

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



Universidad de El Salvador

Hacia la libertad por la cultura

EVALUACION DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS DE *Azadirachta indica* (NIM)
PARA CONTROL DE *Meloidogyne sp* (NEMATODOS PARASITOS) DE
Coffea arabica (CAFE)

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR
WILLIAN ERNESTO GALAN CORTEZ
JOSE BORIS RAMIREZ MELENDEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

MARZO, 2011

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SANCHEZ

SECRETARIO GENERAL

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHAVEZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC.SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIA

MSc. MORENA LIZETTE MARTINEZ DE DIAZ

COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA DE ANALISIS DE ALIMENTOS: FISICOQUIMICO

Ing. Rina Lavinia Hidalgo de Medrano

ASESORA DE AREA DE GESTION AMBIENTAL: TOXICOLOGIA Y QUIMICA LEGAL

Licda. María Luisa Ortiz de López

DOCENTES DIRECTORES

MSc. María Elisa Vivar de Figueroa

Dr. Adán Hernández

AGRADECIMIENTOS

A nuestros docentes directores, MSc. María Elisa Vivar de Figueroa y Doc. Adán Hernández por la valiosa colaboración y tiempo brindado para la realización de nuestro trabajo de graduación.

A la coordinadora general de trabajos de graduación Licda. Odette Rauda Acevedo, a nuestros docentes de área Ing. Rina Lavinia Hidalgo de Medrano y Licda. María Luisa Ortiz de López por toda la ayuda, interés y consejos que nos brindaron para enriquecer nuestro trabajo de graduación.

A la gerente general del Área de Fisicoquímico de Alimentos Licda. Ana María Villalta de la Fundación Salvadoreña para el Desarrollo Económico y Social de El Salvador (FUSADES), al jefe de la Unidad de Química Agrícola Licda. Adayanira de Linares de la Facultad de Ciencias Agronómicas Universidad de El Salvador y Licda. Mirian Álvarez de Amaya coordinadora del Área de Química Agrícola del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) por brindarnos el uso de sus instalaciones, equipos y materiales.

Al Lic. Mario Acosta Oertel presidente de la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFE) por habernos permitido realizar nuestro trabajo de graduación en colaboración con dicha institución y proporcionarnos materiales, equipos e instalaciones.

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso por todas bendiciones que me ha dado en esta vida, por haber dado las fuerzas suficientes para concluir los estudios de mi carrera, por guiarme, por ayudarme a seguir adelante ante cualquier adversidad y por mostrarme siempre el mejor camino, ya que sin su soporte nada sería posible en esta vida.

A mis padres (Jorge y Mirian) por su amor y ayuda incondicional, por guiarme y comprenderme, por su cariño y paciencia a lo largo de toda mi carrera que sin su ayuda no hubiera sido posible este triunfo.

A mis hermanos (Jorge y Jeannie) por su cariño y apoyo

A mi familia a mis tíos, tías, primos y abuelos por su paciencia y apoyo en todo momento, muchas gracias.

A mi amigo y compañero de tesis (Boris Ramírez) por todo el apoyo, interés, dedicación y esfuerzo para la realización de nuestro trabajo de graduación.

A mis amigos tanto de la universidad, como de mi colonia y amistades lejanas que se involucraron de una u otra forma y pusieron su granito de arena, muchas gracias.

A mis docentes directores MSc. María Elisa Vivar de Figueroa y Dr. Adán Hernández por su gran apoyo y consejos para hacer un buen trabajo.

A todos y cada uno de las personas que de una u otra manera se involucraron para que mi sueño se pudiera hacer realidad. MUCHAS GRACIAS A TODOS.

Willian Ernesto Galán Cortez

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso por brindarme cada segundo de vida, por haberme permitido realizar mis estudios y guiarme siempre por el camino del bien ya que sin el esto no sería posible.

A mis padres (Lorenzo y Crucita) por su amor, cariño, comprensión, por su apoyo incondicional en los momentos más difíciles de mi carrera que con su ejemplo me enseñaron a levantarme y seguir siempre hacia adelante. Los amo.

A mi hermano (Roger) por su apoyo y comprensión.

A mi familia a mis tíos, tías en general, en especial a (Gladis y Ruth), por abrirme las puertas de su casa y acogerme como un hijo mas, a mis primos y abuelos por su apoyo en todo momento, muchas gracias.

A mis amigos en general que de una u otra forma pusieron su granito de arena, a (Willian Galán) por todo el apoyo, interés y esfuerzo para realizar nuestro trabajo de graduación ya que es un importante logro en nuestras vidas.

A mi novia (Nancy) por darme siempre la fuerza necesaria para seguir adelante, a su familia por todo el cariño y apoyo que me han brindado.

A mis docentes directores MSc. María Elisa Vivar de Figueroa y Dr. Adán Hernández por su apoyo y consejos para realizar un buen trabajo de graduación.

A todas las personas que de una u otra manera se involucraron para que mi sueño se pudiera hacer realidad. MUCHAS GRACIAS.

José Boris Ramírez Meléndez

INDICE

INDICE GENERAL

Sección	Pág.
Resumen	
Capitulo I	
1.0 Introducción	xx
Capitulo II	
2.0 Objetivos	
2.1 Objetivo General	
2.2 Objetivos Específicos	
Capitulo III	
3.0 Marco Teórico	25
3.1 Nematodos Fitoparásitos del café	25
3.2 Géneros de Nematodos Fitoparásitos del café	27
3.2.1 <i>Meloidogyne sp</i>	27
3.2.2. <i>Helicotylenchus sp</i>	28
3.2.3. <i>Pratylenchus sp</i>	29
3.3 Clasificación Taxonómica de las especies de <i>Meloidogyne</i>	29
3.4 Nematodos del género <i>Meloidogyne</i> como parásitos del café	30

3.4.1. Distribución Mundial	30
3.4.2. Sintomatología de plantas afectadas	30
3.4.3. Métodos de Combate	31
3.4.4. Ciclo Biológico	32
3.4.5. Factores que influyen en el desarrollo del Meloidogyne	33
3.5 Especies de Meloidogyne asociados al cultivo del café	34
3.6 Árbol de Nim	36
3.6.1. Taxonomía del Árbol de Nim	37
3.6.2. Descripción Botánica	37
3.6.3. Hábitat y Distribución	38
3.6.4. Partes utilizadas	38
3.6.5. Composición Química del Árbol de Nim	39
3.6.5.1. Terpenoides con poder Biocidas presentes en el Árbol	39
3.6.6. Mecanismo de acción	43
3.6.7. Insectos Afectados	45
3.7 Impatiens wallerana Hook.f. (China)	46
3.8 Pesticidas botánicos	47
3.8.1. Ventajas del uso de pesticidas botánicos	48
3.8.2. Desventajas del uso de pesticidas botánicos	48

Capitulo IV	
4.0 DISEÑO METODOLOGICO	50
4.1 Tipo de Estudio	50
4.2 Investigación Bibliográfica	50
4.3 Investigación de Campo	51
4.3.1. Diseño Estadístico	51
4.3.2. Tratamientos evaluados	51
4.3.3. Parámetro evaluado	52
4.3.4. Identificación de las Especies Vegetales	52
4.4 Parte Experimental	52
4.4.1. Selección de la muestra	52
4.4.1.1. Universo	52
4.4.1.2. Muestra	52
4.4.1.3. Recolección de muestra	53
4.4.1.4. Secado	53
4.4.1.5. Fraccionado	53
4.4.1.6. Molienda	54
4.4.2 Instalación de crías de Nematodos parásitos	54
4.4.3 Obtención del Extracto	54

4.4.4 Preparación de la Solución Madre	56
4.4.5 Preparación de las Soluciones a las Concentración Elegidas	57
4.4.5.1. Extractos Acuoso	58
4.4.5.2. Extractos Hidroalcohólicos	59
4.4.6 Métodos de extracción de Nematodos	61
4.4.6.1. Bandeja de extracción (Embudo de Baermann)	62
4.4.6.2. Maceración de Raíces	65
4.4.7 Instalación de experimento con Soluciones Acuoso	70
4.4.8 Instalación de experimento con Soluciones Hidroalcohólicas	71
Capítulo V	
5.0 Resultados y Discusión	74
5.1 Recolección, secado, fraccionamiento y molienda de las hojas	74
5.2 Instalación de crías de <i>Meloidogyne sp</i> (Nematodos parásitos)	74
5.3 Extracción del Principio activo de las hojas por Método Soxhlet	75
5.4 Evaluación de las soluciones Acuoso e Hidroalcohólicas	76
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	88
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	91

Bibliografía

Anexos

INDICE ANEXOS

ANEXO N°

1. Anatomía de Nematodos fitoparásitos (hembra y macho)
2. Ciclo Biológico de *Meloidogyne sp*
3. *Impatiens wallerana* Hook. f. (China)
4. Cartas de identificación de las especies botánicas en estudio
5. Materiales, equipos y solventes utilizados
6. Instalación de crías del género *Meloidogyne sp*
7. Equipo de extracción Soxhlet
8. Nematodos del género *Meloidogyne sp* en estado de larva y adulto

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	N° Pág.
1. Distribución geográfica del género <i>Meloidogyne sp</i>	35
2. Métodos de extracción de nematodos	63
3. Número de <i>Meloidogyne sp</i> expuestos a Soluciones Acuosas	79
4. Promedios de <i>Meloidogyne sp</i> expuestos a Soluciones Acuosas	80
5. Número de <i>Meloidogyne sp</i> expuestos a Soluciones Hidroalcohólicas	84
6. Promedios de <i>Meloidogyne sp</i> expuestos a Soluciones Hidroalcohólicas	85

INDICE DE FIGURAS

N° DE FIGURA

1. Árbol de ***Azadirachta indica*** (Nim)
2. Fórmula molecular del principio activo “Azadiractina”
3. Fórmula molecular del principio activo “Meliantriol”
4. Fórmulas moleculares de “Nimbina y Nimbidina”
5. Selección, lavado y fraccionado de raíces infectadas por ***Meloidogyne sp*** (Nematodos Parásitos) en ***Impatiens wallerana* Hook. f.** (China).
6. Instalación del sistema para extracción de ***Meloidogyne sp*** (Nematodos Parásitos)
7. Suspensión de nematodos adaptada a una fuente de oxígeno
8. Toma de alícuota y placa cuenta nematodos
9. Lavado, fraccionado y licuado de raíces infectadas por ***Meloidogyne sp*** (Nematodos Parásitos) en ***Impatiens wallerana* Hook. f.** (China).
10. Vertido de la suspensión de raíces sobre papel absorbente y adición de agua desmineralizada.
11. Sistema de oxigenación, transferencia y suspensión de nematodos.
12. Conteo de nematodos y foto real de ***Meloidogyne sp*** (Nematodos parásitos) vista a 4X.
13. Muestra de hojas de ***Azadirachta indica*** (Nim) después de la molienda
14. ***Impatiens wallerana* Hook.f.** (China) y raíces infectadas.
15. Purificación de extracto con Acetato de Etilo
16. Comparación de nematodos vivos expuestos a soluciones Acuosas de 0, 50, 150, y 300 ppm.

17. Comparación de nematodos muertos expuestos a soluciones Acuosas de 0, 50, 150, y 300 ppm.
18. Comparación de nematodos vivos expuestos a soluciones hidroalcohólicas de 0, 50, 150, y 300 ppm.
19. Comparación de nematodos muertos expuestos a soluciones hidroalcohólicas de 0, 50, 150, y 300 ppm.
20. Anatomía de Nematodos fitoparásitos (hembra y macho)
21. Ciclo biológico de ***Meloidogyne sp***
22. Planta de ***Impatiens wallerana* Hook. f.** (China) con flores
23. Cartas de identificación de especies botánicas: ***Azadirachta indica*** (Nim) e ***Impatiens wallerana* Hook.f.** (China)
24. Instalación de crías de nematodos en plantas de ***Impatiens wallerana* Hook.f.** (China)
25. Aparato de Extracción Soxhlet.
26. Fotografía real de larva y adulto de ***Meloidogyne sp***

ABREVIATURAS

- V = Vivos
- M = Muertos
- X = Media
- T = Tratamientos
- T1 = Soluciones de 0 ppm (Testigo o Blanco)
- T2 = Soluciones de 50 ppm
- T3 = Soluciones de 150 ppm
- T4 = Soluciones de 300 ppm
- %V = Porcentaje de Vivos
- %M = Porcentaje de Muertos
- R = Repeticiones

RESUMEN

Actualmente una de las plagas que causan mayores daños y bajos rendimientos de producción en el cultivo del café es ***Meloidogyne sp*** (Nematodos parásitos). Debido a esto se ha desarrollado un método natural para minimizar esta plaga, siendo menos tóxica para el medio ambiente y para las personas que lo manipulan.

Este estudio se llevó a cabo en la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFE), Fundación Salvadoreña para el Desarrollo Económico y Social de El Salvador (FUSADES) y la Unidad de Química de la Facultad de ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador. Las labores se realizaron en cuatro fases: a) recolección, secado, fraccionamiento y molienda de muestras de hojas, en esta etapa la recolección se realizó en horas frescas de la mañana, para secarlas al aire libre e introducir las en una estufa de ventilación forzada para eliminar la humedad residual, se fraccionaron utilizando una tijera y posteriormente se utilizó un molino foliar. b) Instalación de crías de ***Meloidogyne sp*** (Nematodos parásitos) en plantas de ***Impatiens wallerana*** Hook.f. (China). c) Extracción de principio activo de las hojas utilizando Etanol 90° y el método Soxhlet. d) Estudio del efecto de las diluciones acuosas e hidroalcohólicas sobre larvas de ***Meloidogyne sp*** implementado y analizado por medio de tablas y graficas.

Los resultados obtenidos demostraron que: las crías de ***Meloidogyne sp*** se desarrollaron perfectamente en la planta de China con una buena reproducción de larvas en un período de 30 días, que se observó por la formación de agallas en las raíces. El método de extracción utilizado permitió extraer la Azadiractina (principio activo) de las hojas de ***Azadirachta indica*** (Nim), en forma de resina concentrada y purificada. De 150 g de hojas molidas que se colocaron en el aparato de extracción, se obtuvo un rendimiento de 25.54 g de resina. En cuanto al efecto de las soluciones acuosas e hidroalcohólicas sobre

larvas de **Meloidogyne sp** (Nematodos parásitos) se obtuvo lo siguiente: Las soluciones acuosas que presentaron acción nematocida fueron T3 (150 ppm) y T4 (300 ppm) a partir de la primera hora de exposición, debido a que contenían una mayor concentración de extracto, la cual fue la suficiente para causar la muerte de los nematodos.

La solución acuosa T2 (50 ppm) mostró acción nematostática durante el desarrollo del experimento, ya que a las 6 horas de exposición se observó inmovilidad de los nematodos, los cuales transcurridas 24 horas de exposición habían recuperado nuevamente su movilidad. Esta acción se debió a la poca concentración de extracto presente en la solución, la cual no fue capaz de causar la muerte de los nematodos.

La acción nematocida en las soluciones hidroalcohólicas se vio influenciada por la mínima cantidad de alcohol que contenían, el cual dañó la cutícula de los nematodos evitando así la respiración, generando un fallecimiento mucho más rápido en menos tiempo de exposición. Por lo que se recomienda preparar soluciones acuosas de **Azadirachta indica** (Nim) a mayor concentración para obtener un rápido efecto nematocida, y así disminuir el uso de soluciones hidroalcohólicas evitando obtener resultados falsos positivos.

CAPITULO I

1.0 INTRODUCCION

El café es uno de los cultivos de exportación más importantes para la economía de El Salvador y diferentes países del mundo.

Los rendimientos anuales se ven reducidos por diferentes causas, siendo una de ellas el ataque de plagas: los nematodos fitoparásitos; estos pequeños organismos habitan en el suelo y muchas veces el agricultor no se da cuenta de su presencia y esto le causa pérdidas económicas significativas.

En la región centroamericana uno de los géneros más importantes es el *Meloidogyne sp.* el cual causa pérdidas económicas al disminuir los rendimientos de producción. Antes de iniciar las actividades de producción se debe de realizar un estudio de suelos para determinar la riqueza de nutrientes y detectar la presencia de plagas que puedan afectar el cultivo en el futuro.

Para reducir el daño de los nematodos o evitar su presencia se debe realizar un control permanente. En el campo los nematodos fitoparásitos son difíciles de erradicar, tanto por su diseminación como por su alto costo de control.

Desde hace muchos años el combate de nematodos fitoparásitos se ha basado únicamente en el control químico, sin importar el daño que estos productos causan al medio ambiente y sin tomar en cuenta otras alternativas de manejo que sean menos contaminantes.

En la naturaleza existen muchas plantas que contienen compuestos tóxicos para las plagas fitopatógenas, pero existe poco conocimiento acerca de su efectividad y factibilidad económica para utilizarlas como plaguicidas.

El control de nematodos a base de productos botánicos puede resultar una alternativa que nos brinde mejores beneficios a un menor costo económico que el nematicida comercial (Vidate L) y que sea menos contaminante al medio ambiente. En la presente investigación se evaluaron los extractos de hojas de ***Azadirachta indica*** (Nim) que se prepararon a concentraciones de: 0, 50, 150 y 300 ppm tanto en soluciones acuosas como hidroalcohólicas para verificar su propiedad nematicida y/o nematostática en el control de nematodos del género ***Meloidogyne sp.*** Posteriormente se evaluaron y determinaron las concentraciones más efectivas de las soluciones acuosas e hidroalcohólicas sobre larvas de nematodos, que se obtuvieron en un período de 30 días por medio de la inoculación de raíces de café que presentaban síntomas de agallamiento sobre plantas de ***Impatiens wallerana Hook. f.*** (China).

El ensayo se realizó completamente al azar con 7 repeticiones para cada concentración de las soluciones, este consistió en colocar dentro de tubos de ensayo 3 mL de la solución y posteriormente adicionar 1.0 mL de suspensión de nematodos, en donde se observó el número de nematodos vivos y muertos a 1, 6 y 24 horas de exposición utilizando un estereoscopio.

Los extractos fueron obtenidos por el método de extracción por solvente (Soxhlet) utilizando alcohol etílico 90°. Los análisis se llevaron a cabo en los Laboratorios de la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del café (PROCAFE), Fundación Salvadoreña para el Desarrollo Económico y Social de El Salvador (FUSADES), Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) y la Unidad de Química de la Facultad de ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador.

CAPITULO II

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

2.1.1 Evaluar los extractos de hojas de ***Azadirachta indica*** (Nim) para control de ***Meloidogyne sp*** (Nematodos parásitos) de ***Coffea arabica*** (Café).

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1 Identificar las especies vegetales en estudio.

2.2.2 Preparar extractos acuosos e hidroalcohólicos a partir de hojas de ***Azadirachta indica*** (Nim).

2.2.3 Estudiar la efectividad nematicida y/o nematostática de extractos de la especie ***Azadirachta indica*** (Nim) en nematodos del género ***Meloidogyne sp.***

2.2.4 Determinar la concentración en la cual los extractos tienen la mayor acción nematicida y/o nematostática comparadas con un control.

CAPITULO III

3.0 MARCO TEORICO

3.1. Nematodos fitoparásitos del café. ⁽¹⁴⁾

Los nematodos fitoparásitos son gusanos cilíndricos con simetría bilateral, de tamaño microscópico, poseen la mayoría de los sistemas fisiológicos principales de los animales superiores, excepto el circulatorio y respiratorio.

La pared del cuerpo de los nematodos esta formada por tres capas: cutícula, hipodermis, musculatura somática. Externamente están protegidos por la cutícula, la función principal de la cual es facilitar intercambio de gases con el exterior y proveer protección del medioambiente. La cutícula es una secreción de la hipodermis o capa celular que se encuentra inmediatamente debajo. La musculatura somática es la capa que rodea la cavidad interna del nematodo.

Las especies parásitas de plantas varían de 0.5 a 3 mm de longitud y su anchura de 0.01 a 0.5 mm, (Ver Anexo N° 1). Casi todos son cilíndricos y delgados, adelgazándose hacia la cabeza y la cola, aunque las hembras son mas grandes que los machos; algunas especies tienen formas variadas, como de pera, limón o de riñón. En general los nematodos que viven en el suelo son traslúcidos.

Generalmente los nematodos fitoparásitos se clasifican en dos grandes grupos, de acuerdo al tipo de relación parasítica que exista con la planta. Los nematodos que atacan la superficie o parte exterior de los tejidos de las plantas se denominan como ectoparásitos y los que atacan los tejidos internos se conocen como endoparásitos; a veces se incluyen otras categorías adicionales de manera que si el nematodo deja parte de su cuerpo fuera se le denomina semi-endoparásito, si ataca un solo lugar se le conoce como sésil y si migra de un lugar a otro se le llama migratorio. ⁽¹⁶⁾

Los nematodos obtienen sustancias que necesitan para su desarrollo de las células radicales mediante un estilete, estructura que funciona como una aguja hipodérmica.

Se les responsabiliza de pérdidas considerables en los rendimientos, además de las pérdidas indirectas que ocasionan, pues no permiten que el café se desarrolle normalmente y exprese plenamente su potencial productivo, ya que obstruyen el pase de nutrientes disponibles en el suelo lo que influye directamente en la producción. (17)

Los nematodos Ectoparásitos se encuentran en el suelo fuera de las raíces, a las que pican eventualmente con su largo estilete. Los géneros de mayor importancia son los ***Crimonemoide sp, Helicolytenchus sp y Xiphinema sp.***

Los nematodos Endoparásitos se fijan a las raicillas o raíces, se alimentan de ella, pero su ovoposición la pueden efectuar ya sea al interior o exterior de las raíces. Los géneros más importantes en El Salvador son: ***Pratylenchus sp y Meloidogyne sp.***

Los nematodos se reproducen mayormente durante el periodo lluvioso pero sus daños en la planta se acrecientan durante el período seco cuando los cafetales tienen la falta de agua y algunas plantas mueren a través del tiempo en esas condiciones. (8)

El daño directo que causan los nematodos durante su alimentación sobre las plantas es muy leve. El mayor daño es provocado por secreciones salivares inyectados dentro de los tejidos de las plantas durante el proceso de alimentación. (1)

No existe una sintomatología típica del parasitismo causado por los nematodos, salvo excepciones, como el engrosamiento radical en plantas producidas por el nematodo del género ***Meloidogyne sp.***; por lo general, un ataque de nematodos produce debilitamiento de la planta, que se manifiesta por un menor desarrollo, carencia de minerales, retrasos en las brotaciones, tamaño reducido de hojas y frutos, es decir, menor productividad. Este tipo de síntomas también puede obedecer a diferentes causas relacionadas con un inadecuado régimen de cultivo, condiciones ecológicas desfavorable o debilitamiento por plagas y enfermedades, lo que en un momento dado puede confundir y es por eso la importancia del diagnóstico previo. (7)

3.2. Géneros de nematodos fitoparásitos del café

3.2.1. *Meloidogyne sp.* (16)

Las especies de ***Meloidogyne*** son parásitos de las plantas. El síntoma principal que causan es el desarrollo de agallas, las cuales muy frecuentemente están en los ápices de las raíces, este no forma tumefacciones en todos los casos.

Cuando no se forman hernias, el desarrollo de las hembras rompe la corteza de la raíz y pueden notarse cuerpos esféricos blancos en las grietas radicales. Se cree que esta condición es muy dañina y peligrosa porque las grietas y hendiduras causadas por las hembras sirven como portal para la invasión de otros organismos.

Meloidogyne sp posee un elevado número de hospederos, una amplia distribución geográfica, y su variabilidad patogénica limita, la disponibilidad de cultivares resistentes, y a la vez que produce interacciones sinérgicas con otros patógenos del suelo. (5)

Actualmente se han reportado diferentes especies de nematodos que atacan al café en el mundo. Estudios realizados en El Salvador por Pinochet & Guzmán, (1986), encontraron que los géneros de mayor importancia económica fueron ***Meloidogyne sp*** y ***Pratylenchus sp***; igual situación se presentó en Costa Rica donde encontraron que ***Meloidogyne sp*** estaba atacando alrededor de 24 hospederos diferentes y en poblaciones altas. ⁽¹¹⁾

3.2.2. *Helicotylenchus sp* ⁽¹⁶⁾

Los nematodos de este género son cosmopolitas. Estos se alimentan extremadamente sobre un amplio grupo de plantas, usualmente como ectoparásitos de los tejidos fuera de la raíz. Pero ocasionalmente ***Helicotylenchus sp*** entra y corta completamente los tejidos. Los nematodos del género ***Helicotylenchus*** son una plaga importante de bananos en muchas regiones tropicales y de climas templados. Las lesiones pequeñas se forman alrededor de cada nematodo y los huevos son depositados en los tejidos. Las altas poblaciones ocurren en raíces y suelos que causan daños a las raíces debilitando a las plantas hospederas.

El efecto del nematodo es generalmente un retardamiento del crecimiento aéreo y subterráneo, las raíces infectadas por el nematodo espiral demuestran desorganización y desintegración de los tejidos corticales. Estos efectos se producen porque el nematodo forma galerías a medida que penetra la raíz y las células atacadas se tornan necróticas y se rompen.

Sin embargo existe poca información sobre la patogenicidad, pérdidas en los rendimientos y posibles medidas de control de ***Helicotylenchus sp***. ⁽¹³⁾

3.2.3. *Pratylenchus sp.* ⁽²⁴⁾

Los nematodos del género ***Pratylenchus*** se conocen con el nombre de nematodos de las lesiones radicales, de las praderas o de las necrosis radicales.

Este prefiere penetrar por detrás de la zona de elongación en las raíces. Son un género que son muy polípagos, lo que hace que la rotación sea una medida de difícil control.

Este género se caracteriza por tener una armadura cefálica muy fuerte que le permite desplazarse en los tejidos vegetales por lo que se les conoce como endoparásitos migratorios (móviles). Estos nematodos al desplazarse por el interior de las raíces, se van alimentando y desdoblan sustancias vegetales como fenoles y este es el caso de la amigdalina que la transforma en ácido cianhídrico (HCN). El HCN actúa en la cadena transportadora de electrones, provocando un bloqueo de la misma e impidiendo la respiración de las células y provocando su muerte por oxidación, finalmente provocando necrosis del tejido afectado.

3.3. Clasificación taxonómica de las especies de *Meloidogyne*. ⁽²²⁾

La taxonómica de las especies del género ***Meloidogyne*** es la siguiente:

PHYLUM	: Nemata o nematodo
CLASE	: Secernentea
ORDEN	: Tylenchida
SUPERFAMILIA	: Tylenchoidea
FAMILIA	: Meloidogynidae
GENERO	: <i>Meloidogyne</i>

3.4. Nematodos del género *Meloidogyne* como parásito del café. ⁽²²⁾

3.4.1. Distribución Mundial

No se conocen hábitats originales de las especies de *Meloidogyne*. La amplia distribución del material vegetal infectado por este nematodo dificulta distinguir entre las especies nativas de una región y de las ya adaptadas.

Estos nematodos se encuentran diseminados en todas las zonas productoras de café en el mundo. La distribución de las especies de *Meloidogyne* se explica por la variedad de huéspedes y por las condiciones climáticas tales como la temperatura, pluviosidad y textura del suelo de una determinada región.

3.4.2. Sintomatología de plantas afectadas ⁽¹⁰⁾

La sintomatología de la parte aérea de las plantas infestadas con nematodos generadores de agallas, es similar a aquellos causados por otros patógenos de la raíz y/o por condiciones ambientales que restringen el flujo de agua o de nutrientes.

La mayoría de especies de *Meloidogyne* inducen a la raíz infectada a engrosarse alrededor del punto donde el nematodo se esta alimentando, formándose así una agalla radicular que puede presentarse simple o formando un conjunto masivo de agallas, de tamaño y forma variable sobre las raíces de las plantas que parasitan.

Los síntomas se pueden dividir en dos tipos: aéreos (generales) y subterráneos (específicos).

Síntomas aéreos:

- a) Reducción de la germinación
- b) Bajo en rendimiento
- c) Manchas foliares
- d) Marchitez y clorosis
- e) Enanismo
- f) Deformación y hojas y tallos
- g) Necrosis interna del tallo
- h) Defoliación
- i) Falta de Vigor

Síntomas Específicos:

- a) Raíces con agallas
- b) Desprendimiento y necrosis de la corteza de raíces y tubérculos
- c) Baja en producción de semilla, yemas y brotes.
- d) Deformación y necrosis de raíces, bulbos y tubérculos.
- e) Proliferación excesiva de raíces (escoba de bruja)
- f) Atrofia de ápices radicales (formación de muñón)
- g) Sistema radical pobremente desarrollado

3.4.3. Métodos de combate. ⁽²³⁾

Los caficultores combaten estos nematodos de la raíz con diferentes métodos:

a) Control químico

Este método consiste en la utilización de Nematicidas (organofosforados, carbonatos y fumigantes) para reducir poblaciones de nematodos en el campo y en el suelo para viveros.

b) Control genético.

Este método consiste en utilizar planta resistentes para combatir nematodos, sin embargo, en lo que se refiere al *Coffea arabica*, no existe por el momento, una variedad comercial resistente a las diversas especies de nematodos.

c) Control cultural.

Este método consiste en implementar medidas de evitación o exclusión. Las prácticas consisten, en evitar el transporte de plantas y de suelo infestados con nematodos, a sitios que se encuentran libres de esta plaga.

d) Injertación

Este método consiste en la utilización de variedades portainjertos de *Coffea canephora* (Robusta) resistente a nematodos. En este caso, la variedad patrón no es afectada por los nematodos y la variedad comercial produce con todo su potencial. Este método de combate es bastante aplicado en zonas altamente infestadas y se utiliza desde hace mucho tiempo en Guatemala y Brasil.

e) Enmiendas orgánicas.

Los abonos orgánicos como: la gallinaza y la pulpa de café, juegan un papel muy importante para mejorar la estructura, fertilidad y el regular el balance hídrico del suelo, favorecen igualmente el desarrollo de microorganismos antagónicos de los nematodos.

3.4.4. Ciclo biológico ⁽²²⁾

El ciclo de desarrollo de los *Meloidogyne* comprende cuatro estadios larvarios y un estado adulto. El ciclo comprende dos fases: la primera que va desde la salida de las larvas de los huevos, hasta que penetran en las raíces de los cafetos y la segunda comprende el desarrollo completo del nematodo al interior de los tejidos.

El ciclo de desarrollo de este nematodo se da de la siguiente forma: estos pertenecen al grupo de los endoparásitos sedentarios, presentan dimorfismo sexual, la hembra es de forma piriforme o esférica, y el macho es vermiforme y alargado. La hembra ubicada en el interior de la raíces oviposita sus huevos en una masa protectora gelatinosa. Las larvas mudan por primera vez en interior del huevo, luego eclosionan pasan a su segundo estado juvenil (J2) y se diseminan en el suelo, donde pueden, ya sea penetrar directamente en la raíz, y comenzar a alimentarse, esperar varios meses en el suelo en ausencia de un hospedero o en caso de condiciones desfavorables. Una vez que las larvas encuentran las raíces se fijan en forma definitiva y continúan su crecimiento. Después de la segunda muda, las larvas están en el tercer estadio, es entonces que comienzan a desarrollar células gigantes alrededor del punto de fijación del nematodo, una agalla comienza aparecer sobre la raíz y se inicia también la diferenciación de las larvas en hembra y macho. Después de la tercera muda, y al acercarse al final del cuarto estadio, comienzan a desarrollarse los órganos sexuales de la hembra. El macho, se convierte en un gusano largo y delgado enrollado en una cutícula larvaria; la hembra adulta comienza a depositar nuevamente los huevos en una masa gelatinosa que se encuentra al exterior de la raíz. El macho deja la cutícula larvaria y se desplaza en la misma raíz para copular a la hembra. ⁽²²⁾ (Ver Anexo. N° 2)

3.4.5. Factores que influyen en el desarrollo de *Meloidogyne*

La velocidad de desarrollo de estos nematodos se ve influida por factores como:

a) Temperatura

Se menciona que a temperaturas entre 27.5 °C a 30 °C, el estado adulto es alcanzado en 17 días. A temperaturas inferiores a 15.4 °C, ó superiores a 33.5 °C, las hembras no llegan a alcanzar la madurez. (12)

b) Humedad

Las especies de *Meloidogyne* dependen del agua en el suelo para continuar su vida y todas sus actividades. Las larvas y los huevos mueren en el suelo seco; pero pueden sobrevivir si hay suficiente humedad para mantener el aire del suelo con casi 100% de humedad, en suelos muy húmedos la emergencia puede inhibirse y el movimiento larval disminuir por falta de oxígeno. (22)

c) Textura del suelo

Las larvas de los nematodos se mueven a través de los poros del suelo, muchos nematólogos han concluido que el nematodo de agalla de la raíz es mas severo en suelos arenosos que en suelos arcillosos. Es decir en suelos que contienen menos del 10% de arcilla, menos del 30% de limo y más del 60% de arena. (21)

3.5. Especies de *Meloidogyne* asociados al cultivo del café.

Estudios realizados indican la existencia de 17 especies reportadas como parásitos del cultivo del café en las diversas zonas de producción en el mundo.

(19)

Cuadro N° 1 Distribución geográfica de las especies de *Meloidogyne* reportadas como parásitos sobre las raíces de Café.

NEMATADOS	HUESPED	PAIS
<i>Meloidogyne exigua</i>	<i>Coffea arabica</i>	Guatemala, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, República Dominicana, Puerto Rico, Colombia, Brasil, Bolivia, Perú y Venezuela.
<i>M. ingognita</i>	<i>C. arabica</i> <i>C. canephora</i> (Robusta)	Guatemala, Jamaica, Brasil, Venezuela, Costa de Marfil, Tanzania, India.
<i>M. coffeicola</i>	<i>C. arabica</i>	Brasil
<i>M. javanica</i>	<i>C. arabica</i> <i>C. canephora</i>	El Salvador, Brasil, Tanzania, Zaire, India.
<i>M. hapla</i>	<i>C. canephora</i>	Brasil, Tanzania, Zaire, India.
<i>M. africana</i>	<i>C. arabica</i> <i>C. canephora</i>	Kenia, Zaire
<i>M. decalineata</i>	<i>C. arabica</i>	Tanzania, Sao Tomé
<i>M. kikuyensis</i>	<i>C. arabica</i>	Tanzania
<i>M. arenaria</i>	<i>C. canephora</i>	Jamaica
<i>M. megadora</i>	<i>C. arabica</i> <i>C. canephora</i> <i>C. congensis</i> <i>C. eugenoides</i>	Angola, Uganda
<i>M. inornata</i>	<i>C. arabica</i>	Guatemala
<i>M. oteifae</i>	<i>C. canephora</i>	Zaire
<i>M. thamesi</i>	<i>Coffea spp.</i>	India
<i>M. arabicida</i>	<i>C. arabica</i>	Costa Rica
<i>M. konaensis</i>	<i>C. arabica</i>	Hawai
<i>M. paranaensis</i>	<i>C. arabica</i>	Brasil
<i>Meloidogyne sp.</i>	<i>C. arabica</i>	Brasil, Perú, Surinam, Guatemala, El Salvador

3.6. Árbol de Nim ⁽²⁵⁾

Azadirachta indica (Nim), conocido comúnmente como margosa de la India y Nim en español y como Neem en inglés, es un árbol de tamaño mediano a grande, caracterizado por su fuste corto y recto, una corteza moderadamente gruesa arrugada de color marrón oscuro a gris, con fisuras de color rojizo-castaño y una copa densa-redondeada con hojas pinnadas.

(Ver Fig. N° 1). El Nim se planta y naturaliza extensamente en las áreas semiáridas a través de Asia y África. Ha sido introducida a varias de las islas del Caribe, en donde se le cultiva más que nada para sombra, combustible y numerosos productos no madereros que se obtienen de las hojas, la fruta y la corteza.

Entre estos se encuentran agentes medicinales e insecticidas.

El Nim es siempre verde, excepto en las áreas susceptibles a las heladas y las sequías.



Fig. N° 1 Árbol de ***Azadirachta indica*** (Nim) con sus hojas, flores y frutos.

3.6.1. Taxonomía del Árbol de Nim ⁽²⁶⁾

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Melia

Familia: Meliaceae

Género: ***Azadirachta***

Nombre científico: ***Azadirachta indica A. Juss.***

Nombres comunes: Árbol del Nim, margosa, limba, cinamomo, mimba, nimba, kohomba y lila india.

3.6.2. Descripción Botánica ⁽¹⁸⁾

El Nim es un árbol de tamaño pequeño a mediano, con un tronco recto. Los tallos de las ramas de 2 a 5 m, forman una corona unida, densa, redonda y en forma ovalada. La altura total es de 15 a 25 m, alcanzando ocasionalmente hasta 30 m, con un diámetro de tronco que alcanza de 30 a 90 cm. El Nim está caracterizado por un sistema de raíces laterales penetrantes, que pueden extenderse hasta 15 m, con una cofia relativamente corta. Tiene una corteza moderadamente gruesa arrugada de color marrón oscuro a gris, con fisuras de color rojizo-castaño. Siempre está verde o muda dependiendo del clima, los períodos de deshoje son normalmente breves, y ocurren durante las sequías prolongadas. Los frutos son drupáceos, oval-oblongos, amarillos purpúreos, de 1 cm de diámetro y normalmente contienen una sola semilla. El fruto tiene una longitud de 2 cm y, cuando madura, el pericarpio aparece amarillo y de textura rugosa. Estos empiezan a aparecer cuando el árbol alcanza una edad de 3 a 5

años. Las hojas son alternas, imparipinnadas y compuestas, de 3 a 8 cm de longitud en forma agrupada al extremo de las ramas.

3.6.3. Hábitat y Distribución ⁽²⁷⁾

El Nim es nativo del subcontinente indo-pakistano. Se señala que en la India puede haber un total de 25 millones de árboles, los que se localizan en un largo cinturón que se extiende hacia el sur desde Delhi y Lahore, hasta Cabo Camorin. En el sur de Asia se encuentra en Bangladesh, Birmania y las partes secas del Sri Lanka. En el sureste de Asia se encuentra de manera dispersa en Tailandia, sur de Malasia, y en las islas de Indonesia al Este de Java. En Filipinas se introdujo en un programa que cubre 40,000 hectáreas de bosque. También se encuentra en las planicies del norte de Yemen y se introdujo a Arabia Saudita.

3.6.4. Partes Utilizadas

Del nim se pueden utilizar prácticamente todos sus componentes: semillas, hojas y madera. ⁽²⁸⁾ De las hojas se pueden aislar varias moléculas como un flavonoide polifenólico llamado quercetina, un β -sitosterol, el nimbosterol, nimbina y otros liminoides, como la nimocinolina e isonimocinolina.

También se han aislado un grupo de alcanos de entre 14 y 31 carbonos, aminoácidos y ácidos grasos. La corteza y madera del árbol del Nim son también fuente de numerosos principios activos: nimbina, nimbidina, nimbinina, nimbosterol, margosina, nimbineno y algunos diterpenos como la nimbinona, nimboquina, nimbidiol y nimbona. Pero sin duda el elemento más interesante en la bioquímica del Nim son las semillas, por su riqueza en lípidos y la presencia de moléculas con una intensa actividad biológica. El hueso de la drupa contiene una o dos semillas y de ellas se obtiene un aceite compuesto de ácido oleico

(50-60%), palmítico (13-15%), esteárico (14-19%), linoleico (8-16%) y araquídico (1-3%), composiciones que varían según el método de extracción.

(28)

3.6.5. Composición Química del Árbol de Nim

El Nim contienen varios miles de componentes químicos, de especial interés son los terpenoides, compuestos por C, H y O; la presencia del oxígeno hace esos compuestos más solubles en agua, metanol o etanol que en hexano, gasolina u otros solventes similares. Actualmente se conoce de la existencia de unos 100 terpenoides. Dentro de los cuales el más activo es la azadiractina.

3.6.5.1. Terpenoides con Poder Biocida presentes en el Árbol de Nim.

Hasta el momento, al menos nueve limonoides de Nim han demostrado su capacidad para bloquear el crecimiento de los insectos, afectando a una amplia gama de especies que incluye algunas de las plagas más mortíferas de la agricultura y la salud humana. Nuevos limonoides aún se están descubriendo en el Nim, pero la **Azadiractina, Meliantriol, Nimbina y Nimbidina** son los más conocidos y, al menos por ahora, parecen ser los más significativos. (29)

Azadiractina

Uno de los primeros ingredientes activos aislados de Nim, azadiractina ha demostrado ser el agente principal del árbol para luchar contra los insectos. La mayoría de los efectos antialimentarios y antihormonales son debidos a este principio activo. De hecho se considera que aproximadamente del 72 al 90% de la actividad biológica produce este efecto en la mayoría de las plagas.

Es estructuralmente parecido a las ecdisonas (hormonas que se encuentran en los insectos que controlan el proceso de metamorfosis del insecto desde el

estado de larva hasta que llega a ser adulto). Esta materia activa no mata insectos, al menos no inmediatamente, sino que en lugar de ello, repele y destruye su crecimiento y reproducción.

Es uno de los más poderosos reguladores de crecimiento y frenador de la alimentación que se ha probado. Repele y reduce la alimentación de muchas especies de plagas de insectos así como de algunos nematodos.

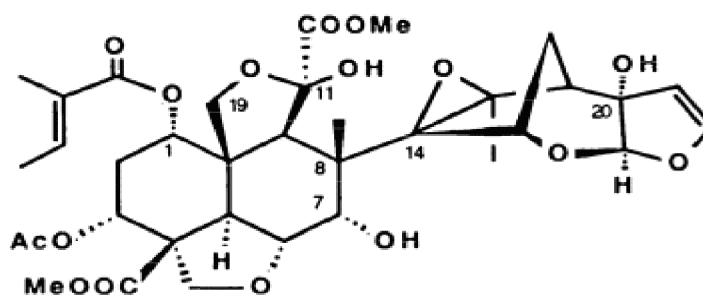
Existe una reducción en la síntesis de ecdisona al aplicar el principio activo. Según investigaciones, la azadiractina también interviene en el sistema neuroendocrino para controlar la síntesis de la hormona ecdisona y juvenil.

La azadiractina aparece por tanto como una materia activa de origen natural que resulta bastante eficaz; de hecho, es tan potente que una simple señal de su presencia previene a algunos insectos de incluso tocar las plantas. No obstante se han mostrado algunas limitaciones sobre todo debido al efecto de los rayos ultravioletas sobre esta sustancia que aceleran su degradación. El efecto residual dura unos cinco días, aunque los efectos juvenoides, es decir sobre el crecimiento, pierden su actividad normalmente después de uno o dos días bajo condiciones de campo.

Las temperaturas parecen jugar un papel de forma indirecta, temperaturas más altas incrementan el efecto porque los insectos son más activos bajo estas condiciones, y el efecto antialimentario es conseguido más rápidamente que a bajas temperaturas.

La azadiractina actúa bloqueando la producción de ecdisona, de esta forma altera el equilibrio hormonal de los insectos, afectando a su metamorfosis. Las malformaciones producidas en cualquiera de los estadios o los daños morfogenéticos en adultos, como alas, aparato bucal mal desarrollado entre otros, provoca que los daños que puedan producir estos insectos se reduzcan

ya que su actividad alimenticia se ve afectada, no pueden volar, son estériles, muriendo rápidamente. Estos efectos se producen de forma combinada y con diferente grado de acción, dependiendo de la especie de insecto, de su estado de desarrollo, del proceso de extracción y de la concentración del preparado. La azadiractina es la materia más eficaz de las contenidas en el Nim, la cual es capaz de garantizar el control de las plagas y ser la alternativa a productos sintéticos. (Ver Fig. N° 2)



azadirachtin

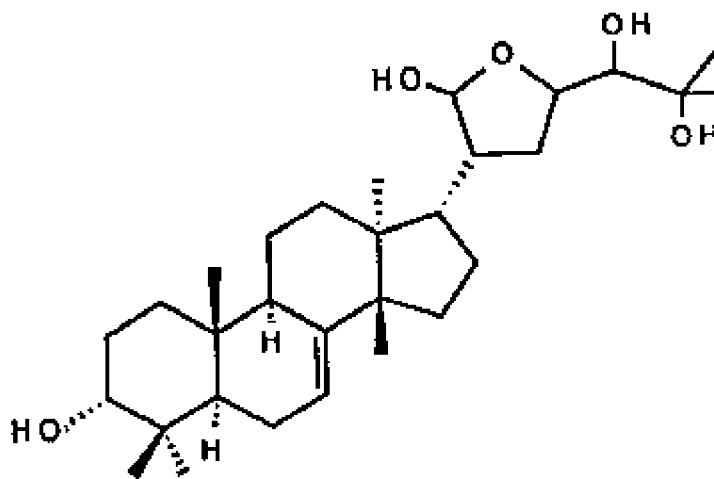
Ac = Grupo Aceto, O = Oxígeno, Me = Metilo, COO = Grupo Carboxilo, OH = Grupo Hidroxilo, H = Hidrogeno, CO = Grupo

Fig. N° 2 Fórmula molecular del principio activo "Azadiractina" del árbol de *Azadirachta indica* (Nim)

Meliantriol

Su estructura es también muy similar a la azadiractina. Este compuesto actúa también como inhibidor de la alimentación. Hace posible que en concentrados extremadamente bajos, los insectos cesen de comer. Además también actúa sobre el crecimiento de los insectos y afecta también a nematodos.

La demostración de su habilidad para prevenir el mascado de las langostas en los cultivos, fue la primera prueba científica del uso tradicional del Nim para el control de insectos en los cultivos de la India. (Ver Fig. N° 3)



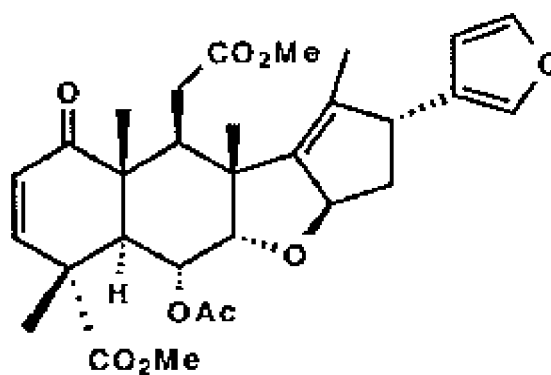
O = Oxígeno, OH = Grupo Hidroxilo, H = Hidrogeno.

Fig. N° 3 Fórmula molecular del principio activo "Meliantriol" presente en el árbol de ***Azadirachta indica*** (Nim)

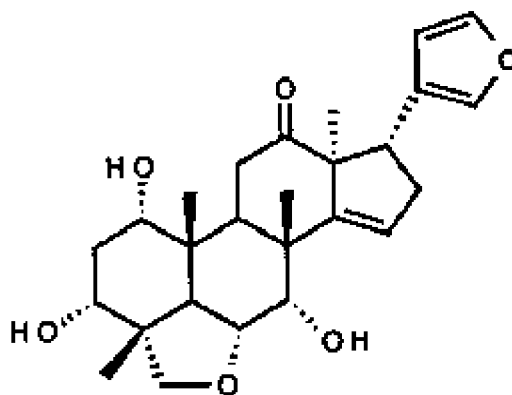
Nimbina y nimbidina

Estos compuestos han demostrado su actividad sobre el Virus X de la Patata, ***Vaccinia virus***, y sobre el virus de las enfermedades venéreas de las aves.

La Nimbidina es el componente primario de principios amargos, que se produce cuando las semillas de Nim son sometidas a un proceso de extracción con alcohol. Esto ocurre en cantidades bastante grandes; sobre el 2 % del núcleo. (Ver Fig. N° 4)



nimbin



nimbidin

Ac = Grupo Aceto, O = Oxígeno, Me = Metilo, COO = Grupo Carboxilo, OH = Grupo Hidroxilo, H = Hidrogeno, CO = Grupo

Fig. N° 4 Fórmulas moleculares de los principios activos “Nimbina” y “Nimbidina” presentes en el árbol de *Azadirachta indica* (Nim)

3.6.6. Mecanismos de Acción

Las propiedades del Nim están basadas en el parecido que presentan sus componentes con las hormonas, de tal forma que los cuerpos de los insectos absorben los componentes del Nim y estas bloquean su sistema endocrino.

Los extractos del Nim actúan en diversos insectos de diferentes maneras:

- a) Destruyendo e inhibiendo el desarrollo de huevos, larvas o crisálidas.
- b) Bloqueando la metamorfosis de las larvas o ninfas.
- c) Destruyendo su apareamiento y comunicación sexual.
- d) Repeliendo a las larvas y adultos.
- e) Impidiendo a larvas poner huevos.
- f) Esterilizando adultos.
- g) Envenenando a larvas y adultos.
- h) Impidiendo su alimentación.
- i) Bloqueando la habilidad para tragar (reduciendo la movilidad intestinal).
- j) Enviando mayores errores a su metamorfosis en varios periodos de desarrollo del insecto.
- k) Inhibiendo la formación de quitina (material del que se compone el esqueleto del insecto).

El Nim impide que se realicen las mudas necesarias, para entrar en la siguiente etapa del desarrollo, de tal forma que actúa como regulador de crecimiento del insecto.

De todos estos efectos, se puede decir que actualmente el poder repelente es probablemente el efecto más débil. La actividad antialimentaria (aunque interesante y valiosa) presenta corta vida y es variable.

La más importante cualidad del Nim, es el bloqueo en el proceso de metamorfosis de la larva.

Otras características destacables del Nim son: difícil desarrollo de resistencia por tratarse de una mezcla de componentes bioactivos, es sistémico a través de las raíces cuando se aplican al suelo, tiene elevada biodegradabilidad sobre todo por la acción de la radiación U.V., con una persistencia en campo de 4-8 días y posibilita el sinergismo con otros productos naturales como ***Bacillus thurigiensis***.

La creciente utilización de los productos de Nim trabaja interviniendo en varias etapas de la vida de un insecto. Los ingredientes activos de este árbol son similares a la forma y estructura de las hormonas para la vida de los insectos. Los cuerpos de estos insectos absorben los compuestos del Nim, pero esto sólo bloquea su sistema endocrino. El resultado de los daños deja a los insectos tan confundidos en el cerebro y el cuerpo que no pueden reproducirse y sus poblaciones se reducen.

Cada vez más, los enfoques de este tipo se consideran como deseables de los métodos de control de plagas: Las plagas no tienen que ser sacrificadas de inmediato si sus poblaciones pueden estar incapacitadas de manera que sean inofensivas para la planta y los seres vivos. En la década de 1990 esto fue particularmente importante debido a que muchas empresas estaban retirando algunos plaguicidas sintéticos por razones toxicológicas y un número creciente de insectos estaban desarrollando resistencia a los controles químicos.

3.6.7. Insectos Afectados ⁽¹⁸⁾

En general, puede decirse que los productos de Nim son plaguicidas de amplio espectro contra insectos comedores de plantas (fitófagos), dentro de los cuales los más afectados son:

- a) ***Orthoptera***: como saltamontes, grillos, langostas
- b) ***Homóptera***: Áfidos, saltamontes, moscas blancas, cochinillas
- c) ***Thysanoptera***: mosca de sierra y larvas de oruga.
- d) ***Coleóptera***: Escarabajos
- e) ***Lepidóptera***: Gorgojos, gusanos, polillas, barrenadores del maíz
- f) ***Díptera***: Mosca, moscardón, mosquitos
- g) ***Himenóptera***: avispas, hormigas.

h) Heteróptera: Chinchas

i) Nematodos:

Productos de Nim afectan los distintos tipos de nematodos. Esto puede ser importante debido a que algunos de estos gusanos hilo están entre los más devastadores de las plagas agrícolas y también se encuentran entre los más difíciles de controlar (debido a que un número creciente de nematicidas sintéticos han tenido que ser retirados del mercado por razones toxicológicas).

Hoy en día, hay un pequeño pero creciente grupo el cual evidencia que el Nim esta proporcionando reemplazos útiles. Algunas limonoides extraídos del Nim están demostrando actividad contra nematodos formadores de agallas, que es el tipo más devastador para las plantas. Inhiben las larvas de las raíces emergentes y sus huevos.

3.7 *Impatiens wallerana* Hook. f. (China)

Entre los nombres comunes que se le pueden dar a esta planta también se encuentran: Alegría de la casa, Alegría del hogar, Impatien, Balsaminia, Miramelindo, Miramelindoses; es una de las plantas de jardín más populares por sus flores prolífica y facilidad en el cultivo. Es una planta perenne pero a menudo se cultiva como anual en climas tropicales. (Ver Anexo N° 3)

La mayoría de las variedades forman montículos bajos que son por lo general de 8 a 24 y presenta una altura de 20 – 61 cm. (30)

Esta planta es susceptible a ciertas enfermedades como: Rizoctonia y Verticillium (marchitez y podredumbre en el tallo), Cercospora, Septoria y Phyllosticta (producen hongos), Pseudomona, entre otras. Aunque tiene la ventaja de presentar tolerancia a: Pulgones, Mosca blanca, Araña roja, Trips y Nematodos de las raíces. La de mayor relevancia e importante para nuestra investigación es esta última plaga, ya que la planta puede sobrevivir por un

periodo de tiempo bastante prolongado y permitir así su desarrollo sin presentar los síntomas comunes que se observan en plantas que han sido atacadas por nematodos de la raíz ⁽³¹⁾.

3.8. Pesticidas botánicos

Los pesticidas botánicos son aquellos que se pueden obtener de las plantas. Existen una variedad de plantas que pueden proporcionar un pesticida botánico a partir de cualquier parte de la planta ya sea hojas, flores, semilla, raíces; ya que pueden ser extraídos principios activos que pueden ser utilizados solos en mezclas con otros compuestos tóxicos.

Algunas de las plantas presentan mecanismos de defensa natural contra predadores y patógenos al producir sustancias que las protegen contra ellos. Dichas sustancias pueden atacar bacterias dañinas, repeler insectos o interferir en los ciclos reproductivos, evitar que germinen esporas de hongos o de otras muchas formas; actúan como protección natural de las plantas. Una de las nuevas tendencias en la investigación es aislar estas sustancias naturales de defensa, estudiar como actúan y después utilizarlas como pesticidas o bien diseñar insecticidas sintéticos, en base a las estructuras de estas sustancias.

El uso de los insecticidas botánicos ha declinado desde 1966 en el cual alcanzó su mayor consumo. Actualmente las piretrinas son los únicos insecticidas naturales de uso significativo.

En el ámbito internacional, entre las plantas con actividad plaguicida de mayor éxito, está el árbol de ***Azadirachta indica*** (Nim), el cual debido a sus excelentes características de adaptabilidad en diferentes agroecosistemas y efectividad para el combate de más de 200 especies de insectos de importancia económica.

3.8.1. Ventajas que podría traer el uso de pesticidas botánicos. ⁽⁴⁾

1. Los agricultores podrían producir gran parte de sus insecticidas, lo que significaría un ahorro de costos para ellos.
2. Muchos extractos botánicos son inofensivos tanto para los humanos como para los organismos benéficos.
3. Se podrían crear puestos de trabajo e ingresos si un pesticida biológico es exportable.
4. La reforestación podría combinarse parcialmente con la producción de pesticidas naturales.
5. Existe poca probabilidad de que se desarrollen resistencias contra sustancias naturales.

3.8.2. Desventajas en el uso de pesticidas.

1. Desconocimiento y falta de experiencia por parte de los agricultores y del personal técnico.
2. Los procesos para la obtención de los insecticidas exigen actividades empresariales y organizativas a las cuales el agricultor generalmente no está acostumbrado.
3. Los pesticidas naturales a menudo tienen efectos repelentes, fagorepelentes o también insecticidas, los cuales no son tan evidentes y visibles para el agricultor.

CAPITULO IV

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO: El estudio planteado en la investigación fue experimental, debido a que se llevó a cabo a nivel de laboratorio, en la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFE) y la Fundación Salvadoreña para el Desarrollo Económico y Social de El Salvador (FUSADES); también fue prospectivo porque con los resultados se busca una alternativa más accesible y menos contaminante para controlar la plaga de ***Meloidogyne sp*** (Nematodos parásitos) que afecta el cultivo de ***Coffea arabica*** (Café).

4.2 INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA:

Se realizó en las bibliotecas de:

Universidad de El Salvador en las facultades de:

- Química y Farmacia “Dr. Benjamín Orozco”
- Ciencias Agronómicas.
- Ciencias Naturales y Matemáticas, Escuela de Biología.

Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer facultad de: Química y Farmacia.

Fundación Salvadoreña para Investigaciones del café (PROCAFE).

Fundación Salvadoreña para el Desarrollo Económico y Social de El Salvador (FUSADES).

Las actividades se llevaron a cabo en los laboratorios:

- Fundación Salvadoreña para el Desarrollo Económico y Social de El Salvador (FUSADES).
- Fundación Salvadoreña para Investigaciones del café. (PROCAFE)

- Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA)
- Universidad de EL Salvador, Unidad de Química Facultad de Ciencias Agronómicas.

4.3 INVESTIGACION DE CAMPO:

4.3.1 Diseño estadístico:

Se instalaron ensayos con un diseño estadístico completamente al azar con 4 tratamientos y 7 repeticiones para cada uno.

Para el análisis de los resultados: se utilizó la media de los datos obtenidos, representándose por medio de tablas y gráficos.

4.3.2 Tratamientos evaluados

Soluciones Acuosas:

T1 = Solución de 0 ppm (blanco o testigo)

T2 = Solución de 50 ppm

T3 = Solución de 150 ppm

T4 = Solución de 300 ppm.

Soluciones Hidroalcohólicas:

T1 = Solución de 0 ppm (blanco o testigo)

T2 = Solución de 50 ppm

T3 = Solución de 150 ppm

T4 = Solución de 300 ppm.

4.3.3. Parámetro evaluado

El parámetro evaluado fue: Número de nematodos vivos y muertos a 1, 6 y 24 horas de exposición.

4.3.4. Identificación de las especies vegetales:

Antes de realizar la parte experimental de la investigación, se realizó la clasificación taxonómica de las especies vegetales con las que se trabajaron: ***Azadirachta indica*** (Nim) e ***Impatiens wallerana*** Hook. f. (China); para ello se visitó el Jardín Botánico La Laguna (Herbario LAGU) (Ver Anexo N° 4).

4.4 PARTE EXPERIMENTAL:

(Lista de material Ver Anexo N° 5)

El trabajo se desarrollo en 4 fases sucesivas:

Fase 1: Recolección, secado, fraccionamiento y molienda de la muestra

4.4.1 Selección de la muestra:

4.4.1.1 Universo:

Los árboles de ***Azadirachta indica*** (Nim) de la estación experimental de la Fundación Salvadoreña Para Investigaciones Del Café (PROCAFE), situada en: Final 1a. Avenida Norte, 13 Calle Poniente y Avenida Manuel Gallardo, Santa Tecla, Departamento de La Libertad, se utilizaron los 6 árboles.

4.4.1.2 Muestra:

Porción de hojas de todos los árboles de ***Azadirachta indica*** (Nim), estas fueron recolectadas en la estación experimental de la Fundación Salvadoreña Para Investigaciones Del Café (PROCAFE), situada en: Final 1a. Avenida Norte, 13 Calle Poniente y Avenida Manuel Gallardo, Santa Tecla,

Departamento de La Libertad. Del cual se tomó una cantidad aproximada de 600 g de hojas (base húmeda)

4.4.1.3 Recolección de las muestras:

Las hojas se recolectaron en las horas frescas del día, cortando solamente la cantidad de material vegetal suficiente, en especial las hojas de edad media a mayor (ya que son las que poseen el principio activo más desarrollado), (25) posterior a su recolección se lavaron con agua potable, luego con agua destilada para eliminar la suciedad adherida y se utilizaron todos los árboles presentes en el lugar.

4.4.1.4 Secado

Luego se procedió al secado, se realizó extendiendo en un lugar seco y a la sombra el material vegetal, se dejó hasta que se obtuvo un secado con la menor cantidad de humedad residual.

Posterior al secado al aire libre se procedió a introducir el material vegetal en una bolsa de papel con agujeros. El material aparentemente seco se sometió a la estufa de ventilación forzada a una temperatura de 60 – 65 °C durante 24 horas (ya que a esta temperatura no se volatiliza ningún principio activo) y de esta manera se eliminó la humedad residual.

4.4.1.5 Fraccionado

Después de sacar el material vegetal de la estufa de ventilación forzada, se fraccionó en partes de menor tamaño utilizando una tijera dentro de una bolsa de polietileno para facilitar la molienda.

4.4.1.6 Molienda

Se pasó el material vegetal ya fraccionado por un molino foliar, el cual tenía un tamiz número 40, y se obtuvo 350 g de un producto de consistencia harinosa. Se recibió en un frasco de vidrio para almacenarlo hasta el momento de su uso.

Fase 2: Instalación de crías de *Meloidogyne sp* (Nematodos parásitos)

4.4.2 Instalación de crías de Nematodos parásitos

Se visitaron 2 fincas cafetaleras (Cruz Grande y Montelimar) de la zona Cruz Grande de Izalco, donde se colectaron raíces de café que presentaban formación de agallas, síntoma característico causado por el ataque de esta plaga.

Posteriormente se trasladaron al invernadero que se encuentra instalado en la Fundación Salvadoreña Para Investigaciones Del Café (PROCAFE).

Estas raíces colectadas se cortaron con tijeras para reducir su tamaño aproximadamente de 1cm y se colocaron sobre macetas con plantas de *Impatiens wallerana* Hook. f. (China) (Ver Anexo N° 6).

Una vez colocadas las raíces, los nematodos tardaron 30 días para desarrollarse y propagarse. La presencia de nematodos se pudo observar por medio de su síntoma mas característico que es la formación de agallas en las raíces de *Impatiens wallerana* Hook. f. (China).

Fase 3: Extracción del Principio activo de las hojas de *Azadirachta indica* (Nim) por solvente (Método Soxhlet) (Ver Anexo N° 7)

4.4.3 Obtención del Extracto

- Pesar 25.0 g de muestra molida dentro de un cartucho de papel filtro (elaborados manualmente) en una balanza analítica digital. Realizar la

pesada individualmente 6 veces, para obtener un total de muestra de 150.0 g en el equipo de extracción. Colocar los cartuchos en las cornetas y unirlos a balones fondo plano de 250 mL.

- Adicionar 200 mL de solvente (alcohol etílico 90°) para humeder la muestra y facilitar el proceso de reflujo.
- Colocar los refrigerantes en la parte superior de las cornetas y adaptar al refrigerante las mangueras para entrada y salida de agua.
- Aplicar calor a una temperatura aproximada de 78 – 80 °C con un Hot Plate y abrir las válvulas de agua. (El vapor del disolvente asciende por el tubo lateral y se condensa en el refrigerante cayendo sobre la muestra).

El disolvente extrae poco a poco los aceites y una vez llenado el depósito superior cae por efecto de “sifón”. El proceso se repite automáticamente por 16 horas, mientras el equipo se mantiene en funcionamiento.

- Recuperar el solvente, que consiste en retirar la corneta y el balón de 250 mL del sistema, antes que se lleve a cabo el proceso de “sifón”. Depositar el solvente recuperado en un frasco de vidrio color ámbar y desechar bajo buenas prácticas de laboratorio.
- Transferir la resina contenida en los 6 balones, a un solo balón de 250 mL previamente pesado y evaporar el resto de solvente utilizando un rotavapor.
- Purificar el extracto con acetato de etilo y luego se evaporar el solvente en un rotavapor. *

* Torres, D., 2010. Purificación de extractos botánicos, San Salvador, El Salvador, Universidad de El Salvador (Entrevista)

- Pesar el balón nuevamente obteniéndose un rendimiento de 25.54 g (resina color verde oscura de consistencia viscosa).

Fase 4: Estudio del efecto de diluciones Hidroalcohólicas y Acuosa sobre larvas de nematodos.

Esta fase se realizó en 5 etapas diferentes:

- a) Preparación de soluciones.

4.4.4. Preparación de la solución madre.

Luego que el extracto fue purificado y concentrado, llevar a cabo la preparación de las soluciones acuosas e hidroalcohólicas a las concentraciones requeridas, para esto preparar una solución madre de 1000 mg/L. (ppm)

- Pesar en una balanza analítica 1.0 g del extracto concentrado en un beaker de 100 mL secado previamente.
- Disolver en 80 mL de alcohol etílico 90°.
- Transferir a un balón de 1000.0 mL, lavar el beaker con el solvente tantas veces como sea posible, y agregar estos lavados al balón de 1000.0 mL.
- Llevar a volumen con alcohol etílico 90°. **** Mantener la solución en refrigeración durante todo el proceso experimental para garantizar su conservación.**

** Vivar de Figueroa, M.E., 2010. Preparación de soluciones a diferentes concentraciones, San Salvador, El Salvador, Universidad de El Salvador (Entrevista).

4.4.5. Preparación de los extractos botánicos a las concentraciones elegidas.

Para la preparación de las soluciones V/V a diferentes concentraciones se utilizó la siguiente fórmula matemática:

$$V_1 C_1 = V_2 C_2$$

Donde:

V_1 = Alícuota a Tomar.

C_1 = Concentración de la solución madre.

V_2 = Volumen a preparar.

C_2 = Concentración a Preparar.

Ejemplo. Preparar 100.0 mL de solución Acuosa a una concentración de 50 ppm, partiendo de una solución madre de 1000 mg/L.

$V_1 = ?$

$C_1 = 1000 \text{ ppm}$

$V_2 = 100.0 \text{ mL}$

$C_2 = 50 \text{ ppm}$

Despejando V_1 :

$$V_1 = \frac{V_2 C_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{(100.0 \text{ mL})(50 \text{ ppm})}{1000 \text{ ppm}}$$

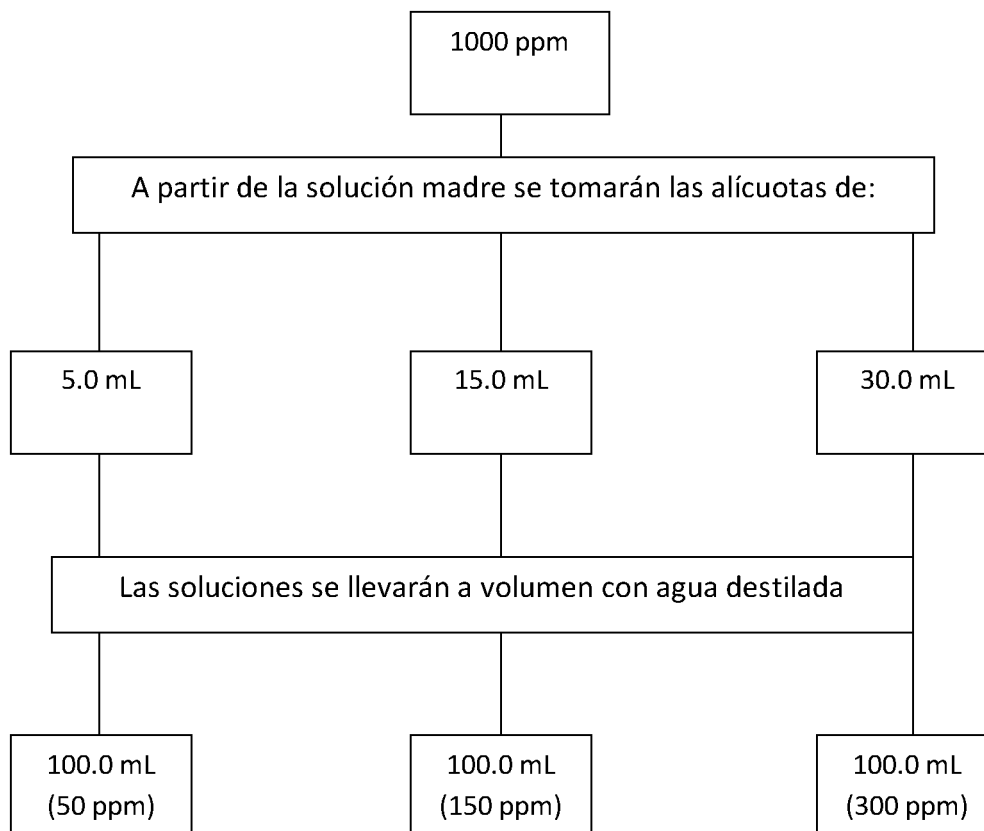
$$V_1 = 5.0 \text{ mL}$$

Nota: se siguió el mismo procedimiento para las demás soluciones Acuosas e hidroalcohólicas a las concentraciones de 50, 150 y 300 ppm.

Concentración Requerida	Alícuota a Tomar
50 ppm	5.0 mL
150 ppm	15.0 mL
300 ppm	30.0 mL

4.4.5.1 Extractos acuosos

Preparación de extractos botánicos acuosos a concentraciones de 50, 150 y 300 ppm partiendo de una solución madre de 1000 ppm. **



**Vivar de Figueroa, M.E., 2010. Preparación de soluciones a diferentes concentraciones, San Salvador, El Salvador, Universidad de El Salvador (Entrevista)

4.4.5.2. Extractos hidroalcohólicos

Preparación de una solución Hidroalcohólica (87:13) (Agua: Alcohol)

Según investigaciones realizadas anteriormente recomiendan la utilización de soluciones Hidroalcohólicas en esta proporción, debido a que presentan una alta efectividad en el combate de plagas y a la vez evitan el crecimiento bacteriano en las soluciones, prolongando su conservación. (2)

Cálculos para preparar 500.0 mL de una solución Hidroalcohólica en una relación (87:13) (Agua: Alcohol)

Para preparar 100.0 mL de solución Hidroalcohólica se necesitan 87 mL de Agua destilada y 13 mL de Alcohol Etílico 90°.

Entonces, para preparar 500.0 mL de una solución Hidroalcohólica se necesitan:

Agua.

100.0 mL de Solución Hidroalcohólica ----- 87 mL de Agua

500.0 mL de Solución Hidroalcohólica ----- **X**

X= 435 mL de Agua para preparar 500.0 mL de una Solución Hidroalcohólica en una relación (87:13) (Agua: Alcohol).

Alcohol Etílico 90°.

100.0 mL de Solución Hidroalcohólica ----- 13 mL de Alcohol Etílico 90°

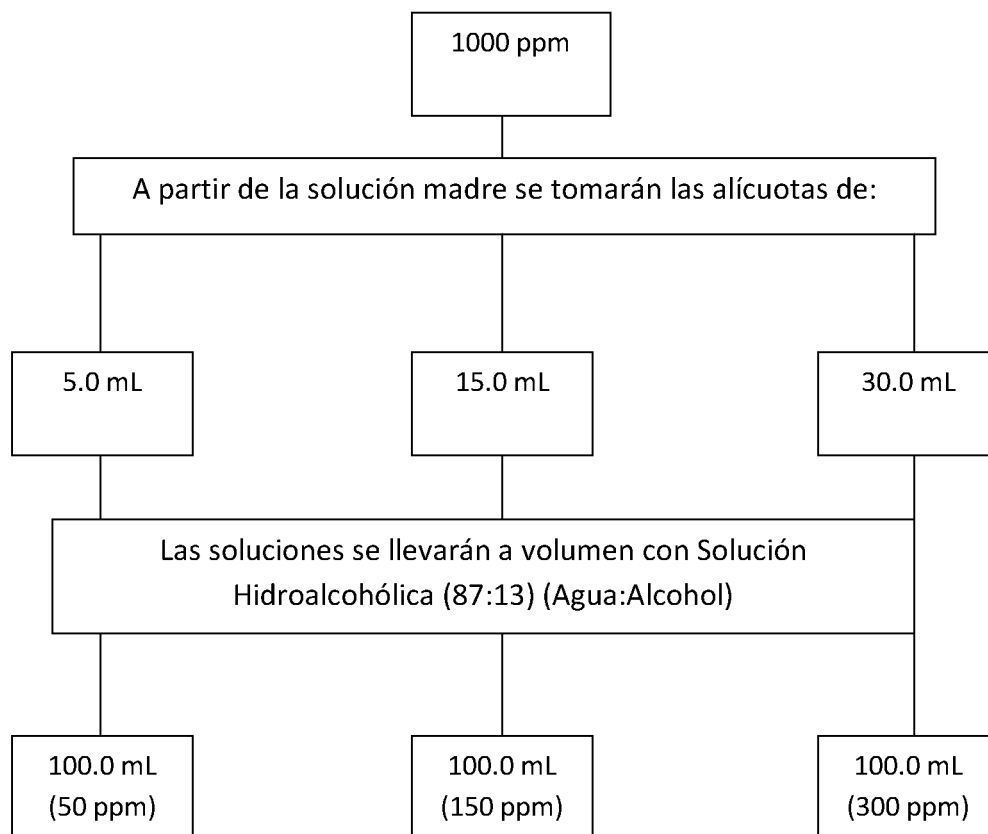
500.0 mL de Solución Hidroalcohólica ----- **X**

X= 65 mL de Alcohol Etílico 90° para preparar 500.0 mL de una Solución Hidroalcohólica en una relación (87:13) (Agua: Alcohol).

Se prepararon 500.0 mL de una solución Hidroalcohólica (87:13) en un balón, primero se midió en una probeta 65 mL de etanol 90° y se transfirió al balón de 500.0 mL con la ayuda de un embudo de vidrio, la probeta se lavó con agua destilada con el objetivo de arrastrar todo el alcohol y los lavados se agregaron al balón de 500.0 mL. Se llevó a volumen con agua destilada y se homogenizó.

La solución fue debidamente identificada colocándole una viñeta la cual contenía: tipo de solución, fecha de preparación y la relación a la que se preparó. **

Preparación de extractos botánicos Hidroalcohólicos a concentraciones de 50, 150 y 300 ppm partiendo de una solución madre de 1000 ppm. **



**Vivar de Figueroa, M.E., 2010. Preparación de soluciones a diferentes concentraciones, San Salvador, El Salvador, Universidad de El Salvador (Entrevista)

b) Preparación de Nematodos para el estudio.

4.4.6. Métodos de extracción de Nematodos

Existen diferentes métodos adecuados de extracción para cada tipo de nematodo (sedentario/migratorio) en muestras de suelo y raíces.

Cuadro N°2. Selección del método de extracción para diferentes tipos de nematodos y muestras.

Método de extracción	Muestra de suelo		Muestra de raíces	
	Nematodos sedentarios	Nematodos migratorios	Nematodos sedentarios	Nematodos migratorios
Bandeja de extracción		X		X
Tamizado	X	X		
Maceración de raíces			X	X
Incubación			X	X

Los métodos que se utilizaron para realizar la extracción de los nematodos en raíces fueron:

- Bandeja de extracción (Embudo de Baermann)
- Maceración de raíces

4.4.6.1. Bandeja de extracción (Embudo de Baermann)

Este método (y sus variantes) también es conocido como la técnica de Baermann modificada, el método del cuenco o el método de la bandeja de Whitehead.

Ventajas:

- No se necesita equipo especial
- Es fácil de adaptar a circunstancias básicas utilizando el material disponible localmente
- Extrae una amplia variedad de nematodos móviles
- Es una técnica simple.

Desventajas:

- Los nematodos de gran tamaño y aquellos que tienen movimiento lento no se extraen bien.
- Las extracciones a veces pueden estar bastante sucias lo cual dificulta el recuento de los nematodos.
- La proporción de nematodos que se extraen puede variar dependiendo de la temperatura ambiente dando lugar a posibles variaciones en los resultados entre las muestras extraídas en diferentes momentos

- Se tarda 3 ó 4 días en conseguir la máxima recuperación de los nematodos.

Procedimiento:

1. Tomar 3 muestras de raíces de *Impatiens walleriana* Hook. f. (China), enjuagar bajo el grifo de agua para eliminar el suelo adherido a las mismas y después eliminar el exceso de agua colocándolas sobre papel absorbente.
2. Fraccionar las raíces en trozos muy pequeños con la ayuda de una tijera y colocarlos en un recipiente de vidrio. (Ver Fig. N°5)



Paso N° 1

Paso N° 2

Fig. N° 5 Selección, lavado y fraccionado de raíces infectadas por *Meloidogyne sp* (Nematodos Parásitos) en *Impatiens walleriana* Hook. f. (China).

3. Colocar las raíces en un papel absorbente que actúa como filtro sobre un embudo de vidrio, luego adicionar agua desmineralizada hasta cubrir las muestras y dejar reposar durante 3 días. (Fig. N° 6)



Paso N° 3

Fig. N° 6 Instalación del sistema para extracción de *Meloidogyne sp* (Nematodos Parásitos)

4. Transcurridos los 3 días de extracción las larvas de nematodos se encuentran en el agua la cual es recuperada y colocada en un tubo de vidrio previamente graduado.
5. Adicionar agua desmineralizada hasta un volumen de 20 mL.
6. Colocar al tubo una fuente de oxígeno para prolongar el periodo de vida de las larvas. (Fig. N° 7)

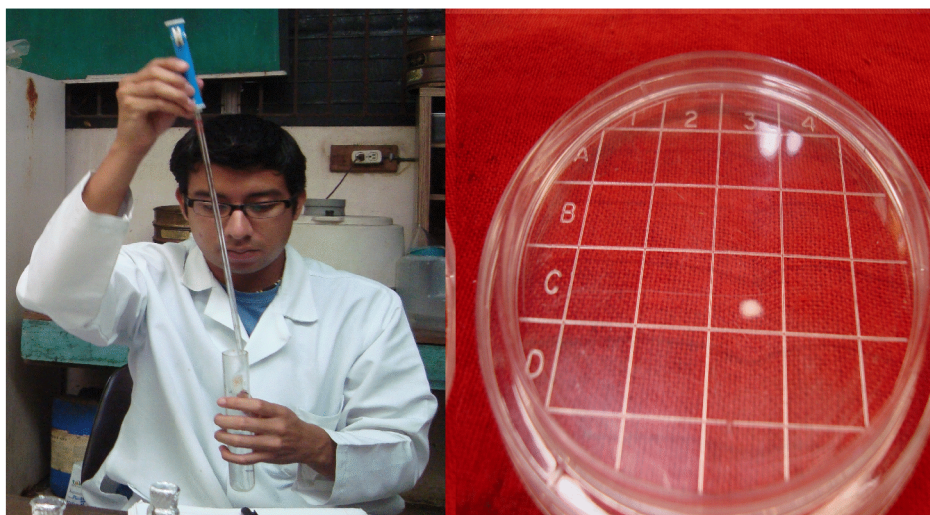


Paso N° 4 y 5

Paso N° 6

Fig. N° 7 Suspensión de nematodos adaptada a una fuente de oxígeno

7. Tomar 1.0 mL con una pipeta volumétrica y colocar en una placa petri cuenta nematodos, con el objetivo de contabilizar la cantidad que se encuentra presente en esa alícuota. (Fig. N° 8)



Paso N° 7

Fig. N° 8 Toma de alícuota y placa especial utilizada para contar nematodos

4.4.6.2. Maceración de las raíces

Ventaja:

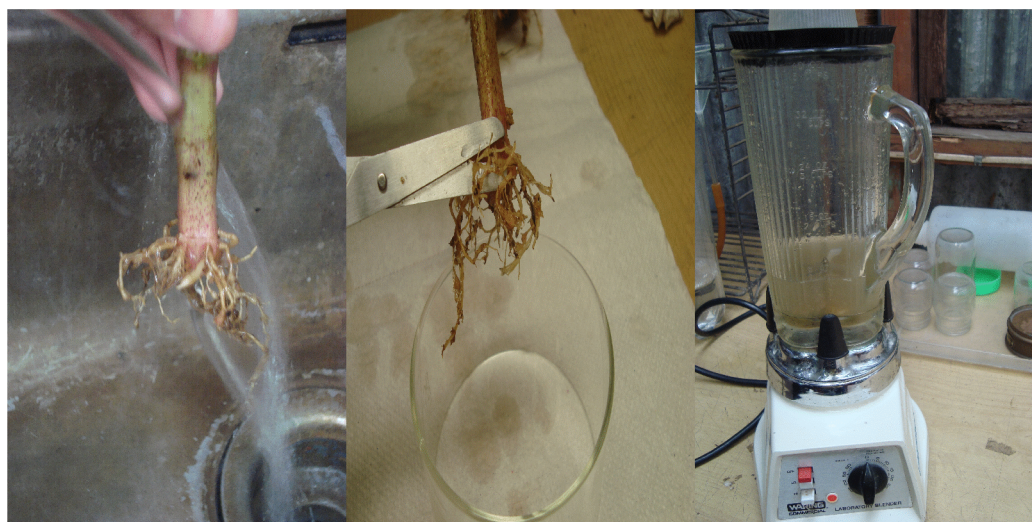
- No se necesita equipo especial.

Desventaja:

- El tiempo empleado en la maceración es crítico, debe ser el suficiente para permitir que el nematodo pueda salir fácilmente del tejido de la planta, pero a su vez, debe evitarse que el nematodo sufra daño por una maceración excesiva.

Procedimiento.

1. Tomar 3 muestras de raíces de *Impatiens walleriana* Hook. f. (China), enjuagar bajo el grifo de agua para eliminar el suelo adherido a las mismas y después eliminar el exceso de agua colocándolas sobre papel absorbente.
2. Fraccionar las raíces en trozos muy pequeños con la ayuda de una tijera y colocar dentro de una licuadora “Waring Commercial”.
3. Adicionar 30 mL agua desmineralizada y licuar por 20 segundos. (Fig. N° 9)



Paso N° 1

Paso N° 2

Paso N° 3

Fig. N° 9 Lavado, fraccionado y licuado de raíces infectadas por *Meloidogyne sp* (Nematodos Parásitos) en *Impatiens walleriana* Hook. f. (China).

4. Reposar la suspensión de raíces en agua por 3 minutos, a continuación verter en papel absorbente sobre un tamiz N° 200 con una luz de malla de 2 mm colocado dentro de un recipiente plástico.

5. Lavar la licuadora con suficiente agua utilizando una pizeta con el objetivo de arrastrar los residuos de raíces adheridos en las paredes y verter sobre el papel absorbente.
6. Agregar agua desmineralizada al recipiente que contiene la suspensión de raíces hasta cubrir las raíces para obtener una mejor extracción. (Fig. N° 10)



Paso N° 4 y 5

Paso N° 6

Fig. N° 10 Vertido de la suspensión de raíces sobre papel absorbente y adición de agua desmineralizada.

7. Posteriormente se dejó reposar por un período de 3 días conectado a una fuente de oxígeno.
8. Transcurridos los 3 días de extracción las larvas de nematodos se encontraban en el agua y ésta se paso por un tamiz N° 500 de 20 cm de diámetro con una luz de malla de 25 μm con el objetivo de reducir el volumen de agua reteniendo los nematodos en el tamiz. Los nematodos fueron transferidos arrastrándolos con agua a un tubo graduado, utilizando un embudo de plástico.
9. Adicionar agua desmineralizada hasta un volumen de 50 mL y colocar una fuente de oxígeno para prolongar la vida de las larvas. (Fig. N° 11)



Paso N° 7

Paso N° 8

Paso N° 9

Fig. N° 11 Sistema de oxigenación, transferencia y suspensión de nematodos

10. Tomar 1.0 mL con una pipeta volumétrica y colocar en una placa petri cuenta nematodos, con el objetivo de contabilizar la cantidad que se encuentra presente en esa alícuota. (Fig. N° 12)



Paso N° 10

Fig. N° 12 Conteo de nematodos y foto real de *Meloidogyne sp* (Nematodos parásitos) vista a 4X.

c) Instalación de un experimento piloto (Soluciones Acuosas).

En el experimento se utilizaron larvas de nematodos (Ver Anexo N° 8) obtenidas de las raíces infectadas de *Impatiens wallerana* Hook. f. (China) para después preparar una suspensión (como se describe en los procedimientos 4.4.6.1 y 4.4.6.2). Luego se procedió a contabilizarlos, para esto se tomaron 3 alícuotas de 1.0 mL cada una y se colocó dentro de una placa cuenta nematodos, y se observó al Estereoscopio obteniéndose un promedio de 52 nematodos por mL. (Parámetro de conteo durante el experimento).

El experimento se instaló en cajas petri con 4 tratamientos y 7 repeticiones.

Los tratamientos fueron:

T1 = Solución acuosa de 0 ppm (blanco o testigo)

T2 = Solución acuosa de 50 ppm

T3 = Solución acuosa de 150 ppm

T4 = Solución acuosa de 300 ppm.

Las repeticiones consistieron en tomar 1.0 mL de la suspensión de nematodos y colocarlo dentro de una caja petri, posteriormente se adicionó 7 mL de la solución en estudio.

Se realizaron evaluaciones a 1, 6 y 24 horas de exposición a temperatura ambiente y consistieron en transferir la solución contenida en la placa petri sobre una placa cuenta nematodos para contabilizar el número de vivos y muertos en ese tiempo de exposición.

El parámetro evaluado fue:

- Número de nematodos vivos y muertos a 1, 6 y 24 horas de exposición.

d) Instalación de experimento con soluciones Acuosos.

4.4.7. Instalación de experimento con Soluciones Acuosas.

En el experimento se utilizaron larvas de nematodos obtenidas de las raíces infectadas de *Impatiens wallerana* Hook. f. (China) para después preparar una suspensión (como se describe en los procedimientos 4.4.6.1 y 4.4.6.2). Luego se procedió a contabilizarlos, para esto se tomaron 3 alícuotas de 1.0 mL cada una y se colocó dentro de una placa cuenta nematodos. Se observó al Estereoscopio, obteniéndose un promedio de 62 nematodos por mL. (Parámetro de conteo durante el experimento).

El experimento se instaló en tubos de ensayo con 4 tratamientos y 7 repeticiones.

Los tratamientos fueron:

T1 = Solución acuosa de 0 ppm (blanco o testigo)

T2 = Solución acuosa de 50 ppm

T3 = Solución acuosa de 150 ppm

T4 = Solución acuosa de 300 ppm.

Las repeticiones consistieron en tomar 3 mL de la solución en estudio y colocarlo dentro de un tubo de ensayo, posteriormente se adicionó 1.0 mL de la suspensión de nematodos.

Se realizaron evaluaciones a 1, 6 y 24 horas de exposición a temperatura ambiente y consistieron en transferir con pipeta volumétrica 1.0 mL de suspensión contenida en el tubo ensayo sobre una placa cuenta nematodos para contabilizar el número de vivos y muertos en ese tiempo de exposición.

El parámetro evaluado fue:

- Número de nematodos vivos y muertos a 1, 6 y 24 horas de exposición.
- e) Instalación de experimento con soluciones Hidroalcohólicas.

4.4.8. Instalación de experimento con Soluciones Hidroalcohólicas

En el experimento se utilizaron larvas de nematodos obtenidas de las raíces infectadas de *Impatiens wallerana* Hook. f. (China) para después preparar una suspensión (como se describe en los procedimientos 4.4.6.1 y 4.4.6.2). Luego se procedió a contabilizarlos, para esto se tomaron 3 alícuotas de 1.0 mL cada una y se colocó dentro de una placa cuenta nematodos. Se observó al Estereoscopio, obteniéndose un promedio de 62 nematodos por mL. (Parámetro de conteo durante el experimento).

El experimento se instaló en tubos de ensayo con 4 tratamientos y 7 repeticiones.

Los tratamientos fueron:

T1 = Solución Hidroalcohólica de 0 ppm (blanco o testigo)

T2 = Solución Hidroalcohólica de 50 ppm

T3 = Solución Hidroalcohólica de 150 ppm

T4 = Solución Hidroalcohólica de 300 ppm.

Las repeticiones consistieron en tomar 1.0 mL de la suspensión de nematodos y colocarlo dentro de un tubo de ensayo, posteriormente se adicionó 3 mL de la solución en estudio.

Se realizaron evaluaciones a 1, 6 y 24 horas de exposición a temperatura ambiente y consistieron en transferir con pipeta volumétrica 1.0 mL de suspensión contenida en el tubo ensayo sobre una placa cuenta nematodos para contabilizar el número de vivos y muertos en ese tiempo de exposición.

El parámetro evaluado fue:

- Número de nematodos vivos y muertos a 1, 6 y 24 horas de exposición.

CAPITULO V

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Recolección, secado, fraccionamiento y molienda de las hojas *Azadirachta indica* (Nim)

La muestra de 350 g color verde de consistencia harinosa, se almacenó en un frasco de vidrio. (Figura N° 13).



Fig. N° 13 Muestra de hojas de *Azadirachta indica* (Nim) después de la molienda

5.2 Instalación de crías de *Meloidogyne sp* (Nematodos parásitos)

El resultado de utilizar *Impatiens wallerana* Hook.f. (China) fue, que esta planta presenta una gran tolerancia al ataque de esta plaga, proporcionando una buena reproducción y propagación dentro de sus raíces. Se obtuvieron nematodos a los 30 días después de la inoculación tanto adultos como larvas juveniles (J2), estos tenían buen movimiento lo cual indica que estaban listos

para diseminarse en el suelo, para penetrar directamente en raíces de plantas y comenzar a alimentarse o esperar varios meses en el suelo. (Figura N° 14)



Fig. N° 14 *Impatiens wallerana* Hook.f. (China), raíces infectadas y larvas de Nematodos.

5.3 Extracción del Principio activo de las hojas de *Azadirachta indica* (Nim) por solvente (Método Soxhlet).

El etanol ofreció ventajas durante la extracción del principio activo, debido a que sus propiedades (menor polaridad que el agua, propiedades conservadoras y baja toxicidad), lo convierten en un solvente extractor de mayor afinidad de principios activos con variada polaridad.

La extracción con etanol al 90° permitió obtener el principio activo en forma de resina. Esta presentaba una coloración verde oscuro, consistencia viscosa. El rendimiento obtenido fue 25.54 g. este extracto se purificó con acetato de etilo (Figura N° 15).



Fig. N° 15 Purificación de extracto con Acetato de Etilo

5.4 Evaluación de las soluciones Acuosas e Hidroalcohólicas sobre larvas de *Meloidogyne sp* (Nematodos parásitos).

Experimento Piloto

Los resultados fueron satisfactorios en relación al parámetro evaluado (Número de nematodos vivos y muertos), pero presentó dificultades al momento de realizar el conteo de nematodos, debido a una excesiva cantidad de solución a evaluar, esto hizo mucho más difícil obtener un número específico para dicho parámetro, por este motivo la prueba tuvo que ser repetida.

Este se usó como referencia y el método que se utilizó fue el que se describe anteriormente en el apartado 4.4.7 y 4.4.8 de la instalación del experimento con las soluciones acuosas e hidroalcohólicas.

Experimento N° 1 Evaluación de Soluciones Acuosas en larvas de *Meloidogyne sp* (Nematodos parásitos). Los resultados se presentan en los cuadros N° 3 y 4, figuras N° 16 y 17.

Cuadro N°3 Número de *Meloidogyne sp* (Nematodos Parásitos) Vivos y muertos después de exposición a 1, 6 y 24 horas en soluciones acuosas.

T	1 Hora de exposición					6 Horas de exposición					24 Horas de exposición				
	V	M	Total	%V	%M	V	M	Total	%V	%M	V	M	Total	%V	%M
T1	31	0	31	100	0	31	0	31	100	0	31	0	31	100	0
R1	31	0	31	100	0	31	0	31	100	0	31	0	31	100	0
R2	23	0	23	100	0	23	0	23	100	0	23	0	23	100	0
R3	19	0	19	100	0	19	0	19	100	0	19	0	19	100	0
R4	24	0	24	100	0	24	0	24	100	0	24	0	24	100	0
R5	18	0	18	100	0	18	0	18	100	0	18	0	18	100	0
R6	20	0	20	100	0	20	0	20	100	0	20	0	20	100	0
R7	19	0	19	100	0	19	0	19	100	0	19	0	19	100	0
M	22	0	22	100	0	22	0	22	100	0	22	0	22	100	0
T2	V	M	Total	%V	%M	V	M	Total	%V	%M	V	M	Total	%V	%M
R1	19	3	22	86	13	3	17	20	15	85	11	3	14	79	21
R2	16	4	20	80	20	2	17	19	11	90	17	3	20	85	15
R3	16	5	21	76	24	5	18	23	22	78	19	4	23	83	17
R4	16	3	19	84	16	4	18	22	18	82	19	2	21	90	10
R5	13	2	15	87	13	3	20	23	13	87	18	6	24	75	25
R6	19	4	23	83	17	1	15	16	6	94	17	9	26	65	35
R7	11	5	16	69	31	5	18	23	22	78	21	2	23	91	9
X	16	4	19	81	19	3	18	21	15	85	17	4	22	81	19
T3	V	M	Total	%V	%M	V	M	Total	%V	%M	V	M	Total	%V	%M
R1	6	6	12	50	50	1	25	26	4	96	0	32	32	0	100
R2	7	4	11	64	36	1	15	16	6	94	0	28	28	0	100
R3	12	10	22	54	46	1	27	28	4	96	0	22	22	0	100
R4	16	13	29	55	45	4	17	21	19	81	0	18	18	0	100
R5	13	9	22	59	41	5	16	21	24	76	0	25	25	0	100
R6	9	4	13	69	31	5	19	24	21	79	0	21	21	0	100
R7	7	7	14	50	50	9	19	28	32	68	0	22	22	0	100
X	10	8	18	57	43	4	20	24	16	84	0	24	24	0	100
T4	V	M	Total	%V	%M	V	M	Total	%V	%M	V	M	Total	%V	%M
R1	0	18	18	0	100	0	18	18	0	100	0	18	18	0	100
R2	0	19	19	0	100	0	19	19	0	100	0	19	19	0	100
R3	0	19	19	0	100	0	19	19	0	100	0	19	19	0	100
R4	0	22	22	0	100	0	22	22	0	100	0	22	22	0	100
R5	0	12	12	0	100	0	12	12	0	100	0	12	12	0	100
R6	0	22	22	0	100	0	22	22	0	100	0	22	22	0	100
R7	0	19	19	0	100	0	19	19	0	100	0	19	19	0	100
X	0	19	19	0	100	0	19	19	0	100	0	19	19	0	100

Abreviatura: V = Vivos, M = Muertos, X = Media, T = Tratamiento, T1 = 0 ppm, T2 = 50 ppm, T3 = 150 ppm, T4 = 300 ppm, %V = Porcentaje de Vivos, %M = Porcentaje de muertos, R = Repeticiones

Los resultados mostrados anteriormente fueron los obtenidos de las soluciones acuosas donde el parámetro evaluado fue: Número de nematodos vivos y muertos a 1, 6 y 24 horas de exposición.

El número de nematodos fue obtenido por cada tratamiento evaluado y para cada repetición. Después se calculó el total de nematodos vivos y muertos, posteriormente los datos se pasaron a porcentaje.

Luego de haber tabulado los datos se calculó el promedio de nematodos vivos y muertos. Se colocaron en una tabla resumen para elaborar los gráficos y de esta manera realizar una mejor interpretación de los resultados.

Cuadro N° 4 Promedios de *Meloidogyne sp* (Nematodos parásitos) vivos y muertos expuestos a soluciones Acuosas de 0, 50, 150 y 300 ppm. A 1, 6 y 24 horas respectivamente.

T	1 Hora de exposición					6 Horas de exposición					24 Horas de exposición				
	V	M	Total	%V	%M	V	M	Total	%V	%M	V	M	Total	%V	%M
0 ppm	22	0	22	100	0	22	0	22	100	0	22	0	22	100	0
50 ppm	16	4	19	81	19	3	18	21	15	85	17	4	22	81	19
150 ppm	10	8	18	57	43	4	20	24	16	84	0	24	24	0	100
300 ppm	0	19	19	0	100	0	19	19	0	100	0	19	19	0	100

Por medio del cuadro N° 4 correspondiente a los promedios de *Meloidogyne sp* (Nematodos parásitos) vivos y muertos expuestos a soluciones Acuosas de 0, 50, 150 y 300 ppm. A 1, 6 y 24 horas respectivamente se elaboraron los gráficos que se muestran en las figuras N° 16 (Nematodos Vivos) y N° 17 (Nematodos Muertos)

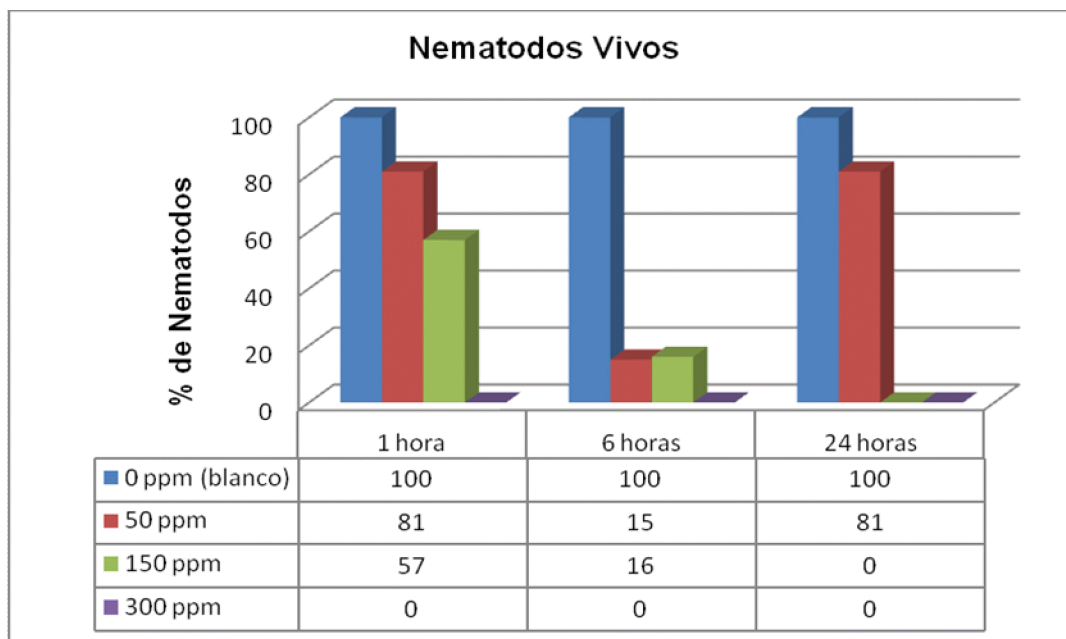


Figura N° 16 Comparación de nematodos vivos expuestos a soluciones Acuosas de 0, 50, 150, y 300 ppm.

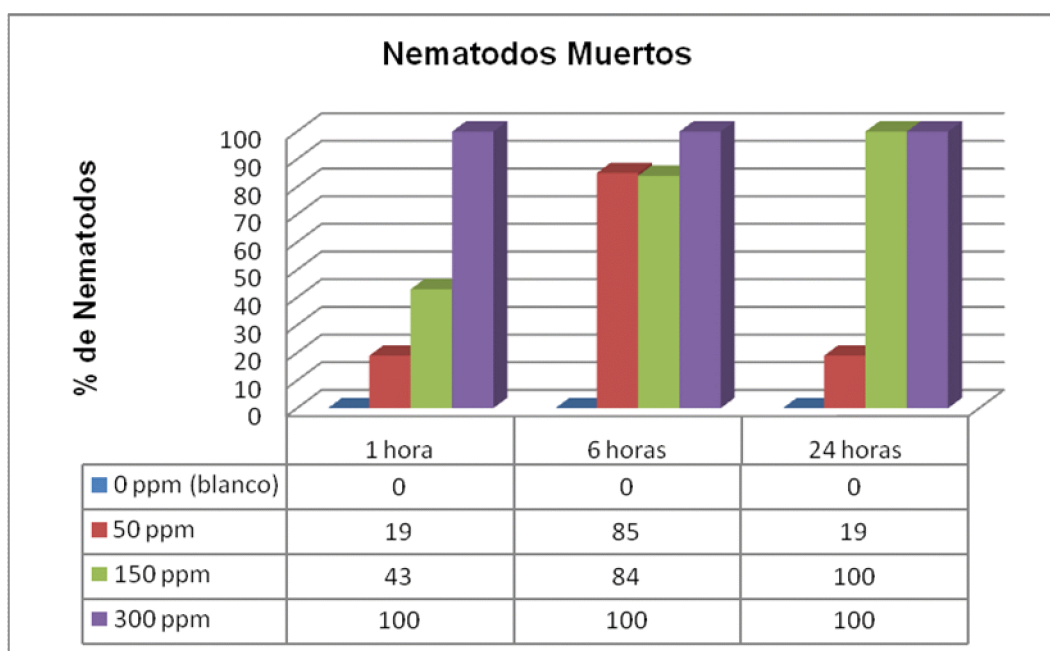


Figura N° 17 Comparación de nematodos muertos expuestos a soluciones Acuosas de 0, 50, 150, y 300 ppm.

De acuerdo a los gráficos de las soluciones acuosas podemos afirmar:

Solución de 0 ppm

A 1, 6 y 24 horas de exposición, el 100% de los nematodos se mantuvieron vivos.

Solución de 50 ppm

A 1 hora de exposición, se observó que el 81% de los nematodos se encontraban vivos y solo el 19% muertos.

A las 6 horas, el 15% de los nematodos se encontraban vivos y 85% muertos.

A las 24 horas, el 81% de los nematodos se encontraban vivos y 19% muertos.

Solución de 150 ppm

A 1 hora de exposición, el 57% de los nematodos se encontraban vivos y el 43% muertos.

A las 6 horas, 16% de los nematodos se encontraban vivos y 84% muertos.

A las 24 horas el 100% estaban muertos.

Solución de 300 ppm

A 1, 6 y 24 horas de exposición, se observó que el 100% se encontraban muertos.

Comparación entre las soluciones acuosas

El T4 (300 ppm) presentó una acción nematicida a la primera hora de exposición, el cual se mantuvo durante las siguientes 24 horas.

El T3 (150 ppm) presentó también una acción nematicida de forma progresiva.

En cuanto al T2 (50 ppm) este mostró un comportamiento menos efectivo por lo que se evidenció una acción nematostática y cercano al T1 (0 ppm).

En las soluciones acuosas, los tratamientos mostraron un efecto tanto nematostático como nematicida de forma progresiva a medida transcurrían las horas de exposición. La acción nematicida la presentaron los tratamientos de T3 (150 ppm) y T4 (300 ppm), mostrando una relación directamente proporcional a la concentración de extracto, ya que a medida que se incremento la concentración, se observó un aumento de nematodos muertos. La concentración del extracto del T2 (50 ppm) no fue la suficiente para ejercer una acción nematicida, observándose a las 6 horas de exposición solamente inmovilidad de los nematodos expuestos, los cuales al ser observados nuevamente a las 24 horas habían recuperado su movilidad, por tanto el efecto ejercido por el extracto fue nematostático.

Experimento N° 2. Evaluación de Soluciones hidroalcohólicas sobre larvas de *Meloidogyne sp* (Nematodos parásitos). Los resultados se presentan en el cuadro N° 5 y 6 en la figura N° 18 y 19.

Los resultados que se muestran en el cuadro N° 5 corresponden al número de ***Meloidogyne sp* (Nematodos parásitos)** vivos y muertos después de 24 horas de exposición en las soluciones hidroalcohólicas y el cuadro N° 6 corresponden a los promedios de ***Meloidogyne sp* (Nematodos parásitos)** los cuales se representan en las figuras N° 18 y 19.

El número de nematodos fue obtenido por cada tratamiento evaluado y para cada repetición. Después se calculó el total de nematodos vivos y muertos, posteriormente los datos se pasaron a porcentaje.

Luego de haber tabulado los datos se calculó el promedio de nematodos vivos y muertos. Se colocaron en una tabla resumen para elaborar los gráficos y de esta manera realizar una mejor interpretación de los resultados.

Cuadro N° 5 Numero de *Meloidogyne sp* (Nematodos parásitos) vivos y muertos después de exposición a 24 horas en soluciones hidroalcohólicas.

T	1 Hora de exposición					6 Horas de exposición					24 Horas de exposición				
	V	M	Total	%V	%M	V	M	Total	%V	%M	V	M	Total	%V	%M
T1															
R1	8	14	22	36	64	0	14	14	0	100	0	14	14	0	100
R2	9	13	22	41	59	0	15	15	0	100	0	15	15	0	100
R3	10	12	22	45	55	0	13	13	0	100	0	13	13	0	100
R4	11	16	27	41	59	0	12	12	0	100	0	12	12	0	100
R5	5	13	18	28	72	0	14	14	0	100	0	14	14	0	100
R6	5	9	14	36	64	0	11	11	0	100	0	11	11	0	100
R7	1	13	14	7	93	0	13	13	0	100	0	13	13	0	100
X	7	13	20	33	67	0	13	13	0	100	0	13	13	0	100
T2															
R1	5	10	15	33	67	0	20	20	0	100	0	20	20	0	100
R2	3	14	17	18	82	0	31	31	0	100	0	31	31	0	100
R3	4	16	20	20	80	0	14	14	0	100	0	14	14	0	100
R4	2	14	16	13	87	0	22	22	0	100	0	22	22	0	100
R5	4	14	18	22	78	0	17	17	0	100	0	17	17	0	100
R6	3	14	17	18	82	0	21	21	0	100	0	21	21	0	100
R7	5	9	14	36	64	0	17	17	0	100	0	17	17	0	100
X	4	13	17	23	77	0	20	20	0	100	0	20	20	0	100
T3															
R1	0	23	23	0	100	0	23	23	0	100	0	23	23	0	100
R2	0	22	22	0	100	0	22	22	0	100	0	22	22	0	100
R3	0	23	23	0	100	0	23	23	0	100	0	23	23	0	100
R4	0	24	24	0	100	0	24	24	0	100	0	24	24	0	100
R5	0	31	31	0	100	0	31	31	0	100	0	31	31	0	100
R6	0	32	32	0	100	0	32	32	0	100	0	32	32	0	100
R7	0	19	19	0	100	0	19	19	0	100	0	19	19	0	100
X	0	23	23	0	100	0	23	23	0	100	0	23	23	0	100
T4															
R1	0	26	26	0	100	0	26	26	0	100	0	26	26	0	100
R2	0	20	20	0	100	0	20	20	0	100	0	20	20	0	100
R3	0	19	19	0	100	0	19	19	0	100	0	19	19	0	100
R4	0	19	19	0	100	0	19	19	0	100	0	19	19	0	100
R5	0	22	22	0	100	0	22	22	0	100	0	22	22	0	100
R6	0	21	21	0	100	0	21	21	0	100	0	21	21	0	100
R7	0	11	11	0	100	0	11	11	0	100	0	11	11	0	100
X	0	20	20	0	100	0	20	20	0	100	0	20	20	0	100

Abreviatura: V = Vivos, M = Muertos, X = Media, T = Tratamiento, T1 = 0 ppm, T2 = 50 ppm, T3 = 150 ppm, T4 = 300 ppm, %V = Porcentaje de Vivos, %M = Porcentaje de muertos, R = Repeticiones

Cuadro N° 6 Promedio de *Meloidogyne sp* (Nematodos parásitos) vivos y muertos expuestos a soluciones Hidroalcohólicas de 0, 50, 150 y 300 ppm.

T	1 Hora de exposición					6 Horas de exposición					24 Horas de exposición				
	V	M	Total	%V	%M	V	M	Total	%V	%M	V	M	Total	%V	%M
0 ppm	7	13	20	33	67	0	13	13	0	100	0	13	13	0	100
50 ppm	4	13	17	23	77	0	20	20	0	100	0	20	20	0	100
150 ppm	0	23	23	0	100	0	23	23	0	100	0	23	23	0	100
300 ppm	0	20	20	0	100	0	20	20	0	100	0	20	20	0	100

Por medio del cuadro N° 6 correspondiente a los promedios de *Meloidogyne sp* (Nematodos parásitos) vivos y muertos expuestos a soluciones hidroalcohólicas de 0, 50, 150 y 300 ppm. A 1, 6 y 24 horas respectivamente se elaboraron los gráficos que se muestran en las figuras N° 18 (Nematodos Vivos) y N° 19 (Nematodos Muertos)

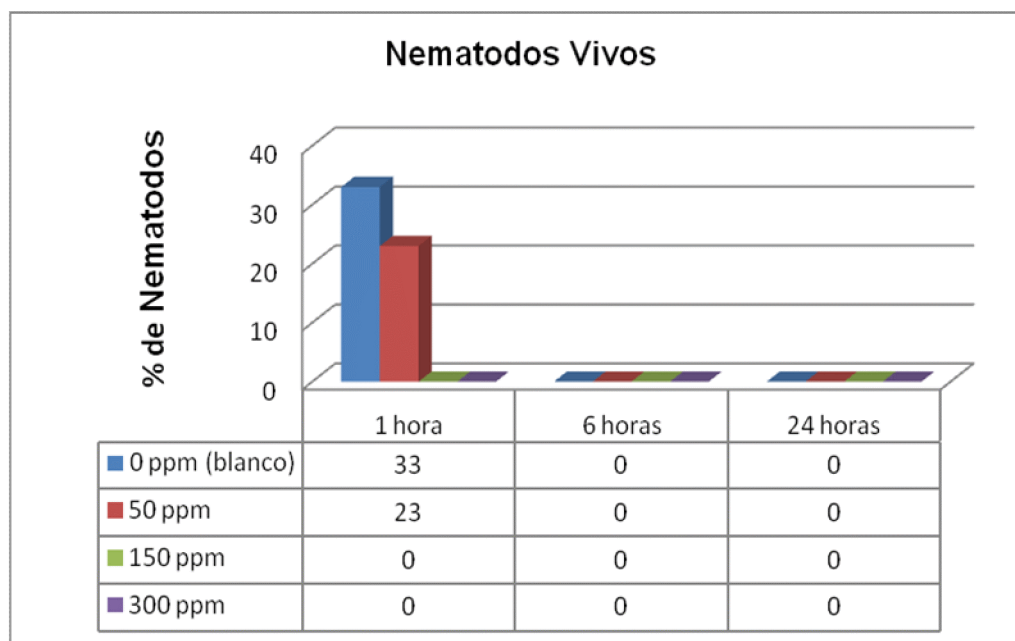


Figura N° 18 Comparación de nematodos vivos expuestos a soluciones hidroalcohólicas de 0, 50, 150, y 300 ppm.

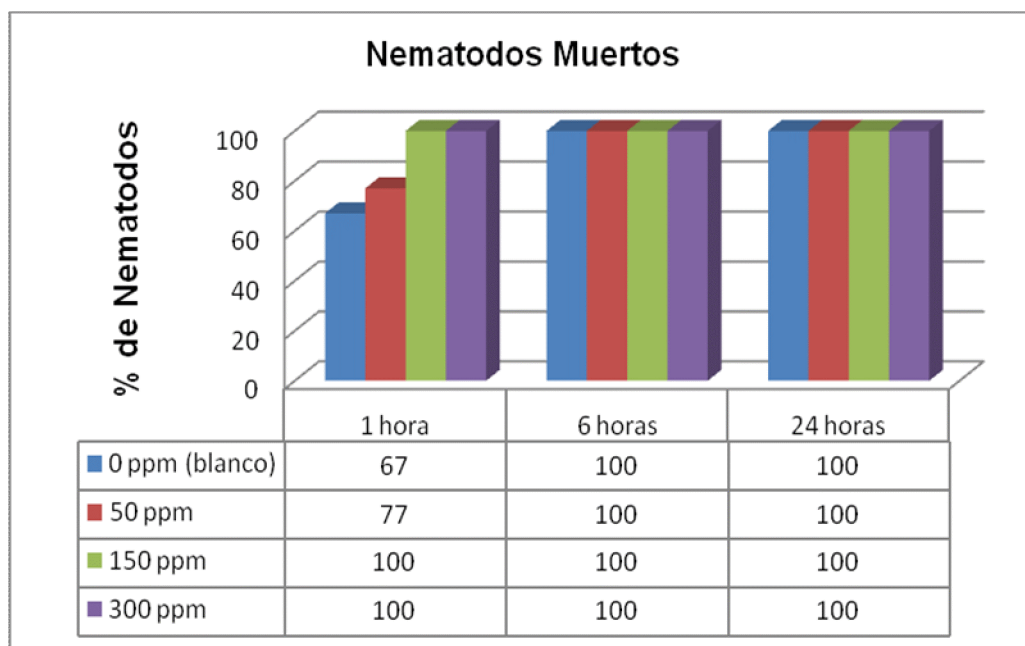


Figura N° 19 Comparación de nematodos muertos expuestos a soluciones hidroalcohólicas de 0, 50, 150, y 300 ppm.

De acuerdo a los gráficos de las soluciones hidroalcohólicas podemos afirmar:

Solución de 0 ppm:

A 1 hora de exposición, se observó que el 33% de los nematodos se encontraban vivos y 67% muertos.

A las 6 y 24 horas, se observaron que el 100% estaban muertos.

Solución de 50 ppm:

A 1 hora de exposición, se observó que el 23% de los nematodos se encontraron vivos y 77% muertos.

A las 6 y 24 horas, se observaron el 100% muertos.

Solución de 150 ppm:

A 1, 6 y 24 horas, se observaron el 100% muertos.

Solución de 300 ppm:

A la 1, 6 y 24 horas se observó el 100% muertos.

Comparación de las soluciones hidroalcohólicas

El T3 (150 ppm) y T4 (300 ppm) mostraron acción nematicida desde la primera hora de exposición.

El T2 (50 ppm) mostró también actividad nematicida desde las 6 horas de exposición.

En cuanto al T1 (0 ppm) se observó una acción nematicida inesperada, debido a que el 67% de los nematodos se encontraron muertos a la primera hora de exposición, y a partir de la segunda evaluación (6 horas) el 100% se encontraron muertos.

Estas soluciones presentaron una acción nematicida desde la primera hora de exposición para los tratamientos de T3 (150 ppm), T4 (300 ppm) y de forma progresiva a partir de las 6 horas para el tratamiento de T2 (50 ppm).

El efecto de estas soluciones fue de una forma rápida y sumativa ejercida por el extracto y el alcohol.

Esta acción se observó en el T1 (0 ppm), el cual debía mantener el 100% de nematodos vivos, pero al realizar las evaluaciones no fue así, y se observó un comportamiento parecido al de todos los tratamientos hidroalcohólicos.

Comparación de las Soluciones Acuosas e Hidroalcohólicas.

Las soluciones hidroalcohólicas tuvieron un efecto más rápido en relación a las soluciones acuosas, esto pudo deberse a una acción sumativa del extracto y el alcohol presente, donde sus propiedades antisépticas pudo causar un daño sobre la cutícula de los nematodos que es la capa más externa, evitando así el

intercambio de gases con el exterior, es decir la respiración, generando un fallecimiento mucho mas rápido en menos tiempo de exposición. De esta manera el principio activo pudo actuar rápidamente sobre los nematodos que se encontraban ya debilitados.

En las soluciones acuosas la acción nematicida la ejerció el extracto de las hojas de ***Azadirachta Indica*** (Nim), debido a la presencia de los metabolitos secundarios principalmente de Azadiractina, esta acción aumento en la soluciones de mayor concentración y con el paso de las horas de exposición.

Los resultados obtenidos del extracto, en el control de ***Meloidogyne sp*** que afectan el cultivo de ***Coffea arabica*** (Café); muestran las propiedades atribuidas a esta especie botánica, que abren paso al estudio y la elaboración de nuevos nematicidas químicos naturales que no contaminen al medio ambiente, reduciendo la utilización de productos agroquímicos (nematicidas sintéticos).

CAPITULO VI

6.0 CONCLUSIONES

1. El método de extracción, por solvente Soxhlet, utilizado para extraer el principio activo de las hojas de *Azadirachta indica* (Nim), fue el adecuado, ya que se pudo extraer la Azadiractina más concentrada y purificada en forma de resina, lo cual es una ventaja sobre otros métodos de extracción y facilita la preparación de las soluciones Acuosas e Hidroalcohólicas a evaluar.
2. A partir de 150 g de hojas que se colocaron en el aparato de extracción Soxhlet, se obtuvo un rendimiento de 25.54 g de principio activo en forma de resina, esta presentaba una coloración verde oscuro y una consistencia viscosa.
3. Las crías de *Meloidogyne sp* se desarrollaron perfectamente en la planta de *Impatiens wallerana* Hook.f. (China), lo cual es beneficioso, ya que se obtiene una buena reproducción de larvas en un período de 30 días, que se observó por la formación de agallas en las raíces.
4. Las soluciones acuosas que presentaron acción nematocida, fueron T3 (150 ppm) y T4 (300 ppm) a partir de la primera hora de exposición, debido a que contenían una mayor concentración de extracto, la cual fue la suficiente para causar la muerte de los nematodos.
5. La solución acuosa T2 (50 ppm) mostró acción nematostática durante el tiempo que duró el experimento, ya que a las 6 horas de exposición se observó inmovilidad de los nematodos, los cuales transcurridas 24 horas de exposición habían recuperado nuevamente su movilidad. Esta acción se debió a la poca concentración de extracto presente en la solución, la cual no fue capaz de causar la muerte de los nematodos.

6. El extracto de hojas de ***Azadirachta indica*** (Nim), presentó acción nematostática en el T2 (50 ppm) y una acción nematicida en los T3 y T4 (150 y 300 ppm) de las soluciones acuosas.
7. La acción nematicida en las soluciones hidroalcohólicas se vio influenciado por la mínima cantidad de alcohol que contenían estas soluciones, el cual dañó la cutícula de los nematodos que es la capa más externa, evitando así el intercambio de gases con el exterior, es decir la respiración, generando un fallecimiento mucho mas rápido en menos tiempo de exposición.

CAPITULO VII

7.0 RECOMENDACIONES

1. Utilizar la planta ***Impatiens wallerana* Hook.f.** (China), para establecer crías de ***Meloidogyne sp*** ya que en ella se obtiene una buena reproducción de larvas en un lapso de 30 días.
2. Mantener conectada la suspensión de nematodos a una fuente de oxígeno después de haber sido extraídos de las raíces, para prolongar su período de vida.
3. Elaborar cartuchos de papel filtro de forma manual para colocar la cantidad requerida de muestra para la extracción, en caso de no contar con cartuchos de celulosa con capacidad para 25 g.
4. Almacenar las soluciones preparadas a partir del extracto de las hojas de ***Azadirachta indica*** (Nim), en lugares frescos y protegidos de la luz solar para evitar la degradación de los principios activos.
5. Preparar soluciones acuosas de ***Azadirachta indica*** (Nim) a mayor concentración para obtener un rápido efecto nematocida, y así disminuir el uso de soluciones hidroalcohólicas para no obtener resultados falsos positivos.
6. Aplicar la misma técnica de extracción a las semillas de ***Azadirachta indica*** (Nim), para obtener una mayor efectividad y verificar si los extractos acuosos e hidroalcohólicos resultan realmente beneficiosos para proteger al cultivo de ***Coffea arabica*** (Café).
7. Identificar en futuras investigaciones la molécula de azadiractina, que según la literatura se encuentra distribuida en todo el árbol de ***Azadirachta indica*** (Nim), utilizando diferentes métodos analíticos como: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), espectrometría de masas y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Agrios, G. 2001. FITOPATOLOGÍA. Limusa. 2da Edición. México, p. 838.
2. Ayala, A.; y otros. 2006. Evaluación de la acción insecticida, repelente y protectora de extractos de *Lantana camara* (Cinco negritos) en el control de *Zabrotes subfasciatus* (Gorgojo de frijol). Trabajo de Graduación Lic. Química y Farmacia. El Salvador, Universidad de El Salvador. p. 65.
3. Ayala, E.; y otros. 2004. Evaluación de la acción insecticida, repelente y disuasiva alimentaria de los extractos acuosos y alcohólicos de dos especies vegetales en el control del gorgojo de maíz (*Sitophilus zeamais*, Motschulsky) sobre los granos almacenados. Trabajo de Graduación Lic. Química y Farmacia. El Salvador, Universidad de El Salvador. p. 35 – 36, 61 – 63.
4. Barillas, B.; y otros. 2008. Evaluación de la acción insecticida, repelente y disuasiva alimentaria del extracto etanólico obtenido a partir de la semilla de *Annona diversifolia* (ANONA) sobre el *Sitophilus zeamais*, Motschulsky (GORGOJO DE MAIZ). Trabajo de graduación Lic. Química y Farmacia. El Salvador, Universidad de El Salvador. p. 63 – 74, 108 – 110.
5. Busquets, J.O.; y otros. 1994. Potencial reproductor del nematodo *Meloidogyne sp* en Cultivos Hortícolas. Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetal 9 (3). p. 493 – 494.
6. Castillo, C.; y otros. 2005. Evaluación de opciones alternativas al uso de agroquímicos para el manejo de nematodos fitoparásitos en el cultivo del

café (*Coffea arabica*) en fincas de Masaya, Granada y Carazo. Trabajo de Graduación Ing. Agr. Nicaragua, Universidad Nacional Agraria. p. ix

7. Dropkin, V. 1980. Introduction to plant nematology. Department of plant pathology. University of Missouri, Columbia. A Wiley Inter Science Publication. USA. p. 293.
8. Einsenback, J. D.; y otros. 1983. Guía para la identificación de las cuatro especies más comunes del nematodo agallador (*Meloidogyne especies*) con una clave pictórica trad. Por Carlos Sosa Moss. p. 74
9. Facultad de Química y Farmacia. 2008. Manual de Laboratorio de Farmacognosia, Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador. p. 18
10. De Guiran, G.; y otros. 1970. Les nematodos du genere *Meloidogyne* parasites de cultures tropicales. CAH Orstom, Sér, Biol, (11): p. 151 – 185.
11. Jiménez L. 1987. Fluctuación estacional de *Meloidogyne incógnita* y *R. reniformis* en Papaya. Revista Turrialba 37 (2) p. 165 – 170.
12. Lordello, L. G. 1977. Nematoides das plantas cultivadas. 4ª ed. Brasil Nobel. p. 197
13. Luc, M.; y otros. 1990. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. C.A.B. INTERNATIONAL. Institute of parasitology. p. 157.

14. NAS (National Academy of Sciences), 1980. Control de plagas de plantas y animales. Control de nematodos parásitos de plantas. Vol. 4. 1ra ed. Editorial Limusa. México. p. 219.
15. Osuna, E. 2005. Uso de Neem para la elaboración artesanal de plaguicidas. (En línea). Consultado 5 de Abril de 2010. Disponible en: http://www.oaidrus-bcs.gob.mx/Info_dependencias/INIFAP/Publicaciones_archivos/NEEM_BIOPLAGUICIDA.pdf
16. Román, J.1978. Fitonematología tropical. Universidad de Puerto Rico. Colegio de ciencias agrícolas. 1ra ed. Derechos reservados por la estación experimental agrícola. Río de Piedras, Puerto Rico. p. 256
17. Rosales, J. 1995. Importancia de los nematodos, su muestreo: en el café de Nicaragua No. 4. Boletín trimestral. Vicegerencia de Investigación y Extensión Cafetalera, UNICAFE. p. 17-28
18. Rusking, F.R.; y otros. 1992. Neem: A Tree for Solving Global Problems Natural Academy Press, Washington D.C. 1992. Second Printing 1993. p. 23, 31 – 36, 39 – 44, 51 – 52.
19. Sandoval, S. C.; y otros. 2002. Caracterización Bioquímica de poblaciones de nematodos del género *Meloidogyne* parásitos del cultivo de cafetos en la zona de Izalco. Trabajo de Graduación Ing. Agr. El Salvador, Universidad de El Salvador. p. 15.

20. Siliezar, A.; y otros. 2009. Propuesta de elaboración de un insecticida a partir de las hojas del árbol de neem, a nivel bibliográfico determinando su efectividad, para implementarse en la zona de Zapotitán, Departamento de la Libertad. Trabajo de Investigación. El Salvador, Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer. p. 35 – 39.
21. Taylor, A. L. 1968. Introducción a la nematología vegetal aplicada. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. p. 131.
22. Taylor, A. L.; y otros. 1983. Biología, Identificación y Control de los nematodos del nódulo de la raíz *Meloidogyne spp.* Carolina del Norte, Estados Unidos, Universidad del Estado de Carolina del Norte. p. 2 – 5, 9 – 11.
23. Villain, L.; y otros. 1996. Evaluation of grafting on *Coffea canephora* var. Robusta, and Chemical treatment for control of *Pratylenchus spp.* In *C. arábica* cropping systems. Producing of Thirid International Nematology Congress. Gosier, Guadeloupe. 1996 Julio, 1996. p. 7 – 12.
24. <http://agronomia.uchile.cl/centros/nematologia/pagina%20menu.htm>
25. Azadirachta indica (en línea). Consultado 28 marzo 2010. Disponible en:
<http://www.fs.fed.us/global/iitf/Azadirachtaindica.pdf>
26. <http://neemcolombia.blogspot.com/2009/03/clasificacion-taxonomica-del-neem.html>
27. http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/neem_roya.htm

28. <http://www.zoetecnocampo.com/Actualidad/Actneem.htm>

29. <http://www.scribd.com/doc/22076794/Caracterizacion-FisicoQuimica-de-los-Extractos-de-la-Semilla-del-Arbol-del-Neem>

30. http://www.floridata.com/ref/i/imp_wall.cfm

31. <http://fichas.infojardin.com/perennes-anuales/impatiens-walleriana-alegria-casa-hogar-miramelindos.htm>

ANEXOS

ANEXO N° 1

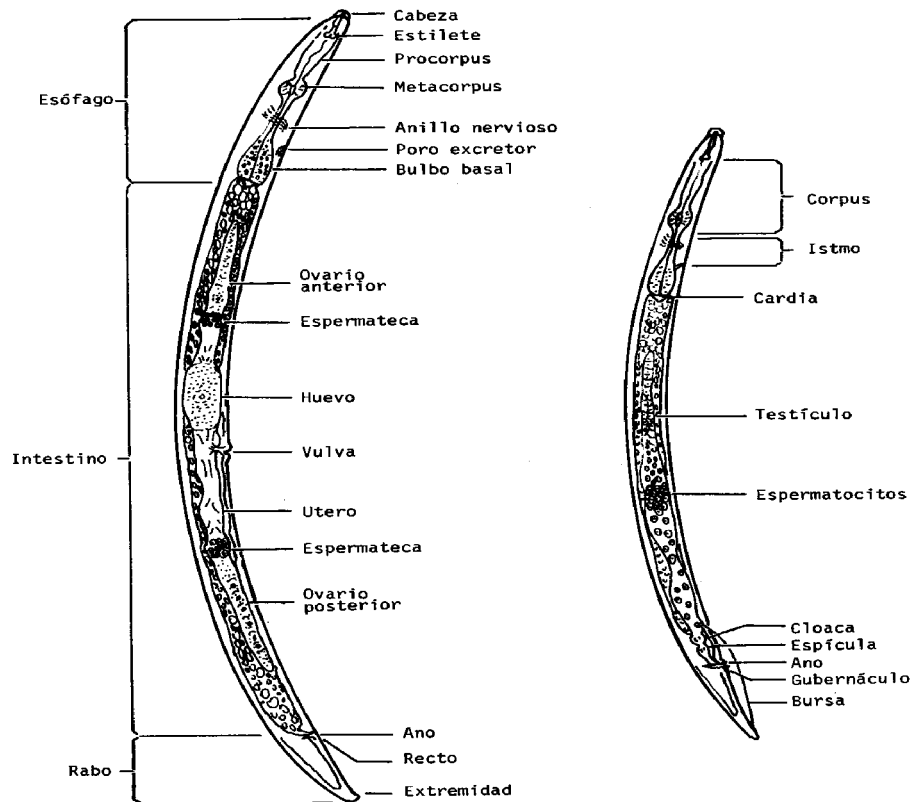


Fig. N° 20 Anatomía de Nematodos fitoparásitos (hembra y macho)

ANEXO N° 2

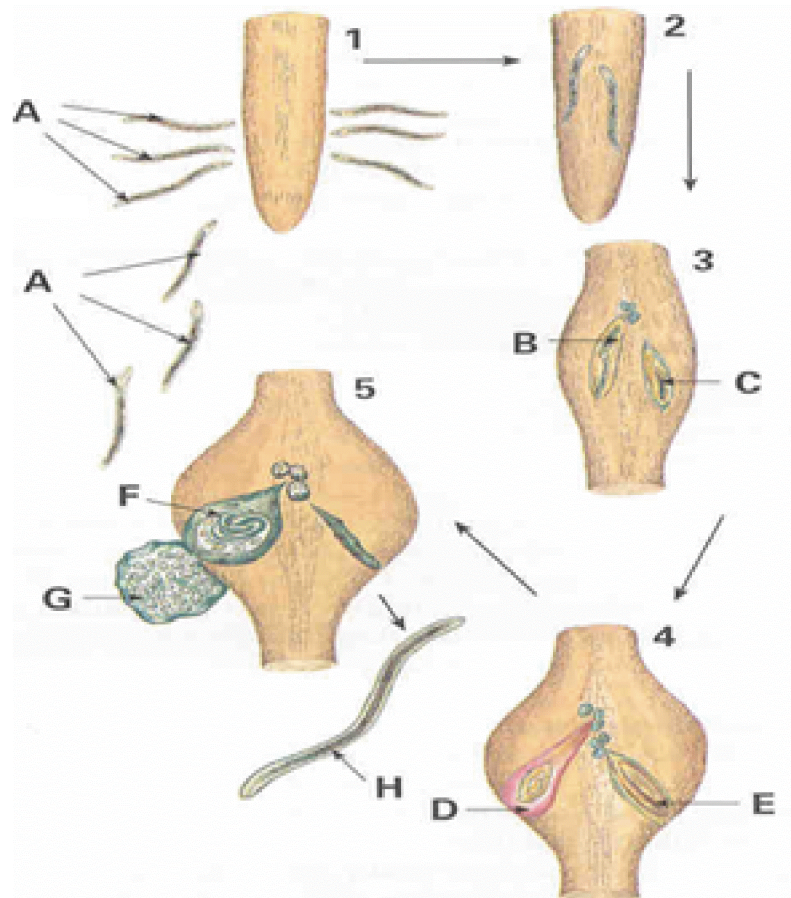


Fig. N° 21 Esquemización del ciclo biológico de *Meloidogyne sp.* **1)** Larva en segundo estadio (J2), **2)** Larva de segundo estadio que acaba de penetrar una raíz, **3)** Inicio de formación de agalla (células gigantes); b: nematodo hembra, c: nematodo macho; larvas de segundo estadio en crecimiento; **4)** Agalla conteniendo: d: hembra adulta; e: macho adulto; desarrollo total de los órganos sexuales; **5)** Agalla conteniendo: f – g: hembra adulta con su masa de huevos en una sustancia gelatinosa; h: Macho adulto libre en su cubierta larvaria

ANEXO N° 3



Fig. N° 22 Planta de *Impatiens wallerana* Hook. f. (China)
con flores

ANEXO N° 4

Cartas



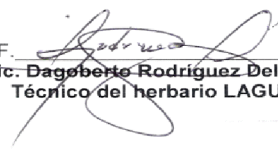
Antiguo Cuscatlán, 20 de Abril de 2010

A quien interese:

Por medio de la presente, yo Dagoberto Rodríguez Delcid, Técnico del Herbario LAGU, Jardín Botánico La Laguna, hago constar que asistieron a estas instalaciones, **Willian Ernesto Galán y José Boris Ramírez** que manifiestan ser estudiantes egresados de la facultad de Química y Farmacia de la Universidad Nacional de El Salvador, con el motivo de certificar un ejemplar de una planta para su trabajo de tesis, denominado: "Evaluación de extractos de hojas de neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) en el control de nematodos fitoparásitos en el cultivo de Café (*Coffea arabica* L.)".

Por lo cuanto hago constar que se trata de:

Familia	Nombre científico
Meliaceae	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.

F. 
Lic. Dagoberto Rodríguez Delcid
Técnico del herbario LAGU

Antiguo Cuscatlán, jueves 26 de agosto de 2010

A quien interese,

Por este medio se hace constar que los bachilleres José Boris Ramírez Meléndez y William Ernesto Galán Cortez se hicieron presentes a las instalaciones de nuestro herbario solicitando la identificación de dos muestras botánicas.

Después de revisado el material y comparado con nuestra colección de referencia, las muestras pertenecen a las especies *Azadirachta indica* A. Juss. de la familia Meliaceae e *Impatiens wallerana* Hook. f. de la familia Balsaminaceae.

Atentamente.



Jorge Alberto Monterrosa Salomón
Jardín Botánico La Laguna
Sección Técnica Científica
Herbario LAGU
Curador



Figura. N° 23 Cartas de identificación de especies botánicas:
Azadirachta indica (Nim) e ***Impatiens wallerana*** Hook.f.
(China)

ANEXO N° 5

Material, Equipo, Solventes y Reactivos

- Agitadores manuales
- Balanza analítica Denver Instruments AA160
- 2 Balones de 1000.0 mL
- 8 Balones de 100.0 mL
- 2 Beakers de 100 y 250 mL
- Bomba de vacío Welch 1402
- 30 tubos de ensayo
- Caja de kleenex
- Cámara extractora de gases Labconco 60830
- Contador de laboratorio Fisher Scientifics
- Cornetas de vidrio Kimax 24/40
- Embudos de cuello corto y largo
- Espátulas
- Estereoscopio
- Estufa
- Extractor multiunidad "Lab Line Instruments"
- Filtro de fondo con motor (filtro para pecera)
- 4 frascos de vidrio medianos
- Gradilla para embudos
- Hojas de ***Azadirachta indica*** (Nim)
- Licuadora Waring Commercial "Laboratory Blender"
- Mangueras de hule
- Macetas de plástico
- Molino eléctrico foliar
- Nematodos del género ***Meloidogyne sp***
- Placa cuenta nematodo
- Papel toalla
- Papel filtro
- Papel parafilm

- Pipetas volumétricas de 1.0, 5.0, 10.0 y 25.0 mL
- Pipeteador
- Pizetas
- Plantas de *Impatiens wallerana* (China)
- Probetas de 10, 50 y 500 mL
- Recipiente de plástico (Guacales)
- Refrigerantes Pirex 45/50
- Rotavapor Brinkmann Instruments
- Tamices N° 500 de 25µm U.S Estándar Testing Sieve
- Tijeras
- Viñetas

SOLVENTES Y REACTIVOS

- Agua destilada
- Acetato de etilo
- Alcohol etílico 90°

ANEXO N° 6



Figura N° 24 Instalación de crías de nematodos en plantas de *Impatiens wallerana* Hook.f. (China).

ANEXO N° 7

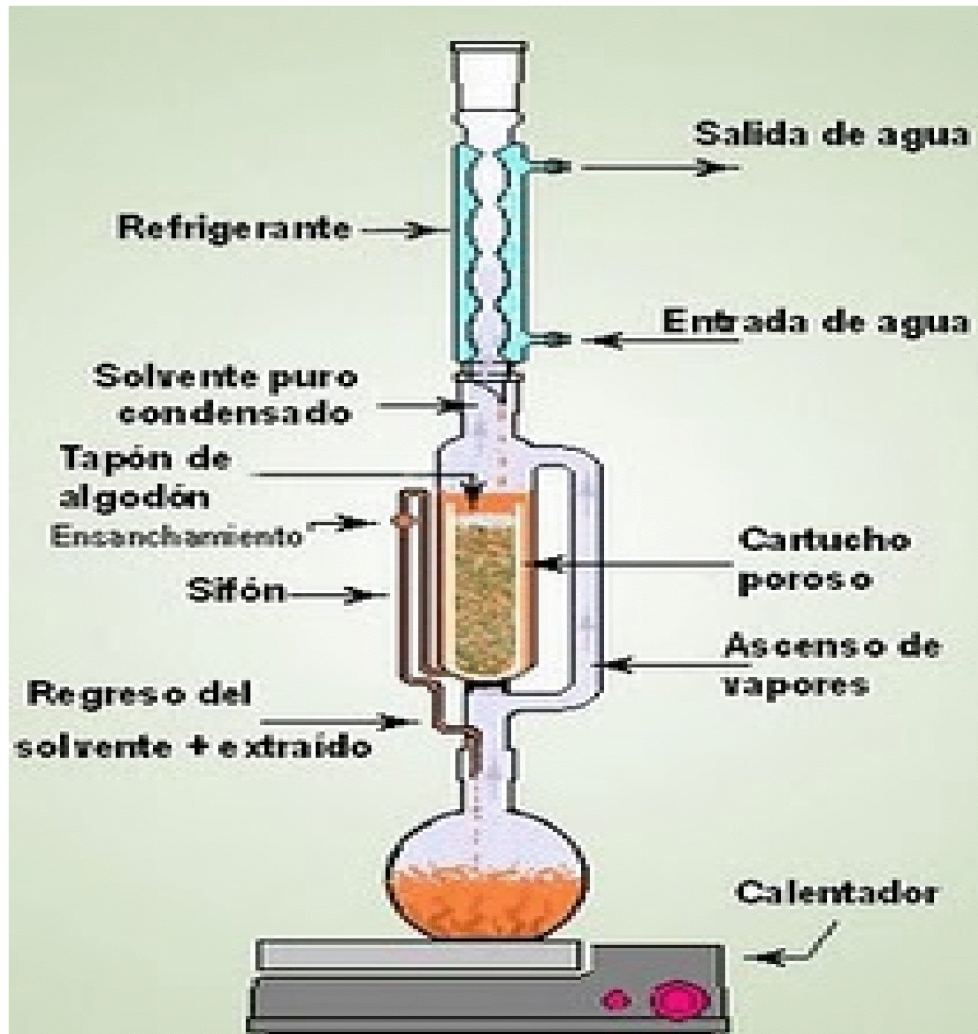


Fig. N°25 Aparato de Extracción Soxhlet. **a)** Cartucho con muestra, **b)** Corneta, **c)** Balón (fondo redondo o plano), **d)** refrigerante.

ANEXO N° 8

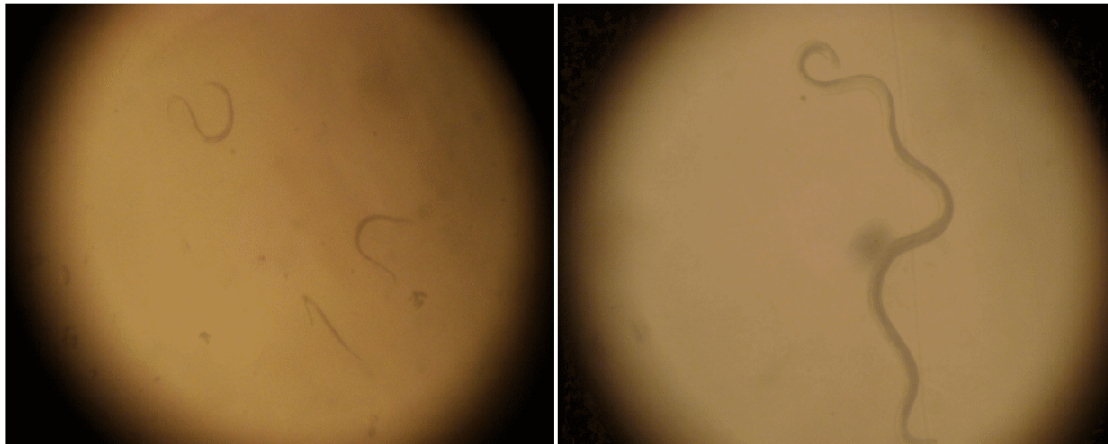


Figura N° 26 Fotografía real de larva y adulto de *Meloidogyne sp*
(Nematodos parásitos) con una vista de 4X