>Tratamiento</b>	66272,73	10	6627,27	sd
<b>Error</b>	0,00	44	0,00	
<b>Total</b>	66272,73	54		

Fuente: (Reyes, 2019).

La Prueba de Tukey al 5% muestra que no existe diferencias significativas entre los tratamientos.

\* **Coefficiente de Variación (CV):** 0,00

\* **Media:** 73,64 %

**Tabla N° 15:** Análisis de Varianza del porcentaje de inhibición del efecto de los tratamientos evaluados sobre *Ralstonia solanacearum* a las 48 horas (**Anexo N° 12**). En ensayos realizados entre el 16 y 27 de mayo de 2019.

<b>Fuente de Variación (FV)</b>	<b>Suma de Cuadrados (SC)</b>	<b>Grados de Libertad (gl)</b>	<b>Cuadrado Medio (CM)</b>	<b>p-valor</b>
<b>Tratamiento</b>	66272,73	10	6627,27	sd
<b>Error</b>	0,00	44	0,00	
<b>Total</b>	66272,73	54		

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

La Prueba de Tukey al 5% muestra que no existe diferencias significativas entre los tratamientos.

\* **Coefficiente de Variación (CV):** 0,00

\* **Media:** 73,64 %

**Tabla N° 16:** Análisis de Varianza del porcentaje de inhibición del efecto de los tratamientos evaluados sobre *Ralstonia solanacearum* a las 72 horas (**Anexo N° 13**). En ensayos realizados entre el 16 y 27 de mayo de 2019.

<b>Fuente de Variación (FV)</b>	<b>Suma de Cuadrados (SC)</b>	<b>Grados de Libertad (gl)</b>	<b>Cuadrado Medio (CM)</b>	<b>p-valor</b>
<b>Tratamiento</b>	66272,73	10	6627,27	sd
<b>Error</b>	0,00	44	0,00	
<b>Total</b>	66272,73	54		

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

La Prueba de Tukey al 5% muestra que no existe diferencias significativas entre los tratamientos.

\* **Coefficiente de Variación (CV):** 0,00

\* **Media:** 73,64 %

**Tabla N° 17:** Análisis de Varianza del porcentaje de inhibición del efecto de los tratamientos evaluados sobre *Ralstonia solanacearum* a las 96 horas (**Anexo N° 14**). En ensayos realizados entre el 16 y 27 de mayo de 2019.

<b>Fuente de Variación (FV)</b>	<b>Suma de Cuadrados (SC)</b>	<b>Grados de Libertad (gl)</b>	<b>Cuadrado Medio (CM)</b>	<b>p-valor</b>
<b>Tratamiento</b>	65159,50	10	6515,95	<0,0001 * *
<b>Error</b>	293,14	44	6,66	
<b>Total</b>	65452,64	54		

Fuente: (Reyes, 2019).

La Prueba de Tukey al 5% muestra que existe diferencias altamente significativas entre los tratamientos.

\* **Coefficiente de Variación (CV):** 3,55

\* **Media:** 72,81 %

**Tabla N° 18:** Prueba de Tukey al 5% del porcentaje de inhibición del efecto de los tratamientos evaluados sobre *Ralstonia solanacearum* a las 96 horas. En ensayos realizados entre el 16 y 27 de mayo de 2019.

<b>Tratamiento</b>	<b>Medias</b>	<b>Orden de los Rangos</b>
Testigo Negativo (Agua)	0,00	A
Testigo Neutro (Agar)	0,00	A
Extracto Etanol 25 %	80,89	B
Testigo Blanco (Metanol 100 %)	90,00	C
Testigo Blanco (Etanol 100 %)	90,00	C
Testigo Positivo (Hidróxido de Cobre)	90,00	C
Extracto Metanol 25 %	90,00	C
Extracto Metanol 50 %	90,00	C
Extracto Metanol 100 %	90,00	C
Extracto Etanol 50 %	90,00	C
Extracto Etanol 100 %	90,00	C

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

Fuente: (Reyes, 2019).

**La prueba de Tukey al 5% muestra que hay diferencias altamente significativas (Tabla N° 17 y Tabla N° 18) en el control de *Ralstonia solanacearum* a las 96 horas entre los**

tratamientos, en el ensayo realizado en laboratorio. Se observó que se forman 3 rangos de agrupación de los tratamientos. El rango en que se observó mayor control de la bacteria encontramos los siguientes tratamientos: Testigo Blanco (Metanol 100 %) (Figura N° 66), Testigo Blanco (Etanol 100 %) (Figura N° 67), Testigo Positivo (Hidróxido de Cobre), Extracto Metanol 25 %, Extracto Metanol 50 %, Extracto Metanol 100 %, Extracto Etanol 50 %, Extracto Etanol 100 %. Mientras que el rango en el que se observó un menor efecto de control encontramos a los siguientes tratamientos: Testigo Negativo (Agua), Testigo Neutro (Agar), Extracto Etanol 25 %.

**Tabla N° 19:** Análisis de Varianza del porcentaje de inhibición del efecto de los tratamientos evaluados sobre *Ralstonia solanacearum* a las 120 horas (Anexo N° 15). En ensayos realizados entre el 16 y 27 de mayo de 2019.

Fuente de Variación (FV)	Suma de Cuadrados (SC)	Grados de Libertad (gl)	Cuadrado Medio (CM)	p-valor
Tratamiento	63693,41	10	6369,34	<0,0001 * *
Error	802,82	44	18,25	
Total	64496,23	54		

Fuente: (Reyes, 2019).

La Prueba de Tukey al 5% muestra que existe diferencias altamente significativas entre los tratamientos.

\* **Coefficiente de Variación (CV):** 5,96

\* **Media:** 71,67 %

**Tabla N° 20:** Prueba de Tukey al 5% del porcentaje de inhibición del efecto de los tratamientos evaluados sobre *Ralstonia solanacearum* a las 120 horas. En ensayos realizados entre el 16 y 27 de mayo de 2019.

Tratamiento	Medias	Orden de los Rangos
Testigo Negativo (Agua)	0,00	A
Testigo Neutro (Agar)	0,00	A
Extracto Etanol 25 %	78,79	B
Extracto Metanol 25 %	79,60	B
Testigo Blanco (Etanol 100 %)	90,00	C
Testigo Positivo (Hidróxido de Cobre)	90,00	C
Testigo Blanco (Metanol 100 %)	90,00	C

Extracto Metanol 50 %	90,00	C
Extracto Metanol 100 %	90,00	C
Extracto Etanol 50 %	90,00	C
Extracto Etanol 100 %	90,00	C

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

Fuente: (Reyes, 2019).

La prueba de Tukey al 5% muestra que hay diferencias altamente significativas (Tabla N° 19 y Tabla N° 20) en el control de *Ralstonia solanacearum* a las 120 horas entre los tratamientos, en el ensayo realizado en laboratorio. Se observó que se forman 3 rangos de agrupación de los tratamientos. El rango en que se observó mayor control de la bacteria encontramos los siguientes tratamientos: Testigo Blanco (Etanol 100 %) (Figura N° 67), Testigo Positivo (Hidróxido de Cobre), Testigo Blanco (Metanol 100 %) (Figura N° 66), Extracto Metanol 50 %, Extracto Metanol 100 %, Extracto Etanol 50 %, Extracto Etanol 100 %. Mientras que el rango en el que se observó un menor efecto de control encontramos a los siguientes tratamientos: Testigo Negativo (Agua), Testigo Neutro (Agar), Extracto Etanol 25 %, Extracto Metanol 25 %.



**Figura N° 66:** Porcentaje de inhibición del testigo blanco metanol al 100 %.

Fotografía: (Reyes, 2019).



**Figura N° 67:** Porcentaje de inhibición del testigo blanco etanol al 100 %.

Fotografía: (Reyes, 2019).

## 2.2) Ensayo 2 (Momento 2): Primera Parte

Para la evaluación de los resultados en el momento 2, parte 1; se ha tomado en consideración los siguientes tratamientos (Tabla N° 10) realizando Análisis de Varianza y Pruebas de Tukey al 5% a las 24 horas de evaluación de los halos de inhibición (Tabla N° 21, Tabla N° 22:



**Tabla N° 21:** Análisis de Varianza de los halos de inhibición resultantes del efecto de los tratamientos evaluados sobre *Ralstonia solanacearum*. En ensayos realizados entre el 19 y 21 de junio de 2019 (Primera Parte) (**Anexo N° 16**).

<b>Fuente de Variación (FV)</b>	<b>Suma de Cuadrados (SC)</b>	<b>Grados de Libertad (gl)</b>	<b>Cuadrado Medio (CM)</b>	<b>p-valor</b>
<b>Tratamiento</b>	1232,59	20	61,63	<0,0001 * *
<b>Error</b>	486,80	84	5,80	
<b>Total</b>	1719,39	104		

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

La Prueba de Tukey al 5% muestra que existe diferencias altamente significativas entre los tratamientos.

\* **Coefficiente de Variación (CV):** 62,11

\* **Media:** 3,88 mm

**Tabla N° 22:** Prueba de Tukey al 5% de los halos de inhibición resultantes del efecto de los tratamientos evaluados sobre *Ralstonia solanacearum*. En ensayos realizados entre el 19 y 21 de junio de 2019 (Primera Parte).

<b>Tratamientos</b>	<b>Medias</b>	<b>Orden de los Rangos</b>			
Testigo Positivo (Carbendazim)	0,00	A			
Testigo Etanol 10 %	0,00	A			
Testigo Metanol 10 %	0,00	A			
Testigo Positivo (Hidróxido de Cobre)	0,00	A			
Testigo Metanol 20 %	0,00	A			
Testigo Negativo (Agua)	0,00	A			
Testigo Metanol 30 %	0,00	A			
Extracto Etanol 10 %	1,40	A	B		
Testigo Etanol 20 %	1,60	A	B		
Extracto Aceite de Oliva 10 %	2,80	A	B	C	
Testigo Aceite de Oliva 10 %	3,00	A	B	C	
Extracto Etanol 20 %	4,40	A	B	C	D
Extracto Metanol 10 %	6,40		B	C	D
Extracto Metanol 20 %	6,80		B	C	D

Testigo Etanol 30 %	7,40	C	D
Extracto Metanol 30 %	7,40	C	D
Testigo Aceite de Oliva 30 %	7,60	C	D
Extracto Etanol 30 %	7,60	C	D
Extracto Aceite de Oliva 20 %	7,80	C	D
Testigo Aceite de Oliva 20 %	8,20	C	D
Extracto Aceite de Oliva 30 %	9,00		D

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

Fuente: (Reyes, 2019).

**La prueba de Tukey al 5% muestra que hay diferencias altamente significativas (Tabla N° 21 y Tabla N° 22) en el control de *Ralstonia solanacearum* entre los tratamientos, en el ensayo realizado en laboratorio. Se observó que se forman 4 rangos de agrupación de los tratamientos. El rango en que se observó mayor control de la bacteria encontramos los siguientes tratamientos:** Extracto Oleoso al 30% (9 mm), Extracto Etílico al 20% (6 mm), Extracto Etílico al 30% (7 mm), Extracto Metílico al 10% (8mm), Extracto Metílico al 20% (8mm), Extracto Metílico al 30% (9mm), Extracto Oleoso al 20% (8 mm), Solución Etílica al 30% (7mm), Solución de Aceite de Oliva al 20% (8 mm), Solución de Aceite de Oliva al 30% (7 mm). **Mientras que el rango en el que se observó un menor efecto de control encontramos a los siguientes tratamientos:** Extracto Etílico al 20% (6 mm), Extracto Etílico al 30% (7 mm), Extracto Metílico al 10% (8mm), Extracto Metílico al 20% (8mm), Extracto Metílico al 30% (9mm), Extracto Oleoso al 20% (8 mm), Solución Etílica al 30% (7mm), Solución de Aceite de Oliva al 20% (8 mm), Solución de Aceite de Oliva al 30% (7 mm), Extracto Etílico al 10% (0mm), Extracto Oleoso al 10% (0 mm), Solución Etílica al 10% (0mm), Solución Etílica al 20% (0mm), Solución Metílica al 10% (0mm), Solución Metílica al 20% (0mm), Solución Metílica al 30% (0mm), Solución de Aceite de Oliva al 10% (0 mm), Agua (0mm), Hidróxido de Cobre (0mm), Carbendazim (0mm).

### 2.3) Ensayo 2 (Momento 2): Segunda Parte

Para la evaluación de los resultados en el momento 2, parte 2; se ha tomado en consideración los siguientes tratamientos (**Tabla N° 10**) realizando Análisis de Varianza y Pruebas de Tukey al 5% a las 24 horas de evaluación de los halos de inhibición (**Tabla N° 23, Tabla N° 24:**

**Tabla N° 23:** Análisis de Varianza de los halos de inhibición resultantes del efecto de los tratamientos evaluados sobre *Ralstonia solanacearum*. En ensayos realizados entre el 2 y 4 de julio de 2019 (Segunda Parte) (**Anexo N° 17**).

<b>Fuente de Variación (FV)</b>	<b>Suma de Cuadrados (SC)</b>	<b>Grados de Libertad (gl)</b>	<b>Cuadrado Medio (CM)</b>	<b>p-valor</b>
<b>Tratamiento</b>	5348,69	21	254,70	<0,0001 * *
<b>Error</b>	1084,80	88	12,33	
<b>Total</b>	6433,49	109		

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

La Prueba de Tukey al 5% muestra que existe diferencias altamente significativas entre los tratamientos.

\* **Coefficiente de Variación (CV):** 66,13

\* **Media:** 5,31 mm

**Tabla N° 24:** Prueba de Tukey al 5% de los halos de inhibición resultantes del efecto de los tratamientos evaluados sobre *Ralstonia solanacearum*. En ensayos realizados entre el 2 y 4 de julio de 2019 (Segunda Parte).

<b>Tratamientos</b>	<b>Medias</b>	<b>Orden de los Rangos</b>	
Aceite de Oliva + Polyether 30 %	0,00	A	
Aceite de Oliva + Polyether 15 %	0,00	A	
Aceite de Oliva + Polyether 20 %	0,00	A	
Aceite Vegetal + Polyether 20 %	0,00	A	
Aceite Vegetal + Polyether 30 %	0,00	A	
Aceite Vegetal + Polyether 15 %	0,00	A	
Aceite Vegetal + Polyether 10 %	0,00	A	
Aceite de Oliva + Polyether 10 %	0,00	A	
Aceite Vegetal 15 %	2,00	A	B
Aceite de Oliva 30 %	3,40	A	B
Aceite Vegetal 5 %	3,60	A	B
Aceite de Oliva 5 %	3,80	A	B
Aceite Vegetal + Polyether 5 %	5,00	A	B
Aceite Vegetal 20 %	5,20	A	B

Aceite Vegetal 30 %	5,40	A	B
Aceite de Oliva + Polyether 5 %	6,80	A	B
Aceite de Oliva 10 %	7,20	A	B
Aceite de Oliva 15 %	7,80	A	B
Aceite de Oliva 20 %	8,20	A	B
Aceite Vegetal 10 %	8,80		B
Testigo Positivo (Sulfato de Cobre Pentahidratado)	20,80		C
Testigo Positivo (Sulfato de Estreptomicina)	28,80		C

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

Fuente: (Reyes, 2019).

**La prueba de Tukey al 5% muestra que hay diferencias altamente significativas (Tabla N° 23 y Tabla N° 24) en el control de *Ralstonia solanacearum* entre los tratamientos, en el ensayo realizado en laboratorio. Se observó que se forman 3 rangos de agrupación de los tratamientos. El rango en que se observó mayor control de la bacteria encontramos los siguientes tratamientos:** Sulfato de Estreptomicina (29 mm) (**Figura N° 68**), Sulfato de Cobre Pentahidratado (21 mm) (**Figura N° 69**), Solución de Aceite Vegetal 10% (9mm), Solución de Aceite de Oliva al 5% (0 mm), Solución de Aceite de Oliva al 10 % (9 mm), Solución de Aceite de Oliva al 15 % (9mm), Solución de Aceite de Oliva 20% (10mm), Solución de Aceite de Oliva al 30% (0 mm), Solución de Aceite de Oliva más Polyether al 5% (8mm), Solución de Aceite Vegetal de Girasol al 5% (0 mm), Solución de Aceite Vegetal de Girasol al 15% (0 mm), Solución de Aceite Vegetal de Girasol al 20% (8 mm), Solución de Aceite Vegetal de Girasol al 30% (8 mm), Solución de Aceite Vegetal de Girasol más Polyether al 5% (8 mm). **Mientras que el rango en el que se observó un menor efecto de control encontramos a los siguientes tratamientos:** Solución de Aceite de Oliva al 5% (0 mm), Solución de Aceite de Oliva al 10 % (9 mm), Solución de Aceite de Oliva al 15 % (9mm), Solución de Aceite de Oliva 20% (10mm), Solución de Aceite de Oliva al 30% (0 mm), Solución de Aceite de Oliva más Polyether al 5% (8mm), Solución de Aceite Vegetal de Girasol al 5% (0 mm), Solución de Aceite Vegetal de Girasol al 15% (0 mm), Solución de Aceite Vegetal de Girasol al 20% (8 mm), Solución de Aceite Vegetal de Girasol al 30% (8 mm), Solución de Aceite Vegetal de Girasol más Polyether al 5% (8 mm), Solución de Aceite de Oliva más Polyether al 10% (0 mm), Solución de Aceite de Oliva más Polyether al 15% (0 mm), Solución de Aceite de Oliva más Polyether al 20% (0 mm), Solución de Aceite de Oliva más Polyether al 30% (0 mm),

Solución de Aceite Vegetal de Girasol más Polyether al 10% (0 mm), Solución de Aceite Vegetal de Girasol más Polyether al 15% (0 mm), Solución de Aceite Vegetal de Girasol más Polyether al 20% (0 mm), Solución de Aceite Vegetal de Girasol más Polyether al 30% (0 mm).

Estos resultados son similares a los propuestos en el estudio “LA FLOR DE MUERTOS CONTRA EL MICROMUNDO” por UNAM, (s.f.) donde a pesar de que dejaron macerar por más días (14 días) y colocaron las partes separadas de la planta (tallos y flores) en etanol también presentaron crecimiento de bacterias, en mayor cantidad en el extracto del tallo. En las cajas con extractos tanto de flor como de tallo de *T. erecta*, las bacterias que se desarrollaron, fueron únicamente Gram (-).

Por el contrario, Torres *et al.*, (2014) En el estudio “Manejo de *Ralstonia solanacearum* raza 2 a través de productos químicos y biológicos” presenta resultados diferentes a los mostrados pues ellos hacen referencia que el hidróxido de cobre en todas las dosis evaluadas fue el tratamiento más efectivo para el control lo que difiere de la presente investigación donde el hidróxido de cobre no funcionó en el control de *R. solanacearum*.

En el estudio “*Ralstonia solanacearum*: Una enfermedad bacteriana de importancia cuarentenaria en el cultivo de *Solanum tuberosum* L.” propuesto por Rueda *et al.*, (2014) al realizar extractos etanólicos en diferentes dosis muestran resultados positivos para el control biológico contra bacterias fitopatógenas *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora*, utilizando la especie *Larrea tridentata* más conocida como la gobernadora mostrando una excelente acción bactericida contra *R. solanacearum*.

Que similar a Barrera *et al.*, (2009): en su estudio “CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LA ESPECIE *Tagetes erecta* Lin.” nos muestra que otras especies del género *Tagetes* como *T. lunulata* L. y *T. patula* L. han tenido mejores efectos fungicidas y bactericidas que *T. erecta*, mediante la aplicación directa de extractos acuosos a cultivos agrícolas.

Según Thais *et al.*, (2015) en su estudio “Biological control of eucalyptus bacterial wilt with rhizobacteria” ellos dicen que *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus* fueron seleccionados como posibles agentes de control biológico. *B. thuringiensis* cuando estaba en alta población, producía compuestos volátiles que inhibían el crecimiento y la multiplicación de *R. solanacearum*. Esta cepa no produce amonio, pero produce cianuro de hidrógeno (HCN) que puede inhibir el crecimiento de patógenos. Este compuesto volátil fue capaz

de retrasar en dos días el crecimiento de *R. solanacearum*. Añaden que el marchitamiento bacteriano controlado por *B. cereus* se debe principalmente a la producción de sideróforos (agentes quelantes para secuestrar hierro en presencia de otros metales). Y el producto comercial Rizolyptus (una formulación comercial de varias rizobacterias obtenidas de la rizosfera y el rizoplaneo de plantas de tomate y eucalipto) disminuyeron la incidencia de marchitez bacteriana en eucalipto.

De acuerdo con Soto *et al.*, (2018) en su estudio “Extractos de *Tagetes patula* L. (Asteraceae): un potencial bactericida contra el Moko” donde el género *Tagetes* en extracto metanólico de hojas no tiene actividad bactericida, mientras que el extracto metanólico de flores si posee una actividad bactericida, pero depende de las concentraciones; siendo *R. solanacearum* sensible a los aceites esenciales del género *Tagetes*.

El estudio “Efecto de prácticas ecológicas sobre la población de *Ralstonia solanacearum* Smith, causante de moko de plátano” propuesto por Arenas *et al.*, (s.f.), ellos igual evalúan al género *Tagetes* inoculando el suelo en condiciones de invernadero con resultados relevantes en la reducción de la población de *Ralstonia solanacearum* en un 84,7 %.



**Figura N° 68:** Halos de inhibición con Sulfato de Estreptomicina.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).



**Figura N° 69:** Halos de inhibición con Sulfato de Cobre Pentahidratado.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).

### 3. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS MEDIANTE UN TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Los principales grupos de constituyentes químicos de *Tagetes erecta* (Tabla N° 25) son:

**Tabla N° 25.** Resultados del análisis del Tamizaje Fitoquímico del Extracto Alcohólico de *Tagetes erecta*.

ENSAYO	PRESENCIA	ETANOL	METANOL
SUDAN	Compuestos grasos	Positivo (+ + +)	Positivo (+ + +)
FEHLING	Azúcares reductores	Positivo (+ + +)	Positivo (+ + +)
MAYER	Alcaloides (No específica)	Negativo (-)	Positivo (+ + +)
CATEQUINA	Catequinas	Positivo (+ + +)	Positivo (+ + +)
WAGNER	Alcaloides	Positivo (+ + +)	Positivo (+ + +)
DRAGENDORFF	Alcaloides	Positivo (+ + +)	Positivo (+ + +)
BALJET	Compuestos con agrupamiento lactónico	Positivo (+ + +)	Positivo (+ + +)
BUCHARD	Triterpenos y/o esteroides	Negativo (-)	Negativo (-)
CLORURO FÉRRICO (Cl Fe <sub>3</sub> )	Compuestos fenólicos y taninos	Positivo (+ + +)	Positivo (+ + +)
BORNTRAGER	Quinonas	Positivo (+ + +)	Positivo (+ + +)
SHINODA	Flavonoides	Negativo (-)	Positivo (+ + +)
RESINAS	Resinas	Negativo (-)	Negativo (-)

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

En el tamizaje fitoquímico, la planta (tallo, hojas, flores) macerado con alcohol (etanol y metanol) se mostraron los siguientes resultados (Tabla N° 25), (Figura N° 70):

**3.1** En etanol y metanol en el ensayo de Sudan hubo presencia de compuestos grasos, en el ensayo de Fehling presento azúcares reductores, en el ensayo de Catequinas hubo presencia de catequinas, en el ensayo de Wagner presentó alcaloides, en Baljet hubo presencia de compuestos con agrupamiento lactónico (en particular Coumarinas), en el ensayo de Cloruro Férrico hubo presencia de compuestos fenólicos, taninos y en el ensayo de Borntrager presentó quinonas.

Los resultados encontrados en el presente estudio concuerdan con lo determinado por Barrera *et al.*, (2009) en su estudio “CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LA ESPECIE *Tagetes erecta* Lin”. Donde el encontró: Alcaloides en los extractos de la flor, las hojas, las raíces y los tallos; Coumarinas en las flores y en las hojas; Fenoles y Taninos en flores, las hojas y los tallos; Azúcares Reductores, importantes como metabolitos energéticos, aparecen en todas las partes de la planta excepto en las raíces, pero predominan en el extracto alcohólico de las flores. Mientras que en las quinonas difieren ya que con el método de Borntranger no se detectan.

Resultados similares a los de Pupo *et al.*, (2009) en su estudio “Efecto del extracto crudo de hojas de *Tagetes erecta* L. en el control de cuatro hongos patógenos de hortalizas en condiciones “in vitro”” donde ellos en el tamizaje fitoquímico tuvieron la presencia de varios metabolitos secundarios entre ellos alcaloides, taninos pirogalotánicos, coumarinas y azúcares reductores.

Al igual que Solórzano (2014) en su estudio “Identificación y cuantificación de flavonoides en los extractos etanólicos de (*Tagetes* sp), (*Tagetes multiflora*) Y (*Tagetes zipaquirensis*) por métodos cromatográficos” en el ensayo de Cloruro Férrico tiene una elevada cantidad de compuestos fenólicos y taninos; en el ensayo de Borntrager presencia de quinonas; en el ensayo de Baljet existe la presencia de compuestos lactónicos; en el ensayo de Sudan la presencia de compuestos grasos (lípidos y/o aceites esenciales).

En lo que respecta al ensayo de Catequinas Solórzano (2014) dice que no hubo presencia de este compuesto en el extracto etanólico.

**3.2** En el ensayo de Mayer en etanol hubo presencia no específica de alcaloides, en el ensayo de Mayer en metanol si existe presencia de alcaloides. En el ensayo de Shinoda en metanol existe la presencia de flavonoides, que en el ensayo de Shinoda en etanol no existe flavonoides.

Guardando concordancia con el estudio realizado por Barrera *et al.*, (2009) donde determinó que los flavonoides predominan en las hojas y son de diferentes sub-familias, donde además de flavonol, las flavononas y flavonas hay antocianidinas, las que forman puentes con el colágeno.

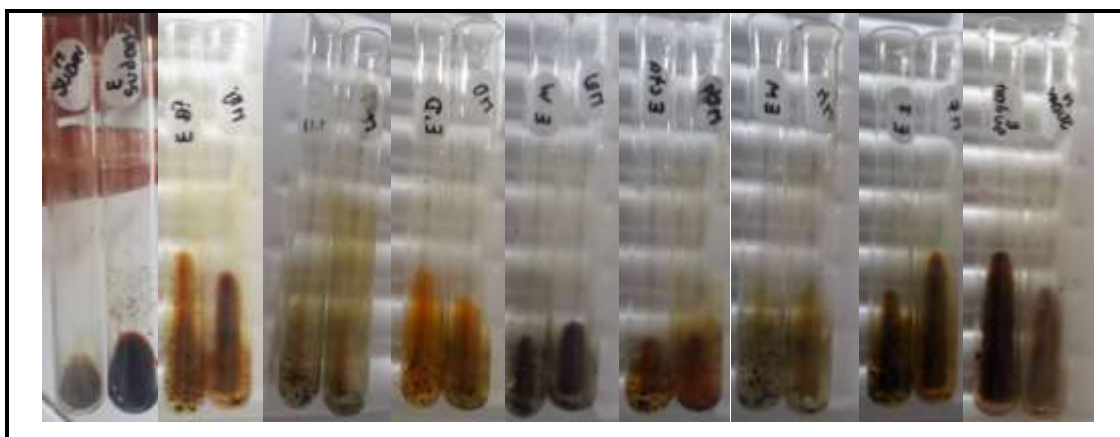
A diferencia de Solórzano (2014) que en el ensayo de Shinoda en etanol tiene presencia de flavonoides; pero en los ensayos de Dragendorff, Wagner y Mayer hay ausencia de alcaloides.



**3.3** En etanol y metanol en el ensayo de Buchard no hubo la presencia de triterpenos y/o esteroides, ni de resinas.

Resultados similares a los expresados en el estudio de Barrera *et al.*, (2009). Donde tampoco hubo presencia de triterpenos y/o esteroides, ni de resinas en ninguna parte de la planta. Y similares a los de Solórzano (2014) que en el ensayo de Resinas no existe la presencia del compuesto.

Resultados contrarios con Pupo *et al.*, (2009) donde en el extracto etanólico evidencio la presencia de resinas. Y a los de Solórzano (2014) que en el ensayo de Buchard existe la presencia de triterpenos y/o esteroides en bajas cantidades.



**Figura N° 70:** Resultados del Tamizaje Fitoquímico de los extractos alcohólicos (Etanol y Metanol) de *Tagetes erecta*.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).

## **VI. CONCLUSIONES**

1. Se acepta la hipótesis alternativa – H<sub>1</sub> “Al menos una de las dosis de los extractos de la Flor de Muerto (*Tagetes erecta* L.) tienen efecto en el control de la Marchitez Bacteriana (*Ralstonia solanacearum* Smith.)”.
2. De las concentraciones evaluadas de los extractos alcohólicos con *Tagetes erecta* en confrontación a la bacteria *Ralstonia solanacearum*. Las que mejores resultados presentaron fueron las concentraciones de 50 y 100 % de los extractos alcohólicos (Metanol y Etanol), mientras que en el extracto oleoso (Aceite de Oliva) al 30 % y el extracto metílico al 30 % de *Tagetes erecta* presentaron buenos resultados en el control de la marchitez bacteriana.
3. El Sulfato de Cobre Pentahidratado y el Sulfato de Estreptomicina fueron los productos con los mejores resultados en el control de la bacteria *Ralstonia solanacearum* en comparación con todos los productos utilizados.
4. En el tamizaje fitoquímico, la planta (tallos, hojas, flores) macerado con alcohol (etanol y metanol) se mostraron los siguientes resultados: en etanol y metanol hubo presencia de compuestos grasos, azúcares reductores, catequinas, alcaloides, compuestos con agrupamiento lactónico (en particular Coumarinas), compuestos fenólicos, taninos y quinonas. En etanol no hubo presencia de alcaloides, en metanol si existe alcaloides. En metanol existe la presencia de flavonoides, que en etanol no existe. En etanol y metanol no hubo la presencia de triterpenos y/o esteroides, ni de resinas. *Tagetes erecta* presentó alcaloides y taninos en etanol y metanol, flavonoides en metanol por lo cual se puede utilizar como bactericida, pero en altas concentraciones para bacterias de similares características que *Ralstonia solanacearum*.

## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Se recomienda la búsqueda de otros productos para el control de la bacteria *Ralstonia solanacearum*.
2. Utilizar otras especies del género *Tagetes*.
3. Realizar más investigaciones probando otras concentraciones y otros líquidos de extracción.
4. Realizar los extractos y el tamizaje fitoquímico con las partes separadas de la planta.

## VIII. RESUMEN

La presente investigación propone: determinar la eficiencia de la extracción alcohólica y la maceración de la Flor de Muerto (*Tagetes erecta* L.) para el manejo de la Marchitez Bacteriana (*Ralstonia solanacearum* Smith.) en Eucalipto Tropical (*Eucalyptus urograndis*); el estudio se realizó en los laboratorios de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo en conjunto con la empresa Novopan del Ecuador S.A. Se prepararon extractos oleosos (aceite de oliva y aceite vegetal de girasol) y alcohólicos (etanol y metanol), de *T. erecta* sin raíz, cortando las partes, secando, moliendo y dejando macerar la planta con los líquidos de extracción, posterior a esto se filtraron todos los extractos; se concentraron y realizaron un tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólicos. El diseño empleado fue en bloques completamente al azar con 5 repeticiones para cada concentración y testigos evaluados, el ensayo se realizó en 2 momentos. Donde se obtuvo que la planta macerada con los alcoholes presenta compuestos grasos, azúcares reductores, catequinas, alcaloides, compuestos con agrupamiento lactónico, compuestos fenólicos, taninos y quinonas. En lo que respecta a la inhibición de *R. solanacearum* se muestran diferencias altamente significativas siendo los extractos alcohólicos en concentraciones de 50 y 100 % las que presentaron mejores resultados a las 120 horas de evaluación, además del extracto oleoso (Aceite de Oliva) al 30 % y el extracto metílico al 30 % a las 24 horas de evaluación; el sulfato de cobre pentahidratado y el sulfato de estreptomycin fueron los insumos químicos que mejor controlaron la bacteria a las 24 horas de evaluación; Se concluye que de los extractos alcohólicos y oleosos con *T. erecta* utilizados en las pruebas de inhibición de la bacteria *R. solanacearum* no todos presentaron buenos resultados a diferencia de los insumos químicos.

**Palabras clave:** EXTRACCIÓN ALCOHÓLICA - TAMIZAJE FITOQUÍMICO - EXTRACTOS VEGETALES - MARCHITEZ BACTERIANA - FLOR DE MUERTO - EUCALIPTO TROPICAL.

**Por:** Ana Reyes



## IX. SUMMARY

The present investigation proposes to determine the efficiency of alcoholic extraction and the maceration of the "Flor de Muerto" (*Tagetes erecta L.*) for the management of bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum Smith*) in Tropical Eucalyptus (*Eucalyptus urograndis*). The study was carried out in the laboratories of the Escuela Superior Politecnica de Chimborazo in association with the company Novopan del Ecuador S.A. Oily extracts (olive oil and sunflower vegetable oil) and alcoholic (ethanol and methanol) extracts of *T. erecta* without root were prepared by cutting the parts, drying, grinding, and letting the plant macerate with the extraction liquids; after this, all extracts were filtered, concentrated, and performed a phytochemical screening of alcoholic extracts. The design used was in completely randomized blocks with 5 repetitions for each concentration, and controls evaluated. The trial was carried out in 2 moments where it was obtained that the plant macerated with the alcohol presents fatty compounds, reducing sugars, catechins, alkaloids, compounds with lactonic grouping, phenolic compounds, tannins, and quinones. Regarding the inhibition of *R. solanacearum*, highly significant differences were shown; alcoholic extracts being in concentrations of 50 and 100% those that presented better results at the 120 hours of evaluation, also the 30% oily extract (Olive Oil), and the 30% methyl extract at 24 hours of evaluation; copper pentahydrate sulfate and streptomycin sulfate were the chemical inputs that best controlled the bacteria at 24 hours of evaluation. It is concluded that of the alcoholic and oily extracts with *T. erecta* used in the inhibition tests of the bacterium *R. solanacearum* not all presented good results, unlike the chemical inputs.

**Keywords:** ALCOHOLIC EXTRACTION - PHYTOCHEMICAL SIZING -  
VEGETABLE EXTRACTS - BACTERIAL MARCHITEZ - DEAD FLOWER -  
TROPICAL EUCALYPTUS.



## X. BIBLIOGRAFÍA

- Alfenas A., Zauza E., Mafia R., & Assis T. (2004). Clonagem e Doenças do Eucalipto. Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa, Brazil.
- Alfenas, A., Valverde E., Mafia, R., & Assis. (2009). Clonagem e Doenças do Eucalipto. Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa, Brasil. p. 500.
- Aosbot, D. (2019). Tinción de Gram. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: [https://es.wikipedia.org/wiki/Tinci%C3%B3n\\_de\\_Gram](https://es.wikipedia.org/wiki/Tinci%C3%B3n_de_Gram).
- Aparicio, G. (2014). Morfología de Célula. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <https://es.slideshare.net/gabrielaparicio9847/morfologia-39861132>
- Arenas, A., López, D., Álvarez, E., Llano, G., & Loke, J. (s.f.). Efecto de prácticas ecológicas sobre la población de *Ralstonia solanacearum* Smith, causante de moko de plátano. Cali, Colombia. 25(2), 76–80.
- Balles, A. (2019). Maceración. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <https://es.wikipedia.org/wiki/Maceraci%C3%B3n>.
- Barrera, L., Hung, B., Botta, A. M., Hernández, E., González, M., & Agular, B. (2009). Caracterización física y tamizaje fitoquímico de la especie *Tagetes erecta* Lin. Revista Cubana de Química, 21(2), 10–15.
- Bowman, J., & Sequeira, L. (1982). Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato: infectivity titrations In relation to multiplication and spread of the pathogen. Am. Potato. J. 59, 155-164.
- Briones, M. (2005). Supuestos del análisis de varianza. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <https://es.slideshare.net/nardysandrav/supuestos-andeva> .
- Champoiseau, P. (2009). *Ralstonia solanacearum* raza 3 biovar 2. (USB). Trad. P Nina; JC Hong. Universidad de Florida. Florida, Estados Unidos. p. 15.
- Cisneros, F. (s.f.). Control físico. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: [http://www.avocadosource.com/books/cisnerosfausto1995/CPA\\_6\\_PG\\_84-88.pdf](http://www.avocadosource.com/books/cisnerosfausto1995/CPA_6_PG_84-88.pdf)

- Correa, A. (2019). Hidróxido de Cobre. Manual de Plaguicidas de Centro América. Universidad Nacional Costa Rica. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/318-hidroxido-de-cobre>.
- Delgado, L., García, L., & García, R. (1999). Marchitez bacteriana del tomate causado por el biovar 2 de *Ralstonia solanacearum* en algunas localidades del estado Mérida, Venezuela. *Forest.* 43(2), 1 83-189.
- Denny, T. (2001). Hayward: «Gram Negative Bacteria. *Ralstonia*», Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd ed., APS Press. Saint. Paul, Minesota, Estados Unidos. pp. 151-174.
- Ecuadorforestal, (2012). Ficha técnica número #10 Eucalipto (*Eucalyptus urograndis*). Características y propiedades. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <http://ecuadorforestal.org/fichas-tecnicas-de-especies-forestales/ficha-tecnica-no-10-eucalipto/>.
- Empresa de Agroquímicos. BASF. (2019). Coadyuvante para optimizar el desempeño de agroquímicos. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <https://agriculture.basf.com/mx/es/Proteccio%CC%81n-de-los-cultivos/Break-Thru.html>.
- European y Mediterranean Plant Protection Organization. EPPO. (2004). Diagnostic protocols for regulated pest. *Bulletin* 34, 155-157.
- Ezziyyani, M., Pérez, C., Requena, M., Ahmed, S., & Candela M. (2004). Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Espinardo. Murcia, España.
- Facultad de Ciencias. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. (2019). Tamizaje Fitoquímico. Riobamba, Ecuador. pp. 1 – 21.
- Fundación Hondureña de Investigación Agrícola. FHIA HN., United States Agency International Development. USAID., & Integrated Pest Management Collaborative Research Support Program IPM CRSP. (2014). Marchitez bacteriana en las solanáceas: su reconocimiento y manejo integrado. Lima, Corte, HN, FHIA. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <http://www.fhia.org.hn>

- Francisco, L. (2008). *Ralstonia solanacearum*. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: [https://es.wikipedia.org/wiki/Ralstonia\\_solanacearum](https://es.wikipedia.org/wiki/Ralstonia_solanacearum).
- Gómez, O., & Zavaleta, E. (2001). La asociación de cultivos como estrategia para el manejo de enfermedades, en particular con *Tagetes* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19, 94-99.
- Google Maps. (2019). Ubicación de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <https://www.google.com/maps/@-1.6541045,-78.6791789,16.69z>
- Guarisch-Sousa, R., Puigvert, M., Coll, N. S., Siri, M. I., Pianzola, M. J., Valls, M., & Setubal, J. (2016). Complete genome sequence of the potato pathogen *Ralstonia solanacearum* UY031. *Standards in Genomic Sciences*, 11(1), 1–9. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0131-4>
- Guerrero, N. (2014). Caracterización Fitoquímica y Actividad Biológica de *Oryctanthus spicatus* (Loranthaceae). (Tesis de grado. Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales). Universidad Politécnica Salesiana. Quito, Ecuador.
- Hayward, A. (2000). *Ralstonia solanacearum*. In Lederberg J ed. *Encyclopedia of Microbiology*. San Diego, Estados Unidos. Academic Press. pp. 32-42.
- Infojardín. (2017). Fichas *Tagetes erecta*. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <http://fichas.infojardin.com/perennes-anuales/tagetes-erecta-tagete-clavel-del-moro-clavelon.htm>
- Jana, C. (2017). Ecos de la Tierra: como hacer oleatos de lavanda y árnica. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <https://ecosdelatierrablog.wordpress.com/2017/03/20/como-hacer-oleatos-de-lavanda-y-arnica/>
- Kelman, A. (1954). The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanaearum* to coloni appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology*. 44: 693-695.
- Kelman, A., & Sequeira, L. (1965). Root-to-root spread of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 55:304-9.



- Loarca, J. (1987). Estudio del patosistema Solanum-Pseudomonas y alternativas de control químico aplicado a la semilla de dos municipios del departamento de Quetzaltenango. (Tesis de grado. Licenciado en Agronomía). Universidad de San Carlos Guatemala. San Carlos, Guatemala.
- Lock, O. (1994). Investigación fitoquímica. Lima: Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, Perú.
- López, M., Segovia, J., & Morán, E. (2016). Manejo fitosanitario de la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum* E . F . Smith) del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <http://ri.ues.edu.sv/9461/>.
- López, M. (s.f.). Maceración. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: [http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lpro/lopez\\_a\\_e/capitulo1.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lpro/lopez_a_e/capitulo1.pdf)
- Mafia, R., Alfenas, A., Penchel, R., Ferreira, M., & Alfenas. M. (2012). Murcha-bacteriana: Disseminação do patógeno e efeitos da doença sobre a clonagem do Eucalipto. Revista Árvore. 36(4), 593-602.
- Martínez, V. (Director General). (2017). Estreptomicina. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: [https://www.terralia.com/agroquimicos\\_de\\_mexico/view\\_composition?composition\\_id=12910](https://www.terralia.com/agroquimicos_de_mexico/view_composition?composition_id=12910).
- Mederos, K. (2019). *Tagetes erecta*. Una planta con propiedades insecticidas y medicinales. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <https://naturalezatropical.com/tagetes-erecta-flor-de-muertos/>
- Mendoza, R. (2015). Anatomía y propiedades físicas de la madera de *Eucalyptus urograndis* H.B.K. Oxapampa - Pasco. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/UNCP/3510>.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. MAGAP. (2013). *Ralstonia solanacearum*. Agrocalidad – MAGAP, (Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro). Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <http://www.agrocalidad.gob.ec/documentos/dcz/4bi-ficha-tecnica-r.solanacearum-raza-2-min.pdf>.

- Montero, I. (2019). Las bacterias Gram Positivas. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <https://okdiario.com/curiosidades/bacterias-gram-positivas-697551>
- MT Healthcare. (2019). Luteina de Tagetes Erecta. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: [https://www.google.com/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=SuZdXem-M8GC5wLEz7GABA&q=tagetes+erecta+luteina&oq=tagetes+erecta+luteina&gs\\_l=img.3...88347.90444..90627...1.0..0.156.1373.0j9.....0....1..gws-wiz-img.....0j0i30j0i5i30j0i24.OJ-1FF7eFQE&ved=0ahUKEwjpi-7ZoJXkAhVBwVkJHcRnDEAQ4dUDCAy&uact=5#imgrc=1B5U7R\\_TLeSzxM](https://www.google.com/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=SuZdXem-M8GC5wLEz7GABA&q=tagetes+erecta+luteina&oq=tagetes+erecta+luteina&gs_l=img.3...88347.90444..90627...1.0..0.156.1373.0j9.....0....1..gws-wiz-img.....0j0i30j0i5i30j0i24.OJ-1FF7eFQE&ved=0ahUKEwjpi-7ZoJXkAhVBwVkJHcRnDEAQ4dUDCAy&uact=5#imgrc=1B5U7R_TLeSzxM)
- Naranjo, E., & Martínez, Y. (2013). Avances en el diagnóstico de la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*): situación actual y perspectivas en Cuba. *Rev. Protección Veg.*, 28(3), 160–170.
- Novopan del Ecuador. (2018). Patrimonio Forestal. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <http://www.novopan.com.ec/>
- Ortisa, L. (2019). Fisión Binaria. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: [https://es.wikipedia.org/wiki/Fisi%C3%B3n\\_binaria](https://es.wikipedia.org/wiki/Fisi%C3%B3n_binaria)
- Palladino, C., Pérez, G., & Pérez, C. A. (2016). Enfermedades bacterianas de eucaliptos. Estado actual del conocimiento. *Bosque*, 37(3), 451–460. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <https://doi.org/10.4067/S0717-92002016000300002>
- Pérez, M. (2013). *Tagetes erecta*. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <http://www.botanicayjardines.com/tagetes-erecta/>
- Perez, M., Rebudillo, R., & Perez, L. (2004). Líneas base de sensibilidad de las poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Morelete de Cuba, a los fungicidas Azoxystrobin y Trifloxystrobin. *La Habana, Cuba. REDALYC*. 8(3), 41-47.
- Pérez, M. (2002). Morfología y estructura bacteriana. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%209.pdf>
- Puccio. (s.f.). Monaco Encyclopedia: Discover the Biodiversity. *Tagetes erecta*. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <https://www.monaconatureencyclopedia.com/tagetes-erecta/?lang=es>.

- Pupo, Y., Herrera, L., Vargas, B., Marrero, Y., Arévalo, R., & Jiménez, C. (2009). Efecto del extracto crudo de hojas de *Tagetes erecta* L. en el control de cuatro hongos patógenos de hortalizas en condiciones “in vitro”. *Centro Agrícola. Cuba*, 36(2), 77-81.
- P&CMaderas, (2013). Ficha técnica Eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*). Distribución y hábitat. Propiedades de la madera. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: [file:///C:/Users/comer/Desktop/TODO%20TESIS/ARTÍCULOS%20Y%20DOC UM%20RS/IMPRESAS/EucaliptoUrograndis\(EucalyptusUropyllaXEucaliptusG randis\).pdf](file:///C:/Users/comer/Desktop/TODO%20TESIS/ARTÍCULOS%20Y%20DOC%20UM%20RS/IMPRESAS/EucaliptoUrograndis(EucalyptusUropyllaXEucaliptusG%20randis).pdf)
- Remache, F. (2018). Evaluación del efecto de microorganismos antagonistas en el control de la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum* E. F. Smith), presente en plantaciones de eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*) en la hacienda Los Ángeles, cantón Buena Fe, provincia de Los Rios. (Tesis de grado. Ingeniero Forestal). Escuela Superior Politecnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.
- Ricardogs. (2005). *Tagetes erecta*. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: [https://es.wikipedia.org/wiki/Tagetes\\_erecta](https://es.wikipedia.org/wiki/Tagetes_erecta)
- Rivas, A. (2012). Principios del control de enfermedades vegetales. Universidad de El Salvador, San Salvador. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: [http://ugi.espe.edu.ec/ugi/wpcontent/uploads/2014/05/Control\\_biologico\\_de\\_enfermedad es\\_de\\_plantas\\_en\\_America\\_Latina\\_y\\_el\\_Caribe\\_2014.pdf](http://ugi.espe.edu.ec/ugi/wpcontent/uploads/2014/05/Control_biologico_de_enfermedad_es_de_plantas_en_America_Latina_y_el_Caribe_2014.pdf)
- Rivera, H. (2015). *Eucalyptus urograndis*. SEMIFOR E.I.R.L. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <http://hrbunas.blogspot.com/2015/01/eucalyptus-urograndis.html>
- Rosales, R. (2014). Alcoholaturas. Instituto Politécnico Nacional. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <https://es.scribd.com/document/268785469/alcoholatura1-docx>
- Rueda, E., Hernández, L., Holguín, R., Ruiz, F., López, J., Huez, A., & Ortega, J. (2014). *Ralstonia solanacearum*: Una enfermedad bacteriana de importancia cuarentenaria en el cultivo de *Solanum tuberosum* L. *Invurnus*, 9(1), 24–36.
- Servicio Nacional de Aprendizaje. SENA. (2006). Aceites esenciales extraídos de plantas medicinales y aromáticas. pp.1–33. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: [https://www.google.com/search?q=SENA.\(2006\).+Aceites+esenciales+extraidos+de+pl antas+medicinales+y+aromaticas.&oq=SENA.\(2006\).+Aceites+esenciales+extraidos+d e+plantas+medicinales+y+aromaticas.&aqs=chrome..69i57.784j0j4&sourceid=chrome&](https://www.google.com/search?q=SENA.(2006).+Aceites+esenciales+extraidos+de+plantas+medicinales+y+aromaticas.&oq=SENA.(2006).+Aceites+esenciales+extraidos+d e+plantas+medicinales+y+aromaticas.&aqs=chrome..69i57.784j0j4&sourceid=chrome&)

ie=UTF-8.

Shew, H. D., & Lucas, G. B. (1991). Compendium de las enfermedades del tabaco. EPS, St. Paul. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:HiMZPWWhp7EEJ:https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5074420.pdf+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=ec>.

Solórzano, K. (2014). Identificación y cuantificación de flavonoides en los extractos etanólicos de (*Tagetes* sp), (*Tagetes multiflora*) Y (*Tagetes zipaquirensis*) por métodos cromatográficos. (Tesis de grado. Ingeniera Bioquímica Farmacéutica). Escuela Superior Politecnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.

Soto, E., Rodríguez, Y., 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.

Tapia, A. (S.f.). Extracción: Alcohol. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/tecnofarma/wp-content/uploads/2013/02/Extracci%C3%B3n.pdf>

Toledo, A. (Gerente General). (2017). *Vademécum Agrícola XIV: Quick Agro Ecuador*. Edifarm. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: [www.edifarm.com.ec](http://www.edifarm.com.ec)

Thais, S., Grabowski, C., Rossato, M., Romeiro, R., & Mizubuti, E. (2015). Biological control of eucalyptus bacterial wilt with rhizobacteria. *Biological Control*, 80, 14–22. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.099>

Torres, C., Casas, M., & Díaz, J. E. (2014). Manejo de *Ralstonia Solanacearum* raza 2 a través de productos químicos y biológicos. *Iteckne*, 10(2), 217–223. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: <https://doi.org/10.15332/iteckne.v10i2.399>.

Universidad Nacional Autónoma de México. UMAM. (s.f.). La flor de muertos contra el micromundo. CENZONXOCHITLS. Recuperado el 3 de marzo del 2019, de: [https://www.feriadelasciencias.unam.mx/anteriores/feria24/feria034\\_01\\_la\\_flor\\_de\\_muertos\\_contra\\_el\\_micromundo.pdf](https://www.feriadelasciencias.unam.mx/anteriores/feria24/feria034_01_la_flor_de_muertos_contra_el_micromundo.pdf).

Vargas, G. (1982). Estudio sobre el enraizamiento de *Eucalyptus deglupta* Blumes. Tesis posgrado. Universidad de Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales. Turrialba, Costa Rica. p. 60.

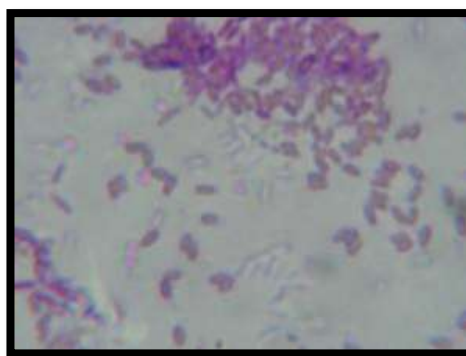
- Vivas, Y., Urdaneta, I., Rangel, S., & Hernández, J. (2009). Caracterización e incidencia de *Ralstonia solanacearum* Smith en plantas de Musa AAB en el sector “El Roble”, Sur del Lago de Maracaibo, Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola*, 9(2), 383–392.
- Watanebe, J. 2006. Informe final de apoyo al laboratorio de biotecnología de la FAUSAC. Guatemala, Facultad de Agronomía. p. 50.

## XI. ANEXOS



**Anexo N° 1:** Muestras de la colonia de *Ralstonia solanacearum* coloreadas con tinción de Gram.

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



**Anexo N° 2:** Muestras de la colonia de *Ralstonia solanacearum* coloreadas con tinción de Gram.

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



**Anexo N° 3:** Extractos alcohólicos de *Tagetes erecta*.

**Fotografía:** (Reyes, 2009).



**Anexo N° 4:** Extractos oleosos de *Tagetes erecta*.

**Fotografía:** (Reyes, 2009).



**Anexo N° 5:** Ubicación del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos



**Anexo N° 6:** Ubicación del Laboratorio de Ecología Natural y Aplicada de la Facultad

Naturales.

**Fuente:** (Google Maps, 2019).



**Anexo N° 7:** Ubicación de los Laboratorios de Productos Naturales, de Tecnología Farmacéutica y de Análisis Bioquímico y Bacteriológico de la Facultad de Ciencias.

**Fuente:** (Google Maps, 2019).



**Anexo N° 9:** Árbol infectado con *R solanacearum*.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).

de Ciencias.

**Fuente:** (Google Maps, 2019).



**Anexo N° 8:** Muestra herborizada.

**Fotografía:** (Reyes, 2019).

**Anexo N° 10:** Certificado de identificación de *Tagetes erecta*.

**HERBARIO POLITECNICA CHIMBORAZO (CHEP)**  
ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL CHIMBORAZO  
Panamericana sur Km 1, Bsm: (03) 2 998-209 ext. 700123, jgaranqui@yahoo.com  
Riobamba Ecuador

**CERTIFICADO**

8 de mayo del 2019

A quien interese:

Certifico que la señorita Reyes Robalino Ana Alexandra con CI: 060367410-2, Tesista de la carrera de Ingeniería Forestal de la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, entregó e identificó 1 muestra de *Tagetes erecta* L.. La especie es de origen introducido y cultivada.

Es todo cuanto puedo decir en honor a la verdad y la interesada puedo usar el presente certificado como crea conveniente

Atte.



Ing. Jorge Garanqui Msc.  
BOTANICO

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL CHIMBORAZO  
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES



**Anexo N° 11:** Tabla del porcentaje de inhibición a las 24 horas (Ensayo 1. Momento 1).

<b>Concentraciones</b> <b>/ Repeticiones</b>	Etanol	Metanol	T. Etanol	T. Metanol	T. Hidróxido de Cobre	T. Agua	T. Medio
R1 - 25%	100	100					
R2 - 25%	100	100					
R3 - 25%	100	100					
R4 - 25%	100	100					
R5 - 25%	100	100					
R1 - 50%	100	100					
R2 - 50%	100	100					
R3 - 50%	100	100					
R4 - 50%	100	100					
R5 - 50%	100	100					
R1 - 100%	100	100	100	100	100	0	0
R2 - 100%	100	100	100	100	100	0	0
R3 - 100%	100	100	100	100	100	0	0
R4 - 100%	100	100	100	100	100	0	0
R5 - 100%	100	100	100	100	100	0	0

**Anexo N° 12:** Tabla del porcentaje de inhibición a las 48 horas (Ensayo 1. Momento 1).

<b>Concentraciones</b> <b>/ Repeticiones</b>	Etanol	Metanol	T. Etanol	T. Metanol	T. Hidróxido de Cobre	T. Agua	T. Medio
R1 - 25%	100	100					
R2 - 25%	100	100					
R3 - 25%	100	100					
R4 - 25%	100	100					
R5 - 25%	100	100					
R1 - 50%	100	100					
R2 - 50%	100	100					
R3 - 50%	100	100					



**Anexo N° 14:** Tabla del porcentaje de inhibición a las 96 horas (Ensayo 1. Momento 1).

<b>Concentraciones</b> <b>/ Repeticiones</b>	Etanol	Metanol	T. Etanol	T. Metanol	T. Hidróxido de Cobre	T. Agua	T. Medio
R1 - 25%	100	92					
R2 - 25%	95	100					
R3 - 25%	100	95					
R4 - 25%	90	100					
R5 - 25%	94	98					
R1 - 50%	100	100					
R2 - 50%	100	100					
R3 - 50%	100	100					
R4 - 50%	100	100					
R5 - 50%	100	100					
R1 - 100%	100	100	100	100	100	0	0
R2 - 100%	100	100	100	100	100	0	0
R3 - 100%	100	100	100	100	100	0	0
R4 - 100%	100	100	100	100	100	0	0
R5 - 100%	100	100	100	100	100	0	0

**Anexo N° 15:** Tabla del porcentaje de inhibición a las 120 horas (Ensayo 1. Momento 1).

<b>Concentraciones</b> <b>/ Repeticiones</b>	Etanol	Metanol	T. Etanol	T. Metanol	T. Hidróxido de Cobre	T. Agua	T. Medio
R1 - 25%	100	89					
R2 - 25%	92	100					
R3 - 25%	100	90					
R4 - 25%	88	100					
R5 - 25%	89	94					
R1 - 50%	100	100					
R2 - 50%	100	100					
R3 - 50%	100	100					

R4 - 50%	100	100					
R5 - 50%	100	100					
R1 - 100%	100	100	100	100	100	0	0
R2 - 100%	100	100	100	100	100	0	0
R3 - 100%	100	100	100	100	100	0	0
R4 - 100%	100	100	100	100	100	0	0
R5 - 100%	100	100	100	100	100	0	0

**Anexo N° 16:** Tabla de milímetros de inhibición a las 24 horas (Ensayo 2. Momento 2: Primera Parte).

<b>Concentración / Repetición</b>	<b>E. Etanol</b>	<b>E. Metanol</b>	<b>E. Aceite de Oliva</b>	<b>T. Etanol</b>	<b>T. Metanol</b>	<b>T. Aceite de Oliva</b>
R1 - 10%	0	0	0	0	0	8
R2 - 10%	0	8	7	0	0	0
R3 - 10%	0	7	0	0	0	0
R4 - 10%	0	9	0	0	0	0
R5 - 10%	7	8	7	0	0	7
R1 - 20%	8	0	8	0	0	9
R2 - 20%	6	9	7	0	0	9
R3 - 20%	0	8	8	0	0	9
R4 - 20%	0	9	8	0	0	9
R5 - 20%	8	8	8	8	0	8
R1 - 30%	7	0	9	8	0	10
R2 - 30%	7	8	9	8	0	7
R3 - 30%	8	9	10	7	0	7
R4 - 30%	7	10	7	7	0	7
R5 - 30%	9	10	10	7	0	7
	<b>Agua</b>		<b>Hidróxido de Cobre</b>		<b>Carbendazim</b>	
	R1	0	R1	0	R1	0
	R2	0	R2	0	R2	0
	R3	0	R3	0	R3	0

R4	0	R4	0	R4	0
R5	0	R5	0	R5	0

**Anexo N° 17:** Tabla de milímetros de inhibición a las 24 horas (Ensayo 2. Momento 2: Segunda Parte).

<b>Concentración / Repetición</b>	<b>T. Aceite de Oliva</b>	<b>T. Aceite Vegetal</b>	<b>T. Aceite de Oliva + Polyether</b>	<b>T. Aceite Vegetal + Polyether</b>
R1 - 5%	0	0	12	9
R2 - 5%	8	0	14	8
R3 - 5%	0	9	0	8
R4 - 5%	0	0	0	0
R5 - 5%	11	9	8	0
R1 - 10%	9	9	0	0
R2 - 10%	9	9	0	0
R3 - 10%	10	8	0	0
R4 - 10%	0	10	0	0
R5 - 10%	8	8	0	0
R1 - 15%	11	0	0	0
R2 - 15%	8	0	0	0
R3 - 15%	9	10	0	0
R4 - 15%	0	0	0	0
R5 - 15%	11	0	0	0
R1 - 20%	9	8	0	0
R2 - 20%	0	0	0	0
R3 - 20%	10	9	0	0
R4 - 20%	11	0	0	0
R5 - 20%	11	9	0	0
R1 - 30%	8	10	0	0
R2 - 30%	0	0	0	0
R3 - 30%	9	8	0	0
R4 - 30%	0	0	0	0
R5 - 30%	0	9	0	0

**Sulfato de Cobre Pentahidratado**

R1	18
R2	23
R3	21
R4	20
R5	22

**Sulfato de Estreptomicina**

R1	30
R2	29
R3	30
R4	27
R5	28

---