



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tlajomulco



TESIS

Valorización del potencial de especies del género *Artemisia* en el estado de Jalisco como fuente de sustancias nematocidas.

QUE PRESENTA:

Ing. Getsemanin Luz María Ramírez Huerta.

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Héctor Flores Martínez

REVISORES DE TESIS:

**Dra. Norma Alejandra Mancilla Margalli
MC. Carolina León Campos**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN AGROBIOTECNOLOGÍA**

TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA, JALISCO. DICIEMBRE, 2019.

DEDICATORIA

“Dulce es el fruto de la adversidad, que como el sapo feo y venenoso, lleva en la cabeza una preciosa joya”

W. Shakespeare.

Para mi familia, lo mejor de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por haberme guiado a lo largo de mi preparación, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad.

Doy Gracias a mis Padres la Sra. Guadalupe Huerta Baltazar y el Sr. David Ramírez Rodríguez por vivir conmigo mis triunfos y mis fracasos, por los valores que me han inculcado, por el apoyo incondicional que siempre han tenido para mí y mis hermanos, por brindarme una vida llena de aprendizaje, experiencias y sobre todo felicidad. Pero sobre todo, gracias infinitas por ser un ejemplo de vida. Los amo y soy muy bendecida por Dios por haber puesto a personas como ustedes como padres.

A mis hermanos por ser parte importante de mi vida. A Lesdy Ramírez por ser una hermana y amiga incondicional en todas las etapas de mi vida. A Rafael Ramirez por ser un gran hermano. Gracias por llenar mis momentos de alegrías, amor y apoyo.

A Moisés Hernández Dávila porque vives conmigo mis triunfos y fracasos, por el amor, comprensión y apoyo que has tenido para mí en estos años. Gracias mi amor por enseñarme el valor de la perseverancia en el trabajo al perseguir tus sueños y motivarme siempre para que yo logre cumplir los míos.

Agradecimiento al Dr. Héctor Martínez Flores por la confianza y oportunidad brindada para desarrollar el tema de Maestría, por brindarme su apoyo, dedicación y conocimientos. A la M.C. Carolina León Campos, por todo el apoyo y la disposición prestados.

Agradezco a la Dra. Irma Guadalupe López Muraira por su apoyo en el proceso de elaboración de la tesis, además de sus consejos y recomendaciones. Al Ing. Rubén Iruegas Buentello, por brindarme su tiempo y compartir sus conocimientos para el apoyo de este proyecto.

A la Dra. Norma Alejandra Mancilla Margalli por la disposición en cada asesoría, y por todas las aportaciones para la mejora de este trabajo.

A mi mejor amigo Adrián Chavira por el apoyo en momentos difíciles, por estos años de amistad.

A mis compañeros de Maestría, Juan Carlos, Claudia, Mary y Rigo por haber compartido tantos momentos agradables.

Carmen Cortés por compartirme sus conocimientos, su disposición y apoyo en los experimentos realizados.

Mary Vargas un agradecimiento especial por el apoyo en el proceso final.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Género <i>Artemisia</i>	2
2.2 <i>Artemisia ludoviciana</i>	2
2.2.1 Taxonomía	2
2.2.2 Descripción morfológica de la planta.....	2
2.2.3 Aplicación Etnobotánica	3
2.3 Metabolitos con actividad nematocida.....	3
2.3.1 Lactonas sesquiterpénicas	4
2.3.2 Aceites esenciales.....	4
2.3.3 Cumarinas.....	5
2.3.4 Triterpenos limonoides.....	5
2.3.5 Flavonoides.....	6
2.3.6 Alcaloides.....	6
2.3.7 Esteroides	7
2.3.8 Quinonas.....	7
2.3.9 Saponinas	7
2.3.10 Taninos	8
2.3.11 Glucósidos cianogénicos.....	9
2.4 Nematodos fitopatógenos.....	9
2.4.1 Generalidades	9
2.4.2 Descripción morfológica de los nematodos	10
2.4.3 Clasificación.....	10
2.4.4 Género <i>Meloidogyne</i> spp y su impacto.....	12
2.4.4.1 Ciclo biológico.....	13
2.4.4.2 Distribución	15
2.4.4.3 Daño de la planta	16
2.4.5 Métodos de control.....	16
3. JUSTIFICACIÓN	18

4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVO GENERAL	20
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1 Colecta de <i>Artemisia</i>	21
6.2 Identificación botánica de la planta.....	21
6.3 Conservación del material vegetal.....	21
6.4 Análisis fitoquímico.....	22
6.4.1 Frente de retención (Rf).....	23
6.4.1.1 Lactonas sesquiterpénicas.....	24
6.4.1.2 Aceites esenciales.....	24
6.4.1.3 Cumarinas.....	24
6.4.1.4 Triterpenos.....	24
6.4.1.5 Flavonoides.....	24
6.4.1.6 Alcaloides.....	25
6.4.1.7 Grupos esteroidales.....	25
6.4.1.8 Sapogeninas.....	25
6.4.2 Pruebas en tubos de ensayo.....	26
6.4.2.1 Taninos.....	26
6.4.2.2 Quinonas.....	26
6.4.2.3 Saponinas	26
6.5 Ensayos biológicos.....	27
6.5.1 Obtención de extracto para ensayos biológicos	27
6.5.2 Material biológico.....	28
6.5.3 Reproducción y mantenimiento del nematodo.....	28
6.5.4 Extracción de nematodos	29
6.5.5 Diseño experimental.....	30
6.6 Métodos analíticos	31
6.6.1 Cuantificación de lactonas sesquiterpénicas por espectrofotometría UV-VIS.....	31
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
7.1 Colecta de <i>Artemisia</i>	34
7.2 Identificación botánica de la planta.....	34
7.3 Conservación del material vegetal.....	35

7.4 Evaluación fitoquímica	35
7.5.1 Identificación de especie	40
7.6 Métodos analíticos	42
7.6.1 Ensayos biológicos.....	42
7.6.2 Cuantificación de lactonas sesquiterpénicas por espectrofotometría UV-VIS presentes en el extracto etanólico.....	47
8. CONCLUSIONES	49
9. REFERENCIAS CITADAS	50

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Especies reportadas en Herbario de la Universidad de Guadalajara.	21
Cuadro 2. Metodología general de evaluación fitoquímica utilizada.....	27
Cuadro 3. Resultados de perfil fitoquímico. (II) presencia de dos manchas (I) presencia de una mancha (-) no detectado.....	36
Cuadro 4. Resultados del análisis por cromatografía en capa fina (TLC).....	38
Cuadro 5. Análisis fitoquímico en tubos de ensayo.....	39
Cuadro 6. Porcentaje de mortalidad promedio por tratamiento.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Meloidogyne</i> ssp.....	15
Figura 2. <i>Artemisia ludoviciana</i> sbsp <i>ludoviciana</i> establecido en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Tlajomulco.	22
Figura 3. Preparación de muestra a) Triturado de muestra vegetal, b) solventes utilizados.	22
Figura 4. Cámara cromatográfica.....	23
Figura 5. Placa de vidrio Silica gel 60.....	23
Figura 6. Muestreo en campo.....	28
Figura 7. Infestación de plantas de tomate 39 días después de germinación (DDG).	29
Figura 8. Embudo de Baermann modificado.....	30
Figura 9. Centrifuga manual.	30
Figura 10. Diagrama general de limpieza de extracto.....	31
Figura 11. Espectrofotómetro PerkinElmer Lambda XLS+.....	32
Figura 12. Reacción química para la cuantificación de artemisinina.	33
Figura 13. Distribución de especies de <i>Artemisia ludoviciana</i> en el estado de Jalisco.....	34
Figura 14. Hojas de <i>Artemisia ludoviciana</i> sbsp <i>mexicana</i>	35
Figura 15. Secador convectivo.....	35
Figura 16. Evaluación fitoquímica para la detección de lactonas sesquiterpénicas.....	36
Figura 17. Evaluación fitoquímica a) cumarinas, b) flavonoides.	37
Figura 18. Placas de cromatografía de alcaloides.....	38
Figura 19. Pruebas fitoquímicas en tubos a) saponinas, b) taninos, c) quinonas.	39
Figura 20. Pruebas fitoquímicas en tubos para la identificación de presencia de triterpénos. ...	40
Figura 21. Nematodos en raíz de tomate observados en microscopio 10x.	40
Figura 22. Hembra de <i>Meloidogyne</i>	41
Figura 23. Juveniles de <i>Meloidogyne</i>	41
Figura 24. Tinción en raíz a) Huevecillos, b) Juvenil de primer estadio (J1).....	42
Figura 25. Nematodo muerto por extracto de <i>A. ludoviciana</i> sbsp <i>ludoviciana</i> observado en microscopio.	44
Figura 26. Porcentaje de mortalidad por tratamiento.	45
Figura 27. Curva linealizada de porcentaje de mortalidad/t para <i>Artemisia ludoviciana</i> sbsp <i>ludoviciana</i>	46
Figura 28. Curva linealizada de porcentaje de mortalidad/t para <i>Artemisia ludoviciana</i> sbsp <i>mexicana</i>	46
Figura 29. Muestra de <i>Artemisia ludoviciana</i> sbsp <i>ludoviciana</i>	47
Figura 30. Curva de calibración para lactonas sesquiterpénicas.....	48

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo valorar el potencial de especies del género *Artemisia* presentes en el estado de Jalisco como fuente de sustancias nematocidas. Se realizó la colecta de las especies en dos municipios, reportándose *Artemisia ludoviciana* sbsp *ludoviciana* y *A. ludoviciana* sbsp *mexicana*, ambas consideradas malezas de cultivos. Con el fin de ahondar en el conocimiento de estas subespecies se realizó un análisis fotoquímico de las hojas, en el que se evaluó la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios asociados con actividad nematocida: lactonas sesquiterpénicas, aceites esenciales, cumarinas, triterpenos, flavonoides, alcaloides, esteroides, sapogeninas, quinonas, taninos y saponinas.

Mediante ensayos biológicos se evaluó la mortalidad de individuos de nematodos del género *Meloidogyne* con el empleo de extractos de hoja seca obtenidos con etanol al 70%. Los ensayos *in vitro* se realizaron bajo un diseño completamente aleatorizado con 9 repeticiones. La unidad experimental consistió en una caja plástica de 2.5 cm de diámetro y 0.8 cm de altura (15 larvas J2), en presencia del extracto de la planta. Se evaluó la mortalidad a los 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 min, se determinó la mortalidad de los nematodos, considerando como muertos a aquellos que presentaban inmovilidad expresándose el resultado como porcentaje de mortalidad.

El extracto de *Artemisia ludoviciana* sbsp *ludoviciana* es una buena alternativa de producto nematocida al presentar porcentajes de mortalidad de 100% en un tiempo de 90 min.

ABSTRACT

The present study aimed to assess the potential of species of the genus *Artemisia* as a source of nematicidal substances. The species were collected in two townships of the state of Jalisco, reporting *Artemisia ludoviciana* sbsp *ludoviciana* and *A. ludoviciana* sbsp *mexicana*, both considered crop weeds. In order to deepen the knowledge of these subspecies, a phytochemical analysis of the leaves was carried out, in which the presence of the main groups of secondary metabolites associated with nematicidal activity were evaluated: sesquiterpenic lactones, essential oils, coumarins, triterpenes, flavonoids, alkaloids, steroids, saponins, quinones, tannins and saponins.

Biological tests evaluated the mortality of individuals of *Meloidogyne* nematodes with the use of extracts macerated in 70% ethanol. *In vitro* tests were performed under a completely randomized design with 9 repetitions. The experimental unit consisted of a plastic box 2.5 cm in diameter and 0.8 cm high (15 J2 larvae), with plant extract added. Mortality was evaluated at 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 minutes, dead and alive nematodes were quantified and nematode mortality was determined, to those who presented immobility expressed as a percentage of mortality.

The extract of *Artemisia ludoviciana* sbsp *ludoviciana* is a good alternative to a nematicidal product, presenting 100% mortality rates in a time of 90 minutes.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas, a través del tiempo y como resultado de la evolución, han desarrollado estructuras morfológicas y bioquímicas para defenderse de agentes patógenos y depredadores. Existe un amplio repertorio de compuestos químicos llamados metabolitos secundarios, presentes en concentraciones variables en los tejidos vegetales, que participan en la defensa natural de las plantas (Vivanco *et al.*, 2005).

Uno de los principales problemas en la agricultura son los ocasionados por plagas, tales como los nematodos fitoparásitos. Se ha estimado que éstos causan alrededor de \$157 mil millones de pesos en pérdidas agrícolas anuales, la mayoría de las cuales son debidas a nematodos del género *Meloidogyne*, considerados los más dañinos debido a su prevalencia mundial y a las pérdidas de rendimiento causadas a una extensa gama de cultivos (D'Addabbo *et al.*, 2017).

Los nematicidas sintéticos han sido el principal método para el control de nematodos y se ha enfatizado la necesidad de investigar productos menos dañinos para el medio ambiente, como las formulaciones nematicidas derivadas de plantas (D'Addabbo *et al.*, 2017).

Los extractos de algunas plantas han demostrado tener compuestos químicos con propiedades que controlan poblaciones de nematodos de suelo, tal es el caso de la planta *Artemisia annua*, cuyos efectos en el control de *Meloidogyne* spp. han mostrado resultados positivos (D'Addabbo *et al.*, 2017). Los nematicidas derivados de plantas podrían ajustarse bien a los principios del manejo integrado de plagas, gracias a su seguridad para el medio ambiente, los seres humanos y los animales por su modo de acción selectivo y la ausencia de resistencia a las plagas.

Por ello, este estudio tiene como finalidad evaluar el potencial de algunas especies del género *Artemisia* reportadas como maleza para el estado de Jalisco, como posible uso nematicida y de las cuales se sabe muy poco sobre los principios activos que contienen (Ruiz y Suárez, 2015).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Género *Artemisia*

El género *Artemisia* incluye un gran número de especies vegetales, aproximadamente 400. La mayoría de los representantes son hierbas o arbustos aromáticos quienes, en últimas fechas, han adquirido una gran relevancia como fuente de importantes compuestos bioactivos (Rzedowski y Calderón, 1997).

En 1999, Pérez *et al.*, describieron que en México existen ocho especies de *Artemisia*, una de ellas introducida (*A. vulgaris*). Cuatro de estas especies (*A. filifolia*., *A. franseroides*, *A. khlutzchiana* y *A. ludoviciana*) comparten las características de olor fuerte y sabor.

2.2 *Artemisia ludoviciana*

2.2.1 Taxonomía

La taxonomía de esta especie constituye un complejo taxonómicamente muy difícil y es tratado de diversas maneras por muchos autores. Es reconocida como una especie muy variable, dividida en varias subespecies (Rzedowski y Calderón, 1997).

Artemisia ludoviciana es una especie ampliamente distribuida en todo el territorio mexicano y se conoce comúnmente como "estafiate", con propiedades médicas similar a otras especies del mismo género. Se ha informado que también tiene actividad antifúngica contra patógenos de plantas y vertebrados (Damián *et al.*, 2008).

En el Valle de México se distribuye la subespecie *Artemisia ludoviciana ssp. Mexicana*, (sus sinonimias son *Artemisia mexicana*, *A. ghisbreghtiana*). En la Flora de Norteamérica se reconocen seis variedades.

2.2.2 Descripción morfológica de la planta

La CONABIO (2009), describe al estafiate (como se le conoce a *A. ludoviciana*) como una hierba aromática, robusta, a veces un poco leñosa en la base, que crece en manchones y tiene hojas angostas y bicoloras. Presenta un hábito y forma de vida perenne, de 1 a 1.5 m de alto. Generalmente, presenta de varios a muchos tallos, a partir de una base rizomatosa, estriado (con rayas longitudinales) y anguloso, flocoso-

tomentoso (con pelos largos y entrelazadas), 3-5 mm de ancho en la base. Presenta hojas alternas, sésiles o con un pecíolo corto y ancho, a veces agrupados en las axilas de una hoja, de hasta 15 cm de largo, de 1-10 mm de ancho, indivisas y lineares a lanceoladas, elípticas u obovadas a divididas, blanco-tomentosas en ambas caras cuando joven, margen revoluto. La inflorescencia es una panícula o racimo folioso, 20-50 cm de alto, ramas de hasta 30 cm, las cabezuelas generalmente en ramitas secundarias, casi sésiles.

Las cabezuelas a menudo son péndulas. Involucro campanulado, sus brácteas 6 a 16, las interiores de 2 a 4 mm de largo, más o menos tomentosas por fuera; receptáculo hemisférico; flores periféricas 5 a 12, sus corolas angostamente cilíndricas, de 1 a 1.5 mm de largo; flores del disco 6 a 15, sus corolas tubulosas o con la garganta campanulada, de aproximadamente 2 mm de largo, teñidos de púrpuras, que luego cambian a color paja. Sus frutos y semillas son aquenios algo comprimidos, en forma de clavo o elipse, de aproximadamente 1 mm de largo, glabros, café claro, con 12 costillas. Su raíz consiste principalmente en un rizoma.

2.2.3 Aplicación Etnobotánica

Las partes consumidas de la planta son los tallos, hojas y flores en infusiones de té, las cuales antiguamente se empleaba para quitar los dolores que provienen del frío o la flatulencia, también para la cura de cólicos del intestino, contra la debilidad de las manos, lastimaduras de los pies y contra el cansancio. Aunque se ha encontrado que su uso más generalizado es como antihelmíntico, para controlar la disentería y el vómito (Becerra *et al.*, 1993).

2.3 Metabolitos con actividad nematocida

Chitwood (2002), menciona que las plantas compuestas son una gran fuente potencial de compuestos nematocidas, principalmente los constituyentes del metabolismo secundario implicado en los mecanismos de defensa de las plantas contra agentes abióticos y bióticos. Estos compuestos nematocidas se pueden obtener directamente como extractos de plantas, formulaciones fitoquímicas o enmiendas orgánicas, o se pueden usar como compuestos modelo para el desarrollo de derivados sintetizados

químicamente. De entre los principales compuestos a los que se les ha asociado con propiedades nematocidas, se encuentran los siguientes:

2.3.1 Lactonas sesquiterpénicas

Las lactonas sesquiterpénicas constituyen un grupo de terpenoides C₁₅ con un anillo lactónico; son sustancias amargas que se encuentran comúnmente distribuidas en todas las partes de las plantas principalmente en especies de la familia Asteraceae, en concentraciones que varían entre 0.01 y 8% del peso seco, encontrándose las concentraciones mayores generalmente en las hojas; son bastantes solubles en cloroformo y en éter etílico. Presentan gran importancia por la variada acción biológica que han demostrado: acción citotóxica, antitumoral, inhibidoras del crecimiento de bacterias, entre otras (Ruiz y Suárez, 2015).

Constituyen un extenso grupo de productos naturales puesto que se conocen más de 4500 registros reportados en el buscador SciFinderSchola 2018. Estos metabolitos son primariamente clasificadas con base en su esqueleto carbocíclico como germacranólidos, guaianólidos, eudesmanólidos y pseudoguaianólidos, entre otros (Scotti *et al.*, 2012)

La absintina, la cual es un sesquiterpeno dimérico producido por *Artemisia absinthium*, se ha reportado como responsable de una actividad anti-alimentaria en insectos y nematodos (Guesmi *et al.*, 2013).

2.3.2 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas de compuestos volátiles, que incluyen terpenos de bajo peso molecular y constituyentes fenólicos, que tienen una función importante en la defensa química de las plantas contra insectos, patógenos fúngicos y nematodos. Son producidos por especies de plantas aromáticas de muchas familias botánicas.

Debido a la baja toxicidad y la persistencia en el medio ambiente, así como a la baja inducción de resistencia en los organismos objetivo, los aceites esenciales se consideran cada vez mejores candidatos para el desarrollo de nuevas formulaciones nematocidas sostenibles (Lahlou, 2004).

Se ha probado *in vitro* la actividad nematocida de extractos de plantas que contienen aceites esenciales, tales como *Cymbopogon* spp., *Mentha* spp., *Eucalyptus* spp., *Pelargonium graveolens* y *Ocimum basilicum* (Sangwan *et al.*, 1990; Leela *et al.*, 1992; Oka *et al.*, 2000; Pandey *et al.*, 2000; Batish *et al.*, 2008; Ntalli *et al.*, 2010), principalmente contra los nematodos de *Meloidogyne* y el nematodo de madera de pino *Bursaphelenchus xylophilus*.

2.3.3 Cumarinas

Las cumarinas son los metabolitos más comunes derivados de la ruta biosintética del shikimato-corismato (García *et al.*, 2003). Son sustancias solubles en soluciones acuosas o alcohólicas de hidróxido de sodio; además de ser sustancias fluorescentes bastante fotosensibles. Cuando se encuentran en forma de glicósidos, se pueden extraer con metanol o etanol (Valencia, 1995).

Hasta la fecha, se han reportado más de 1500 cumarinas identificadas en más de 800 especies de plantas, que actúan como agentes antimicrobianos y como inhibidores de germinación. Algunas muestran fototoxicidad frente a insectos, tras activarse por luz UV, acción llevada a cabo por bloqueo de la transcripción y de la reparación de DNA, provocando la muerte celular (Ávalos y Pérez, 2009).

2.3.4 Triterpenos limonoides

Los limonoides son un grupo de triterpenos alterados metabólicamente que ocurren en especies pertenecientes a la familia Rutaceae (Akhtar, 2000). De entre los principales compuestos limonoides de importancia comercial se tienen a los provenientes del árbol de neem (*Azadirachta indica*) el cual contiene más de 100 compuestos, que se incluyen azadirachtin, salannin y nimbin (Schmutterer, 1990), funcionan como repelentes e inhibidores del crecimiento de insectos. Azadirachtin es un triterpeno limonoide presente en hojas del neem que demostró efectos contra nematodos fitoparásitos de los nudos de la raíz en experimentos de campo e invernadero en el sur de Italia (D'Addabbo *et al.*, 2017).

Posteriormente, Mojumder y Raman (1999); Rodrigues *et al.*, (2001) demostraron el efecto nematocida de las formulaciones de Azadirachtin sobre especies de nematodos quísticos, como *Heterodera cajani* y *Heterodera glycines* (nematodo del quiste de la

soya). Sepúlveda *et al.*, (2004) mencionan que el triterpenoide cucurbitacina de las raíces de pepino (*Cucumis sativus*) es un compuesto con acción nematocida.

2.3.5 Flavonoides

Ntalli y Caboni (2012), reportaron una actividad nematocida constante para los flavonoides, los cuales son compuestos que presentan un esqueleto carbonado que contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo los principales: antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas. Entre sus funciones se encuentra la defensa y la pigmentación (Ávalos y Pérez, 2009).

En la ruta de biosíntesis de flavonoides, la primera etapa consiste en la condensación de 3 moléculas de malonil-CoA con una molécula de p-cumaril-CoA. Esta reacción está catalizada por chalcona sintasa y da lugar a naringerina chalcona, precursor de los flavonoles y antocianinas (Valencia, 1995).

Los flavonoides son conocidos como tóxicos para los insectos, hongos, bacterias, malezas y nematodos, reportándose una actividad nematocida consistente contra *Meloidogyne incognita* (D'Addabbo *et al.*, 2017). Así mismo, Karr *et al.*, (1990) realizaron estudios con flavonoides procedentes de la planta *Chenopodium ambrosioides*, quienes los identificaron con propiedades nematocidas.

2.3.6 Alcaloides

Los alcaloides constituyen un grupo heterogéneo de sustancias orgánicas nitrogenadas. Tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula y exhiben actividad biológica (Ávalos y Pérez, 2009).

La mayoría de los alcaloides se encuentran en forma de sales de ácidos orgánicos, otros se encuentran en forma de glucósidos o de ésteres de ácidos orgánicos; mientras que en ciertos casos, puede haber un ácido especial asociado a éstos. Los alcaloides ejercen una importante estimulación del sistema nervioso central y autónomo. Algunos actúan como estimulantes para dichos sistemas, mientras que otros, actúan como inhibidores (Verde-Star *et al.*, 2016).

Se ha documentado una actividad nematicida para los alcaloides esteroideos, como la α -tomatina, la α -chaconina y solanina; aunque la actividad más alta contra fitonematodos se reportó para los alcaloides de pirrolizidina de las especies de Fabaceae (Thoden *et al.*, 2009; D'Addabbo *et al.*, 2017). Este primer autor, asimismo, reporta actividad nematicida para extractos de Liliaceae, Apocynaceae y Papaveraceae.

2.3.7 Esteroides

Los esteroides son alcoholes secundarios policíclicos con estructura de ciclopentanofenantreno (Valencia, 1995). Se ha reportado que en algunas plantas, la síntesis de estos compuestos representan mecanismos de defensa constitutivos e inducidos contra patógenos microbianos (Castilla *et al.*, 2009).

2.3.8 Quinonas

Las quinonas son pigmentos que se encuentran en formas libres o combinadas con azúcares formando glicósidos. Se conocen más de 450 estructuras que contribuyen a la coloración de las plantas superiores. Las quinonas naturales varían en su color desde el amarillo pálido hasta el color casi negro. Son dicetonas insaturadas, compuestos muy reactivos, con capacidad para funcionar como sistemas redox, por lo que son sustancias muy activas biológicamente. Su propiedad principal es su poder purgante y se usan como colorantes (Valencia, 1995).

2.3.9 Saponinas

Las saponinas son compuestos triterpenoides o esteroides que generalmente contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura, pudiendo encontrarse como glicósidos esteroideos, glicósidos esteroideos alcaloides o bien glicósidos triterpenos. Sin embargo, también se pueden presentar como agliconas, es decir, sin el azúcar, en cuyo caso se denominan sapogeninas (Ávalos y Pérez, 2009).

En experimentos reportados *in vitro* en 1994 por Omar *et al.*, se encontró que soluciones con 260-280 ppm de saponinas de *Medicago sativa* (alfalfa) reducían las poblaciones totales, el número de masas de huevos y los juveniles viables del nematodo de nudo de la raíz. Una formulación de saponinas de la corteza de quillay (*Quillaja saponaria*) resultó en un control satisfactorio de nematodos aún a dosis menores (San Martín y Magnunacelaya, 2005).

D'Addabbo *et al.*, (2014) mencionan que las saponinas de *Medicago sativa*, muestran una composición química bien caracterizada y actividades biológicas establecidas, las cuales representan buenos candidatos para el control de fitonematodos. Argentieri *et al.*, (2008) y D'Addabbo *et al.*, (2011) en una investigación *in vitro* de los efectos biocidas de las mezclas de saponina de los tejidos de la parte superior y raíz de la alfalfa sobre *Xiphinema index*, *Meloidogyne incognita* y *Globodera rostochiensis*, demostraron que las saponinas de ambas partes de la planta eran nematotóxicas para las tres especies de fitoparásitos y su actividad dependía de la concentración y el tiempo de incubación de los nematodos.

Debido a sus características químicas, físicas y fisiológicas, las saponinas naturales muestran un amplio espectro de efectos biológicos y farmacológicos que también incluyen actividades fungicidas, molusquicidas, antibacterianas y antivirales. Los efectos biológicos de las saponinas normalmente se atribuyen a su interacción específica con las membranas celulares, ya que causan cambios en la permeabilidad celular (D'Addabbo *et al.*, 2017).

2.3.10 Taninos

Los taninos son compuestos fenólicos poliméricos que se unen a proteínas, desnaturalizándolas, documentados por su actividad contra los nematodos fitoparásitos (Hewlett *et al.*, 1999).

El nombre de tanino procede de la antigua práctica de utilizar extractos vegetales para convertir la piel animal en cuero (en el curtido, se unen al colágeno aumentando su resistencia al calor, al agua y a microorganismos). Existen dos categorías: taninos condensados y taninos hidrolizables. Generalmente son tóxicos debido a su capacidad de unirse a proteínas. También actúan como repelentes alimenticios de muchos animales, como en el caso de los mamíferos, los que evitan plantas o partes de plantas que contienen altas concentraciones de taninos. Esto también ocurre en los frutos inmaduros, en los que se concentran los taninos en su piel (Ávalos y Pérez, 2009).

Se encontró que los tratamientos del suelo con ácido tánico controlan eficazmente la infestación del nematodo de nudo de la raíz (*Meloidogyne arenaria*) sobre la calabaza (Mian y Rodríguez-Kabana, 1982). La aplicación al suelo de una formulación comercial

de los taninos de castaño (*Castanea sativa*) redujo significativamente la población de *Meloidogyne javanica* en tomate en maceta (D'Addabbo *et al.*, 2017).

2.3.11 Glucósidos cianogénicos

Los glucósidos cianogénicos son derivados de aminoácidos liberadores de cianuro, que participan en la defensa de más de 2500 especies de plantas contra depredadores y parásitos. El cianuro es uno de los productos de descomposición de la hidrólisis de la b-glucosidasa. (Mojtahedi *et al.*, 1993; Widmer y Abawi, 2000).

El abono verde de *Sorghum sudanens* es ampliamente reportado por su capacidad de supresión en nematodos de nudo de la raíz (*Meloidogyne*), debido al efecto de fumigación en el suelo del cianuro liberado por la hidrólisis de dhurrin, un glucósido cianogénico (D'Addabbo *et al.*, 2017).

Derivado de lo anteriormente expuesto, fue de especial interés para el presente estudio, la caracterización de las especies del género *Artemisia* localizadas en el estado de Jalisco, con el fin de manifestar su potencial actividad nematocida, permitiendo con ello incrementar su valor como fuente de ingredientes activos para el desarrollo de nuevas formulaciones de productos a base de extractos de plantas que puedan ser introducidas en el mercado.

Las evaluaciones fitoquímicas son un medio preciso y rápido para determinar el tipo de metabolitos secundarios presentes en una muestra vegetal (Babu y Savithramma, 2013), por lo que fue la metodología utilizada para este propósito.

2.4 Nematodos fitopatógenos

2.4.1 Generalidades

Los nematodos parásitos de plantas son un grupo de gusanos microscópicos que viven en el suelo y atacan las raíces o partes aéreas de la mayoría de los cultivos. Constituyen una limitación significativa para la agricultura de subsistencia y pueden ser difíciles de controlar. En general, los nematodos fitoparásitos causan pérdidas anuales entre 11 y 14% en cultivos de importancia económica como leguminosas, granos, banano, yuca, coco, remolacha azucarera, caña de azúcar, papa, hortalizas y varios frutales, equivalentes a USD\$80 billones al año (Guzmán *et al.*, 2012).

Orion y Kritzman (1991), describieron los nematodos del género *Meloidogyne* como endoparásitos sedentarios, los cuales una vez localizado su sitio de alimentación, permanecen incrustados en la raíz infestada de la planta.

2.4.2 Descripción morfológica de los nematodos

Los nematodos fitopatógenos son organismos pequeños de 300 a 1000 μm de largo y entre 15 y 35 μm de ancho; su tamaño los hace invisibles a simple vista, pero pueden ser fácilmente observados con la ayuda de un microscopio o estereoscopio (Agrios, 2005; Guzmán *et al.*, 2012).

El cuerpo de un nematodo es más o menos transparente, cubierto por una cutícula incolora que a menudo presenta estrías u otras características. Esta cutícula presenta la muda cuando los nematodos pasan a través de sus etapas larvarias sucesivas (Agrios, 2005).

Según el género, tienen en la región anterior (cabeza) un estilete hueco (estomatoestilete u odontoestilete) también llamado “lanza”, pero hay algunos con estilete sólido modificado (onquioestilete) (Guzmán *et al.*, 2012).

El estilete es usado para perforar o penetrar las células de las plantas y a través de él extraer los nutrientes, causando enfermedades en diferentes cultivos (Guzmán *et al.*, 2012).

Las hembras de algunas especies cuando llegan al estado adulto son abultadas con forma de pera o esfera (Agrios, 2005).

2.4.3 Clasificación

Guzmán *et al.*, (2012) mencionan una clasificación de los nematodos fitoparásitos del sistema radical como:

- Ectoparásitos: Son los nematodos que se alimentan sin penetrar a las raíces. En general, los ectoparásitos son de mayor tamaño y con estiletes más largos.

Estos nematodos se dividen en ectoparásitos migratorios y sedentarios.

Los ectoparásitos migratorios, se caracterizan por tener un estilete generalmente largo, alimentarse manteniendo el cuerpo fuera del tejido de la raíz, poner los huevos

individualmente en el suelo o en la rizósfera, y todos sus estados de desarrollo son parasíticos; como ejemplos de este grupo, están los géneros: *Hemicriconemoides*, *Longidorus*, *Trichodorus*, *Paratrichodorus*, *Belonolaimus*, *Criconemella*, *Xiphinema*, *Paratylenchus*, entre otros.

Los ectoparásitos sedentarios, se caracterizan por tener un cuerpo generalmente grueso y en forma de salchicha, alimentarse por largo tiempo de una célula y poner los huevos dispersos en el suelo. Como ejemplos representativos, están los géneros *Criconemella* y *Criconema*.

Otra clasificación de los nematodos ectoparásitos se basa en el tamaño del estilete y se conocen como ectoparásitos con estilete corto, los cuales se alimentan principalmente sobre la epidermis, células corticales y pelos absorbentes de las raíces, entre estos se encuentran los géneros *Tylenchorhinchus*, *Trichodorus*, *Paratrichodorus* y algunas especies de *Helicotylenchus*.

- Endoparásitos: Son los nematodos que penetran completamente dentro de las raíces; por consiguiente, se alimentan, se desarrollan y ponen los huevos en su interior o adheridos a ellas. De igual manera que los ectoparásitos, estos nematodos se dividen en endoparásitos sedentarios y migratorios.

Los endoparásitos sedentarios, se caracterizan por tener un estilete pequeño y delicado; las hembras inmaduras y juveniles entran al tejido de la planta donde desarrollan un sitio de alimentación fijo e inducen la formación de un sofisticado sistema trófico de células de abrigo (cuidar, criar) llamado sincitia (células gigantes), se tornan inmóviles, adquieren una forma abultada para formar y depositar los huevos. Los machos carecen de aparato digestivo funcional. Como ejemplos representativos de este grupo, están *Globodera*, *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Nacobbus*, *Punctodera* y *Cactodera*.

Los endoparásitos migratorios, retienen su movilidad y no están fijos en un sitio de alimentación dentro de los tejidos de la planta. Se alojan y migran a través de los tejidos, no forman células modificadas de alimentación, ni saco de huevos, y todos sus estados de desarrollo son parasíticos. Ejemplos representativos de este grupo son: *Hirschmanniella*, *Radopholus* y *Pratylenchus*.

- Semi-endoparásitos. En este caso, solamente la parte anterior del nematodo penetra las raíces y la parte posterior permanece en contacto con el suelo. Aunque algunas formas pueden penetrar parcialmente las raíces con la parte anterior de su cuerpo, la parte posterior de las hembras se proyecta desde las raíces y llega a adquirir forma abultada. Los juveniles o hembras inmaduras raramente penetran las raíces del hospedante completamente. En general, el tamaño de los nematodos y la longitud del estilete son intermedios comparados con los endoparásitos y ectoparásitos. Estos nematodos se dividen en semi-endoparásitos sedentarios y semiendoparásitos migratorios. En los primeros, las hembras se alimentan con el cuerpo parcialmente embebido en las raíces, son de forma irregularmente abultada, poseen un saco de huevos y se alimentan de células modificadas. Ejemplos representativos son: *Tylenchulus semipenetrans*, *Rotylenchulus reniformis* y los géneros *Sphaeronema* y *Tylenchulus*. En los semi-endoparásitos migratorios, las hembras introducen parte de su cuerpo en el tejido, conservan su aspecto vermiforme, depositan los huevos libremente en el suelo, se alimentan de células no modificadas.

2.4.4 Género *Meloidogyne* spp y su impacto.

Perry y Moens (2009), describen que el género *Meloidogyne*, agrupa a los nematodos formadores de agallas, el cual comprende a más de 90 especies descritas. Los nematodos de este género son endoparásitos sedentarios quienes tienen cerca de 2,000 hospederos, entre ellos: hortalizas, frutales, ornamentales, forestales y cereales, pueden soportar temperaturas entre los 0 a 35 °C.

La población de nematodos se concentra principalmente a una profundidad de 10-25 cm de suelo, pero se han encontrado casos de su presencia a más de 5 m (Salmerón y Cabello, 1989; Salazar, 2013).

La gravedad del daño causado por *Meloidogyne* puede ser específica de la especie y también puede variar según el huésped, la rotación de cultivos, la estación y el tipo de suelo (Greco *et al.*, 1992). Del mismo modo, los umbrales económicos varían, principalmente dependiendo de estos mismos factores. Se han establecido umbrales de daño para varios cultivos, donde el promedio es de aproximadamente 0.5–2 juveniles / g de suelo (o desde los límites inferiores de detección, más de 1000 individuos / 500 cm³

de suelo). Cabe mencionar que el Umbral Económico de Daño (U.E.D.) es una densidad mínima de fitófagos plaga que causa un daño económico en la cosecha, cuyo valor es al menos igual que la medida de control. Si se supera ese umbral, es decir, ese valor de fitófagos, entonces se entra en una zona en la que el daño producido es de valor superior a la medida de control.

Además de los costos directos, los nematodos del nudo de la raíz causan costos indirectos debido al estado de cuarentena de algunas especies de *Meloidogyne* en varios países o regiones. Por ejemplo, *Meloidogyne chitwoodi* está cada vez más regulado porque es una plaga grave de papa y otros cultivos económicamente importantes como la zanahoria, y la distribución geográfica conocida aún es relativamente limitada. Está en la lista de plagas prohibidas de muchos países (Canadá, Europa, México y otros países de América Latina y el Lejano Oriente) (Hockland *et al.*, 2006).

2.4.4.1 Ciclo biológico

El ciclo de vida de *Meloidogyne* es típico de otros tipos de nematodos, comenzando por estadio huevo, que se incuba en las raíces de la planta; cuatro estadios juveniles (J1 a J4), donde el primero de ellos ocurre aún en el huevo y el estadio adulto, que pudiera ser hembra o macho, en donde éste último puede ser ausente, puesto que la reproducción es partenogénica (Figura 1). La duración de cada uno de estos estadios difiere en cada especie y depende de otros factores como la temperatura, la humedad y la planta hospedante (Hernández *et al.*, 2012).

La hembra es sedentaria, continúa alimentándose hasta el momento de depositar los huevos, tiene forma de pera cuando es madura, la región del cuello sobresale para, de esta manera, tener movilidad y que los huevos se alimenten de los nutrientes que son absorbidos a través de la pared del nematodo. Las hembras depositan los huevos dentro de un saco gelatinoso, el cual es producido por las glándulas rectales de la misma. Este saco consiste en una estructura muy compleja que puede llegar a ser más grande que la hembra misma y está compuesto de varias proteínas, mucopolisacáridos, compuestos antimicrobianos y enzimas, mismo que es colocado por la hembra en la raíz de la planta. La masa de huevos es inicialmente suave, pegajosa e hialina, pero se vuelve más firme y color marrón oscuro con la edad (Manzanilla-López y Marbán-Mendoza, 2012).

Dentro del huevo, la embriogénesis procede al juvenil de primer estadio (J1), que muda al juvenil de segundo estadio conocida como la etapa pre-parasitaria o infecciosa (J2), ésta dependerá principalmente de la temperatura y la humedad suficientes; las características de J2 radican en ser vermiforme con una longitud de 20 μm , el cual penetra la raíz del huésped para establecer un sitio de alimentación que facilite su desarrollo, es altamente móvil pues se mueve intracelularmente al sitio de alimentación a través del protoxilema y protofloema de la planta, induciendo a las células a diferenciarse en “células gigantes” (nódulos, agallas); es delgado y guarda reservas de alimentos. Éste estadio (J2), puede sobrevivir en el suelo en estado de reposo durante un período prolongado que dependerá de la reserva de alimento que se encuentre en el intestino. En condiciones favorables, la etapa pre-parasitaria, muda al juvenil de la tercera etapa (J3) después de 14 días, posteriormente al juvenil de cuarta etapa (J4) la cual ocurre generalmente de 4 a 6 días. En este estadio (J4), el nematodo carece de estilete funcional impidiendo de esta manera alimentarse para finalmente llegar a la etapa adulta (Perry y Moes, 2009).

Los machos son vermiformes como los juveniles. Este estado se produce hasta después de la tercera etapa juvenil en donde dejan de alimentarse y se encuentran dentro de las cutículas de la raíz, después se libera el adulto en la cuarta muda completamente formada, para posteriormente emigrar en busca de hembras adultos (Manzanilla-López y Marbán-Mendoza, 2012).

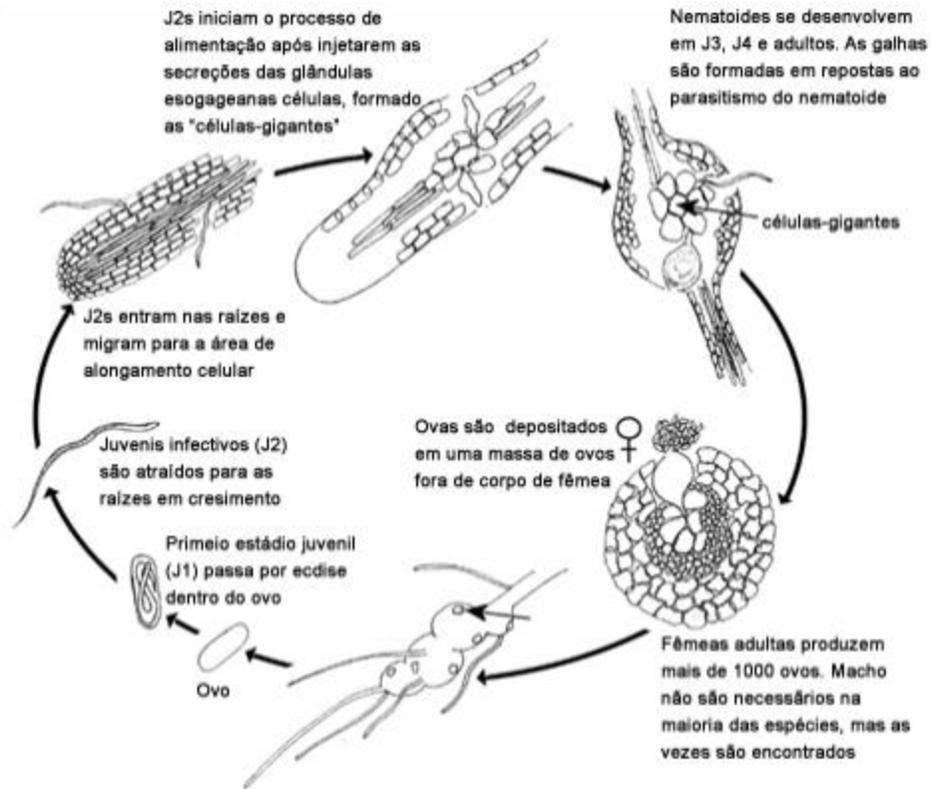


Figura 1. Ciclo de vida de *Meloidogyne ssp.*

2.4.4.2 Distribución

El nematodo agallador está distribuido en todo el mundo, aunque ocurre con mayor frecuencia y abundancia en regiones con clima cálido y tórrido con inviernos cortos y moderados. Considerando su temperatura mínima de 10 °C y a partir de la cual pueden completar su ciclo biológico (Perry y Moes, 2009).

Cid del Prado *et al.*, (2001) menciona que está presente en varias zonas agrícolas de México, atacando a un gran número de especies cultivadas, donde ocasiona pérdidas de consideración en el rendimiento y productividad.

Las especies que se han reportado para México son *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. hapla*, *M. chitwoodi*, *M. enterolobii* y *M. paranaensis*. Las últimas dos especies fueron reportadas recientemente en Veracruz, infectando sandía (Ramírez-Suárez *et al.* 2014) y plantas de café respectivamente (López-Lima *et al.* 2015). Ambas especies, e incluyendo *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, también han sido detectadas en tomate (Guzmán-Plazola *et al.*, 2006; Martínez-Gallardo *et al.*, 2015), papa (Tovar, 1994), piña (Domínguez, 2001; Rebolledo *et al.*, 2002), vid (Ramírez, 1989),

guayaba (Franco-Navarro, 2000) y plátano (Adriano-Anaya *et al.*, 2008; Lara-Posadas *et al.*, 2016)

2.4.4.3 Daño de la planta

Individuos del género *Meloidogyne* son conocidos por su habilidad para producir cambios fisiológicos en el sistema radicular de las plantas y causar pérdidas en la absorción de nutrientes afectando su crecimiento (enanismo) y su producción (Jaramillo-Pineda *et al.*, 2015).

Según Agrios (2005), la mayoría de los daños parecen ser causados por la secreción de saliva introducida en los tejidos de las plantas durante el proceso de alimentación. Cabe recordar que estos nematodos perforan la pared celular, introducen saliva dentro del citoplasma y extraen parte del contenido celular.

El proceso de alimentación causa una reacción en las células de las plantas afectadas, resultando en la muerte o debilitamiento de los extremos de las raíces, formación de lesiones y rompimiento de tejidos, formación de agallas, arrugamiento y deformación en tallos y hojas. Estas manifestaciones son causadas por la descomposición del tejido afectado por las enzimas del nematodo, la cual causa desintegración del tejido y muerte de las células (Perry y Moens, 2009; Luc *et al.*, 2005).

2.4.5 Métodos de control

El método de control más utilizado es el uso de nematicidas químicos que, además de costosos, son altamente contaminantes (Vinueza *et al.*, 2006).

Solano (2012) y Solano *et al.*, (2014) mencionan que en los últimos años se han utilizado sustancias activas como el Carbofurán (Furadán), Fenamiphos (Nemacur), Oxamyl (carbamato), Terbufos (organofosforado), Ethoprofos (organofosforado), Dazomet (Basamid), Azadirachtina y Bromuro de metilo (BM). Estos productos causan severos daños medioambientales, como es la contaminación de los mantos acuíferos, el suelo y el aire debido a su alta residualidad, principalmente debida al uso inadecuado. Adicionalmente son muy costosos, lo cual asimismo incide en muchos casos para que el retorno de la inversión sea igual o menor a lo producido.

Buscando controlar a los nematodos fitoparásitos, con criterios ecológicos y económicos, diversos investigadores han realizado aportes importantes sobre los efectos nematicidas o nematostáticos de algunas plantas, como hojas, semillas y raíces en forma de extractos acuosos o simplemente como abono verde, obteniendo resultados prometedores (Vinueza *et al.*, 2006).

Las plantas son una gran fuente de compuestos nematicidas, principalmente constituyentes del metabolismo secundario implicado en los mecanismos de defensa de las plantas contra agentes abióticos y bióticos. Estos compuestos nematicidas se pueden explotar directamente como extractos de plantas, formulaciones fitoquímicas o enmiendas orgánicas, o se pueden usar como compuestos modelo para el desarrollo de derivados sintetizados químicamente (D'Addabbo *et al.*, 2017).

Estos extractos vegetales presentan algunas ventajas sobre los pesticidas sintéticos, algunos de ellos son ofrecer nuevos compuestos que las plagas no pueden inactivar, son menos concentrados, por lo que son menos tóxicos que los compuestos puros, sufren biodegradación rápida, pueden poseer múltiples modos de acción, haciendo posible un amplio espectro de usos en cuanto tienen una acción selectiva dentro de cada clase de plaga (Vinueza *et al.*, 2006). Además, se pueden combinar fácilmente con otras prácticas de control, como la solarización del suelo, agentes de control biológico, pueden también resultar en una mejora de las propiedades físicas y químicas del suelo (D'Addabbo *et al.*, 2017).

3. JUSTIFICACIÓN

Los nematodos del género *Meloidogyne* por naturaleza son fitopatógenos, pero sus interacciones con otros agentes causantes de enfermedades dificultan medir su verdadero impacto en el rendimiento de los cultivos y su estimativo.

Sin embargo, se estima que éstos causan pérdidas anuales entre 11 y 14% en cultivos de importancia económica como, leguminosas, granos, banano, yuca, coco, remolacha azucarera, caña de azúcar, papa, hortalizas y varios frutales por mencionar algunos, equivalentes a US\$80 billones por año.

El género *Artemisia* incluye un gran número de especies, aproximadamente 400. La mayoría de los representantes son hierbas o arbustos aromáticos los cuales, en últimas fechas, han adquirido una gran relevancia como fuente de importantes compuestos bioactivos. A pesar del creciente interés en este género y de que Jalisco cuenta con al menos dos especies pertenecientes al mismo, se sabe muy poco sobre los compuestos químicos que están presentes en ellas. Mediante la caracterización de sus componentes y la cuantificación de metabolitos de importancia como lo son las lactonas sesquiterpénicas, se pretende valorizarlas a través de su posible aplicación nematicida en prácticas agrícolas, puesto que los extractos botánicos presentan ventajas con respecto a la utilización de productos sintéticos. Actualmente, en el manejo de nematodos se emplean nematicidas o fumigantes de suelo del grupo de los organofosforados (aldicarb, carbofuran), fosforados (fensulfothion, fenamiphos), que por su composición química son tóxicos para los animales y plantas e interfieren en su ciclo de vida, con efectos nocivos sobre el medio ambiente y la salud humana. Asimismo, la inadecuada gestión del uso de plaguicidas ha inducido resistencia de plagas y enfermedades por su capacidad de mutación, generando un problema de grandes proporciones, situación que en mucho podría verse disminuida con la utilización de nematicidas naturales.

4. HIPÓTESIS

Las especies del género *Artemisia* presentes en el estado de Jalisco tienen potencial agroindustrial como fuente de sustancias nematocidas contra especies del género *Meloidogyne*.

5. OBJETIVO GENERAL

Valorar el potencial de dos especies del género *Artemisia* en el estado de Jalisco como fuente de sustancias nematocidas sobre el género *Meloidogyne*.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Evaluar la presencia de dos especies del género *Artemisia* distribuidas en el estado de Jalisco como fuente de sustancias bioactivas, principalmente de uso agrícola.
- 2) Identificar en los extractos de *Artemisa ludoviciana* sbsp *ludoviciana* y *Artemisa ludoviciana* sbsp *mexicana* los principales metabolitos secundarios reportados con actividad nematocida, por medio de pruebas fitoquímicas.
- 3) Evaluar *in-vitro* el potencial de los extractos de las especies vegetales seleccionadas como agentes de control en nematodos del género *Meloidogyne*.
- 4) Cuantificación de lactonas sesquiterpénicas presentes en el extractos con mayor efecto potencial nematocida.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en el Herbario y en Laboratorio de Alimentos y Productos Naturales del Instituto Tecnológico de Tlajomulco (ITTJ).

6.1 Colecta de *Artemisia*

Se realizó la visita al herbario de la Universidad de Guadalajara para corroborar la localización de las especies, encontrándose reportadas las siguientes:

Cuadro 1. Especies reportadas en Herbario de la Universidad de Guadalajara.

EJEMPLAR	LUGAR DE COLECTA	AÑO DE COLECTA
<i>Artemisia albula</i>	Durango	1997
<i>Artemisia frigida Willd</i>	Nuevo León	1978
<i>Artemisia klotzchiana Besser</i>	Ojuelos de Jalisco	2000
<i>Artemisia mexicana Willd</i>	Guadalajara Jalisco	1975
<i>Artemisia (sin especie)</i>	Tepatitlán de Morelos Jalisco	1980
<i>Artemisia laciniata Willd</i>	Tamazula de Gordiano	1990

6.2 Identificación botánica de la planta

En el Herbario del ITTJ se llevó a cabo la clasificación taxonómica de las especies de acuerdo con el método de Rzedowski y Calderón (1997). En Flora de Norteamérica se describió la presencia de 6 subespecies de *Artemisia ludoviciana* distribuidas en localidades de Estados Unidos y parte de México.

6.3 Conservación del material vegetal

Los ejemplares encontrados fueron conservados *in vivo* para su reproducción (Figura 2). Posteriormente, para su análisis, muestras de las hojas de las plantas fueron sometidas a un proceso de secado en una estufa de aire circulante a una temperatura de 40 °C, hasta alcanzar un porcentaje de humedad menor al 10 % en base húmeda.



Figura 2. *Artemisia ludoviciana* sbsp *ludoviciana* establecido en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Tlajomulco.

6.4 Análisis fitoquímico

La evaluación fitoquímica de las dos especies de *Artemisia* identificadas se realizó a través de la obtención de extractos vegetales con diferentes solventes de diferente polaridad, incluyendo cloroformo, etanol y agua (Figura 4b) en cantidad suficiente para cubrir 1 g de material vegetal de cada especie, consistente en tejido de hoja seca y triturada (Figura 3a). La metodología aplicada fue de acuerdo a Carvajal *et al.*, (2009) y Martínez *et al.*, (2008) (Cuadro 2).



Figura 3. Preparación de muestra a) Triturado de muestra vegetal, b) solventes utilizados.

Algunos ensayos fitoquímicos se realizaron utilizando cromatografía en capa fina. Esta técnica analítica es precisa, rápida y sencilla (Figura 4) ya que permite separar los

compuestos de una mezcla, con un elevado grado de pureza, para posteriormente realizar la identificación de un grupo fitoquímico específico a través de una reacción química de derivatización para su fácil identificación. En ella se emplean una fase móvil (eluyente) el cual dependerá del metabolito a identificar, y una fase estacionaria. Para ello, se utilizaron placas de vidrio Silica gel 60 W F 254 S marca Merck (Figura 5) con sus respectivas cámaras cromatográficas.

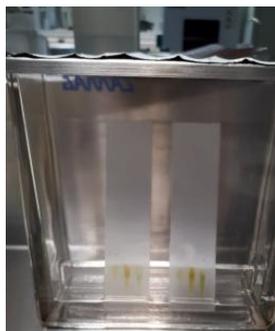


Figura 4. Cámara cromatográfica.

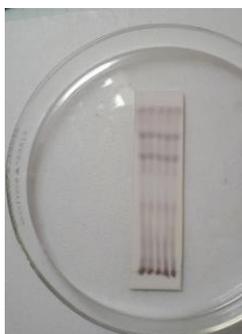


Figura 5. Placa de vidrio Silica gel 60.

6.4.1 Frente de retención (Rf)

El Rf la relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa. Este valor permite identificar las especies químicas existentes, a partir de la comparación de los valores Rf de estándares obtenidos bajo las mismas condiciones experimentales. La distancia recorrida por el compuesto se mide desde el centro de la mancha, utilizando la siguiente ecuación:

$$Rf = \frac{FM}{FS}$$

Donde

FS: Frente de solvente.

FM: Frente de mancha.

6.4.1.1 Lactonas sesquiterpénicas

La determinación de lactonas sesquiterpénicas se llevó a cabo con la prueba de Baljet, el reactivo se preparó de la siguiente manera: a) 0.5 g de ácido pícrico en 50 mL de etanol al 96%, b) 5 g de NaOH en 50 mL de agua. Se mezcló a y b, posteriormente se añadió la muestra. Es reacción positiva si se observa el color amarillo.

6.4.1.2 Aceites esenciales

Para la determinación de aceites esenciales se utilizó la prueba de reactivo anisaldehído. El reactivo se preparó mezclando 0.5 mL de anisaldehído, 1 mL de H₂SO₄ concentrado en 50 mL de ácido acético glacial (CH₃COOH). Coloraciones verdes, verde-amarillas indican que la prueba es positiva.

6.4.1.3 Cumarinas

Para la determinación de cumarinas, se tomó un volumen de extracto acuoso y se colocó en una cápsula de porcelana, se añadieron unas gotas de NH₄OH y se visualizó con luz UV a 365 nm. La prueba es positiva si se observa fluorescencia azul en el extracto.

6.4.1.4 Triterpenos

En la determinación de triterpenos se empleó la prueba de Liebermann. El reactivo se preparó mezclando 1 mL de anhídrido acético, 1 mL de cloroformo y añadiendo 3 gotas de H₂SO₄ concentrado. A la muestra (1-2 mg) disuelta en 1 mL de cloroformo o sin disolver, se le añade una gota de reactivo. La presencia de un color verde-azuloso, es prueba positiva para esteroides y color rojizo para triterpénos.

6.4.1.5 Flavonoides

En el caso de los flavonoides se realizaron 3 pruebas:

a) Shinoda: Se disuelven 1-2 mg de la muestra en 1 mL de etanol, agregando unas gotas de HCl concentrado y 1 o 2 limaduras de magnesio; si la solución se torna de color rojo

intenso, la prueba es positiva; Con color naranja, verde o azul pueden estar presentes, flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas.

b) Reacción álcali: Se toma un 1 mL del extracto metanólico y se agrega hidróxido de sodio al 5 %, siendo la evidencia positiva, la presencia de un color amarillo, amarillo a naranja naranja a rojo pueden estar presentes, flavonas, flavanonol e isoflavonas o chalconas.

6.4.1.6 Alcaloides

Para la determinación de alcaloides se realizó la técnica ácida y la prueba básica, utilizándose en ambas el reactivo de Dragendorff modificado, consistente en una Solución A: se disuelven 0.85 g de subnitrito de bismuto (o nitrato de bismuto), en una mezcla de 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua; Solución B: se disuelve 8.0 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua destilada. Para esta prueba se emplearon granos de café e inflorescencia de *Cannabis sativa* como estándar.

Al momento de realizar el ensayo, se mezclan: 5 mL de solución A y 5 mL de solución B, se le añade 20 mL de ácido acético glacial, aforando la solución con agua destilada a 100 mL. Es positiva la prueba cuando aparece una mancha oscura en la placa.

6.4.1.7 Grupos esteroidales

La presencia de esteroides se evaluó tomando 4 mL de extracto clorofórmico, se agregaron unas gotas de H_2SO_4 concentrado y la mezcla se dejó reposar por 2 min La formación de un anillo rojizo en la interfase indica la presencia de esteroides.

6.4.1.8 Sapogeninas

Para la identificación de Sapogeninas se emplearon placas cromatograficas y revelaron con reactivo de Cloruro de Zinc, el cual se preparó colocando 6 g de $ZnCl_2$ en 20 mL de metanol. Esta prueba es positiva si aparecen coloraciones brillosas en luz a 365 nm. Para corroborar la prueba se elaboró el reactivo de Komarowsky con dos mezclas, a) H_2SO_4 al 50% y b) 4-hidroxibenzaldehido al 2% en metanol, posteriormente se mezclaron 5 mL de a con 50 mL de b, esta prueba es positiva con manchas amarillas o rosadas.

6.4.2 Pruebas en tubos de ensayo

6.4.2.1 Taninos

Los taninos se evaluaron a partir del extracto etanólico en un tubo de ensayo. Se tomó un volumen de extracto y se agregaron unas gotas de FeCl_3 al 5%. La presencia de color azul intenso indica la presencia de galotaninos y elagitaninos. Si la coloración es verde intenso muestra la presencia de taninos condensados. Si existe la presencia de ambos y en altas concentraciones la reacción no suele distinguirse claramente y el extracto se vuelve café oscuro o negro.

6.4.2.2 Quinonas

Se tomó un volumen de extracto hidroetanólico y a continuación se extrajo con un volumen de éter de petróleo. Se recuperó la fase orgánica y se extrajo nuevamente con una mezcla 1:7 de etanol:agua a 60 °C. Se separó la solución hidroalcohólica y se calentó para eliminar por completo el éter. Se agregó 1 mL de agua oxigenada de 30 volúmenes y 1 mL de ácido sulfúrico al 50% en agua. La solución se dejó enfriar y a continuación se extrajo con benceno. Se recuperó nuevamente la fase orgánica y se agregó 1 mL de NaOH al 5% con 2% de NH_4OH . Por último, se agitó levemente. La aparición de un anillo rojo es prueba positiva de la presencia de quinonas.

6.4.2.3 Saponinas

Se colocó en un tubo de ensayo la muestra (1-2 mg) disuelta en 1 mL de agua, se agita y se forma una espuma abundante, si ésta permanece por 1 h, la prueba se considera positiva para comprobar la presencia de saponinas.

Cuadro 2. Metodología general de evaluación fitoquímica utilizada.

METABOLITO	PRUEBAS FITOQUÍMICAS	FASE MOVIL	EXTRACTO
Lactonas sesquiterpénicas	Reactivo de Baljet.	Benceno: Acetato de etilo	Cloroformo
Aceites esenciales	Reactivo Anisaldehído.	Benceno: Acetato de etilo	Cloroformo
Cumarinas	Fluorescencia 365nm.	Tolueno: Acetato de etilo	Metanol
Triterpenos	Prueba de Liebermann.	Tolueno: Éter etílico: Ácido acético	Cloroformo
Flavonoides	Reacción A) Shinoda, B) de álcali.	Acetato de etilo: Á. fórmico: Á. acético: Agua	Agua
Alcaloides	Prueba básica y ácida con reactivo de Dragendorff.	Acetato de etilo:Metanol:Agua	Éter, etanol, á acético
Esteroides	Reactivo de Liebermann-Burchurd LB.	Benceno: Acetato de etilo	Cloroformo
Sapogeninas	Ensayo con $ZnCl_2$ y Komarowsky.	Benceno: acetato de etilo	Cloroformo
Quinonas	Prueba de quinonas.	Tubos de ensayo	Etanol, éter
Taninos	Reactivo de Gelatina y Cloruro férrico.	Tubos de ensayo	Etanol, agua
Saponinas	Reacción de espuma.	Tubos de ensayo	Agua

6.5 Ensayos biológicos

Los ensayos biológicos se llevaron a cabo en el Herbario del Instituto Tecnológico de Tlajomulco, en condiciones de temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, tomando como criterio de selección aquellos nematodos móviles juveniles en segundo estadio.

6.5.1 Obtención de extracto para ensayos biológicos

Se tomaron 10 g de partes aéreas secas de *Artemisia ludoviciana* sbsp *ludoviciana* y *A. ludoviciana* sbsp *mexicana* para realizar la extracción en etanol al 70% con un volumen de 400 mL, en relación 1:10 (w/v).

Se trituró la planta para posteriormente colocarla en un frasco de vidrio que fue previamente tapado con papel aluminio. El material vegetal se puso en contacto con el medio de extracción y se almacenó en un espacio a temperatura ambiente en ausencia

de luz. Los extractos se dejaron macerar durante 11 días con intervalos de agitación diaria.

6.5.2 Material biológico

Durante los meses de septiembre y octubre de 2018, se obtuvo la tierra procedente de un campo experimental en Michoacán (Figura 6), donde se llevó a cabo un muestreo previo al cultivo (pepino) utilizando una pala para la toma de la muestra. Se realizó una pequeña perforación en el suelo de 40 cm de longitud y 30 cm de profundidad. La muestra de suelo obtenida posteriormente se colocó en una bolsa de plástico.



Figura 6. Muestreo en campo.

El estudio de las muestras e identificación de las especies de *Meloidogyne* spp., se realizó en el herbario del Instituto Tecnológico de Tlajomulco conforme a la metodología propuesta por Cid del Prado *et al.*, (1995).

6.5.3 Reproducción y mantenimiento del nematodo

Se prepararon 50 macetas de plástico negras con capacidad de 5 kg, con una textura de suelo arcilloso arenoso 1:1 y la tierra recolectada en el muestreo con porcentajes, en seguida se realizó el trasplante de las plántulas de tomate de 39 días después de germinación (DDG), colocándose 2 plantas por maceta (Figura 7).



Figura 7. Infestación de plantas de tomate 39 días después de germinación (DDG).

6.5.4 Extracción de nematodos

Se realizaron extracciones de nematodos en suelo, 27 días después del trasplante de las plantas de tomate, para corroborar la presencia de *Meloidogyne* en las muestras.

Individuos en el estadio J2 fueron extraídos utilizando un embudo de Baermann (Figura 8), esta técnica consiste en recolectar la muestra de suelo dentro de una envoltura o filtro poroso, ubicada en la parte superior de un embudo lleno de agua con un cierre en la parte inferior. Una vez que han transcurrido 24 horas los nematodos presentes en la muestra, migran por fuerza de la gravedad hacia la base del embudo, donde son recolectados en un vaso de precipitados para su observación.

Por otra parte, las hembras maduras se extrajeron a partir de las raíces de tomate mediante Macerado-Tamizado-Centrifugado (Rosas-Hernández *et al.*, 2014). Estos especímenes se utilizaron para la identificación de las especies de *Meloidogyne* spp., considerando las características morfométricas, la cual consiste en la forma del estilete de hembras y machos y la forma de la región labial de los machos (no se realizó el patrón perineal de hembras) (Cid del Prado *et al.*, 1995).

Esta identificación taxonómica cualitativa se emplea utilizando un microscopio, los nematodos son de aspecto filiforme y al ser vistos en microscopio lucen traslucidos envueltos en una cavidad pseudocelómica y carentes de sistema respiratorio y circulatorio.



Figura 8. Embudo de Baermann modificado.

Para la extracción de machos se emplearon raíces agalladas de tomate dejando éstas en agua, mediante Macerado-Tamizado-Centrifugado (Figura 9).



Figura 9. Centrifuga manual.

6.5.5 Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 9 repeticiones. La unidad experimental consistió en una caja plástica de 2.5 cm de diámetro y 0.8 cm de altura. Se añadió 1 mL de extracto etanólico de *Artemisia ludoviciana* subsp *ludoviciana* (tratamiento 1), 1 mL de *Artemisia ludoviciana* subsp *mexicana* (tratamiento 2) permitiendo de esta manera al solvente evaporarse a temperatura ambiente dejando los sólidos solubles. Además de un testigo negativo, consistente en agua destilada y un testigo positivo, que es un nematicida comercial de origen natural (ajo). Luego se agregó 100 μ L de suspensión de larvas de *Meloidogyne* (15 larvas) en 900 μ L de agua destilada.

Se evaluó contabilizando la muerte de individuos después de 15, 30, 45, 60, 75,90, 105 min. Se registró la muerte del nematodo bajo estereomicroscopio cuando no existía

respuesta de movilidad al ser tocado con un pincel expresándose como porcentaje de mortalidad (#Muertos/Tiempo).

6.6 Métodos analíticos

6.6.1 Cuantificación de lactonas sesquiterpénicas por espectrofotometría UV-VIS

La metodología realizada para la cuantificación espectrofotométrica de las lactonas sesquiterpénicas, se realizó de acuerdo a Malca Chamache y Rodríguez Muñoz (2018).

En esta técnica se requiere la preparación de la solución estándar de artemisinina a una concentración de 1mg/mL disuelta en etanol al 70 % v/v.

6.6.1.1 Preparación de la curva de calibración

A partir de la solución estándar se prepararon las diferentes concentraciones de lactona: 10, 20, 30, 40 $\mu\text{g/mL}$.

En matraces de 10 mL, se colocaron por separado 1 mL de cada concentración de lactona. Luego se añadieron 1 mL de yoduro de potasio al 2% y 1 mL de HCl 5 M, se mezclaron suavemente hasta percibir un color amarillo que indica la liberación de yodo. Posteriormente se añadieron 0.5 mL de solución de safranina al 0.01% y 2mL de acetato de sodio 2 M. Se agitaron suavemente durante 5 min, y después se completaron a volumen con agua destilada. Posteriormente se llevaron a leer al espectrofotómetro (PerkinEimer Lambda XLS+) a 521 nm. Se repitió el proceso por triplicado.

6.6.1.2 Preparación de extracto para cuantificación

Se realizó una limpieza del extracto de ambas variedades de *Artemisia* para la eliminación de grasas y clorofilas, entre algunos otros metabolitos que pudieran alterar los resultados de la cuantificación, la cual se describe en la Figura 10.

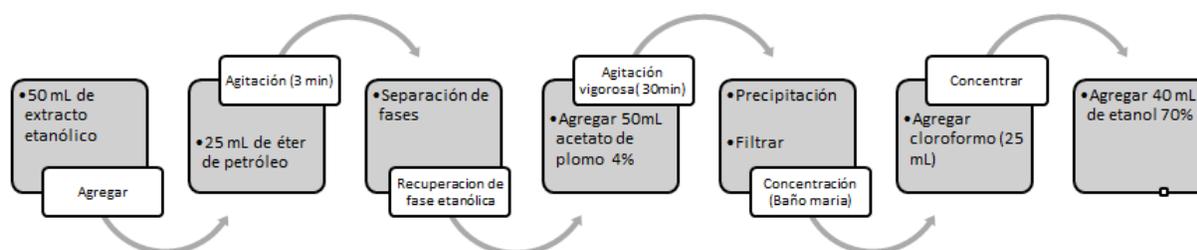


Figura 10. Diagrama general de limpieza de extracto.

La cuantificación de lactonas sesquiterpénicas se realizó como se describe anteriormente sustituyendo el mL del estándar por 3 mL del extracto.

6.6.1.3 Preparación del blanco

En matraces de 10 mL, se colocaron 3 mL de etanol al 70, se adicionaron 1 mL de yoduro de potasio al 2% y 1 mL de HCl 5 M, se mezclaron suavemente hasta que aparezca el color amarillo que indica la liberación de yodo. Posteriormente se añadieron 0.5 mL de solución de safranina al 0.01% y 2 mL de acetato de sodio 2M. Se agitaron suavemente durante 5 minutos, y después se completaron a volumen con agua destilada. Posteriormente se llevaron a leer al espectrofotómetro (Figura 11) (PerkinEimer Lambda XLS+) a 521 nm. Se repitió el proceso por triplicado.

Este método se fundamenta en que el enlace endoperóxido de la artemisinina en medio ácido, produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual reacciona con el yoduro de potasio, para liberar yodo (Figura 12). Este yodo liberado decolora el color rojo de la safranina O, la cual se mide a una longitud de onda de 521.



Figura 11. Espectrofotómetro PerkinEimer Lambda XLS+.

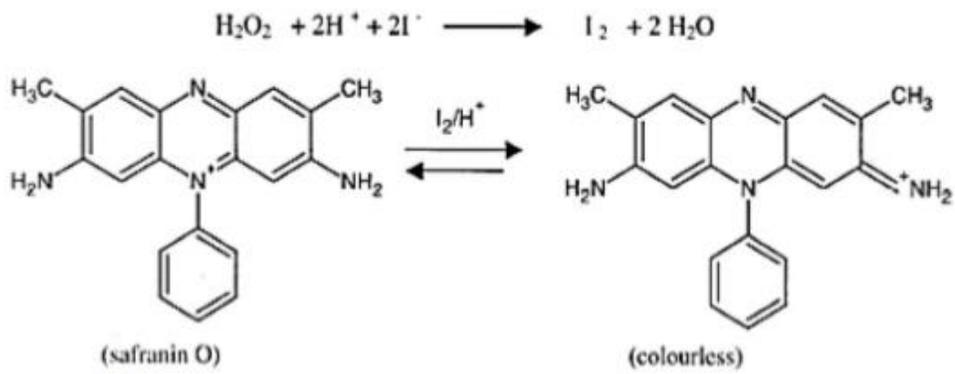
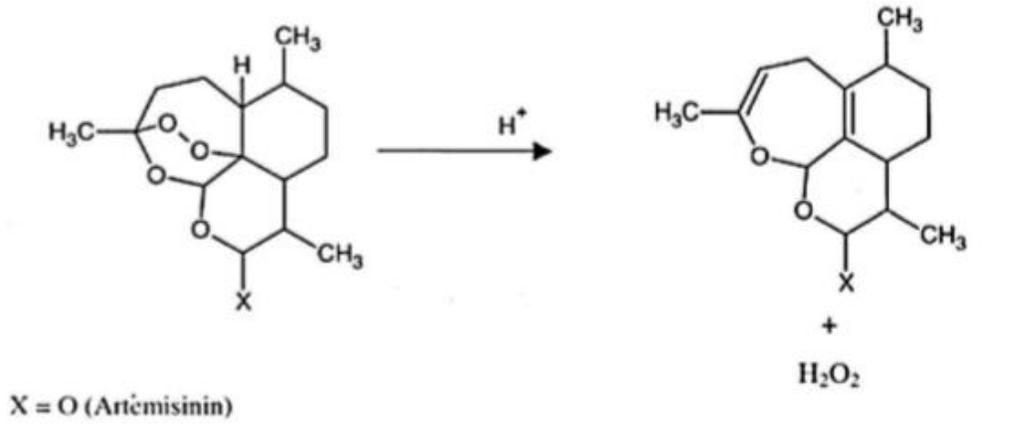


Figura 12. Reacción química para la cuantificación de artemisinina.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Colecta de *Artemisia*

La colecta del material vegetal se llevó a cabo entre los meses de febrero y marzo de 2018 en tres municipios del estado de Jalisco: 1) Yahualica de González Gallo situado en la Zona Altos Sur de Jalisco, a los 20°59'00" de latitud norte y 103°48'30" de longitud oeste; a una altitud de 1,790 metros sobre el nivel del mar, 2) Tlajomulco de Zúñiga se localiza en la porción media de la región centro del estado, entre las coordenadas 20° 28' de latitud norte y 103° 27' de longitud oeste, a una altura de 1.575 metros sobre el nivel del mar (Figura 13).

Para corroborar la localización de las especies se revisó el herbario de la Universidad de Guadalajara.



Figura 13. Distribución de especies de *Artemisia ludoviciana* en el estado de Jalisco.

7.2 Identificación botánica de la planta

Tras la identificación botánica de las muestras colectadas de acuerdo a Rzedowski y Calderón (1997) para el caso de la especie *Artemisia ludoviciana*; de la misma se reportan dos subespecies de maleza: *Artemisia ludoviciana* sbsp. *mexicana* con características de hojas de color verde grisáceo, márgenes generalmente lobulados, caras abaxiales peludas y *Artemisia ludoviciana* sbsp. *ludoviciana* con márgenes de la

hoja planos, ésta misma revoluta; estos criterios descritos en Flora Norteamericana (Visitado: 04/04/2018).

7.3 Conservación del material vegetal

El secado del material vegetal de las plantas colectadas (Figura 14) fue realizado en un secador convectivo ajustado a temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Figura 15) hasta establecerse un peso constante y humedad menor a 10%.



Figura 14. Hojas de *Artemisia ludoviciana* sbsp *mexicana*.



Figura 15. Secador convectivo.

7.4 Evaluación fitoquímica

Los resultados del análisis fitoquímico de las muestras de cada especie obtenida de los dos municipios del estado de Jalisco, muestran la presencia de varias clases de compuestos. Las observaciones se registraron en función del cambio de color en las reacciones o en el caso de las placas cromatográficas, mediante la coloración y número

de manchas para los diferentes ensayos, los cuales se muestran de manera general a continuación en el Cuadro 3:

Cuadro 3. Resultados de perfil fitoquímico. (II) presencia de dos manchas (I) presencia de una mancha (-) no detectado.

Metabolitos	<i>Ludoviciana</i> sbsp. <i>ludoviciana</i>	<i>Ludoviciana</i> sbsp. <i>mexicana</i>
Lactonas sesquiterpénicas		
Aceites esenciales	-	
Cumarinas	-	
Triterpénos		
Flavonoides		
Alcaloides		-
Esteroides		
Sapogeninas		-
Quinonas	-	-
Taninos	-	
Saponinas		-

Las diferentes pruebas de identificación química realizadas en los extractos obtenidos de las hojas de *A. ludoviciana* sbsp. *mexicana* permitieron mostrar la presencia de dos diferentes lactonas sesquiterpénicas (Figura 16b) mientras que en *A. ludoviciana* sbsp. *ludoviciana* se encontró una sola con Rf de 0.534 (Cuadro 4, Figura 16a). Estos resultados son acordes a los reportados por otros autores: Sagástegui (2009) reportó mediante pruebas de colorimetría, la presencia de lactonas en un estudio sobre *Artemisia absinthium*; asimismo, Saeidnia *et al.*, (2017), reportaron la presencia de dos sesquiterpenlactonas en *Artemisia santolina*.

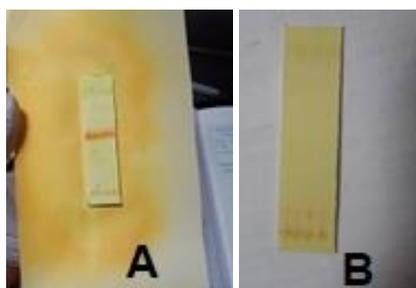


Figura 16. Evaluación fitoquímica para la detección de lactonas sesquiterpénicas

a) *A. ludoviciana* sbsp. *ludoviciana*, b) *A. ludoviciana* sbsp. *mexicana*

La presencia de aceites esenciales en *A. ludoviciana* sbsp. *ludoviciana* es nula mientras que en *A. ludoviciana* sbsp. *mexicana* se identificaron dos con Rf de 0.433 y 0.265 respectivamente, existen reportes de presencia de estos metabolitos en *Artemisia ludoviciana* sbsp *ludoviciana* con el cual se evaluó la actividad antinociceptiva por Anaya *et al.*, (2016) quienes utilizaron las partes aéreas de la planta. Por otra parte, aunque aún no se han reportado en otras especies del mismo género, autores como Díaz *et al.*, (2012) mencionan que el aceite esencial de *Tagetes erecta* presenta actividad biológica sobre varios organismos, primordialmente contra nematodos. Por su parte, Regnault *et al.*, (2004) señalaron que plantas de *Ocimum spp* poseen aceites esenciales, con actividad sobre *Meloidogyne spp.* *Heterodera spp.*, *Anguina tritici*, *Tylenchulus semipenetrans* y *Rotylenchulus reniformis*.

La prueba de cumarinas fue positiva para *A. ludoviciana* sbsp. *mexicana* (Figura 17a), por su parte en 2015, Moscatelli reportó la cumarina escopoletina presente en la especie *Artemisia copa*.

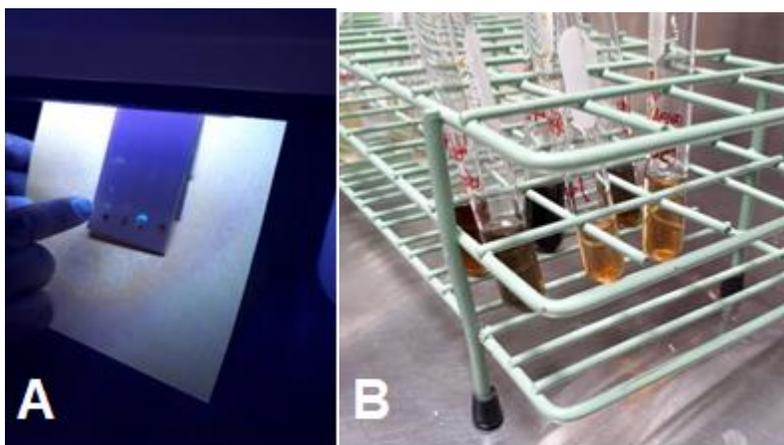


Figura 17. Evaluación fitoquímica a) cumarinas, b) flavonoides.

La presencia de un flavonoide fue equivalente en ambas especies de *Artemisia* analizadas, con Rf de 0.506, sin embargo *A. ludoviciana* sbsp. *mexicana* contiene un flavonoide adicional con Rf de 0.49 (Figura 17b). Moscatelli en 2015 y Sagástegui en 2009, en sus estudios correspondientes con las dos especies de *Artemisia*, reportan diferentes flavonoides tales como jaceosidina, espinacetina y tricina, entre algunos otros.

Los resultados obtenidos de *A. ludoviciana* sbsp. *ludoviciana* indican la presencia de dos alcaloides diferentes con Rf de 0.894 y 0.931, respectivamente (Figura 18a,b). Estos grupos en particular son importantes, y están presentes en otras especies, que si bien no son del mismo género, tienen capacidad para adherirse a los nematodos fitoparásitos, como los formadores de agallas en el sistema radical (*Meloidogyne* spp.) como es el caso del alcaloide denominado ricinina presente en *Ricinus communis* (Arboleda et al., 2010).

La cromatografía realizada para la detección de sapogeninas (Cuadro 4), por el contrario, sugiere que en la subespecie *mexicana* no se presentan estos compuestos, resultado coincidente con reportes realizados para *Artemisia absinthium* por Sagástegui, (2009).

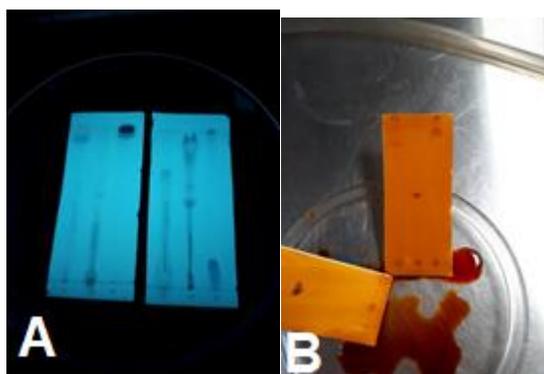


Figura 18. Placas de cromatografía de alcaloides

a) Revelado con luz UV 302nm b) Revelado con reactivo de Dragendorff.

Cuadro 4. Resultados del análisis por cromatografía en capa fina (TLC).

	<i>Ludoviciana</i> sbsp. <i>ludoviciana</i>		<i>Ludoviciana</i> sbsp. <i>mexicana</i>	
Lactonas	Rf: 0.534		Rf: 0.109	Rf: 0.098
Sesquiterpénicas				
Aceites esenciales	/		Rf: 0.433	Rf: 0.265
Cumarinas	/			Rf: 0.08
Triterpénos	Rf: 0.77			Rf: 0.77
Flavonoides	Rf: 0.506		Rf: 0.506	Rf: 0.49
Alcaloides	Rf: 0.894	Rf: 0.931	/	
Esteroides	Rf: 0.686		Rf: 0.686	
Sapogeninas	Rf: 0.540	Rf: 0.009	/	

Las saponinas están presentes en *A. sbsp ludoviciana* (Figura 19a), sin embargo no así en *A. sbsp. mexicana*. Estudios sobre la presencia de ese grupo de compuestos en especies similares no se han reportados, sin embargo son de importancia, puesto que Chitwood (2002) reportó ocho diferentes saponinas esteroidales en especies de *Asparagus*, las cuales redujeron significativamente la movilidad de juveniles de *Meloidogyne incognita*.

Así mismo, los resultados indican presencia de taninos en *A. sbsp. Mexicana*, de igual manera Sagástegui, (2009) reporta en *Artemisia absinthium*. Finalmente La presencia de quinonas en las dos subespecies es nula (Cuadro 5).

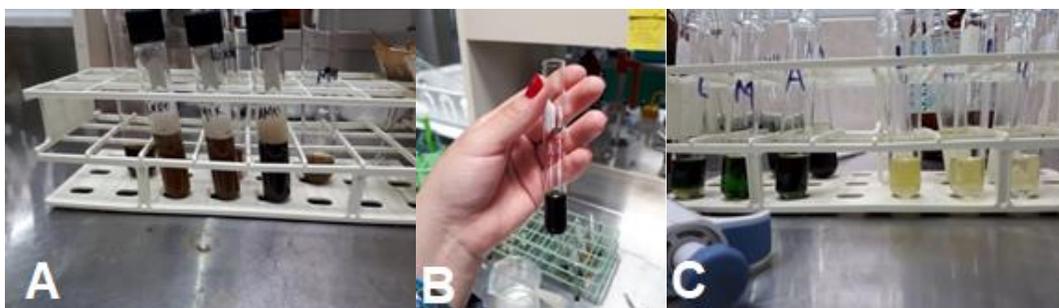


Figura 19. Pruebas fitoquímicas en tubos a) saponinas, b) taninos, c) quinonas.

Cuadro 5. Análisis fitoquímico en tubos de ensayo.

	<i>Ludoviciana sbsp. ludoviciana</i>	<i>Ludoviciana sbsp. mexicana</i>
Quinonas	-	-
Saponinas	***	-
Taninos	-	***

De acuerdo a las pruebas fitoquímicas, en ambas subespecies de *Artemisia* se determinó la presencia de un triterpeno con un Rf de 0.77 (Cuadro 4). Para corroborar se realizaron pruebas de colorimetría en tubos de ensayo (Figura 20). Del mismo modo, Sagástegui, (2009) cita presencia del metabolito en hojas de *Artemisia absinthium*. La importancia de este grupo de metabolitos radica en que, en otras especie de plantas como (*Azadirachta indica*) las semillas han utilizadas para reducir poblaciones severas de nematodos de la soya (Vyas, 1993; Johnson *et al.*, 1996). En otros estudios (Silva *et al.*, 2002; Regnault

et al., 2004) reportan que en el extracto de esta planta han identificado terpenos como nimbina, tionemona y azadiractina; este último compuesto muestra acción antialimentaria, reguladora del crecimiento e inhibidora de la ovoposición para diversos nematodos fitoparásitos; además reduce la movilidad de *Meloidogyne incognita*.

Adicionalmente, Regnault *et al.*, (2004) informan actividad sobre *Meloidogyne* spp y *Heterodera* spp, utilizando moléculas de citral, citronelol y linalol presentes en albahaca (*Ocimum basilicum*), estos tres compuestos, son terpenoides.



Figura 20. Pruebas fitoquímicas en tubos para la identificación de presencia de triterpénos.

7.5 Material biológico

7.5.1 Identificación de especie

Para la identificación de las especies de nematodos se realizó una tinción en raíces de acuerdo a Shurtleff y Averre III (2000), en cuya metodología, en general, se toman raíces de la planta infectada, se colocan en un vaso de precipitado con agua y se le agrega una solución de hipoclorito de sodio al 5%, estas se lavan, para posteriormente agregar una solución de fucsina-acida; Al finalizar la tinción se observa los nematodos presentes en la parte interior de la raíz con la coloración que se muestra en la Figura 21.



Figura 21. Nematodos en raíz de tomate observados en microscopio 10x.

Manzanilla-López y Marbán-Mendoza (2012) y Perry *et al.*, (2009) citan una de las características principales del género, la cual es representada por la hembra en forma de pera, como se aprecia en la figura 22; estos especímenes fueron encontrados en las raíces de tomate.



Figura 22. Hembra de *Meloidogyne*.

La morfología del juvenil de segundo estadio (J2) (Figura 23) presenta características importantes para la identificación (Perry *et al.*, 2009) como es el caso de cuerpo delgado, posee una región anterior angosta y achatada, una región labial poco esclerotizada, estilete “delicado” (<19 μm) y una región hialina corta (<1/3 μm).



Figura 23. Juveniles de *Meloidogyne*.

En la tinción también se logró identificar la presencia de huevos (Figura 24a). Sin embargo, otros géneros pudiesen presentar este tipo de estructuras, por lo que para la

identificación precisa de ello sería necesario el empleo de técnicas más específicas como el uso de técnicas bioquímicas, por ejemplo fenotipos isoenzimáticos de algunas enzimas como esterasa, malato deshidrogenasa (MDH), gliceraldehído deshidrogenasa (GDH) o el empleo de técnicas más específicas de análisis moleculares como ITS-RFLP, rDNA (28S-5.8S-18S), COI, LAMP y RPA (Subbotin, 2019). Se encontró también un huevo sin eclosionar (Figura 24b) en donde está presente un *Meloidogyne* de primer estadio (J1).

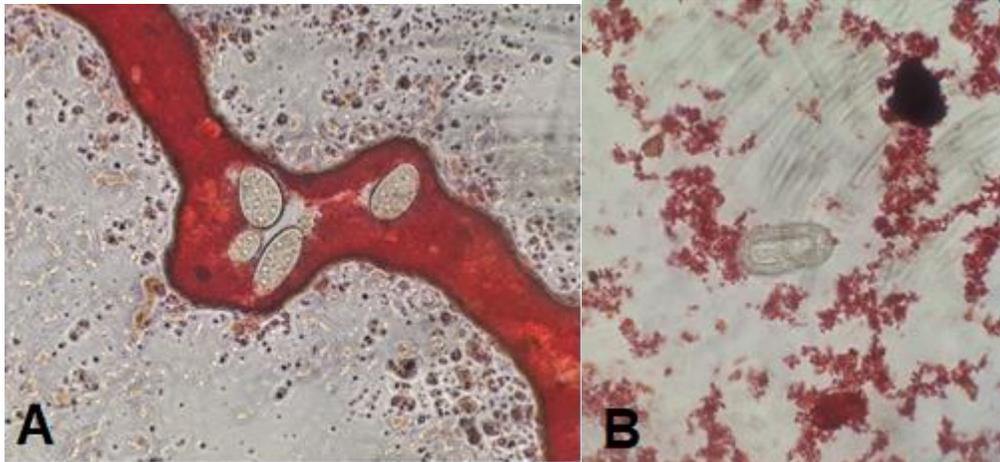


Figura 24. Tinción en raíz a) Huevecillos, b) Juvenil de primer estadio (J1).

7.6 Métodos analíticos

7.6.1 Ensayos biológicos

En el Cuadro 6 se indica los porcentajes de inhibición de los nematodos a diferentes tiempos (de 0 a 90 min) en el cual se aprecia que hay una relación entre el tiempo de exposición del extracto etanólico de las especies *A. ludoviciana* sbsp *ludoviciana* y *A. ludoviciana* sbsp *mexicana* y la sobrevivencia de los individuos, debido a que conforme aumentan los minutos de exposición, disminuye el número de individuos vivos. Se comparan además, estos resultados con un control positivo, el cuál consistió en un extracto de ajo comercial y con un control negativo, usando solamente agua.

De manera general, se observa que en el minuto 75 se obtuvo una mortalidad del 99.17% en la especie *A. ludoviciana* sbsp *ludoviciana*, esto, comparado con el testigo positivo, representa una mayor eficiencia dado que este último, en el minuto 80 presentó un rango de mortalidad de 96.46%, evidenciando de esta manera el efecto que tuvo el extracto de *A. ludoviciana* sbsp *ludoviciana* para lograr la mortalidad de los nematodos juveniles.

A este respecto, se ha reportado que los tratamientos de suelo infestado por *Meloidogyne incognita* y *M. hapla* tratados con un extracto acuoso de biomasa vegetal de *Artemisia annua*, reduce huevos de *M. incognita* e índices de J2 y agallas en las raíces de tomate (D’Addabbo *et al.*, 2017).

Cuadro 6. Porcentaje de mortalidad promedio por tratamiento.

TIEMPO Minutos	Ludoviciana (T1)	Mexicana (T2)	Test posit (TC1)	Test neg (T0)
0	0	0	0	0
15	70.49±14.36	37.68±13.13		0
20			42.68±13.33	0
30	79.69±8.42	54.12±12.46		0
40			78.24±20.3	0
45	92.34±6.83	57.05±13.82		0
60	98.08±4.33	77.38±10.77	91.73±7.61	0
75	99.17±2.66	80.46±11.04		0
80			96.46±5.34	0
90	100	85.88±10.9		0

Asimismo, cabe destacar la alta efectividad de los extractos de *A. ludoviciana* sbsp *ludoviciana*, en la cual a los 90 minutos de exposición al extracto se obtuvo un 100% de mortalidad, mientras que en ensayos *in vitro* realizados por otros autores (Julio *et al.*, 2017) utilizando hidrolato de *Artemisia absinthium*, se logró la mortalidad de 100% de *Meloidogyne javanica* en estadio J2 hasta las 72 h de evaluación. Estos datos representan un parte aguas para continuar con más investigaciones en la optimización del método de extracción, dosificación, y un estudio en el cual se profundice en el modo de acción en el que trabaja el extracto, pues como se observa en la figura 25 el nematodo es envuelto por los componentes del mismo (encapsulado), logrando primeramente inmovilidad y enseguida su muerte.



Figura 25. Nematodo muerto por extracto de *A. ludoviciana* sbsp *ludoviciana* observado en microscopio.

En la figura 26 se muestran los resultados obtenidos del porcentaje de mortalidad correspondiente a los extractos ensayados a diferentes tiempos y el comportamiento que se tiene con respecto al testigo negativo, en donde al finalizar el ensayo se reporta una mortalidad del 0%. En el caso de *A. ludoviciana* sbsp. *Mexicana*, para los 90 minutos de exposición, se observa un incremento en el porcentaje de mortalidad de acuerdo al tiempo transcurrido. En esta subespecie se encontró una mortalidad de individuos significativa, con un 80% de eficiencia. Otros ensayos como el de Elbadri *et al.*, (2008) evalúan la actividad nematicida de varias plantas, obteniendo resultados de mortalidad en rangos de 94-80 % después de una exposición al extracto de 72 hrs. Por su parte Insunza *et al.*, (2001), evaluaron in vitro la actividad nematicida de extractos acuosos *Tagetes erecta* sobre *Xiphinema amerucanum* durante 24 hrs y encontraron una inmovilización significativa de nematodos de esta especie. Estos resultados determinan que las especies evaluadas en el presente estudio tienen un alto potencial en uso en futuros ensayos de actividad nematicida por los tiempos menores en los cuales fueron encontrados resultados positivos de efectividad.

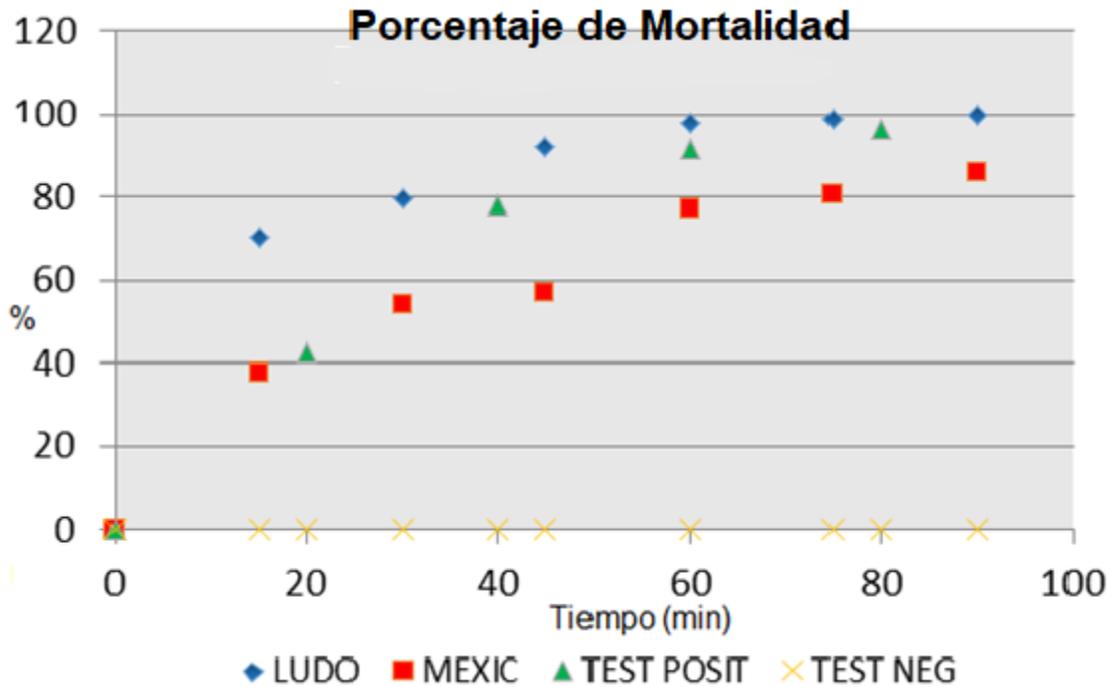


Figura 26. Porcentaje de mortalidad por tratamiento.

Con el fin de determinar el comportamiento cinético de la mortalidad expresada en porcentaje de inhibición, se procedió a aplicar un modelo de primero y segundo orden a fin de evaluar su posible representatividad y obtención de los parámetros cinéticos correspondientes. Aplicando un modelo de primer orden (resultados no mostrados) por se obtuvo una R^2 de 0.8 para los resultados de *Artemisia ludoviciana* sbsp *ludoviciana*, y 0.6 *Artemisia ludoviciana* sbsp *mexicana*, los cuales no son del todo satisfactorios. Por consiguiente se optó por ensayar el empleo de un modelo de segundo orden, en el cual se incluye un cambio de variable de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\frac{dI_t}{dT} = K_2(I_s - I_t)^2$$

En dónde:

K_2 es la constante de porcentaje de inhibición de segundo orden

I_s Corresponde al porcentaje de inhibición al tiempo ∞

I_t es el porcentaje de inhibición al tiempo de evaluación

d_T diferencial del tiempo

Mediante la integración de la ecuación anterior se llegó a la ecuación linealizada siguiente: $K_2 = \frac{I_s}{I_t}$ por lo que se procedió a hacer las gráficas de las figuras 27 y 28, en las cuales se observa los coeficientes de correlación para los resultados de los ensayos biológicos linealizados, representativos con un R^2 mayor a 0.9.

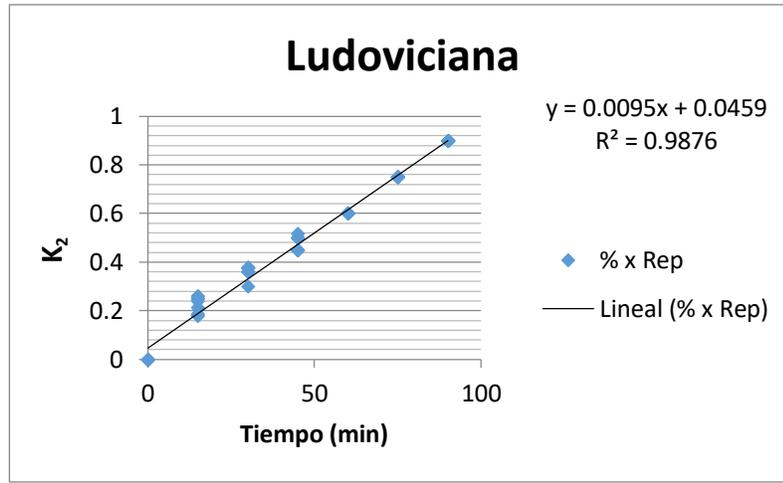


Figura 27. Curva linealizada de porcentaje de mortalidad/t para *Artemisia ludoviciana* sbsp *ludoviciana*.

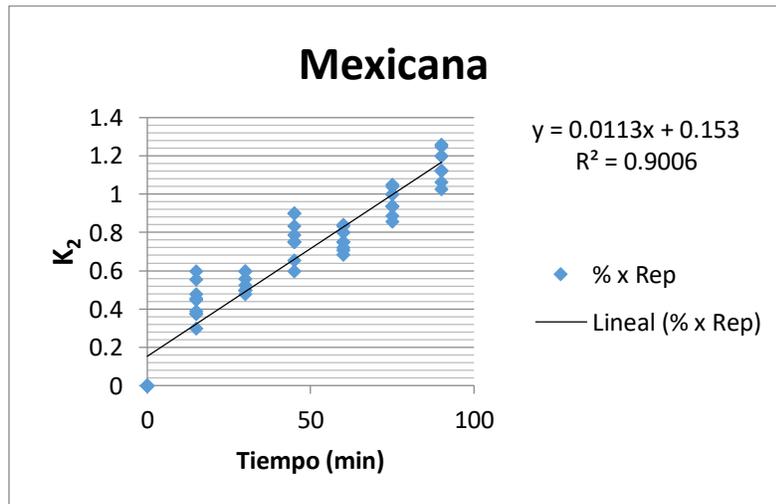


Figura 28. Curva linealizada de porcentaje de mortalidad/t para *Artemisia ludoviciana* sbsp *mexicana*.

Con estos resultados se puede observar la representatividad de los resultados experimentales y del modelo de segundo orden para los resultados de porcentaje de mortalidad obtenidos, lo cual asimismo nos indica que, al menos existen dos variables independientes que afectan el porcentaje de mortalidad a obtener, siendo muy probablemente éstas, el tiempo de contacto y la concentración del extracto ensayado.

Aun cuando en las condiciones actuales los nematocidas vegetales no podrían sustituir a los productos de síntesis, por sus costos, tiempos residuales y dificultad para lograr altos volúmenes de producción, su uso podría seguir en expansión, ocupando espacios importantes en los mercados, especialmente en los rubros de producciones orgánicas, donde la variedad de productos ecológicamente amigables permitidos es limitada.

7.6.2 Cuantificación de lactonas sesquiterpénicas por espectrofotometría UV-VIS presentes en el extracto etanólico.

La cuantificación de artemisinina del extracto de *Artemisia ludoviciana* sbsp *ludoviciana* (Figura 29), misma que fue quien presentó mejor actividad biológica, se realizó mediante espectrofotometría UV-Visible, para lo cual se leyeron las absorbancias de las muestras, referidos como artemisinina a una longitud de onda de 521 nm, utilizando el método descrito por Sreevidya y Narayana (2018).



Figura 29. Muestra de *Artemisia ludoviciana* sbsp *ludoviciana*.

El contenido de artemisinina se calculó a partir de la ecuación de regresión de la curva de calibración que se muestra en la figura 30, la concentración del extracto ensayado de *Artemisia ludoviciana* sbsp *ludoviciana* fue de 84.76 $\mu\text{g/mL}$ de artemisinina (0.01356 g

de artemisinina por cada 100 g hoja desecada). Malca Chamache y Rodríguez Muñoz (2018) reportan 0.180 ± 0.001 g de artemisinina por cada 100 g hoja desecada en un extracto etanólico al 70% en *Artemisia absinthium*. Para el caso de la especie *A. ludoviciana* sbsp *mexicana* no se logró la cuantificación debido a la turbidez del extracto impidiendo de esta manera la reacción y por ende la lectura en el equipo. Este resultado quizás pudo deberse a que en la estructura de la artemisinina, se encuentra un puente de peróxido y un anillo γ -lactona, generando una polaridad media, en este caso no tan soluble en el etanol. Sin embargo, cabe considerar que la diferencial polar de los solventes es sólo uno de los factores que afectan el comportamiento de la disolución.

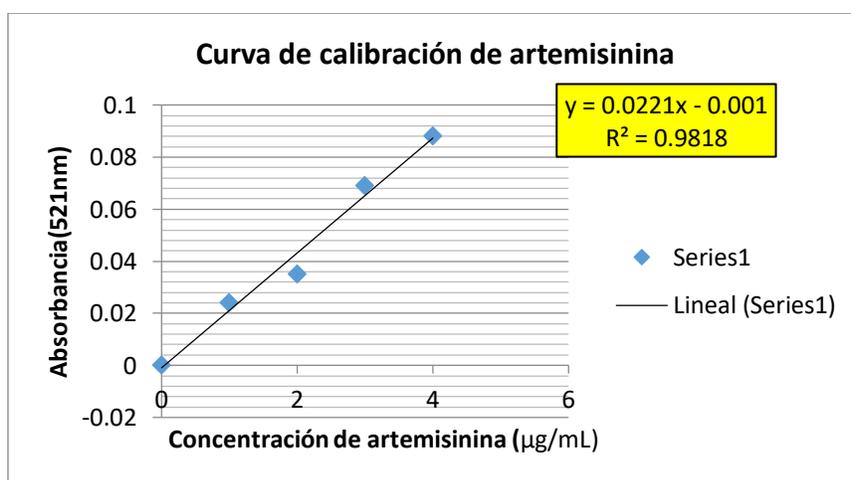


Figura 30. Curva de calibración para lactonas sesquiterpénicas.

En el extracto de *A. ludoviciana* sbsp *ludoviciana* se determinaron concentraciones de 0.01356 g de lactonas sesquiterpénicas por cada 100 g hoja desecada. Este dato representa una crucial e importante iniciativa para continuar con las investigaciones utilizando métodos más específicos en cromatografía líquida o de gases para la caracterización de los metabolitos y su posible utilidad para nuevas formulaciones de nematocidas naturales, o algún otro producto para el control de diferentes plagas en la agricultura.

8. CONCLUSIONES

- Se identificó a la especie *Artemisia ludoviciana* sbsp. *mexicana* en el municipio de Yahualica de González Gallo y *Artemisia ludoviciana* sbsp. *ludoviciana* en Tlajomulco de Zuñiga.
- El extracto de *Artemisia ludoviciana* sbsp *ludoviciana* es una buena alternativa de producto nematocida el presentar porcentajes de 100% en un tiempo menor (90 min) comparado con *Artemisia absinthium* (72 h).
- El extracto de *Artemisia ludoviciana* sbsp *mexicana* puede representar también una alternativa de producto nematocida, para lo cual es necesario la optimización del extracto, para lograr un mayor porcentaje de inhibición en menor tiempo.
- Los resultados del análisis fitoquímico de ambas subespecies de *Artemisia*, a pesar de tratarse de *Artemisia ludoviciana*, presentan compuestos fitoquímicos diferentes, lo que representa un aporte en la clasificación quimiotaxonómica del género.
- Ambas especies son candidatas para la elaboración de formulaciones de productos nematocidas, consiguiendo de esa manera elevar su potencial valor comercial.

9. REFERENCIAS CITADAS

- Adriano-Anaya, M. L., Herrera-López, D., Albores-Flores, V. & Figueroa, M. S. (2008). Nematodos Endorrizosféricos del Banano (*Musa* AAA. Subgrupo Cavendish) Clon “Grande Naine” en el Soconusco, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26:147–152.
- Agrios, G. (2005). *Fitopatología*. México: Limusa. Pp 719-735.
- Akhtar, M. (2000). Nematicidal potential of the neem tree *Azadirachta indica* (A. Juss). *Integrated Pest Management Reviews* 5:57-66.
- Anaya, E. G. D., I.R.C. (2016). Antinociceptive activity of the essential oil from *Artemisia ludoviciana*. *Journal of Ethnopharmacology* 179:403-411.
- Arboleda, F., Guzmán, O. & Restrepo, J. (2010). Efecto *in vitro* de extractos acuosos de higuerilla (*Ricinus communis* Linneo) sobre el nematodo barrenador [*Radopholus similis* (cobb) thorne]. Tesis de Maestría. Universidad de Caldas. Caldas. Colombia. ISSN. 0568-3076.
- Argentieri, M.P, D’addabbo T., Tava, A., Agostinelli, A., Jurzysta, M. & Avato, P. (2008). Evaluation of nematicidal properties of saponins from *Medicago spp.* *Eur. J. Plant pathology*. 120:189-197.
- Ávalos, G. A. & Pérez, U.C.E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal 2: 119-145.
- Babu, R.H. & Savithramma N. (2013). Phytochemical screening of underutilized species of Poaceae. *JPR:BioMedRx: An International Journal* 1:947-951.
- Batish D.R., Singh, H.P., Kohli, R.K. & Kaur, S. (2008). Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*. 256:166-174.
- Becerra, P. A., Castro, M. P. H. & Mendoza, N. D. (1993). Importancia de las plantas aromáticas en el estado de Jalisco. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara
- Carvajal, R. L., Hata, U.Y., Sierra, M.N. & Rueda, N.D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). *Revista Colombia Forestal* 12:161-170.
- Castilla, V., Ramírez, J. & Coto, C.E. (2009). Prospectiva del uso de esteroides de plantas como antivirales. *Revista Química Viva* 1: 8-24.
- Cid del Prado, V.I, Hernández, J.A., Espinoza, T.A., Tovar, S.A. & Torres, C.R. (1995) Colección e identificación de especies y razas de *Meloidogyne* y su distribución en los cultivos más importantes para México. *Avances en la investigación*, Instituto

- de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Edo. de México. 172- 174.
- Cid del Prado V.I, Hernández, J.A. & Alfonsina, J. (2001). Distribución de Especies y Razas de *Meloidogyne* en México. Revista Mexicana de Fitopatología Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Texcoco, México 19(1):32- 39.
- Chitwood, D.J. (2002). Phytochemical based strategies for nematode control. Annual Review of Phytopathology 40: 221–249.
- Coast, W. (2008). Los pesticidas y su salud. Environmental Law. Libro. 1era Edición 2-3 p.
- Conabio (2009). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Consultado el 10/01/2018 en <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/artemisia-ludoviciana/fichas/ficha.htm>
- D'addabbo, T., Argentieri, M., Radicci, V., Grassi, F. & Avato, P. (2017). *Artemisia annua* compounds have potential to manage root-knot and potato cyst nematode. Industrial Crops & Products 108:195-200.
- D'addabbo, T., Carbonara, T., Leonetti, P., Radicci, V., Tava, A. & Avato, P. (2011). Control of plant parasitic nematodes with active saponins and biomass from *Medicago sativa*. Phytochemical 10:503-519.
- D'addabbo, T., Laqueale, S., Lovello, S., Candido, V. & Avato, P. (2014). Biocide plants as a sustainable tool for the control of pests and pathogens. Italian Journal of Agronomy 9:616-625.
- Damián, B. L. M., Salgado, G. R., Martínez, M. R. E. & Martínez, P. M. M. (2008). Antifungal Properties of Some Mexican Medicinal Plants. The Open Natural Products Journal 1: 27-33.
- Díaz, F. & Serrato, M. (2012). Composición del aceite esencial de *Tagetes parryi* A. GRAY. Revista fitotecnia mexicana 34(2): 145 – 148.
- Domínguez, A. J. (2001). Nematodos ftoparásitos asociados al cultivo de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) en la Sabana de Huimanguillo, Tabasco, México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. San José Puyacatengo, Teapa, Tab., México. 50-54.
- Elbadri, G. A., Lee, D.W., Park, C.J., Yu, B.H. & Choo, H.Y. (2008). Evaluation of various plant extracts for their nematicidal efficacies against juveniles of *Meloidogyne incognita*. Journal of Asia-Pacific Entomology 11: 99–102.

Flora de Norteamérica. Consultado el 04/04/2018 en http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=242416100

- Franco-Navarro, F. (2000). Retrospectiva de enfermedades en frutales causadas por nematodos en México. In: Diagnóstico Fitosanitario. Enfermedades de Frutales. Dirección General de Sanidad Vegetal. México: SAGAR.
- García, A.A.N., González, L.N.M., Márquez, C. & Martínez, V. (2003). Cumarinas presentes en especies del género *Casimiroa*. Revista de la Sociedad Química de México. 47:151-154
- Guesmi, I., D'addabbo, T., Radicci, V. & Horrigue-raouani, N. (2013). Evaluation of the suppressive effects of three Brassica green manures on *Meloidogyne incognita*. Symposium "Crop protection management in Mediterranean organic agriculture". 14-16.
- Greco, N., Vovlas, N., Di vito, M. & Inserra, R.N. (1992). *Meloidogyne artiellia*: a root-knot nematode parasite of cereals and other field crops. Nematology circular Florida department of Agriculture & consumer services. 201:280-289.
- Greco, N., & Di vito, M. (2009). Population dynamics and damage levels. Root-Knot Nematodes (Eds. Perry, R.N., Moens, M. and Starr J.L.). CABI, U.K. 46-69.
- Guzmán, P.O.A., Castaño, Z.J. & Villegas, E.B. (2012). Principales nematodos fitoparásitos y síntomas ocasionados en cultivos de importancia económica. Revista agronómica colombiana 20: 38 – 50.
- Guzmán-Plazola, R. A., Jaraba, N. J., & Caswell-Chen, E. (2006). Spatial distribution of *Meloidogyne* species and races in the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) producing region of Morelos, Mexico. Nematropica 36: 215–229.
- Hernández, O.D., Arias, Y., Gómez, L., Peteira, B., Miranda, I. & Rodríguez, M.G. (2012). Elementos del ciclo de vida de población cubana de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood en *Solanum lycopersicum* L. Revista de Protección Vegetal. 27: 88-193.
- Hewlett, T.E., Hewlett, E.M. & Dickson, D.W. (1999). Response of *Meloidogyne spp.*, *Heterodera glycines* and *Radopholus similis* to tannic acid. Journal Nematology 29:737-741.
- Hockland, S., Inserra, R.N., Millar, L. & Lehman, P.S. (2006). International plant health – putting legislation into practice. Plant Nematology. CAB International, Wallingford, UK. 327–345.
- Insunza, V., Aballay, E. & Macaya, J. (2001). In vitro nematicidal activity of aqueous plant extracts on chilen populations of *Xiphinema americanum*. Nematropica 31:47-54.

- Jaramillo-Pineda, J., Guerrero, O. M., Fuentes, G.J.A., Viader, S. JM., Meza, G.JL. & Morales, R.L.H. (2015). Identificación de especies de *Meloidogyne* utilizando la secuenciación de regiones espaciadoras transcritas internas de ADN ribosomal de estadios juveniles. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 1-11.
- Johnson, S., Morgan, D.E. & Peiris, C.N. (1996). Development of the major triterpenoids and oil in the fruit and seed of neem (*Azadirachta indica*). *Annals of Botany* 78: 383-388.
- Julio, L.F., González- Coloma, A., Burillo, J., Diaz, C.E., & Andrés, M.F. (2017). Nematicidal activity of the hydrolate byproduct from the semi-industrial vapor pressure extraction of domesticated *Artemisia absinthium* against *Meloidogyne javanica*. *Crop Protection* 94: 33-37.
- Karr, L.L., Drewes, C.D. & Coats, J.R. (1990). Toxic effects of d-limonene in the earthworm *Eisenia foetida* (Savigny). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 36: 175 - 186.
- Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research* 18:435-448.
- Lara-Posadas, A. V., Núñez-Sánchez, A. E. & López-Lima, D. (2016). Nematodos fitoparásitos asociados a raíces de plátano (*Musa acuminata* AA) en el centro de Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34:116–130.
- Leela, N.K., Khan, R.M., Reddy, P.P. & Nidiry E. (1992). Nematicidal activity of essential oil of *Pelargonium graveolens* against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Nematology Medit.* 20:57-68.
- López-Lima, D., Sánchez-Nava, P. & Carrion, G. (2015). Corky-root symptoms for coffee in central Veracruz are linked to the root-knot nematode *Meloidogyne paranaensis*, a new report for Mexico. *European Journal of Plant Pathology* 141: 623–629.
- Luc, M., Sikora, R.A. & Bridge, J. (2005). *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. 2nd Edition. CABI Publishing. 467-490.
- Malca Chamache, J.A. & Rodríguez Muñoz, C.A. (2018). Tesis: Cuantificación de artemisinina de las hojas de “ajenjo” mediante el método de espectrofotometría UV-Vis. Biblioteca digital- dirección de sistemas de informática y comunicación. Perú: Universidad Nacional de Trujillo.
- Manzanilla-López, R. H. & Marbán-Mendoza, N. (2012). *Practical Plant Nematology*. Biblioteca básica de Agricultura. México. 881-891.
- Martínez, A., Valencia, G. A., Jiménez, N. & Galeano, M.M. (2008). *Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica*. Universidad de Antioquia. Medellín, 2008.

- Martínez-Gallardo, J. A., Díaz-Valdés, T. & Allende-Molar, R. (2015). Primer reporte de *Meloidogyne enterolobii* parasitando tomate en Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11: 2165–2168.
- Mian, I.H. & Rodriguez-Kabana, R. (1982). Organic amendments with high tannin and phenolic contents for control of *Meloidogyne arenaria* in infested soil. *Nematropica* 12:221-234.
- Mojtahedi, H., Santo, G.S. & Ingham, R.E. (1993). Suppression of *Meloidogyne chitwoodi* with sudangrass cultivars as green manure. *Journal Nematology* 25:303-310.
- Mojumder, V. & Raman, R. (1999). Nematicidal efficacy of Neema-SI, an experimental formulation for neem seed treatment against *Heterodera cajani* and *Meloidogyne incognita* in cowpea and chickpea, respectively. *International Journal of Plant & Soil Science* 2:217-222.
- Moscatelli, V. A. (2015). Química y farmacología de una planta medicinal argentina: *Artemisia copa*. *Dominguezia* 31:5-13.
- Ntalli, N.G. & Caboni, P. (2012). Botanical nematicides: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:9929-9940.
- Ntalli, N.G., Ferrari, F., Giannakou, I. & Menkissoglu-Spiroudi, U., (2010). Phytochemistry and nematicidal activity of the essential oils from 8 Greek Lamiaceae aromatic plants and 13 terpene components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:7856-7863.
- Omar, S.A., Abdel-Massih, M.I. & Mohamed, B.E., (1994). Use of saponins to control the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in tomato plants. *Bull. Faculty of Agriculture Cairo (Egypt)* 45:933-940.
- Oka, Y., Nacar, S., Putievsky, E., Ravid, U., Yaniv, Z. & Spiegel, Y. (2000). Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology* 90:710-715.
- Orion, D. & Kritzman, G. (1991). Antimicrobial activity of *Meloidogyne javanica* gelatinous matrix. *Revue Nematologie* 14: 481-483.
- Pandey, R., Kalra, A., Tandon, S., Mehrotra, N., Singh, H.N. & Kumar, S. (2000). EOs as potent sources of nematicidal compounds. *Journal of phytopathology* 148:501-509.
- Peréz, M.R., Reyes, A.J.A. & Aguirre, R.J.R. (1999). Distribución geográfica y ecológica del Istafiate (*Artemisia ludoviciana* Nutt. ssp. mexicana (Willd. Ex Spreng.) Keck). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 64: 111-115.

- Perry, R & Moens, M. (2009). *Meloidogyne* species- a Diverse group of novel and important plant Parasites. First edition 1-10.
- Perry, R & Moens, M. (2009). Root-knot Nematodes. First edition CABI. London, United Kingdom. 487-497.
- Perry, R. N., Moens, M. & Starr, J. L. (2009). Root-Knot Nematodes. CAB International. London, UK. 488.
- Ramírez, A. J. A. (1989). Efecto de diferentes niveles poblacionales de *Meloidogyne incógnita*, sobre el desarrollo del cultivar de vid Garignane en condiciones de invernadero, Costa de Hermosillo, Sonora. Memorias del XVI Congreso Nacional de Fitopatología. Montecillo, México. Resumen 83.
- Ramírez-Suárez, A., Rosas-Hernández, L., & Alcasio-Rangel, S. (2014). First report of the rootknot nematode *Meloidogyne enterolobii* parasitizing watermelon from Veracruz, Mexico. Plant Disease, 98:428-432.
- Rebolledo, M. L, Rodríguez, E. J. G. & López, G. V. (2002). Población de tres géneros de nematodos en las plantaciones piñeras del estado de Veracruz. In Fourth international pineapple symposium. Veracruz, Ver., México.157-161.
- Regnault, R.C., Bernard, J.R. & Charles, V. (2004). Plantas nematicidas y plantas resistentes a los nematodos. Biopesticidas de origen vegetal 4:191-234.
- Rodrigues, A.C., Jham, G.N. & Oliveira, R.D. (2001). Mortality of the soybean cyst nematode in aqueous extracts of neem plant parts. Nematology Mediterranean 29:173-175.
- Rosas-Hernández, L. (2014). Métodos de extracción de nematodos fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología 32: 32-33.
- Ruiz, R.E. & Suarez, M. (2015). Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. Revista CENIC Ciencias Biológicas 46: 9-24.
- Rzedowsky, J. & Calderón, G. (1997). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Familia Compositae. Fascículo 60. Instituto de Ecología, A.C. Centro Regional del Bajío Pátzcuaro, Michoacán. 6-29.
- Saeidnia, J., Asili, A., Manayi, A.R., Goharl, A., Nezhadali, J., Lari, M. & Kurepaz, M. (2017). Bioactive sesquiterpene lactone from *Artemisia santolina*. Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas 16: 570 – 577.
- Sagástegui, G. W. A. (2009). Tesis Maestría: Estudio fitoquímico de las hojas de *Artemisia absinthium* y su actividad antimalárica. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. Escuela de post grado programa de doctorado en ciencias biomédicas. 20-56.

- Salazar, A.W. & Gúzman, H.T.J. (2013). Efecto de poblaciones de *Meloidogyne sp.* en el desarrollo y rendimiento del tomate. *Agronomía Mesoamericana* 24:419-426.
- Salmeron, T. & Cabello, T. (1989). Incidencia de *Meloidogyne incognita* en cultivos de tabaco de la Vega de Granada. *Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas* 4:307-314.
- Sangwan, N.K., Verma, B.S., Verma, K.K. & Dhindsa, K.S. (1990). Nematicidal activity of some essential plant oils. *Journal of Pesticide Science* 28:331-335.
- San martin, R. & Magunacelaya, JC. (2005). Control of plant parasitic nematodes with extracts of *Quillaja saponaria*. *Nematology* 7:577-585.
- Sasser, J.N. & Freckman, D.W. (1987). World perspective on nematology: The role of society. In: Veech, J.A. & Dicson, D.W. (eds.). *Vistas on Nematology: A commemoration of the Twenty-fi fth Anninersary of the society of Nematologist*. Society of nematologist, Inc Hyattsville, MD. 7-14
- Schmutterer, H. (1990). Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annual Review of Entomology* 35:271-297.
- Scotti, M.T., Emerenciano, V., Ferreira, M.J.P., Scottl, L., Stefani, R. & Da silva, M.S. (2012). Self-organizing maps of molecular descriptors for sesquiterpene lactones and their application to the chemotaxonomy of the Asteraceae family. *Molecules* 17: 4684-4702.
- Shurtleff, M.C. & Averre III, CW. (2000). Diagnosing plant diseases caused by nematodes. The American Phytophathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 187-192.
- Sepúlveda, J.G., Pota, D.H. & Rocha, S.M. (2004). La participación de los Metabolitos Secundarios en la defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:355-363.
- Silva, G., Lagunes, A., Rodríguez, J.C. & Rodríguez, D. (2002). Insecticidas vegetales: Una vieja y nueva alternativa para el manejo de plagas. Costa Rica. *Revista Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 66: 4-12.
- Solano, T.F. (2012). Los Plaguicidas agrícolas en Ecuador: Impactos en la producción, la salud y el ambiente. *Universidad Agraria de la Habana*.16-20.
- Solano, T.F., Castillo, M.L., Medina, J.V. & Del pozo, E.M. (2014). Efectividad de hongos nematófagos sobre *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood en tomate en condiciones de campo, Loja, Ecuador. *Revista de Protección Vegetal* 29: 192-196.
- Sreevidya & Narayana, B. (2008). Spectrophotometric determination of artemisinin and dihydroartemisinin. *Indian Journal of Chemical Technology* 15: 59-62.

- Subbotin, S. A. (2019). Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii*. *Nematology* 21: 243-251
- Thoden, T.C., Boppré, M. & Hallmann, J. (2009). Effects of pyrrolizidine alkaloids on the performance of plant-parasitic and free-living nematodes. *Pest management Science* 65:823-830.
- Tovar, S. A. (1994). Especies y razas de *Meloidogyne* en papa, en una localidad de Guadalupe Victoria, Puebla y su comportamiento en cinco variedades. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 73-82.
- Valencia, C. (1995). Fundamentos de fitoquímica. México: Trillas. Pp 103-105, 210-213.
- Verde-Star, M.J., García, G.S. & Rivas, M.C. (2016). Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 1-40.
- Vinueza, S., Crozzoll, R. & Perichi, G. (2006). Evaluación *in vitro* de extractos acuosos de plantas para el control del nematodo agallador *Meloidogyne incognita*. *Revista de Fitopatología Venezolana* 19:26-31.
- Vivanco, J., Cosio E., Loyola-Vargas, V. & Flores, H. (2005). Mecanismos Químicos de Defensa en las Plantas. INVYCIE. Prensa Científica. 1-8.
- Vyas, S.S. (1993). Effect of Neem cake, neem oil, repelin and carbofuran on control of soybean nematodes. In: *Neem and Environment*. Singh R.P., Cari M.S., Raheja A. K y Graus W. (Eds). World Neem Conference. Oxford and IBH Publishing Co. New Delhi, India. 663-667.
- Widmer, T.L. & Abawi, G.S. (2000). Mechanism of suppression of *Meloidogyne hapla* and its damage by a green manure of Sudan grass. *Plant Disease Journal* 84:562-568.