

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**“ACTIVIDAD DE POLVO, EXTRACTOS Y ACEITE ESENCIAL DE *Peumus boldus*
Molina SOLOS Y EN MEZCLA CON *Bacillus thuringiensis* Berliner CONTRA
Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) y *Helicoverpa zea* (Boddie) “**

GONZALO IVAN SILVA AGUAYO

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

DOCTOR EN CIENCIAS

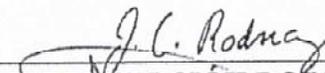
MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

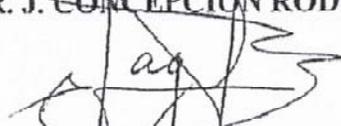
2010

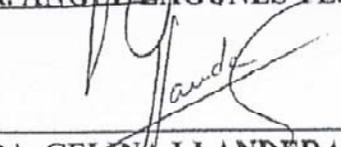
La presente tesis titulada: *Actividad de polvo, extractos y aceite esencial de Peumus boldus* Molina solos y en mezcla con *Bacillus thuringiensis* Berliner contra *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) y *Helicoverpa zea* (Boddie) realizada por el alumno **Gonzalo Iván Silva Aguayo**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

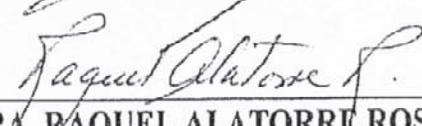
DOCTOR EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

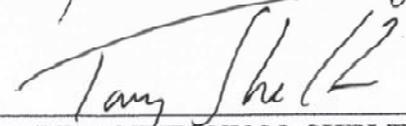
CONSEJO PARTICULAR

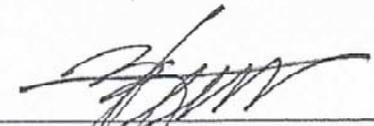
CONSEJERO: 
DR. J. CONCEPCIÓN RODRÍGUEZ MACIEL

ASESOR: 
DR. ÁNGEL LAGUNES TEJEDA

ASESOR: 
DRA. CELINA LLANDERAL CAZARES

ASESOR: 
DRA. RAQUEL ALATORRE ROSAS

ASESOR: 
DR. ANTHONY M. SHELTON

ASESOR: 
DR. CARLOS A. BLANCO

Montecillo, Texcoco, Edo., de México, Julio 2010

<<Esta tesis corresponde a los estudios realizados con una beca otorgada por la Secretaría de Relaciones Exteriores del Gobierno de México>>

AGRADECIMIENTOS

Al programa de intercambio académico de la Secretaría de Relaciones Exteriores de México por otorgarme la beca que me permitió cursar mis estudios de doctorado.

A la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción por darme las facilidades para cursar mis estudios de postgrado.

A mi consejero Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel por haberme dado la oportunidad de unirme a su equipo de investigación y ser a la vez mi amigo.

A los miembros de mi consejo particular, profesores Dra. Celina Llanderal Cazares, Dra. Raquel Alatorre Rosas, Dr. Angel Lagunes Tejeda, Dr. Carlos A. Blanco y Dr. Anthony M. Shelton por sus acertados comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar el presente trabajo.

Al M. C. Jorge Valdéz Carrasco por su ayuda en el procesamiento de las imágenes de la presente investigación.

Al M.C. Julio Cesar Velásquez por todo su apoyo en la obtención y análisis de los extractos

A Don Lauro Hernández Pérez por su invaluable ayuda, enseñanzas y paciencia.

A Don Rubén Pérez por todo su apoyo en el trabajo de invernadero.

Al personal del programa de Entomología y Acarología por toda la ayuda y atenciones prestadas durante estos tres años.

DEDICATORIA

.....A.:L.:G.:D.:G.:A.:U.:

.....A mis padres María Magdalena e Iván porque todos mis logros son gracias a lo que ellos me enseñaron.

.....A mi esposa Inés por sus incontables muestras de amor y ser siempre el primer apoyo en todas mis aventuras.

.....A mi abuela “Mamy”[†] por enseñarme a dar siempre de corazón y porque te extraño mucho.

.....A mi tía abuela Laura[†] por mostrarme lo que significa ser familia.

..... Para usted Sra. Norma[†], por acogerme en su familia y enseñarme lo que significa tener fe.

.....A Pazita, Pipe y Coke por haber nacido.

.....Para ti Rupe[†] porque trabajando contigo aprendí el verdadero significado de la academia y la ética.

.....Porque los amigos son la familia que uno elige a Alejandra Gutiérrez, Cristián Muñoz, Ernesto Cañarte, Winston Mediavilla y Rodrigo Contreras.

.....A mis cuates Bertha, Liliana, Marilú, Hortencia, Julio, Jarquín, Fidel, Juan Carlos y Martín porque gracias a su amistad nunca me sentí como extranjero.

.....A la centenaria mansión casanuestra

..... Al mundo del fin del mundo

.....S.:F.:U.:

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
CONTENIDO.....	vi
INDICE DE CUADROS.....	viii
INDICE DE FIGURAS.....	xiv
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCION GENERAL.....	3
LITERATURA CITADA.....	6

**CAPITULO 1.- BIOACTIVIDAD DE BOLDO (*Peumus boldus* Molina)
(LAURALES: MONIMIACEAE) SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) Y
Helicoverpa zea (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae).**

RESUMEN.....	14
ABSTRACT.....	15
INTRODUCCIÓN	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
RESULTADOS	20
DISCUSION.....	23
LITERATURA CITADA.....	26

**CAPITULO 2.- TOXICIDAD DE UN EXTRACTO DE BOLDO EN CLORURO
DE METILENO (*Peumus boldus* Molina) SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E.
Smith) Y *Helicoverpa zea* Bodie.**

RESUMEN.....	40
ABSTRACT.....	41
INTRODUCCIÓN	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
RESULTADOS Y DISCUSION.....	46
CONCLUSIONES.....	53
LITERATURA CITADA.....	54

CAPITULO 3.- TOXICIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE *Peumus boldus* Molina SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) Y *Helicoverpa zea* Bodie.

RESUMEN.....	68
ABSTRACT.....	69
INTRODUCCIÓN	69
MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
RESULTADOS Y DISCUSION.....	75
CONCLUSIONES.....	82
LITERATURA CITADA.....	83

CAPITULO 4.- ACCIÓN CONJUNTA DE UN EXTRACTO EN CLORURO DE METILENO DE *Peumus boldus* Molina Y SUS PRINCIPALES COMPONENTES, CON *Bacillus thuringiensis* Berliner SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)

RESUMEN.....	97
ABSTRACT.....	98
INTRODUCCIÓN	98
MATERIALES Y MÉTODOS.....	100
RESULTADOS Y DISCUSION.....	102
CONCLUSIONES.....	107
LITERATURA CITADA.....	107

CAPITULO 5.- EFICACIA DE UN EXTRACTO DE BOLDO EN CLORURO DE METILENO (*Peumus boldus* Molina) SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) Y *Helicoverpa zea* Bodie

RESUMEN.....	123
ABSTRACT.....	124
INTRODUCCIÓN	124
MATERIALES Y MÉTODOS.....	125
RESULTADOS Y DISCUSION.....	130
CONCLUSIONES.....	135
LITERATURA CITADA.....	136
CONCLUSIONES GENERALES.....	149

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
CAPITULO 1		
1	Mortalidad y concentración letal 50% (CL ₅₀) y 90% (CL ₉₀), en larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> y <i>Helicoverpa zea</i> tratadas con dieta artificial mezclada con polvos de <i>Peumus boldus</i> .	32
2	Tamaño y peso final de larvas, porcentaje de pupación y peso de pupas, tiempo entre larva-pupa y pupa-adulto y porcentaje de emergencia de adultos de <i>Spodoptera frugiperda</i> alimentada con dieta artificial mezclada con polvo de <i>Peumus boldus</i> .	33
3	Tamaño y peso final de larvas, porcentaje de pupación y peso de pupas, tiempo entre larva-pupa y pupa-adulto y porcentaje de emergencia de adultos de <i>Helicoverpa zea</i> alimentada con dieta artificial mezclada con polvo de <i>Peumus boldus</i> .	34
4	Preferencia y consumo de dieta artificial mezclada con diferentes concentraciones de polvo de <i>Peumus boldus</i> de larvas neonatas de <i>Spodoptera frugiperda</i> y <i>Helicoverpa zea</i> .	35
5	Índice de disuasión de la alimentación (IDA) e índice de supresión de la alimentación (ISA) en larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> y <i>Helicoverpa zea</i> expuestas a dieta artificial con diferentes concentraciones de polvo de <i>Peumus boldus</i> .	36
6	Tasa de consumo relativo (TCR), Índice de inhibición de la alimentación (IIA) y crecimiento (IIC), Tasa de incremento del peso larvario (TIP) y Eficiencia de conversión del alimento ingerido (ECI) en larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> y <i>Helicoverpa zea</i> que se expusieron a dieta artificial con diferentes concentraciones de polvo de <i>Peumus boldus</i> .	37

Cuadro		Página
CAPITULO 2		
1	Principales compuestos presentes en el extracto de <i>P. boldus</i> con cloruro de metileno.	59
2	Mortalidad y concentración letal 50% (CL ₅₀) y 90% (CL ₉₀), en larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith y <i>Helicoverpa zea</i> (Boddie) tratadas con dieta artificial mezclada con un extracto en cloruro de metileno de <i>Peumus boldus</i> .	60
3	Tamaño y peso final de larvas, porcentaje de pupación y peso de pupas, tiempo entre larva-pupa y pupa-adulto y porcentaje de emergencia de adultos de <i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith y <i>Helicoverpa zea</i> (Boddie) alimentadas con dieta artificial mezclada con un extracto en cloruro de metileno de <i>Peumus boldus</i> Molina.	61
4	Preferencia y consumo de dieta artificial mezclada con diferentes concentraciones de un extracto en cloruro de metileno de <i>Peumus boldus</i> Molina de larvas neonatas de <i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith y <i>Helicoverpa zea</i> (Boddie).	62
5	Índice de disuasión de la alimentación (IDA) e índice de inhibición de la alimentación (IIA) en larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> J. E. Smith y <i>Helicoverpa zea</i> (Boddie) expuestas a dieta artificial con diferentes concentraciones con un extracto en cloruro de metileno de <i>Peumus boldus</i> Molina.	63
6	Tasa de consumo relativo (TCR), Índice de inhibición de la alimentación (IIA) y crecimiento (IIC), Tasa de incremento del peso larvario (TIP) y Eficiencia de conversión del alimento ingerido (ECI) en larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith y <i>Helicoverpa zea</i> (Boddie) que se expusieron a dieta artificial con diferentes concentraciones de un extracto en cloruro de metileno de <i>Peumus boldus</i> Molina.	64

Cuadro

Página

CAPITULO 3

1	Principales compuestos presentes en el aceite esencial de <i>Peumus boldus</i> .	89
2	Mortalidad y concentración letal 50% (CL ₅₀) y 90% (CL ₉₀), en larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith y <i>Helicoverpa zea</i> (Boddie) tratadas con dieta artificial mezclada con aceite esencial de <i>Peumus boldus</i> .	90
3	Tamaño y peso final de larvas, porcentaje de pupación y peso de pupas, tiempo entre larva-pupa y pupa-adulto y porcentaje de emergencia de adultos de <i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith y <i>Helicoverpa zea</i> (Boddie), alimentadas con dieta artificial mezclada con aceite esencial de <i>Peumus boldus</i> Molina.	91
4	Preferencia y consumo de dieta artificial mezclada con diferentes concentraciones de aceite esencial de <i>Peumus boldus</i> Molina de larvas neonatas de <i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith y <i>Helicoverpa zea</i> (Boddie).	92
5	Índice de disuasión de la alimentación (IDA) e índice de supresión de la alimentación (ISA) en larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> J. E. Smith y <i>Helicoverpa zea</i> (Boddie) expuestas a dieta artificial con diferentes concentraciones de aceite esencial de <i>Peumus boldus</i> Molina.	93
6	Tasa de consumo relativo (TCR), Índice de inhibición de la alimentación (IIA) y crecimiento (IIC), Tasa de incremento del peso larvario (TIP) y Eficiencia de conversión del alimento ingerido (ECI) en larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith y <i>Helicoverpa zea</i> (Boddie) que se expusieron a dieta artificial con diferentes concentraciones de aceite esencial de <i>Peumus boldus</i> Molina.	94

Cuadro

Página

CAPITULO 4

1	Mortalidad y concentración letal 50% (CL ₅₀) y 90% (CL ₉₀), en larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith tratadas con <i>B. thuringiensis</i> (Crymax ¹).	112
2	Mortalidad y concentración letal 50% (CL ₅₀) y 90% (CL ₉₀), en larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith) tratadas con un extracto en cloruro de metileno de <i>Peumus boldus</i> , boldina y eucaliptol.	113
3	Peso y porcentaje de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith) que alcanzaron el tercer instar tratadas con diferentes concentraciones de <i>B. thuringiensis</i> (Crymax ¹).	114
4	Peso y porcentaje de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith) que alcanzaron el tercer instar, tratadas con un extracto en cloruro de metileno de <i>Peumus boldus</i> , Boldina y Eucaliptol.	115
5	Fuentes de variación, error y coeficiente de variación para el efecto insecticida del extracto en cloruro de metileno de <i>P. boldus</i> , Eucaliptol y Boldina, contra <i>S. frugiperda</i> en laboratorio.	116
6	Peso y porcentaje de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith) que alcanzaron el tercer instar tratadas con diferentes concentraciones de un extracto en cloruro de metileno de <i>Peumus boldus</i> , en combinación con <i>B. thuringiensis</i> (Crymax ²) en proporciones de 1:1, 1:10 y 1.20.	117
7	Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith) tratadas con diferentes concentraciones de Boldina en combinación con <i>B. thuringiensis</i> (Crymax ¹) en proporciones de 1:1, 1:10 y 1.20.	118
8	Peso y porcentaje de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith) que alcanzaron el tercer instar tratadas con diferentes concentraciones de Boldina en combinación con <i>B. thuringiensis</i> (Crymax ²) en proporciones de 1:1, 1:10 y 1.20.	119

Cuadro	Página
9	Peso y porcentaje de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith) que alcanzaron el tercer instar tratadas con diferentes concentraciones de Eucaliptol en combinación con <i>B. thuringiensis</i> (Crymax ²) en proporciones de 1:1, 1:10 y 1:20. 120
10	Efecto de la mezcla en diferentes proporciones de <i>B. thuringiensis</i> (Crymax ¹) con un extracto en cloruro de metileno de <i>Peumus boldus</i> , Boldina y Eucaliptol. 121

CAPITULO 5

1	Cuadro 1.- Mortalidad y concentración letal 50% (CL ₅₀) y 90% (CL ₉₀), en larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith y <i>Helicoverpa zea</i> (Boddie) tratadas con dieta artificial mezclada con un extracto en cloruro de metileno de <i>Peumus boldus</i> . 141
2	Cuadro 2.- Índice de actividad antialimentaria (AA) en larvas de tercer instar de <i>Spodoptera frugiperda</i> J. E. Smith y <i>Helicoverpa zea</i> (Boddie) expuestas a discos foliares tratados con diferentes concentraciones de un extracto en cloruro de metileno de <i>Peumus boldus</i> Molina. 142
3	Cuadro 3.- Efecto de la inyección de 1 µL de un extracto en cloruro de metileno de <i>Peumus boldus</i> Molina en larvas de quinto instar de <i>Spodoptera frugiperda</i> J. E. Smith y <i>Helicoverpa zea</i> (Boddie). 143
4	Cuadro 4.- Porcentaje de área foliar dañada de plantas de maíz tratadas con diferentes concentraciones de un extracto en cloruro de metileno de <i>Peumus boldus</i> Molina y dosis comercial de Cyflutrina infestadas con larvas por <i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith y efecto del extracto en el desarrollo larval. 144

Cuadro		Página
5	Número promedio de masas y total de huevos de <i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith, depositados en plantas de maíz tratadas con diferentes concentraciones de un extracto en cloruro de metileno de <i>Peumus boldus</i> Molina y la dosis comercial de Cyflutrina.	145
6	Efecto en el ciclo de <i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith de diferentes concentraciones de un extracto en cloruro de metileno de <i>Peumus boldus</i> Molina y dosis comercial de Cyflutrina.	146
7	Número promedio de oviposturas de <i>Helicoverpa zea</i> (Boddie) en plantas de <i>Licopersicum scullentum</i> tratadas con diferentes concentraciones de un extracto en cloruro de metileno de <i>Peumus boldus</i> Molina y dosis comercial de Cyflutrina.	147

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
CAPITULO 1		
1	Estados intermedios entre larva-pupa de <i>Spodoptera frugiperda</i> alimentados con dieta tratada con polvo al 8%. A, B y C estados intermedios, D exuvia larval cubriendo el cuerpo y E cutícula ennegrecida.	38
CAPITULO 2		
1	Malformaciones de larvas de <i>Helicoverpa zea</i> alimentadas con dieta mezclada con un extracto en cloruro de metileno de <i>Peumus boldus</i> a una concentración de 2%. A. Depresiones en 6-7 segmento abdominal. B. Ennegrecimiento del integumento C. Estadio prepupal ennegrecido y ruptura parcial de la sutura dorsal del exoesqueleto.	65
2	Malformaciones de adultos de <i>Helicoverpa zea</i> provenientes de larvas alimentadas con dieta mezclada con un extracto en cloruro de metileno de <i>Peumus boldus</i> a una concentración de 2%. A. Falta de extensión de los apéndices ambulatorios y alares B. Alas reducidas y no extendidas C. Alas de mayor tamaño pero sin extenderse.	66
CAPITULO 3		
1	A. Endurecimiento y ennegrecimiento del integumento de la larva B. Falta de despliegue de apéndice ambulatorios y desarrollo parcial de alas.	95

RESUMEN

Se evaluaron en condiciones de laboratorio e invernadero las propiedades insecticidas del polvo, aceite esencial y extracto en cloruro de metileno de Boldo (*Peumus boldus* Molina), además del alcaloide boldina y el terpeno 1-8-cineol (eucaliptol), solos y en combinación con *Bacillus thuringiensis* Berliner contra larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) y *Helicoverpa zea* Boddie. Se realizaron bioensayos para evaluar mortalidad, efecto en el ciclo de vida y las preferencias alimenticias de larvas neonatas y de tercer instar e inhibición de la alimentación y oviposición. El diseño experimental fue de bloques completos al azar con 7 tratamientos y 20 repeticiones. La mayor toxicidad se manifestó con el extracto que a una concentración de 8% tuvo una mortalidad de 100 y 95% para *S. frugiperda* y *H. zea*, respectivamente. El polvo y el aceite esencial ocasionaron una mortalidad de 65 y 82.5% para *S. frugiperda* y de 67.58 y 21.3% para *H. zea*. En ambas especies, a medida que aumentó la concentración de boldo en la dieta, las larvas fueron de menor tamaño y peso, pocas alcanzaron los estados de pupa y adulto y requirieron más tiempo para completar el ciclo de vida. Además, la concentración de 2% de aceite esencial y del extracto provocó malformaciones de larvas y adultos de *H. zea*. En los bioensayos de elección de alimento, las larvas neonatas tanto de *H. zea* como de *S. frugiperda* seleccionaron la dieta con la menor concentración de polvo, extracto o aceite esencial, además de que el consumo fue menor mientras mayor era la concentración de boldo en la dieta. En las pruebas con posibilidad de elección, con larvas de tercer instar, al aumentar la concentración de boldo también aumentaron los índices de disuasión y supresión de la alimentación, lo que indica un efecto deterrente de la alimentación. En las pruebas sin posibilidad de elección, las concentraciones más altas obtuvieron los mayores índices de inhibición de la alimentación y del crecimiento y los menores valores de consumo relativo, incremento del peso larvario y eficacia de conversión del alimento. Los bioensayos con mezclas indicaron que solamente en la combinación de *B. thuringiensis*-boldina la interacción es significativa, indicando que en esta mezcla es relevante tanto la proporción como la concentración. En los casos de *B. thuringiensis*-extracto y *B. thuringiensis*-1-8-cineol la interacción no fue significativa, siendo en ambos casos de mayor importancia la concentración que la proporción. La pérdida de peso y el porcentaje de larvas que llegó a tercer instar tanto en los bioensayos con los compuestos solos como con las mezclas, mostraron la tendencia de que a mayor concentración menor peso y menor número de larvas. El índice de combinación (IC) indicó que solamente las combinaciones de *B. thuringiensis*-extracto y *B. thuringiensis*-boldina en la proporción 1:1 tuvieron efecto sinergista, mientras que las restantes combinaciones evaluadas presentaron un efecto antagonista. En las pruebas en invernadero se observó que el extracto no disminuyó de manera significativa el daño de *S. frugiperda* al follaje de plantas de maíz, presentando todos los tratamientos más de 30% de daño. Sin embargo, en ambas especies se observó una disminución en la oviposición de las hembras, destacándose los tratamientos con 4 y 8% de extracto, ya que en *S. frugiperda* no hubo oviposturas y en *H. zea* sólo un huevo en la primera concentración. Finalmente, los resultados permiten concluir que el polvo, extracto y aceite esencial de esta planta tienen propiedades insecticidas e insectistáticas para el control de *S. frugiperda* y *H. zea*, lo cual podría constituir las en el futuro en una alternativa eficaz de control.

Palabras clave: gusano cogollero, gusano elotero, monoterpenos, insecticidas vegetales, Cry1Aa, Cry1Ac

ABSTRACT

Under laboratory and greenhouse conditions, the insecticidal properties of powder, essential oil and methylene chloride extract of Boldo (*Peumus boldus* Molina), as well the alkaloid boldine and terpene 1-8-cineole (eucalyptol), singly and in mixture with *Bacillus thuringiensis* Berliner were evaluated against larvae of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) and *Helicoverpa zea* Boddie. Bioassays were conducted to assess mortality, impact on life cycle and alimentary preferences of neonate and third instar larvae, in addition to feeding and oviposition inhibition. The experimental design was completely randomized block with 7 treatments and 20 replications. The highest toxicity was observed with the methylene chloride extract at the 8% concentration; it caused 100 and 95% mortality in *S. frugiperda* and *H. zea*, respectively. The powder and essential oil showed 65 and 82.5% mortality against *S. frugiperda*, and 67.58 and 21.3% against *H. zea*. In both species, when boldo's concentration in the diet increased, the larvae showed a smaller size and weight, few of them reached the pupa and adult stages and required more time to complete their life cycle. In addition, the 2% concentration of essential oil and extract caused larval and adult malformations in *H. zea*. In the food choice bioassays, the neonate larvae of *H. zea* and *S. frugiperda* preferred diet with the lowest concentration of powder, extract or essential oil, diet consumption reduced as the concentration of boldo in the diet increased. In choice tests, with third instar larvae, as boldo's concentration increased, the feeding rate decreased indicating a deterrent alimentary effect. In no choice tests, the highest concentrations conveyed the highest rates of feeding and growth inhibition and the lowest rates of relative diet consumption, larval weight increase and feed conversion efficiency. The bioassays using mixtures showed that only in the *B. thuringiensis*-boldine combination, the interaction is significant, indicating that in this mixture are relevant the proportion and concentration. The *B. thuringiensis*-extract and *B. thuringiensis*-1-8-cineole interaction were not significant; in both cases the concentration was more relevant than the ratio. In bioassays with the compounds evaluated singly or in mixtures, as the concentration increased, the number and larval weight decreased. The combination index (CI) indicated that only combinations of *B. thuringiensis*-extract and *B. thuringiensis*-boldine in a 1:1 ratio have synergistic effect, whereas the other combinations evaluated showed antagonistic effect. The greenhouse experiments showed that the extract spray did not decrease significantly the *S. frugiperda* foliage damage to corn plants, because all treatments showed more than 30% of damage. However, both species showed a decrease in female's oviposition, mainly with 4 and 8% of extract. In *S. frugiperda* zero ovipositions were recorded and in *H. zea* only one egg was observed at the first concentration. The results indicate that the powder, extract and essential oil of this plant have insecticidal and insectistatic properties to *S. frugiperda* and *H. zea* control, which could be in the future an effective alternative control strategy.

Key words: fall armyworm, corn armyworm, monoterpenes, botanical insecticides, Cry1Aa, Cry1Ac.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los insectos plaga son uno de los principales problemas fitosanitarios que ocasionan pérdida de cosechas de hasta el 30% a nivel mundial. Si se considera que las plantas cultivadas le proporcionan al ser humano una parte fundamental de su dieta y que aportan a los países productores importantes divisas, se puede concluir que el daño causado por los insectos no sólo tiene impacto social sino que también económico (Isman, 2006).

Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) y *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae) son dos especies de insectos polípagos que afectan importantes cultivos como maíz (*Zea mays* L.), algodón (*Gossypium hirsutum* L), soya (*Glycine max* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y camote (*Ipomoea batata* L.), entre otros (Bergvinson, 2005). Las larvas de ambas especies producen daño económico al consumir el follaje que en casos extremos conlleva a la pérdida total del cultivo.

El control de estas especies se realiza principalmente con insecticidas del grupo de los piretroides y en menor medida con organofosforados (Cook *et al.* 2004). Sin embargo, el desarrollo de resistencia ha limitado el uso de estos agroquímicos (Yu, 1992; Abd-elghafar *et al.*, 1993; Al-Sarar *et al.*, 2006; Pietrantonio *et al.*, 2007). Específicamente según la Arthropod Pesticide Resistance Database (APRD)¹, *S. frugiperda* registra 16 casos de resistencia (4 a organoclorados, 3 a carbamatos, 5 a organofosforados y 4 a piretroides) y *H. zea* 9 (3 a organoclorados, 3 a carbamatos y 3 a organofosforados).

Los insecticidas microbiales y vegetales son los dos grupos de biocidas naturales más utilizados en el control de plagas. En el primer grupo se destaca *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt), una bacteria gram positiva formadora de esporas, habitante natural del suelo. Esta bacteria forma δ -endotoxinas como inclusiones parasporales durante la esporulación, las cuales se disuelven en el intestino medio del insecto liberando protoxinas que proteolíticamente se convierten en pequeñas moléculas tóxicas (Gill *et al.* 1992). Estas protoxinas se unen a las microvellosidades de la membrana epitelial del intestino medio de la larva, producen pequeños poros que alteran el balance osmótico de las células y provocan lisis celular y una eventual destrucción del intestino (Yu, 2008). Existe una gran variedad de formulaciones comerciales a base de Bt recomendadas principalmente para control de plagas de lepidópteros y en menor medida otros órdenes de insectos como Diptera. Además, los avances en la ingeniería genética han permitido la inserción

¹ www.pesticideresistance.org

del gen de *B. thuringiensis* en importantes cultivos agrícolas como algodón (*Gossypium hirsutum* L.) y maíz (*Zea mays* L.), siendo estos capaces de expresar una alta concentración de la toxina, Cry1Ac δ -endotoxina (Perlak *et al.* 1993), que permite a los cultivos protegerse por sí solos de los daños de larvas de lepidópteros, tales como *Heliothis virescens* (Fabricius), *Pectinophora gossypiella* (Saunders) y *Helicoverpa zea* (Boddie) (Koziel *et al.* 1993, Perlak *et al.* 1993, Benedict *et al.* 1994, Feldman y Stone 1997), aunque ya se han detectado casos de resistencia lo cual ha disminuido el potencial de esta bacteria como agente controlador (Tabashnik, 1994).

El uso de compuestos de origen vegetal para la protección de cultivos es una de las técnicas más antiguas de la agricultura (Isman, 2006). Los primeros insecticidas vegetales que se utilizaron fueron nicotina, extraída de *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae), rianodina, aislada de *Ryania speciosa* Valh (Flacuortiaceae), sabadilla y otros alcaloides de *Schoenocaulon officinale* (Schlecht.) A. Gray (Liliaceae), rotenona de *Derris* spp. y *Lonchocarpus* spp. (Fabaceae) y las piretrinas obtenidas del piretro (*Tanacetum cinerariaefolium* (Trev.) Bocc. (Asteraceae) (Roel *et al.* 2000). En la actualidad la investigación se encuentra completamente vigente pero focalizada en otras especies como *Azadirachta indica* A. Juss, *Melia azedarach* L. (Meliaceae) (De Brito *et al.* 2004; Souza *et al.* 2007), *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) (Mancebo *et al.* 2000; Souza *et al.* 2007) y *Annona cherimolia* Miller (Álvarez-Coloma *et al.* 2007), entre otras.

Los insecticidas de origen vegetal se utilizan principalmente en forma de polvo, extractos y aceite esencial, cada uno de ellos con un modo de acción diferente. El uso de polvos se ha dado fundamentalmente en la protección de cereales almacenados. Según Weaver y Subramanyam, (2000), el uso más sencillo de estos compuestos es como polvos, ya que las plantas se secan para luego molerlas y mezclarlas con el grano, lo que modifica el ecosistema de las plagas presentes en los granos almacenados. Los efectos más significativos en el comportamiento de los insectos están relacionados con la selección del hospedero para alimentación y oviposición y en cuanto a la alteración del metabolismo las consecuencias más importantes son aquellas relacionadas con la duración del ciclo del insecto, fecundidad y supervivencia (Rodríguez y Lagunes, 1992). La mayoría de las especies vegetales que se utilizan como insecticidas no eliminan al insecto por intoxicación, sino que generalmente inhiben el desarrollo normal de estos al actuar como repelentes o disuasivos de la alimentación u oviposición, lo cual hace que muchas veces se sobredimensionen sus efectos protectores (Silva *et al.*, 2002).

En el caso de los extractos, Isman (2002 y 2006) señala que cuando estos contienen compuestos como alcaloides, fenoles y terpenoides, presentan acción tóxica al bloquear algún proceso vital del insecto. Aunque en otros, como es el caso del neem, también actúan como reguladores del crecimiento e inhibidores de la alimentación y la reproducción (Isman, 2006). Los extractos han mostrado ser efectivos contra larvas del género *Spodoptera*, siendo los más promisorios los obtenidos de *Azadirachta indica* J. (Martínez y van Emden, 2001), *Melia azedarach* L. (Schmidt *et al.*, 1997; de Brito *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2007), *Brassica alba* (L.) Boiss. (Shadia y Sharaby, 1997), *Carica papaya* L. (Franco-Archundia *et al.*, 2006), *Geranium pelargonium graveolens* (Linn) (Shadia y El-Aziz, 1998), *Reynoutria* sp. (Pavela *et al.*, 2008) y teocintle (*Zea diploperennis* L.) (Fariás-Rivera *et al.*, 2002). En el caso de *Helicoverpa* spp., los insecticidas botánicos utilizados son a base de *A. indica* (Barnby and Klocke, 1987), *M. azedarach* (McMillian *et al.*, 1969), *Trichilia havanensis* Jacq (López-Olguín *et al.*, 1998) y *Ocimum* spp (Karamaj *et al.*, 2008).

Los aceites esenciales tienen actividad fumigante y de contacto (Isman, 2000), además de acción ovicida, antialimentaria y repelente (Sanna *et al.*, 2004). Específicamente los aceites esenciales han demostrado tener propiedades insecticidas contra *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera) (Bittner *et al.*, 2008), *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) (Barreira *et al.*, 2004), *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) (Paranagama *et al.*, 2003), *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) (Homoptera: Aphididae) (Sampson *et al.*, 2005), *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae) (Cestari *et al.*, 2004), *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) (Juntarajumnong y Chandrapatya, 2009; Asawalan y Hassalani, 2006; Oliveira *et al.*, 2003; Obeng-Oferi *et al.*, 1998), *Sitophilus granarius* L. (Coleoptera: Curculionidae) (Aslan *et al.*, 2004), *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) (Miresmailli e Isman, 2006) *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) (Juntarajumnong y Chandrapatya, 2009), además de acción fungicida contra *Fusarium oxysporum* Schltdl, *Botrytis cinerea*, *Bipolaris sorokiniana* (Salgado *et al.*, 2003), *Pythium irregulare* Buisman, *Ceratocystis pilifera* (Fr.) C. Moreau y *Phragmidium violaceum* (Schultz) G. Winter (Bittner *et al.*, 2009) y antimicrobial de amplio espectro (Schwob *et al.*, 2006).

El boldo (*Peumus boldus* Molina), de la familia Monimiaceae, es un árbol perenne nativo de Chile que puede alcanzar hasta 20 m de altura. Sin embargo, a veces por las podas se presenta como un arbusto bajo densamente ramificado (Vogel *et al.*, 2005a). Las hojas contienen

alcaloides conocidos en conjunto como boldina y aceites esenciales en concentraciones de 1.5 a 2.4 mL 100 g⁻¹ de materia seca (Vogel *et al.*, 1999). Según Vogel *et al.*, (2005a) este aceite está conformado por ascaridol (45 a 53%), 1,8-cineol (30%), limoneno, α -terpinol y terminen-4-ol. El principal uso que se le ha dado a esta especie es medicinal, ya que posee propiedades antioxidantes (Quezada *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2000; Russo *et al.*, 2004; Vogel *et al.*, 2005b), antitumorales (Russo *et al.*, 2004), antiinflamatorias (Young *et al.*, 2000; Vogel *et al.*, 2005) y antimicrobianas (Vogel *et al.*, 2005b; Mazutti *et al.*, 2008). Además, estudios recientes han demostrado que polvos, extractos y aceite esencial obtenidos de follaje y madera tienen propiedades insecticidas contra *S. zeamais* (Bittner *et al.* 2008; Silva *et al.*, 2003a; 2003b; 2005a; 2005b; 2006), *A. obtectus* (Bittner *et al.*, 2008) y *Spodoptera littoralis* Bois. (Zapata *et al.*, 2006). Por todo lo antes expuesto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad biológica del polvo, extracto en cloruro de metileno y aceite esencial de hojas de *P. boldus* contra larvas de *S. frugiperda* y *H. zea* en condiciones de laboratorio e invernadero.

LITERATURA CITADA

- Abd-elghafar, S. F., C. O. Knowles and M. L. Wall. 1993. Pyrethroid resistance in two field strains of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 86: 1651-1655.
- Adamcyk, J. J. and J. Gore. 2004. Laboratory and field performance of cotton containing CRY1AC, CRY1AF, and both CRY1AC and CRY1AF (Widestrike) against beet armyworm and fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). Florida Entomologist 87: 427-432.
- Al-Sarar, A, F. R. Hall and R. A. Downer. 2006. Impact of spray application methodology on the development of resistance to cypermethrin and spinosad by fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Pest Manag. Sci. 62: 1023-1031.
- Alvarez-Coloma, A., A. Neske, S. Popich y A. Bardon. 2007. Toxic effects of annonaceous acetogenics from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Pest. Sci. 80: 63-67.
- Asawalam, E.F. and A. Hassanali. 2006. Constituents of the essential oil of *Vernonia amygdalina* as maize weevil protectants. Tropical and Subtropical Agroecosystems 6: 95-102.

- Aslan, I., H. Ozbek, S. Kordali, O. Çalmasur, and A. Cakir. 2004. Toxicity of essential oil vapors obtained from *Pistacia* spp. to the granary weevil, *Sitophilus zeamais* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Plant Diseases and Protection*. 111: 400-407.
- Barnby, M. and J. Klocke. 1987. Effects of azadirachtin on the nutrition and development of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Fabr.) (Noctuidae). *J. Insect Physiol.* 33: 69-75.
- Benedict, J. H., E. S. Sachs, J. L. Halcomb, D. R. Ring, B. Cook, D. M. Stelly, D. W. Altman, R. J. Kohel, J. C. Correa, M. W. Goynes, J. F. Taylor, and S. K. Davis. 1994. Feeding preference and movement of tobacco budworm and bollworm in mixed stands of transgenic *Bt* and non-*Bt* cotton. *Annual Plant Resistance to Insects Newsletter* 20: 31-32.
- Bergvinson, D. J. 2005. *Heliothis/Helicoverpa* problem in the Americas: biology and management. In: H.C. Sharma (Ed.), *Heliothis/Helicoverpa* Management Emerging Trends and Strategies for Future Research (pp. 7-37). Plymouth, UK. Science Publishers, Inc.
- Bittner, M., M. E. Casanueva, C. Arbert, M. Aguilera, V. Hernández, and J. Becerra. 2008. Effects of essential oils from five plants species against the granary weevil *Sitophilus zeamais* and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera). *J. Chil. Chem. Soc.* 53: 1455-1459.
- Bittner, M., M., Aguilera, V. Hernández, C. Arbert, J. Becerra and M. E. Casanueva. 2009. Fungistatic activity of essential oils extracted from *Peumus boldus* Mol., *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde and *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul (Chilean monimiaceae). *Chilean Journal of Agricultural Research* 69: 30-37.
- Buntin, G. D., R. D. Lee, D. M. Wilson and R. McPherson. 2001. Evaluation of Yieldgard transgenic resistance for control fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) on corn. *Florida Entomologist* 84: 37-42.
- Cestari, I., S. Sarti, C. Waid and A. Castello. 2004. Evaluation of the potential insecticide activity of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil against the head lice *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). *Neotropical Entomology* 33: 805-807.
- Cook, D. R., B. R. Leonard and J. Gore. 2004. Field and laboratory performance of novel insecticides against armyworms (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist* 87: 433-439.
- De Brito, C.H., J.A. Mezzomo, J.L. Batista, M. Barbosa and A. Murata. 2004. Bioatividade de extratos vegetais aquosos sobre *Spodoptera frugiperda* em condições de laboratorio. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* 71:41-45.

- Farías-Rivera, L. A., J. L. Hernández-Mendoza, J. Molina-Ochoa and A. Pescador-Rubio. 2002. Effect of leaf extracts of Teosinte, *Zea diploperennis* L., and a mexican maize variety, criollo “Uruapeño”, on the growth and survival of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist* 86: 239-243.
- Feldman, J. and T. Stone 1997. The development of a comprehensive resistance management plan for potatoes expressing the cry3A endotoxin, pp. 49-61. *In* N. Carozzi and M. Koziel (eds.). *Advances in Insect Control: the role of transgenic plants*. Taylor and Francis, London..
- Franco-Archundia, S. L., A. Jiménez-Pérez, C. Luna-León y R., Figueroa-Brito. 2006. Efecto tóxico de semillas de cuatro variedades de *Carica papaya* (Caricaceae) en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Folia Entomol. Mex.* 45: 171-177.
- Gill, S., E. Cowles and P. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37:615-636.
- Isman, M. B. 2000. Plant essential oil for pest and disease management. *Crop Protection* 19: 603-608.
- Isman, M. 2002. Insect antifeedants. *Pesticide Outlook* 13:152-157.
- Isman, M. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 45-66.
- Juntarajumnong, K. K. and A. Chandrapatya. 2009. Repellency, fumigant and contact toxicities of *Litsea cubeba* (Lour.) Persoon against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 43: 56 – 63.
- Kamaraj, C., A. A. Rahuman and A. Vagaban. 2008. Screening for antifeedant and larvicidal activity of plant extracts against *Helicoverpa armigera* (Hübner), *Sylepta derogata* (F.) and *Anopheles stephensi* (Liston). *Parasitol Res.* 103: 1361-1368.
- Koziel, M. K., F. L. Belang, C. Bowman, N. B. Carozzi, R. Crenshaw, L. Crossland, J. Dawson, N. Desai, M. Hill, S. Kadwell, K. Launis, K. Lewis, D. Addox, K. Mcpherson, M. R. Mefhji, E. Merlin, R. Rhodes, G. W. Warren, M. Wright and S. Evola. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology* 11: 194-200.

- López-Olguín, J. F., F. Budia, P. Castañeda y E. Viñuela. 1997. Actividad de *Trichilia havanensis* Jacq. (Meliaceae) sobre larvas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). Bol. San. Veg. Plagas 23: 3-10.
- Mazutti, M., A. J. Mossi, R. L. Cansian, M. L. Corazza, C. Dariva and J. V. Oliveira. 2008. Chemical profile and antimicrobial activity of Boldo (*Peumus boldus* MOLINA) extracts obtained by compressed carbon dioxide extraction. Brazilian Journal of Chemical Engineering 25: 427-434.
- McMillian, W., M. C. Bowman, R. L. Burton, K. J. Starks and B. R., Wiseman. 1969. Extract of chinaberry leaf as a feeding deterrent and growth retardant for larvae of the corn earworm and fall armyworm. J. Econ. Entomol. 62: 708-710.
- Miresmailli, S. and M.B. Isman. 2006. Efficacy and persistence of rosemary oil as an acaricide against twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) on greenhouse tomato. J. Econ. Entomol. 99: 2015-2023.
- Obeng-Oferi, D., Ch. Reichmuth, A. Bekeles, and A. Hassanali. 1998. Toxicity and protectant potential of camphor, a major component of essential oil of *Ocimum kilimandscharicum*, against four stored product beetles. Int. J. Pest Manag. 44: 203-209.
- Oliveira, S. de, J. Vendramim, J. Ribeiro e J. Barbosa. 2003. Bioatividade de diversos pós de origem vegetal em relação a *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). Ciênc. Agrotec. 27: 1231-1236.
- Paranagama, P., Ch. Adhikari, K. Abeywickrama and P. Bandara. 2003. Deterrent effects of some Sri Lankan essential oils on oviposition and progeny production of the cowpea bruchid, (*Callosobruchus maculatus* F.) (Coleoptera: Bruchidae). Food, Agriculture & Environment 1(2): 254-257
- Pavela, R., N. Vrchotova and B. Será. 2008. Growth inhibitory effect of extracts from *Reynoutria* Sp. plants against *Spodoptera littoralis* larvae. Agrociencia. 42: 573-584.
- Perlak, F., T. B. Stone, Y. M. Muskopf, L. J. Petersen, G. B. Parker, S. A. Mcpherson, J. Wyman, S. Love, D. Biever, G. Reed, and D. Fischhoff. 1993. Genetically improved potatoes; protection from damage by Colorado potato beetles. Plant Molecular Biol. 22: 313-321.
- Pietrantonio, P.V., T. A. Junek, R. Parker, D. Mott, K. Siders, N. Troxclair, J. Vargas-Camplis, J. K. Westbrook and V. A. Vassiliou. 2007. Detection and evolution of resistance to the

pyrethroid cypermethrin in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera, Noctuidae) populations in Texas. *Environmental Entomology* 36: 1174-1188.

Quezada, N., M. Ascencio, J. M. Del Valle, J. M. Aguilera and B. Gómez. 2004. Antioxidant activity of crude extract, alkaloid fraction, and flavonoid fraction from Boldo (*Peumus boldus* Molina) leaves. *Journal of Food Science* 69: 371-376.

Roel, A., J. D. Vendramim, R. Shiraishi y N. Frighetto. 2000. Efeito do extrato acetate de etila de *Trichilia pallid* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivencia da lagarta-do-cartucho. *Bragantia* 59(1): 53-58.

Rodríguez, C. y A. Lagunes 1992. Plantas con propiedades insecticidas: resultados de pruebas experimentales en laboratorio, campo y granos almacenados. *Agroproductividad* 1:17-25.

Russo, A., V. Cardile, F. Sánchez, N. Troncoso, A. Vanella and J. A., Garbarino. 2004. Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sciences* 76: 545-558.

Salgado, A.P., M. Cardoso, P. De Souza, J. De Souza, C. Abreu y J.B. Pinto. 2003. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. *Ciênc. e Agrotec.* 27: 249-254

Sampson, B., N. Tabanca, N. Kirimer, B. Dermirci, K. Husnu, I. Khan, J. Spiers and B. Wedge. 2005. Insecticidal activity of 23 essential oils and their major compounds against adult *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) (Aphididae: Homoptera). *Pest Manag. Sci* 61: 1122–1128

Sanna, G., E. Bazzoni, and M. Moretti. 2004. Microencapsulated essential oils active against Indian meal moth. *Bol. San. Veg. Plagas.* 30: 125-132.

Schwob, I., J. Vianno, G. Jann-Para, J.M. Bessiere and M. Dherbomez. 2006. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum hyssopifolium* spp. *hyssopifolium* from southeast France. *J. Essent. Oil Res.* 18: 469-471.

Schmidt, G. H., A. I. Ahmed, and M. Breuer. 1997. Effect of *Melia azedarach* extract on larval development and reproduction parameters of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) and *Agrotis ipsilon* (Hufn.) (Lep. Noctuidae). *Anz. Schädlingskde, Pflanzenschutz, Umweltschutz* .70: 4-12.

- Shadia, E. and A. El-Aziz. 1998. Essential oil of geranium *Pelargonium graveolens* (Linn.) as a feeding deterrent, growth retardant and oviposition repellent for the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). J. Egypt Ger. Soc. Zool. 25: 47-58.
- Silva, G., A. Lagunes, y J. Rodríguez. 2003a. Control de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) con polvos vegetales solos y en mezcla con carbonato de calcio en maíz almacenado. Cienc. Inv. Agr. 30: 153-160.
- Silva, G., D. Pizarro, P. Casals, y M. Berti. 2003b. Evaluación de plantas medicinales en polvo para el control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky en maíz almacenado. Rev. Bras. Agrocienc. 9: 383-388.
- Silva, G., O. Orrego, R. Hepp, y M. Tapia. 2005a. Búsqueda de plantas con propiedades insecticidas para el control de *Sitophilus zeamais* en maíz almacenado. Pesq. Agropec. Bras. 40: 11-17.
- Silva, G., R. Kiger, R. Hepp, y M. Tapia. 2005b. Control de *Sitophilus zeamais* con polvos vegetales de tres especies del género *Chenopodium*. Pesq. Agropec. Bras. 40: 953-960.
- Souza, M., A. Roel, E. J. Arruda e A., S. Marques. 2007. Eficiência de produtos vegetais no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Ciênc. Agrotec. 31: 326-331.
- Vogel, H., I. Razmilic., P. Muñoz, U. Doll and J. San Martín. 1999. Studies of genetic variation of essential oil and alkaloid content in Boldo (*Peumus boldus*). Planta Med. 65: 90-91.
- Vogel, H., I. Razmilic. y U. Doll. 1997. Contenido de aceite esencial y alcaloides en diferentes poblaciones de boldo (*Peumus boldus* Mol). Ciencia e Investigación Agraria 24 (1): 1-6.
- Vogel, H., I. Razmilic, J. San Martín, U. Doll, y B. González. 2005a. Plantas Medicinales Chilenas. Experiencias de Domesticación y Cultivo de Boldo, Matico, Bailahuén, Canelo, Peumo y Maqui. Editorial Universidad de Talca. Talca. Chile. 192 p.
- Vogel, H., I. Razmilic., P. Acevedo and B. González. 2005b. Alkaloid and essential oil concentration in different populations of *Peumus boldus*. Acta Hort. 676: 181-184.
- Weaver, D. and B. Subramanyam. 2000. Botanicals. p. 303-320. In B. Subramanyam and D. Hagstrum (eds.) Alternatives to Pesticides in Stored Product IPM. Kluwer Academic Press, Boston, USA.

- Young, Y., J. J. H. Song, E. S. Han and C. S. Lee. 2000. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacological Research* 42: 361-371.
- Yu, S. J. 1992. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 85: 675-682.
- Yu, S.J. 2008. *The Toxicology and Biochemistry of Insecticides*. CRC Press. Boca Raton. Florida. USA.
- Zapata, N., F. Budia, G. Silva, E. Viñuela y P. Medina. 2006. Actividad antialimentaria de *Maytenus boaria* Mol., *Peumus boldus* Mol. y *Quillaja saponaria* Mol. sobre *Spodoptera littoralis* Boisd. *Bol. San. Veg. Plagas.* 32: 125-135.

CAPITULO 1

Bioactividad de boldo (*Peumus boldus* Molina) (Laurales: Monimiaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) y *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) ¹

Gonzalo Silva-Aguayo^{2*}, J. Concepción Rodríguez-Maciel³, Angel Lagunes-Tejeda³, Celina Llanderal-Cázares³, Raquel Alatorre-Rosas³, A. M. Shelton⁴ y Carlos A. Blanco⁵.

RESUMEN

Se evaluaron las propiedades insecticidas del polvo de boldo (*Peumus boldus*) contra larvas de *Spodoptera frugiperda* y *Helicoverpa zea*. Se realizaron bioensayos para evaluar mortalidad, efecto en el desarrollo y las preferencias alimentarias en larvas neonatas y de tercer instar. En ambas especies, la mayor mortalidad (65% y 67.5% respectivamente) se obtuvieron con la concentración de 8% de boldo (p/p) cuando esta se incorporó a la dieta. La CL₅₀ y CL₉₀ para *S. frugiperda* fueron 6.8 y 25.9 g boldo kg⁻¹dieta y 3.8 y 35.6 g boldo kg⁻¹dieta para *H. zea*. Cuando se incrementó la concentración de boldo el tamaño y peso de la larva se redujo, el porcentaje de pupación disminuyó y las larvas mostraron anomalías anatómicas. Las concentraciones de 4 y 8% obtuvieron, en ambas especies, un menor número de adultos. En las pruebas de preferencia alimentaria, las larvas neonatas seleccionaron la dieta con la menor concentración de polvo de boldo y el menor consumo de dieta se observó en las mayores concentraciones. En los experimentos de selección las mayores concentraciones tuvieron los mayores índices de inhibición de la alimentación y del crecimiento mientras que los menores índices produjeron un incremento del peso larval y una mayor eficiencia de conversión del alimento ingerido para producir nueva biomasa.

Palabras clave: Gusano bellotero, gusano elotero, boldo, Monimiaceae

¹**Traducción del artículo aceptado para publicación en la revista *Southwestern Entomologist***

²Departamento de Producción Vegetal. Facultad de Agronomía. Universidad de Concepción. Vicente Méndez 595. Chillán. Chile. E-mail:gosilva@udec.cl. Autor para correspondencia.

³Programa de Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carretera México-Texcoco. 56230. Montecillo. Estado de México. México.

⁴Department of Entomology, Cornell University, New York State Agricultural Experiment Station, Geneva, NY 14456, USA

⁵USDA. Animal and Plant Health Inspection Service, Biotechnology Regulatory Services. 4700 River Road, Unit 89, Riverdale, MD 20737, USA.

ABSTRACT

Insecticidal properties of powdered boldo (*Peumus boldus*) were evaluated against larvae of *Spodoptera frugiperda* and *Helicoverpa zea*. Bioassays were conducted to assess mortality, development and feeding preferences of neonate and third instars. In both species, the highest mortality (65% and 67.5%, respectively) was obtained with 8% boldo concentration (w: w) when it was incorporated into an artificial insect diet and the LC₅₀ and LC₉₀ for *S. frugiperda* were 6.8 and 25.9 g boldo kg⁻¹diet and 3.8 and 35.6 g boldo kg⁻¹diet for *H. zea*. With increased boldo concentration, larvae were reduced in length and weight, pupation percentage decreased, and larvae showed anatomical abnormalities. Concentrations of 4% and 8% resulted in fewer numbers of adults of both species. In feeding preference tests, neonates selected the diet with the lowest concentration of boldo powder, and the lowest larval feeding occurred with higher concentrations. In the tests for insect preference, the highest concentrations of boldo in the diet resulted in the highest indexes of feeding inhibition and growth, while the lowest indexes resulted in larval weight increases and higher efficiency of conversion of ingested food in diet percentage used to produce new larval biomass.

INTRODUCCION

Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) y *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae) son dos especies de insectos polifagos que afectan cultivos como maíz (*Zea mays* L.), algodónero (*Gossypium hirsutum* L.), soya (*Glycine max* L.), tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), y camote (*Ipomoea batata* L.) (Bergvinson, 2005). La larva se alimenta del follaje y en casos extremos puede causar la pérdida total del cultivo. Estas especies son controladas principalmente con piretroides y organofosforados (Cook *et al.* 2004) entre otros insecticidas sintéticos. Sin embargo, el desarrollo de resistencia ha limitado el uso de estos insecticidas (Yu, 1992; Abd-elghafar *et al.* 1993; Al-Sarar *et al.* 2006; Pietrantonio *et al.* 2007). Aunque, ya han sido desarrollados algodónero y maíz genéticamente modificados capaces de expresar la δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* Berliner lo cual les permite protegerse de estas dos plagas (Buntin *et al.* 2001; Gore *et al.* 2001; Adamcyk and Gore, 2004), la búsqueda de insecticidas de bajo riesgo continúa siendo una necesidad debido a que ambas especies han demostrado tolerancia a diferentes razas de *B. thuringiensis* (Matten *et al.* 2008, Tabashnik *et al.* 2008).

La efectividad de los insecticidas vegetales contra larvas del género *Spodoptera* ya ha sido demostrada. Los extractos más promisorios se han obtenido de plantas como *Azadirachta indica* J. (Martínez and van Emden, 2001), *Melia azedarach* L. (Schmidt et al. 1997; De Brito et al. 2004; Souza et al. 2007), *Brassica alba* (L.) Boiss. (Shadia and Sharaby, 1997), *Carica papaya* L. (Franco-Archundia et al. 2006), *Geranium pelargonium graveolens* (Linn) (Shadia and El-Aziz, 1998), *Reynoutria* sp. (Pavela et al. 2008), y teocintle (*Zea diploperennis* L.) (Farías-Rivera et al. 2002). En el caso de *Helicoverpa* spp., algunos de los insecticidas de origen vegetal evaluados son derivados de *A. indica* (Barnby and Klocke, 1987), *M. azedarach* (McMillian et al. 1969) y *Trichilia havanensis* Jacq (López-Olguín et al. 1997). Estos estudios han demostrado el potencial de las plantas como fuente de compuestos con actividad insecticida que pueden ser de utilidad tanto en la agricultura orgánica como en programas de manejo integrado de plagas.

El Boldo (*Peumus boldus* Molina), de la familia Monimiaceae, es un árbol perenne nativo de Chile del que se han reportado propiedades terapéuticas como antioxidante (Quezada et al. 2004; Young et al. 2000; Russo et al. 2004; Vogel et al. 2005a), anticancerígeno (Russo et al. 2004), antiinflamatorio (Young et al. 2000; Vogel et al. 2005a) y antimicrobial (Vogel et al. 2005a; Mazutti et al. 2008). De acuerdo a Vogel et al. (1997, 1999 and 2005b), los principales compuestos activos de Boldo son aceites esenciales y alcaloides los que se encuentran presentes en diferentes concentraciones en el follaje y la madera dependiendo de la época del año. Este árbol también ha mostrado actividad insecticidas contra *Sitophilus zeamais* Mots. (Páez et al. 1990; Pérez et al. 2007; Silva et al. 2003, 2005 and 2006), y larvas de *Spodoptera littoralis* Boisd. (Zapata et al. 2006), junto con efecto fungicida contra *Penicillium* spp, *Fusarium* spp, *Aspergillus niger* and *A. flavus* (Leite de Souza et al. 2005). Sin embargo, sus propiedades contra otras plagas no han sido estudiadas por lo que el objetivo de la presente investigación fue evaluar en laboratorio la actividad biológica del polvo de follaje de Boldo contra larvas de *S. frugiperda* y *H. zea* de manera que pueda constituirse como una fuente de compuestos insecticidas contra estos dos polífagos insectos.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

El material vegetal consistió en hojas deshidratadas de boldo que fueron adquiridas en el mercado de frutas y hortalizas de la ciudad de Texcoco, Estado de México, México. Las hojas fueron

corroboradas taxonómicamente de acuerdo a Vogel *et al.* 2005. Se seleccionaron solamente hojas adultas y con la lámina foliar completa debido a que según Pérez *et al.* (2007) estas mantienen sus propiedades insecticidas. Las hojas de boldo fueron molidas con un molino eléctrico para café (Braun KSM2BLK, Braun de México y Cía de C.V., Naucalpan, Estado de México, México) y uniformizadas con un tamiz de 250 micrones (DUAL Manufacturing Co., Chicago, IL. USA).

Insectos

Las larvas de *S. frugiperda* y *H. zea* se obtuvieron de la colonia permanente del Laboratorio de Toxicología de Insecticidas del programa de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México donde son mantenidas en una cámara bioclimática en condiciones de 27 ± 1 °C de temperatura, $70 \pm 5\%$ humedad relativa y fotoperiodo de 14: 10 h luz: oscuridad.

Toxicidad del polvo de Boldo

El polvo de boldo fue incorporado a la dieta artificial (Tobacco Bollworm, Southland Products, Inc., USA) cuando esta se enfrió a 40°C para prevenir la degradación de los compuestos activos (Martínez y van Emden, 2001). Una vez que el polvo se incorporó a la dieta para obtener concentraciones de 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8% en base peso/peso (p/p), con una micropipeta Multipette[®] (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) se colocaron 10 mL de la dieta en vasos plásticos de 20 mL (Envases Cuevas S.A. de C.V., Ecatepec, Estado de México, México). Cuando la dieta solidificó y enfrió cada vaso se inoculó con una larva de 24-72 h de edad elaborando por separado un grupo de tratamientos para *S. frugiperda* y otro para *H. zea*. Los vasos fueron tapados con sus tapas perforadas y cubiertas con tela de organza para permitir la ventilación. Posteriormente, la mortalidad fue evaluada cada 48h hasta que el testigo (0%) alcanzó el 75% de pupación. Las larvas fueron consideradas como muertas si no se movían ante la punción por 15 s con una aguja de disección. Los vasos fueron colocados en una cámara bioclimática en un arreglo de bloques al azar. Para cada insecto se evaluó un total de seis concentraciones de boldo y un testigo sin tratar con 20 repeticiones. La metodología fue repetida cinco veces en diferentes días (100 vasos por tratamiento). Para estimar la CL₅₀ y CL₉₀ los datos fueron sometidos a un análisis Probit (Finney, 1971) usando el procedimiento PROC PROBIT del software Statistical Analysis System (SAS) (SAS Institute, 1998).

Efecto del polvo de boldo en el desarrollo del insecto.

En un estudio independiente, utilizando la metodología y concentraciones de boldo descritas anteriormente, se prepararon 100 vasos de dieta para *S. frugiperda* y *H. zea*. Cada vaso se inoculó con una larva de menos de 24 h de edad. Posteriormente, se dejó a las larvas alimentarse por 72h y luego cada 48h se retiraron aleatoriamente cinco vasos por tratamiento de los que se midieron el largo y peso de las larvas. Una vez que el testigo alcanzó el 75% de pupación los vasos restantes de cada tratamiento se dividieron en 10 grupos de 5 vasos cada uno. En cada grupo cada 24h se registró el porcentaje de larvas que alcanzaron el estado de pupa, el peso individual de estas, el número que alcanzó el estado adulto y el tiempo entre larva-pupa y pupa-adulto.

Pruebas de preferencia alimentaria

Pruebas con posibilidad de elección.

Estos estudios se realizaron utilizando las mismas concentraciones descritas anteriormente y en larvas neonatas y de tercer instar de ambas especies. El bioensayo de evaluación de la preferencia alimentaria de larvas neonatas se realizó utilizando una arena de selección consistente de una caja Petri (Industrias Technicare, Atizapan de Zaragoza, Estado de México, México) de 5 cm de diámetro y 1.5 cm de profundidad acorde a lo descrito por Gore *et al.* (2005). Luego, una larva de 24 h de edad fue colocada en el centro de una caja Petri mientras que a su alrededor se ubicaron al azar círculos de dieta (1.5 cm diam. x 0.25 cm alto), representando cada una de las concentraciones de boldo. La tapa de la caja Petri fue perforada (2.5 cm diam.) y los agujeros se cubrieron con tela de organza para permitir la ventilación. La preferencia de la larva para alimentarse de cada concentración de boldo se evaluó durante cinco minutos y en cinco días consecutivos. La preferencia alimentaria fue evaluada cuantificando la cantidad de dieta consumida. Los restos de los discos de las siete dietas fueron deshidratados en un horno a 40°C por 48h y posteriormente pesados. El peso final de la dieta fue comparado con el peso promedio de 20 muestras por tratamiento deshidratadas al principio del experimento. Cada tratamiento tuvo 10 repeticiones y toda la metodología se repitió cinco veces en diferentes días.

Este experimento fue repetido con larvas de tercer instar de ambas especies usando dieta de cada una las concentraciones de boldo mencionadas anteriormente. Se vaciaron 2 mL de dieta en cubeteras para hielo (Imperial Plastic[®] Inc, Lakeville, MN, USA) y una vez que esta solidificó,

dos cubos de dieta, uno con la concentración de boldo y otro sin tratar fueron colocados en una caja Petri (9 cm de diámetro x 3 cm de profundidad) con la tapa perforada y cubierta de tela de organza. Luego, cada caja Petri se infestó con una larva de tercer instar a la que se le dejó alimentarse libremente por 72h. Los restos de dieta, después que la larva se alimentó, fueron deshidratados en un horno a 40°C por 72h. Cada tratamiento tuvo 20 repeticiones y el método completo se repitió cinco veces en diferentes días (100 vasos por tratamiento). Con los valores obtenidos se calculó el índice de disuasión de la alimentación (**IDA**) $IDA = ((Ic - It) / (Ic + It)) * 100$ (Sadek, 2003) y el índice de inhibición de la alimentación (**IIA**) $IIA = ((Ic - It) / Ic) * 100$ (Raffa y Frazier, 1988), donde Ic = Ingestión de alimento no tratado, It = Ingestión de alimento tratado. Para calcular los índices antes señalados, como referencia inicial al principio de los bioensayos se deshidrataron y pesaron 20 muestras de dieta por tratamiento y 50 larvas.

Pruebas sin posibilidad de elección.

Esta evaluación se realizó por separado con larvas del tercer instar de ambas especies. Este test se llevó a cabo de la manera descrita anteriormente para la prueba con posibilidad de elección con la diferencia que la larva en cada caja Petri tuvo acceso a dos cubos de dieta con la misma concentración asegurándose de que esta tuviera suficiente alimento durante su desarrollo. Al principio y final del experimento se pesaron las larvas y la dieta y con los valores de peso seco obtenidos se calcularon los índices de inhibición de la alimentación (**IIA**) (Raffa y Frazier, 1988) e inhibición del crecimiento (**IIC**) $IIC = ((Pc - Pt) / Pc) * 100$, donde Pc = Peso larvas testigo (g) y Pt = Peso larvas tratadas (g); Tasa de consumo relativo (**TCR**) $TCR = IaL / (PiL * T)$, donde IaL = ingestión de alimento durante el período experimental (g), PiL = peso inicial de la larva (g) y T = duración del experimento (días); Tasa de incremento de peso larvario (**TIP**) $TIP = \Delta P / (PiL * T)$, donde ΔP = Incremento del peso larval durante el período experimental, PiL = peso inicial de la larva (g) y T = duración del experimento (días) (Farrar *et al.* 1989) y eficiencia de conversión del alimento ingerido (**ECI**) $ECI = (TIP / TCR) * 100$ (Waldbauer, 1968).

Diseño experimental y análisis estadístico.

Para evaluar el efecto del polvo de boldo sobre el ciclo biológico de *S. frugiperda* y *H. zea*, se utilizó un diseño experimental en bloques completos al azar. Para lograr homogeneidad de las varianzas, los datos se transformaron a $\sqrt{x + 0.5}$ y se sometieron a un análisis de varianza

ANDEVA, ($\alpha = 0.05$) y a una prueba de comparación de medias Tukey con un nivel de significancia del 95% ($P \leq 0.05$) con el programa Statistical Analysis System (SAS) (SAS Institute, 1998).

RESULTADOS

Toxicidad del polvo de Boldo

El polvo de *P. boldus* incorporado a la dieta artificial en una concentración de 8% (p/p) produjo una mortalidad de *S. frugiperda* de 65% y de 67.5% de *H. zea*. En el caso de *H. zea*, no hubieron diferencias significativas entre la mortalidad provocada por las concentraciones de 4 y 8% ($p > 0.05$), aunque 8% fue significativamente diferente del resto de las concentraciones evaluadas ($F=11.56$; $df=6,22$; $p < 0.001$). En ambas especies, el resto de las concentraciones ($\leq 2\%$) no superaron el 40% de mortalidad (Cuadro 1). Para *S. frugiperda*, los valores de CL_{50} y CL_{90} , en g boldo kg^{-1} dieta, fueron de 6.89 y 25.9 respectivamente. En el caso de *H. zea*, la CL_{50} y CL_{90} fueron 3.8 y 35.6 g boldo kg^{-1} dieta respectivamente.

Efecto del polvo de boldo en el desarrollo del insecto

Spodoptera frugiperda.

El máximo tamaño de larva (38.26 mm) se obtuvo en el testigo sin tratar, el cual no fue significativamente diferente de las concentraciones de boldo menores a 4% (Cuadro 2). El menor tamaño (5.6 mm) fueron las larvas que se alimentaron con la dieta a la concentración de 8% de polvo de boldo ($F=28.08$; $df=6, 20$; $p < 0.0001$), siendo significativamente diferentes del resto de los tratamientos. Los pesos de larvas significativamente menores se observaron en las concentraciones $\geq 2\%$ (0.0012-0.22g) (Table 2). El porcentaje de pupación no difirió entre los tratamientos bajo 4%, fluctuando entre 85-100% de pupación. Los insectos que se alimentaron de las concentraciones de boldo $\geq 4\%$ no puparon ($F=57.38$; $df=6, 27$; $p < 0.0001$) (Cuadro 2) y además la concentración de 8% indujo anomalías anatómicas. Las anomalías se manifestaron como estados intermedios (Figura 1a, b y c), con el cuerpo cubierto por el exuvio larval evitando la muda (Figura 1d) y la cutícula se tornó negra (Figura 1e). En los tratamientos en que se alcanzó el estado pupal (ej., $\leq 2\%$), el peso de estas no fue significativamente diferente. El tiempo de pupa a adulto fue estadísticamente diferente ($F=7.97$; $df=4, 19$; $p < 0.0022$) entre la concentración de 2% de boldo (23.5 d) y las menores a esta (Cuadro 2). La emergencia de

adultos fue observada con las concentraciones de boldo $\leq 2\%$ que fluctuaron entre 45% (2%) a 90% en el testigo sin tratar. La emergencia de adultos fue significativamente menor en la concentración de 4% que en las concentraciones menores a 2% de polvo en dieta ($F=20.42$; $df=6, 27$; $p<0.0001$) (Cuadro 2).

Helicoverpa zea.

El mayor tamaño de larva se observó con la dieta testigo sin tratar con 47.6 mm el cual no fue significativamente diferente ($p>0.05$) de los valores obtenidos con las concentraciones de 0.25, 0.5 y 1% de polvo de boldo. El menor tamaño fue 12.5 mm y se observó en la concentración de 8%. El peso de las larvas alimentadas con la dieta testigo sin tratar no fue significativamente diferente de las que se alimentaron de las concentraciones $\leq 4\%$ con un valor mínimo de 0.25g y máximo de 0.73g (Cuadro 3). La concentración de 8% causó el menor peso larval (0.08g). En el testigo sin tratar el 100% de las larvas puparon mientras que de las que se alimentaron con la dieta con concentraciones de 4 y 8% de boldo ninguna larva alcanzó este estado. El peso pupal fue significativamente menor ($F=6.5$; $df=4, 14$; $p<0.0037$) en la concentración de 2% (0.28g) que en las concentraciones menores. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en el tiempo entre larva y pupa fluctuando entre 13.6 y 19 d (Cuadro 3). El menor tiempo entre pupa y adulto (21 d) se observó en el testigo sin tratar. El mayor porcentaje (66%) de adultos emergidos fue en el testigo aunque no difirió estadísticamente de lo observado en la concentración de 0.25% donde un 52.7% alcanzó el estado adulto.

Pruebas de preferencia alimentaria

Spodoptera frugiperda.

Pruebas con posibilidad de elección.

Larvas neonatas (L1). Durante todo el periodo de evaluación, 24 a 120 h, los tratamientos con mayor preferencia fueron los $\leq 0.5\%$ (Cuadro 4). El consumo de la dieta con un 8% de *P. boldus*, 0.03 g, fue significativamente menor ($F=9.53$; $df=6, 20$; $p<0.0004$) que las otras concentraciones y el testigo que fluctuaron entre 0.05 a 0.18 g (Cuadro 4).

Larvas de tercer instar (L3). El índice de disuasión de la alimentación (IDA) para 8% fue significativamente mayor (47.35%, $F=3.69$; $df=5, 23$; $p<0.00141$) que las otras concentraciones

que fluctuaron entre 15 a 40% (Cuadro 5). El menor índice de inhibición de la alimentación (IIA) se observó en la dieta control ($F=3.95$; $df=5, 23$; $p<0.0106$), el cual fue significativamente menor que las otras concentraciones que contenían boldo que estuvieron entre 51.32 y 65.5% (Cuadro 5).

Pruebas sin posibilidad de elección.

No se encontraron diferencias significativas en la tasa de consumo relativo (TCR) entre el testigo sin tratar y las concentraciones $\geq 2.0\%$ ($F=7.67$; $df=6, 27$; $p<0.0001$), las cuales fluctuaron entre 2.91 a 1.66 $g\ g^{-1}\ d^{-1}$ (dieta consumida (g) / (peso inicial larva (g) * periodo alimentación (d)) (Cuadro 6). El mayor valor de IIA se observó en la concentración 8% con 65.18% pero sin diferencia significativa con las concentraciones de 1 a 4% ($p>0.05$). El IIC fue significativamente afectado por la concentración de boldo (Cuadro 6). El efecto fue dosis dependiente porque este parámetro se incrementó progresivamente con la mayor concentración de polvo de boldo. El mayor IIC fue alcanzado por 8% (67.81%) el cual no fue significativamente diferente de 4% pero mayor que 0.25 a 2% ($F=6.76$; $df=5, 23$; $p<0.0008$). La TIP también fue dosis dependiente ($F=9.73$; $df=6, 27$; $p<0.0001$) teniendo el testigo 1.72 $g\ g^{-1}\ d^{-1}$ y la dieta con 8% de polvo 0.37 $g\ g^{-1}\ d^{-1}$. La eficiencia de conversión el alimento ingerido (ECI) fluctuó entre 22 y 37% sin diferencias estadísticas entre tratamientos.

Helicoverpa zea.

Pruebas con posibilidad de elección.

Larvas neonatas (L1). A las 24 y 48h no hubo diferencias estadísticas en la preferencia entre los tratamientos testigo y la concentración de 0.25%, mientras que todos los otros tratamientos fueron significativamente menos preferidos (Cuadro 4). La dieta ingerida fue mayor en el testigo que en todos los otros tratamientos con un valor de 0.22g ($F=17.99$; $df=6, 20$; $p<0.0001$).

Larvas de tercer instar (L3). Los mayores índice de disuasión (IDA) e inhibición de la alimentación (IIA) se observaron en las concentraciones de 2.0 a 8.0% fluctuando entre 46.0 a 81.9% para IDA y entre 62.5 a 87.9% para IIA (Cuadro 5). Entre 4 y 8% no hubo diferencias estadísticas, sin embargo de 0.25 a 1% los valores fueron significativamente diferentes de 8% para IDA ($F=4.28$; $df=8, 23$; $p<0.0128$) e IIA ($F=5.12$; $df=8, 23$; $p<0.0062$).

Pruebas sin posibilidad de elección

No hubo diferencias significativas entre los tratamientos en la tasa de consumo relativo (TCR) observándose un rango entre 1.37 a 3.57 g g⁻¹ d⁻¹ (Cuadro 6). El mayor IIA (60.6%) se observó en la concentración de 8% pero sin diferencias significativas con las concentraciones de 2 a 4%. Tampoco hubo diferencias significativas en el índice de inhibición del crecimiento (IIC) entre los tratamientos fluctuando este entre 22.1 a 56.4%. La tasa de incremento del peso larvario (TIP) no fue significativamente diferente entre los tratamientos con *P. boldus* aunque estos fueron significativamente diferentes del testigo (F=2.57; df=9, 18; p<0.05) que tuvo un valor de 1.96 g g⁻¹ d⁻¹. La eficiencia de conversión del alimento ingerido (ECI) fluctuó entre 36 a 88% aunque no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (p>0.05).

DISCUSIÓN

Toxicidad del polvo de Boldo

Los resultados obtenidos indican que la toxicidad del polvo de boldo sobre *S. frugiperda* y *H. zea* es dependiente de la concentración (Cuadro 1). Esta tendencia concuerda con Zapata *et al.* (2006) donde el polvo de *P. boldus* en concentraciones de 4% causó una mortalidad >40% de larvas de *S. littoralis*. La mortalidad se vio afectada tanto por la concentración de la planta como por la especie de insecto. Basados en los valores de la CL₅₀, *S. frugiperda* fue menos susceptible al boldo que *H. zea* pero a nivel de CL₉₀ fueron igualmente sensibles produciéndose un traslape de los límites fiduciales al 95%.

Efecto del boldo en el desarrollo del insecto

S. frugiperda

La misma tendencia de reducción de peso fue encontrada en *S. littoralis* usando similares concentraciones (Zapata *et al.* 2006). El número de larvas que alcanzaron a pupar muestran una relación inversa con la concentración de polvo en la dieta mientras que el peso de las pupas y el tiempo en alcanzar este estado no mostraron diferencias significativas (Cuadro 2). Esta tendencia es similar a la encontrada con extractos de otras plantas contra *S. frugiperda* como es el género *Trichilia* (Bogorni y Vendramim, 2005; Roel *et al.* 2000; Roel y Vendramim, 2006).

H. zea

Los resultados obtenidos (Cuadro 3) son similares a los de Barnby y Klocke (1987) y Grzywacz *et al.* (2005) quienes evaluaron diferentes concentraciones de azadirachtina contra *H. virescens*. Estos autores encontraron que con el incremento de la concentración en la dieta el número y peso de pupas y adultos disminuye junto con que el tiempo a adulto aumenta.

S. frugiperda

Pruebas con posibilidad de elección.

Larvas neonatas (L1). En las primeras 24h, la larva se está adaptando al nuevo ambiente y su búsqueda es más amplia (Gore *et al.* 2005). Después de las 48h las larvas neonatas se adaptaron al ambiente cesando el movimiento y alimentándose en la dieta testigo sin tratar y la de 0.25 a 0.5% lo que indica un efecto repelente del boldo ya que la larva prefiere alimentarse con la dieta con menor concentración. Pero, la diferencia entre el peso inicial y final de la dieta indica que solo una pequeña cantidad de esta fue consumida por las larvas durante la evaluación.

Larvas de tercer instar (L3). Tanto el índice de disuasión (IDA) como de inhibición de la alimentación (IIA) muestran una disminución en la alimentación de la larva con el aumento de la concentración de boldo (Cuadro 5). El IDA fue menor a lo documentado por Zapata (2005) quien registró valores de 96.2% en larvas de *S. littoralis* mientras que los valores de IIA del presente estudio son mayores a los de Zapata (2005) con la concentración de 4% (14.7%). El IDA también fue menor al obtenido con otras especies tales como la familia Aristolochiaceae (Raffa y Frazier, 1988), *A. indica* (Bomford e Isman, 1996) y *Adhatoda vasica* Nees contra *S. littoralis* (Sadek, 2003). Los valores de IIA son levemente mayores que los reportados por Raffa y Frazier (1988), quienes con una concentración de 1% obtuvieron un 51.8% de deterrencia de *S. frugiperda*.

Pruebas sin posibilidad de elección

Los valores de TCR (Cuadro 6), muestran que la larva se alimenta principalmente de la dieta sin tratar, mostrando que una alta concentración de polvo de *P. boldus* provoca menos consumo. Similares resultados fueron encontrados con *P. boldus* en larvas de *S. littoralis* (Zapata, 2005). Esta tendencia fue también encontrada en otras especies como *Reynoutria* sp. (Pavela *et al.* 2008), *A. vasica* (Sadek, 2003) y ácido ursínico aislado de líquenes (Emmerich *et al.* 1993). Por

lo tanto, una menor ingesta de la dieta debido a la disuasión de la alimentación (IDA) redundó en un menor crecimiento (IIC) y menor peso de la larva (TIP). Zapata (2005) obtuvo los mismos resultados con larvas de *S. littoralis* alimentadas con polvo de otras plantas nativas de Chile como *Cetrum parqui* L'Heritier y *Drimys winteri* J.R. Forster & G. Forster. La relación inversa entre ECI y la concentración de polvo está acorde con Shea y Romeo (1991) y Emmerich *et al.* (1993) para aminoácidos no proteicos de *Calliandra* spp contra *S. frugiperda* y ácido ursínico contra *S. littoralis*, respectivamente. Sin embargo, Sadek (2003) y Pavela *et al.* (2008) obtuvieron la misma tendencia pero con diferencias significativas del testigo sin tratar.

H. zea

Pruebas con posibilidad de elección.

Larvas neonatas (L1). Las pruebas de preferencia (Cuadro 4) muestran que la dieta mezclada con diferentes concentraciones de polvo de *P. boldus* repelen a las larvas neonatas de *H. zea*. Aunque a diferencia de las larvas de *S. frugiperda*, *H. zea* no mostró el periodo inicial de adaptación porque desde el principio del bioensayo y hasta las 120h las larvas permanecieron en el testigo y en la dieta con la concentración de 0.25% de polvo. Este comportamiento explica la mayor alimentación de las larvas en la dieta testigo y en la que tenía menor concentración de polvo de *P. boldus*.

Larvas de tercer instar (L3). Los índices de disuasión (IDA) e inhibición de la alimentación (IIA) tienen valores sobre 80% indicando que las larvas de *H. zea* se alimentaron preferentemente de la dieta sin tratar. Al aumentar la concentración de boldo la dieta se tornó menos atractiva como alimento para la larva.

Pruebas sin posibilidad de elección

El consumo de la dieta (TCR) disminuyó con las mayores concentraciones de polvo de *P. boldus*, produciendo un menor crecimiento (IIC) y peso (TIP) lo cual se relaciona directamente con la inhibición de la alimentación (IIA) y la concentración de boldo en la dieta. La eficacia de conversión de la dieta ingerida (ECI) a pesar de no mostrar diferencias disminuyó con el incremento de polvo en la dieta. Esto último implica que el incremento del polvo de *P. boldus* en la dieta no influye significativamente en el porcentaje que la larva utiliza para producir nueva

biomasa. Esto difiere de Shea y Romeo (1991) quienes indican que altas concentraciones de un insecticida botánico provocan que una menor cantidad de alimento ingerido se transforme en biomasa lo cual explica la disminución en peso y tamaño de la larva de *H. zea*.

Los resultados obtenidos sugieren que *P. boldus* puede ser útil para el control de *S. frugiperda* y *H. zea* debido a su acción tóxica, efecto regulador del crecimiento e inhibidor de la alimentación como también por sus propiedades repelentes en altas concentraciones. La deterrencia de la alimentación de las larvas recién emergidas afectará su desarrollo y por ende el impacto de la plaga en el cultivo. Sin embargo, estos resultados deben ser validados en pruebas de campo para determinar el potencial de *P. boldus* como protector de cultivos.

LITERATURA CITADA

- Abd-elghafar, S. F., C. O. Knowles, and M. L. Wall. 1993. Pyrethroid resistance in two field strains of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 86: 1651-1655.
- Adamecyk, J. J. and J. Gore. 2004. Laboratory and field performance of cotton containing CRY1AC, CRY1AF, and both CRY1AC and CRY1AF (Widestrike) against beet armyworm and fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist* 87: 427-432.
- Al-Sarar, A, F. R. Hall and R. A. Downer. 2006. Impact of spray application methodology on the development of resistance to cypermethrin and spinosad by fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pest Manag. Sci.* 62: 1023-1031.
- Barnby, M. and J. Klocke. 1987. Effects of azadirachtin on the nutrition and development of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Fabr.) (Noctuidae). *J. Insect Physiol.* 33: 69-75.
- Bergvinson, D. J. 2005. *Heliothis/Helicoverpa* problem in the Americas: biology and management. In: H.C. Sharma (Ed.), *Heliothis/Helicoverpa* Management Emerging Trends and Strategies for Future Research (pp. 7-37). Plymouth, UK. Science Publishers, Inc.
- Bogorni, P. C. and J. D. Vendramim. 2005. Efeito subletal de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. *Neotropical Entomology* 34(2):311-317.

- Buntin, G. D., R. D. Lee, D. M. Wilson and R. McPherson. 2001. Evaluation of Yieldgard transgenic resistance for control fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) on corn. *Florida Entomologist* 84: 37-42.
- Bomford, M. and M. B. Isman. 1996. Desensitization of fifth instar *Spodoptera litura* to azadirachtin and neem. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 81: 307-313.
- Cook, D. R., B. R., Leonard, and J. Gore. 2004. Field and laboratory performance of novel insecticides against armyworms (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist* 87: 433-439.
- De Brito, C. H., J. A. Mezzomo, J. L. Batista, M. D. Barbosa, and A. T. Murata. 2004. Bioatividade de extratos vegetais aquosos sobre *Spodoptera frugiperda* em condições de laboratorio. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)*. 71: 41-45.
- Emmerich, R., I. Giez, O. Lange, and P. Proksch. 1993. Toxicity and antifeedant activity of lichen compounds against the polyphagous herbivorous insect *Spodoptera littoralis*. *Phytochemistry* 33: 1389-1394.
- Farías-Rivera, L. A., J. L. Hernández-Mendoza, J. Molina-Ochoa and A. Pescador-Rubio. 2002. Effect of leaf extracts of Teosinte, *Zea diploperennis* L., and a Mexican maize variety, criollo "Uruapeño", on the growth and survival of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist*. 86: 239-243.
- Farrar R., J. Barbour and G. Kennedy 1989. Quantifying food consumption and growth in insects. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 82: 593-598.
- Finney, D. 1971. *Probit Analysis*. Cambridge University Press. Cambridge. UK. 333p.
- Franco-Archundia, S. L., A. Jiménez-Pérez, C. Luna-León and R., Figueroa-Brito. 2006. Efecto tóxico de semillas de cuatro variedades de *Carica papaya* (Caricaceae) en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Folia Entomol. Mex.* 45: 171-177.
- Gore, J., B.R. Leonard and J.J. Adamczyk. 2001. Bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) survival on "Bolgard" and "Bollgard II" cotton flower bud and flower components. *J. Econ. Entomol.* 94:1445-1451.
- Gore, J., J. Adamczyk and C. A. Blanco. 2005. Selective feeding of tobacco budworm and bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) on meridic diet with different concentrations of *Bacillus thuringiensis* proteins. *J. Econ. Entomol.* 98: 88-94.

- Grzywacz, D., A. Richards, R. J. Rabindra, H. Saxena and O. P. Rupela. 2005. Efficacy of biopesticides and natural products for *Heliothis/Helicoverpa* control. In: H. C. Sharma (Ed.), *Heliothis/Helicoverpa* Management Emerging Trends and Strategies for Future Research (pp. 371-389). Plymouth, UK. Science Publishers, Inc.
- Leite de Souza, E., E. de Oliveira, K. R. de Luna, and C. Paiva de Souza. 2005. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various mould isolated of from foods. *Brazilian Archives of Biology and Biotechnology* 48: 245-250.
- López-Olguín, J. F., F. Budia, P. Castañeda and E. Viñuela. 1997. Actividad de *Trichilia havanensis* Jacq. (Meliaceae) sobre larvas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). *Bol. San. Veg. Plagas.* 23: 3-10.
- Martínez, S. and H. van Emden. 2001. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. *Neotropical Entomology* 30: 113-125.
- Matten, S.R., G.P. Head and H.D. Quemada. 2008. How governmental regulation can help or hinder the integration of *Bt* crops within IPM programs. p 27-39. In J. Romeis, A.M. Shelton and G.G. Kennedy (eds). *Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs*. Springer. USA.
- Mazutti, M., A. J. Mossi, R. L. Cansian, M. L. Corazza, C. Dariva and J. V. Oliveira. 2008. Chemical profile and antimicrobial activity of Boldo (*Peumus boldus* MOLINA) extracts obtained by compressed carbon dioxide extraction. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 25: 427-434.
- McMillian, W., M. C. Bowman, R. L. Burton, K. J. Starks and B. R., Wiseman. 1969. Extract of chinaberry leaf as a feeding deterrent and growth retardant for larvae of the corn earworm and fall armyworm. *J. Econ. Entomol.* 62: 708-710.
- Páez, A., A. Lagunes, J. L. Carrillo. and J. C. Rodríguez. 1990. Polvos vegetales y minerales inertes para el combate del gorgojo *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculiniodae) en maíz almacenado. *Agrociencia* 3: 35-46.
- Pavela, R., N. Vrchotova and B. Será. 2008. Growth inhibitory effect of extracts from *Reynoutria* Sp. plants against *Spodoptera littoralis* larvae. *Agrociencia.* 42: 573-584.

- Pérez, F., G. Silva, M. Tapia, and R. Hepp. 2007. Variación anual de las propiedades insecticidas de *Peumus boldus* sobre *Sitophilus zeamais*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 42: 633-639.
- Pietrantonio, P.V., T. A. Junek, R. Parker, D. Mott, K. Siders, N. Troxclair, J. Vargas-Camplis, J. K. Westbrook and V. A. Vassiliou. 2007. Detection and evolution of resistance to the pyrethroid cypermethrin in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera, Noctuidae) populations in Texas. *Environmental Entomology* 36: 1174-1188.
- Quezada, N., M. Ascencio, J. M. Del Valle, J. M. Aguilera and B. Gómez. 2004. Antioxidant activity of crude extract, alkaloid fraction, and flavonoid fraction from Boldo (*Peumus boldus* Molina) leaves. *Journal of Food Science* 69: 371-376.
- Raffa K. and J. Frazier. 1988. A generalized model for quantifying behavioral desensitization to antifeedants. *Ent. Exp. Appl.* 46: 93-100.
- Roel, A., J. D. Vendramim, R. Shiraishi and N. Frighetto. 2000. Efeito do extrato acetate de etila de *Trichilia pallid* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivencia da lagarta-do-cartucho. *Bragantia* 59: 53-58.
- Roel, A. and J. D. Vendramim. 2006. Efeito residual do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) para lagartas de diferentes idades de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciencia Rural* 36: 1049-1054.
- Russo, A., V. Cardile, F. Sánchez, N. Troncoso, A. Vanella and J. A., Garbarino. 2004. Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sciences* 76: 545-558.
- Sadek, M. 2003. Antifeedant and toxic activity of *Adhatoda vasica* leaf extract against *Spodoptera littoralis* (Lep. Noctuidae). *J. Appl. Entomol.* 127: 396-404.
- SAS Institute. 1998. Language guide for personal computer release. 6.03 Edition. SAS Institute. Cary. N. C. USA. 1028 p.
- Schmidt, G. H., A. I. Ahmed and M. Breuer. 1997. Effect of *Melia azedarach* extract on larval development and reproduction parameters of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) and *Agrotis ipsilon* (Hufn.) (Lep. Noctuidae). *Anz. Schädlingskde, Pflanzenschutz, Umweltschutz* 70: 4-12.

- Shadia, E. and A. Sharaby. 1997. Some biological effects of white mustard oil, *Brassica alba* against the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.). Anz. Schädlingsskde Pflanzenschutz Umweltschutz 70: 62-64.
- Shadia, E. and A. El-Aziz. 1998. Essential oil of geranium *Pelargonium graveolens* (Linn.) as a feeding deterrent, growth retardant and oviposition repellent for the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). J. Egypt Ger. Soc. Zool. 25: 47-58.
- Shea, C., and J. T. Romeo. 1991. Nutritional indices: do they explain toxicity of *Calliandra* amino acids?. Florida Entomologist 74: 10-17.
- Silva G., A. Lagunes and J. C. Rodríguez 2003. Control de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) con polvos vegetales solos y en mezcla con carbonato de calcio. Ciencia e Investigación Agraria 30: 153-160.
- Silva, G., O. Orrego, R. Hepp and M. Tapia. 2005. Búsqueda de plantas con propiedades insecticidas para el control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky en maíz almacenado. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 40: 11-17.
- Silva, G., M. Tapia, R. Hepp, G. Bustos and F. Osses. 2006. Evaluación de boldo (*Peumus boldus* Molina) y cal para el control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky. Agrociencia 40: 219-228.
- Souza, M., A. Roel, E. J. Arruda and A., S. Marques. 2007. Eficiência de produtos vegetais no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Ciênc. Agrotec. 31: 326-331.
- Tabashnik, B., A.J., Gassman, D.W. Crowder and Y. Carrière. 2008. Insect resistance to *Bt* crops: evidence versus theory. Nature Biotechnology 26: 199-202.
- Vogel, H., I. Razmilic., P. Muñoz, U. Doll and J. San Martín. 1999. Studies of genetic variation of essential oil and alkaloid content in Boldo (*Peumus boldus*). Planta Med. 65: 90-91.
- Vogel, H., I. Razmilic. and U. Doll. 1997. Contenido de aceite esencial y alcaloides en diferentes poblaciones de boldo (*Peumus boldus* Mol). Ciencia e Investigación Agraria 24: 1-6.
- Vogel, H., I. Razmilic., J. San Martín, U. Doll, and B. González. 2005a. Plantas Medicinales Chilenas. Experiencias de Domesticación y Cultivo de Boldo, Matico, Bailahuén, Canelo, Peumo y Maqui. Editorial Universidad de Talca. Talca. Chile. 192 p.

- Vogel, H., I. Razmilic., P. Acevedo and B. González. 2005b. Alkaloid and essential oil concentration in different populations of *Peumus boldus*. *Acta Hort.* 676: 181-184.
- Waldbauer, G. 1968. The consumption and utilization of food by insects. *Adv. Insect Physiol.* 5: 229-288.
- Young, Y., J. J. H. Song, E. S. Han and C. S. Lee. 2000. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacological Research* 42: 361-371.
- Yu, S. J. 1992. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 85: 675-682.
- Zapata, N. 2005. Evaluación de la actividad insecticida y antialimentaria de *Cestrum parqui* L'Heritier (Solanaceae) y *Drimys winteri* J.R. Forster & G. Forster (Winteraceae) en plagas agrícolas. Ph D. Thesis. E.T.S.I.A. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid. España. 148p.
- Zapata, N., F. Budia, G. Silva, E. Viñuela and P. Medina. 2006. Actividad antialimentaria de *Maytenus boaria* Mol., *Peumus boldus* Mol. y *Quillaja saponaria* Mol. sobre *Spodoptera littoralis* Bois. *Bol. San. Veg. Plagas.* 32: 125-135.

Cuadro 1.- Mortalidad y concentración letal 50% (CL₅₀) y 90% (CL₉₀), en larvas de *Spodoptera frugiperda* y *Helicoverpa zea* tratadas con dieta artificial mezclada con polvos de *Peumus boldus*.

Concentración	Mortalidad (%) ± EE	
	<i>Spodoptera frugiperda</i> ^{1,2}	<i>Helicoverpa zea</i> ^{1,2}
Testigo	0.0 ± 0 A b	0.0 ± 0 A d
0.2 5	0.0 ± 0 B b	10.0 ± 4.1 A d
0.5	2.5 ± 2.5 A b	10.0 ± 5.5 A d
1	2.5 ± 2.5 A b	15.0 ± 5.5 A cd
2	12.5 ± 5.5 A b	37.5 ± 7.7 A bc
4	17.5 ± 6.5 A b	52.5 ± 7.9 B ab
8	65.0 ± 9.3 A a	67.5 ± 7.5 A a
n [†]	200	200
b ± ES [¶]	1.5 ± 0.2	1.3 ± 0.14
CL ₅₀ [§]	6.89	3.8
(95% LC) ^{&}	(5.27-10.3)	(2.74-6.03)
CL ₉₀ [§]	25.9	35.6
(95% LC) ^{&}	(15.5 – 65.1)	(17.5 – 122.1)
Pr>χ ^{2Φ}	0.0001	0.0001

EE = error estándar de la media

¹Dentro de la misma fila, los valores con la misma letra mayúscula no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, p≤0.05).

² Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra minúscula no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, p≤0.05).

[†]= número total de insectos tratados

[¶]=Pendiente (b) ajuste Probit y Error estándar de la pendiente (ES)

[§]= Concentración letal= g kg⁻¹

[&]= Límites de confianza al 95%

^Φ=Probabilidad de que la línea log Dosis-Probit ajuste a una línea recta.

Cuadro 2.- Tamaño y peso final de larvas, porcentaje de pupación y peso de pupas, tiempo entre larva-pupa y pupa-adulto y porcentaje de emergencia de adultos de *Spodoptera frugiperda* alimentada con dieta artificial mezclada con polvo de *Peumus boldus*.

Concentración (%)	Tamaño de larva ± EE * (mm)	Peso larva ± EE * (g)	Pupación ± EE (%)*	Peso pupa ± EE (g)	Larva-Pupa* (LP) ¹ DDI ³	Pupa-adulto ± EE* (PA) ² DDI ³	Emergencia de adultos ± EE * (%)
Testigo	38.26 ± 8.5a	0.59 ± 0.03a	100 ± 0.0a	0.27 ± 0.007a	9.5 ± 0.5a	20.0 ± 0.57a	90 ± 5.3a
0.25	37.17 ± 7.5 a	0.57 ± 0.03a	95 ± 6.6a	0.28 ± 0.003ab	10.5 ± 0.5a	20.0 ± 0.57a	85 ± 5.0a
0.5	36.23 ± 7.3a	0.57 ± 0.07a	90 ± 6.6a	0.28 ± 0.004ab	10.5 ± 0.5a	20.0 ± 0.57a	85 ± 5.0a
1.0	35.87 ± 8.8a	0.55 ± 0.11a	85 ± 11.5a	0.29 ± 0.005ab	11.0 ± 0.0a	20.5 ± 0.50a	75 ± 9.6ab
2.0	29.30 ± 7.0a	0.22 ± 0.02b	85 ± 11.5a	0.3 ± 0.003ab	11.5 ± 0.5a	23.5 ± 0.50b	45 ± 12.6b
4.0	17.70 ± 3.7b	0.077 ± 0.02b	0.0 ± 0.0b				
8.0	5.6 ± 0.6c	0.0012 ± 0.001b	0.0 ± 0.0b				

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

EE= Error estándar de la media

¹LP= Período (días) en que 50 % de larvas que alcanzan el estado de pupa

²PA= Período (días) en que 40% de pupa alcanzan el estado de adulto

³DDI= Días después de la infestación

Cuadro 3.- Tamaño y peso final de larvas, porcentaje de pupación y peso de pupas, tiempo entre larva-pupa y pupa-adulto y porcentaje de emergencia de adultos de *Helicoverpa zea* alimentada con dieta artificial mezclada con polvo de *Peumus boldus*.

Concentración (%)	Tamaño de larva \pm EE (mm)	Peso de larva \pm EE (g)	Pupación \pm EE (%)	Peso de pupa \pm EE (g)	Tiempo larva-pupa \pm EE (LP) ¹ DDI ³	Tiempo pupa-adulto \pm EE (PA) ² DDI ³	Emergencia de adultos \pm EE (%)
Testigo	47.6 \pm 1.3a	0.73 \pm 0.007a	100 \pm 0.0a	0.42 \pm 0.027 a	13.6 \pm 0.7a	21 \pm 0.0 a	66.6 \pm 8.3a
0.25	41.9 \pm 1.2a	0.63 \pm 0.078a	66.6 \pm 0.0ab	0.38 \pm 0.004a	13.6 \pm 0.7a	22 \pm 0.66 b	52.7 \pm 13.8ab
0.5	38.3 \pm 2.7a	0.6 \pm 0.205ab	61.1 \pm 20.0abc	0.37 \pm 0.013a	14.0 \pm 0.7a	25 \pm 0.0 b	25.0 \pm 0.0bc
1.0	37.9 \pm 3.9ab	0.5 \pm 0.021ab	58.3 \pm 8.3 abc	0.37 \pm 0.010a	16.0 \pm 1.0a		0.0 \pm 0.0c
2.0	26.8 \pm 1.1bc	0.26 \pm 0.127ab	44.4 \pm 22.2abc	0.28 \pm 0.096 b	19.0 \pm 2.0a		0.0 \pm 0.0c
4.0	18.5 \pm 2.0cd	0.25 \pm 0.115ab	0.0 \pm 0.0c				
8.0	12.5 \pm 0.4 d	0.08 \pm 0.046b	0.0 \pm 0.0c				

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

EE= Error estándar de la media

¹LP= Período (días) en que 40 % de larvas que alcanzan el estado de pupa

²PA2= Período (días) en que 20% de pupa alcanzan el estado de adulto

³DDI= Días después de la infestación

Cuadro 4.- Preferencia y consumo de dieta artificial mezclada con diferentes concentraciones de polvo de *Peumus boldus* de larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* y *Helicoverpa zea*.

Insecto	Concentración (%)	Preferencia ± EE		Consumo dieta (g)
		24 h (%)	48, 72, 96 y 120 h (%)	
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Testigo	49.9 ± 25.0 a	41.6 ± 16.6 ^a	0.18 ± 0.004 a
	0.25	16.6 ± 16.6ab	41.6 ± 22.0a	0.07 ± 0.01a
	0.5	16.6 ± 8.3ab	16.6 ± 8.3ab	0.06 ± 0.01a
	1.0	16.6 ± 8.3ab	0.0 ± 0.0 b	0.05 ± 0.01a
	2.0	0.0 ± 0.0b	0.0 ± 0.0 b	0.05 ± 0.01a
	4.0	0.0 ± 0.0b	0.0 ± 0.0b	0.05 ± 0.02a
	8.0	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0b	0.03 ± 0.006b
<i>Helicoverpa zea</i>	Testigo	44.4 ± 22.2 a	55.5 ± 22.2 a	0.22 ± 0.07a
	0.25	55.5 ± 22.2 a	44.4 ± 22.2 a	0.09 ± 0.015b
	0.5	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b	0.07 ± 0.012bc
	1.0	0.0 ± 0.0b	0.0 ± 0.0 b	0.06 ± 0.028bc
	2.0	0.0 ± 0.0b	0.0 ± 0.0 b	0.017 ± 0.009bc
	4.0	0.0 ± 0.0b	0.0 ± 0.0 b	0.015 ± 0.005bc
	8.0	0.0±0.0 b	0.0 ± 0.0 b	0.007 ± 0.007c

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

EE= Error estándar de la media

Cuadro 5.- Índice de disuasión de la alimentación (IDA) e índice de inhibición de la alimentación (IIA) en larvas de *Spodoptera frugiperda* y *Helicoverpa zea* expuestas a dieta artificial con diferentes concentraciones de polvo de *Peumus boldus*.

Insecto	Concentración (%)	IDA promedio \pm EE (%)	IIA promedio \pm EE (%)
<i>S. frugiperda</i>	Testigo	--	--
	0.25	15.00 \pm 4.1 a	25.88 \pm 6.5 b
	0.5	35.34 \pm 6.1 a	51.32 \pm 6.7a
	1.0	36.76 \pm 3.5a	53.47 \pm 3.7a
	2.0	39.66 \pm 8.8a	55.03 \pm 4.3a
	4.0	40.31 \pm 3.7a	57.16 \pm 3.7a
	8.0	47.35 \pm 6.1b	65.53 \pm 5.9a
	<i>H. zea</i>	Testigo	--
0.25		28.99 \pm 0.8 b	44.93 \pm 0.9b
0.5		29.77 \pm 0.7b	45.87 \pm 0.8b
1.0		33.37 \pm 4.3b	49.61 \pm 4.5b
2.0		46.01 \pm 4.8ab	62.57 \pm 4.6ab
4.0		75.53 \pm 28.6ab	78.40 \pm 15.7ab
8.0		81.95 \pm 14.2a	87.93 \pm 9.2a

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

EE = error estándar de la media

Cuadro 6.- Tasa de consumo relativo (**TCR**), Índice de inhibición de la alimentación (**IIA**) y crecimiento (**IIC**), Tasa de incremento del peso larvario (**TIP**) y Eficiencia de conversión del alimento ingerido (**ECI**) en larvas de *Spodoptera frugiperda* y *Helicoverpa zea* que se expusieron a dieta artificial con diferentes concentraciones de polvo de *Peumus boldus*

Insecto	Concentración (%)	TCR promedio ±	IIA promedio ±	IIC promedio ±	TIP promedio ±	ECI promedio ±
		EE g g ⁻¹ d ⁻¹	EE (%)	EE (%)	EE g g ⁻¹ d ⁻¹	EE (%)
<i>S. frugiperda</i>	Testigo	4.76 ± 0.43a	-	-	1.72 ± 0.13a	37 ± 0.04 a
	0.25	3.70 ± 0.29ab	21.80 ± 6.3 b	8.2 ± 8.8c	1.32 ± 0.14ab	35 ± 0.01a
	0.5	3.39 ± 0.69ab	22.80 ± 14.6b	19.9 ± 6.6bc	1.13 ± 0.10abc	33 ± 0.05a
	1.0	3.34 ± 0.68ab	29.89 ± 14.2ab	24.9 ± 9.7bc	1.06 ± 0.15bc	32 ± 0.05a
	2.0	2.91 ± 0.18bc	42.57 ± 11.2ab	30.8 ± 7.8bc	0.96 ± 0.12bc	33 ± 0.04a
	4.0	2.77 ± 0.39bc	49.59 ± 1.8ab	48.59 ± 11.4ab	0.68 ± 0.18cd	27 ± 0.08a
	8.0	1.66 ± 0.14c	65.18 ± 2.9 ^a	67.81 ± 4.47 a	0.37 ± 0.07d	22 ± 0.04a
<i>H. zea</i>	Testigo	3.57 ± 0.61a	-	-	1.96 ± 0.17a	88 ± 0.60 a
	0.25	3.02 ± 0.11a	13.15 ± 3.3 c	22.1 ± 7.7a	1.08 ± 0.12b	83 ± 0.28 a
	0.5	2.61 ± 0.97a	17.68 ± 8.6bc	38.27 ± 0.97a	0.82 ± 0.015b	49 ± 0.23 a
	1.0	2.27 ± 0.44a	44.80 ± 4.2ab	41.3 ± 11.4a	0.78 ± 0.18b	42 ± 0.08 a
	2.0	1.59 ± 0.08a	46.70 ± 2.5 ^a	43.2 ± 8.9a	0.75 ± 0.14b	41 ± 0.09 a
	4.0	1.67 ± 0.28a	51.80 ± 8.1 ^a	50.8 ± 11.3a	0.63 ± 0.17b	37 ± 0.07 a
	8.0	1.37 ± 0.34a	60.60 ± 9.7 a	56.4 ± 9.9a	0.54 ± 0.15b	36 ± 0.05 a

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

EE= Error estándar de la media.

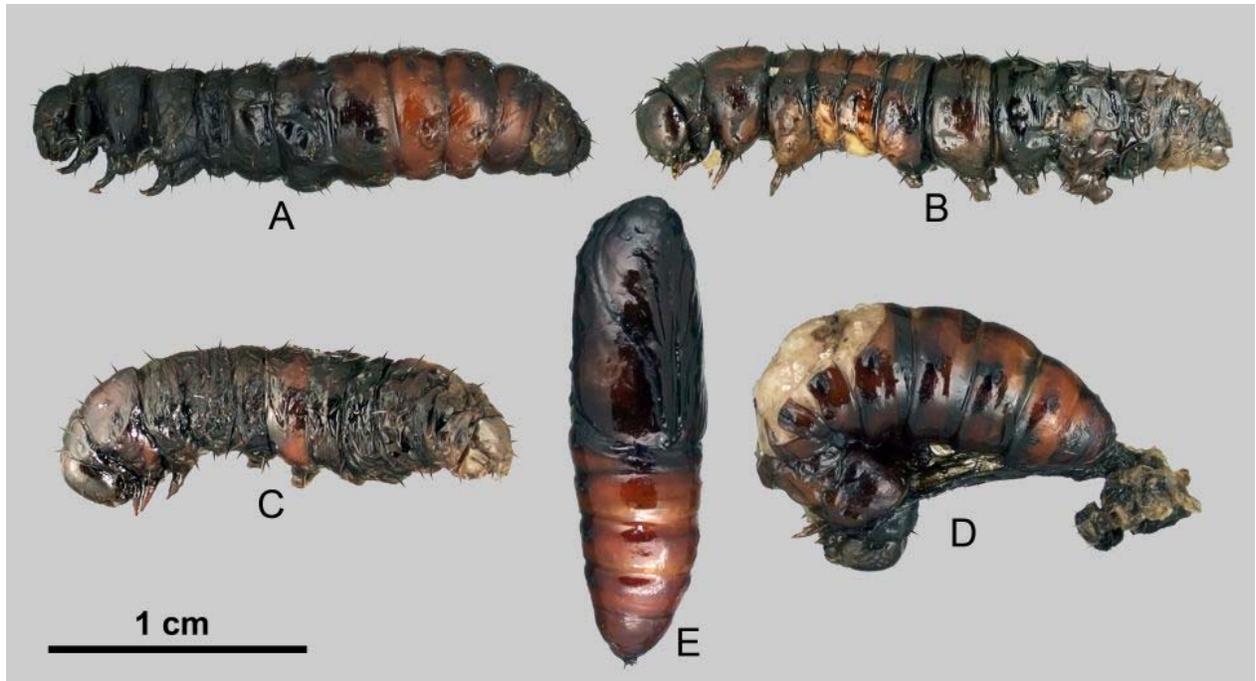


Figura1.- Estados intermedios entre larva-pupa de *Spodoptera frugiperda* alimentados con dieta tratada con polvo al 8%. A, B y C estados intermedios, D exuvia larval cubriendo el cuerpo y E cutícula ennegrecida.

CAPITULO 2

TOXICIDAD DE UN EXTRACTO DE BOLDO EN CLORURO DE METILENO (*Peumus boldus* Molina) SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) Y *Helicoverpa zea* Bodie

Gonzalo Silva¹, J. Concepción Rodríguez², Angel Lagunes², Celina Llanderal², Raquel Alatorre², A. M. Shelton³ y Carlos A. Blanco⁴.

RESUMEN

En condiciones de laboratorio se evaluaron las propiedades insecticidas y el efecto en el ciclo y hábitos alimenticios de *Spodoptera frugiperda* y *Helicoverpa zea*, de un extracto en cloruro de metileno de la planta *Peumus boldus*. También se realizaron estudios de cromatografía de gases para identificar los compuestos presentes en el extracto. Tanto *S. frugiperda* como *H. zea* fueron susceptibles al extracto de *P. boldus*, con mortalidad de 100 y 95%, respectivamente a una concentración de 8%. La CL₅₀ y CL₉₀ fueron de 0.41 y 2.25 mL kg⁻¹ para *S. frugiperda* y 1.7 y 8.31 mL kg⁻¹ para *H. zea*. En ambas especies, a medida que aumentó la concentración del extracto en la dieta, las larvas fueron de menor tamaño y peso, un menor número alcanzó los estados de pupa y adulto y requerían más tiempo para completar el ciclo. La concentración de 2% provocó malformaciones de larvas y adultos de *H. zea*. En las dos especies, las larvas neonatas prefirieron la dieta con menor concentración de extracto. Las larvas de tercer instar de *S. frugiperda* y *H. zea* en las evaluaciones con y sin opción de elección tuvieron mayor inhibición de la alimentación y del crecimiento. En las concentraciones más altas, la cantidad de alimento transformado en biomasa fue menor. Los principales compuestos identificados fueron 1-8-cineol, ascaridol y 4-careno, del grupo de los terpenos.

Palabras clave: gusano cogollero, gusano elotero, insecticidas vegetales

¹Departamento de Producción Vegetal. Facultad de Agronomía. Universidad de Concepción. Vicente Méndez 595. Chillán. Chile. E-mail:gosilva@udec.cl. Autor para correspondencia.

²Programa de Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carretera México- Texcoco. 56230. Montecillo. Estado de México. México.

³Department of Entomology, Cornell University, New York State Agricultural Experiment Station, Geneva, NY 14456, USA.

⁴USDA. Animal and Plant Health Inspection Service, Biotechnology Regulatory Services. 4700 River Road, Unit 89, Riverdale, MD 20737, USA.

ABSTRACT

Under laboratory conditions the insecticidal properties and the cycle and feeding habits effect of a methylene chloride extract of the plant *Peumus boldus* against *Spodoptera frugiperda* and *Helicoverpa zea* were evaluated. Also gas chromatography studies were conducted to identify the compounds present in the extract. Both *S. frugiperda* and *H. zea* were susceptible to the extract of *P. boldus*, with mortality of 100 and 95% respectively at 8% concentration. The LC₅₀ and LC₉₀ were 0.41 and 2.25 mL kg⁻¹ for *S. frugiperda* and 1.7 and 31.8 mL kg⁻¹ for *H. zea*. In both species, as the extract concentration in diet increased, the larvae were smaller in size and weight, less of them reached pupa and adult stage and needed more time to complete the cycle. The concentration of 2% caused larvae and adults malformations of *H. zea*. In both species, the neonate larvae preferred diet with lower extract concentration. In third instars larvae of *S. frugiperda* and *H. zea*, in choice and no choice evaluations, the highest extract concentrations reduced feeding and growth rate. At higher concentrations, the amount of food converted to biomass was lower. The main compounds identified were the terpenes 1-8-cineole, ascaridole and 4-carene.

INTRODUCCIÓN

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) y *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae) afectan en el estado de larva a una gran cantidad de cultivos como maíz (*Zea mays* L.), algodónero (*Gossypium hirsutum* L.), soya (*Glycine max* L.) y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Zalom *et al.*, 1986; Lutrell *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2007). El control de estos insectos se realiza principalmente con insecticidas sintéticos, cuyo uso inapropiado ha provocado problemas como presencia de residuos peligrosos en los alimentos, desequilibrio biológico, intoxicaciones y desarrollo de resistencia. La búsqueda de métodos alternativos al control químico incluye el uso de productos naturales que sean menos agresivos al ambiente, entre los que se destacan los extractos vegetales (Roel y Vendramim, 2006).

El uso de compuestos de origen vegetal para la protección de cultivos es una de las técnicas más antiguas de la agricultura (Isman, 2008). Los primeros insecticidas vegetales que se utilizaron fueron la nicotina, extraída de *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae), la rianodina, aislada de *Ryania speciosa* Valh (Flacuortiaceae), la sabadilla y otros alcaloides de *Schoenocaulon officinale* (Schlecht.) A. Gray (Liliaceae), la rotenona de *Derris* spp. y *Lonchocarpus* spp. (Fabaceae) y las

piretrinas obtenidas del piretro (*Tanacetum cinerariaefolium* (Trev.) Bocc. (Asteraceae) (Roel *et al.*, 2000). En la actualidad, la investigación se enfoca también en otras especies de plantas como *Azadirachta indica* A. Juss, *Melia azedarach* L. (Meliaceae) (De Brito *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2007), *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) (Mancebo *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2007) y *Annona cherimolia* Miller (Álvarez-Coloma *et al.*, 2007), entre otras.

En el caso de *S. frugiperda* y *H. zea*, los compuestos vegetales que han mostrado tener efectividad pertenecen a plantas de la familia Meliaceae como *Trichilia pallida* Swartz (Roel *et al.*, 2000; Roel y Vendramim, 1999 y 2006), *A. indica*, *M. azedarach*, *Anacardium occidentale* L. y *Guarea trichilioides* L. (De Brito *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2007) y Annonaceae como *A. cherimolia* Miller (Alvarez-Coloma *et al.*, 2007).

El boldo (*Peumus boldus* Molina: Monimaceae) es un árbol nativo de Chile que tradicionalmente se le conoce por sus propiedades medicinales (Vogel *et al.*, 2005) y, estudios recientes han demostrado que polvos y extractos del follaje y madera de esta planta tienen propiedades insecticidas contra *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Silva *et al.*, 2003 y 2005) y *Spodoptera littoralis* Boisd. (Zapata *et al.*, 2006). La presente investigación tuvo como objetivo el de evaluar la actividad biológica de un extracto en cloruro de metileno de hojas de boldo contra larvas de *S. frugiperda* y *H. zea*, en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal se adquirió en forma de hojas deshidratadas, en el mercado de frutas y hortalizas de la ciudad de Texcoco, Estado de México, México y su identificación taxonómica se corroboró de acuerdo a Vogel *et al.*, 2005. Las hojas se procesaron el mismo día que se utilizaron, ya que Pérez *et al.* (2007) demostraron que el follaje de esta planta conserva sus propiedades insecticidas si se le mantiene deshidratado y sin moler. La trituration se hizo con un molino eléctrico para café Braun KSM2-BLK (Braun de México y Cía de C.V., Naucalpan, Estado de México, México) y lo obtenido se hizo pasar por un tamiz de 250 micrones (DUAL Manufacturing Co. Chicago. IL. USA).

Insectos

Las larvas de *S. frugiperda* y *H. zea* provinieron de la colonia que se mantiene de manera permanente en el Laboratorio de Toxicología de Insecticidas del Programa de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, las que se mantuvieron en cámara bioclimática bajo condiciones controladas de 27 ± 1 °C, $70 \pm 5\%$ de humedad relativa y fotoperiodo de 14: 10 horas luz: oscuridad.

Obtención del extracto

En un sistema de extracción Soxhlet se colocaron 400 g de polvo y se utilizó cloruro de metileno como solvente. La extracción se realizó durante 120 h. Posteriormente, el extracto se concentró en un rotovapor a 40 °C hasta sequedad (Kamaraj *et al.* 2008a y b). El extracto concentrado se utilizó como solución madre y hasta su utilización se depositó en un frasco ámbar y se almacenó a 4°C.

Análisis cromatográfico

El extracto se analizó mediante cromatografía de gases en el laboratorio de Ecología Química del Programa de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo, México. Para el análisis cromatográfico se utilizó un equipo Hewlett-Packard (HP) modelo 5890, equipado con un detector de flama y un inyector capilar splitless. La muestra se introdujo en un horno a una temperatura de 40°C durante los primeros dos minutos y se incrementó 15°C por minuto hasta llegar a 250°C, donde se mantuvo por dos minutos. Posteriormente la temperatura se incrementó 20°C por minuto hasta alcanzar 280°C por un minuto. El modo de inyección fue splitless, con columna HP 5MS y el detector a 280°C y helio, a un flujo de 1 mL min^{-1} , como gas acarreador. El tiempo de análisis fue de 20 min.

Toxicidad del extracto de *P. boldus*

Se utilizaron vasos plásticos (Envases Cuevas S.A. de C.V., Ecatepec, Estado de México, México) de 20 mL de capacidad en los que con una micropipeta Multipette® (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) se colocaron 10 mL de dieta artificial (Tobacco Bollworm, Southland Products, Inc.) mezclada con el extracto de boldo para obtener concentraciones de 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0%. La mezcla se realizó a una temperatura de 40 °C para evitar la degradación de

los compuestos activos (Martínez y van Emden, 2001). Una vez que la dieta se enfrió y solidificó, en cada vaso se introdujo una larva neonata de 24 a 72 h de edad. Luego, cada 48 h se evaluó la mortalidad hasta que el 75% de las larvas del testigo sin tratar alcanzaron el estado de pupa. Se consideró como muerta aquella larva que carecía de movimiento después de punzarla con una aguja de disección. El testigo sin tratar consistió en 10 mL de dieta libre de extracto. En total se evaluaron seis concentraciones de boldo y un testigo sin tratar, cada uno con 20 repeticiones y la metodología se repitió cinco veces en diferentes días (100 vasos por tratamiento). Para estimar la concentración letal 50% (CL₅₀) y 90% (CL₉₀), los datos se sometieron a un análisis Probit (Finney, 1971) con el procedimiento PROC PROBIT del programa Statistical Analysis System (SAS) (SAS Institute, 1998).

Efecto de boldo en el ciclo biológico

El efecto del extracto de boldo sobre el ciclo de las especies evaluadas se realizó en vasos plásticos de 20 mL de capacidad, en los que se colocaron 10 mL de dieta artificial mezclada con el extracto en concentraciones de 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0%. Para cada tratamiento se prepararon 100 vasos y en cada uno de ellos se introdujo una larva neonata de menos de 24 h de edad. Se dejó a las larvas alimentarse libremente por 72 h y luego cada 48 h se retiraron aleatoriamente cinco vasos por tratamiento para pesar y medir la longitud de las larvas ahí presentes. Una vez que en el testigo sin tratar se alcanzó un 75% de pupación, las unidades experimentales restantes de todos los tratamientos se dividieron en 10 repeticiones de cinco vasos cada una. En cada repetición se evaluó el porcentaje de larvas que alcanzaron el estado de pupa, el peso en gramos de éstas, el número que llegó al estado adulto y el tiempo transcurrido entre los estados de larva-pupa y pupa-adulto.

Bioensayos de actividad antialimentaria

Bioensayos con posibilidad de elección

Larvas de primer instar. La preferencia alimentaria de larvas neonatas se evaluó con un dispositivo de elección (choice arena) (Gore *et al.*, 2005), consistente de una caja Petri plástica de 5 cm de diámetro y 1.5 cm de altura (Industrias Technicare, Atizapan de Zaragoza, Estado de México, México). En el centro de la caja Petri se colocó una larva neonata de 24-48 h de edad y alrededor de ella se colocó un círculo de dieta de 1.5 cm de diámetro y 0.25 cm de altura, de cada

tratamiento: 0 (testigo), 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0%. Finalmente, la caja Petri se cubrió con su tapa perforada y cubierta internamente de tela de organza para permitir la ventilación. Diariamente y durante cinco días, se evaluó por cinco minutos la preferencia de la larva para alimentarse de cada una de las concentraciones estudiadas. Para evaluar la preferencia de alimento, los restos de las siete dietas se secaron en una estufa a 40 °C por 48 h para obtener su peso seco, el que se comparó con el peso seco de círculos de dieta intactos deshidratados al comienzo del bioensayo. Cada tratamiento tuvo 10 repeticiones y la metodología se repitió cinco veces en el tiempo. En cada repetición, los tratamientos se ubicaron de manera aleatoria para evitar interferencias con factores externos como luz y temperatura entre otros.

Larvas de tercer instar.

Pruebas con posibilidad de elección

En el caso de larvas del tercer instar, la dieta se preparó en una cubetera de hielo (Imperial Plastic[®] Inc, Lakeville, MN, USA) vaciando 2 mL de dieta en cada cavidad. Como dispositivo de elección se utilizó una caja Petri plástica de 9 cm de diámetro por 3 cm de alto, con la tapa perforada y cubierta internamente con tela de organza. Para mantener la humedad relativa, en la base de la caja se colocó un trozo de papel filtro humedecido y sobre éste se colocaron dos cubos de dieta de 2 × 2 cm, uno a la concentración requerida y otro sin tratar. Luego, cada caja se infestó con una larva de tercer instar a la que se le permitió alimentarse libremente durante 72 h con la dieta de su preferencia. Las concentraciones evaluadas fueron: 0 (testigo), 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0% de extracto en dieta y cada tratamiento constó de 20 repeticiones y la metodología se repitió cinco veces en diferentes días (100 cajas Petri por tratamiento). Al final del bioensayo los restos de dieta se deshidrataron en una estufa a 40°C por 72 h para obtener su peso seco (Zapata *et al.* 2006) y con los valores obtenidos se calculó el índice de disuasión de la alimentación (**IDA**) $IDA = ((Ic - It) / (Ic + It)) * 100$ (Sadek, 2003) y el índice de inhibición de la alimentación (**IIA**) $IIA = ((Ic - It) / Ic) * 100$ (Raffa y Frazier, 1988), donde Ic = Ingestión de alimento no tratado, It = Ingestión de alimento tratado.

Pruebas sin posibilidad de elección

El experimento se realizó de la manera indicada anteriormente, pero con la diferencia de que la larva de cada caja Petri, tenía acceso a dos cubos de dieta del mismo tratamiento. Los

tratamientos evaluados fueron los indicados en las pruebas con posibilidad de elección y con los valores de peso seco obtenidos se calcularon los índices de inhibición de la alimentación (**IIA**) (Raffa y Frazier, 1988) e inhibición del crecimiento (**IIC**) $IIC = ((Pc-Pt)/Pc)*100$, donde Pc = Peso larvas testigo (g) y Pt = Peso larvas tratadas (g); Tasa de consumo relativo (**TCR**) $TCR = IaL/(PiL*T)$, donde IaL = ingestión de alimento durante el período experimental (g), PiL = peso inicial de la larva (g) y T = duración del experimento (días); Tasa de incremento de peso larvario (**TIP**) $TIP = \Delta P / (PiL * T)$, donde ΔP = Incremento del peso larval durante el período experimental, PiL = peso inicial de la larva (g) y T = duración del experimento (días) (Farrar *et al.* 1989) y eficiencia de conversión del alimento ingerido (**ECI**) $ECI = (TIP/TCR)*100$ (Waldbauer, 1968).

Para calcular los índices antes señalados, como referencia inicial al principio de los bioensayos se deshidrataron y pesaron 20 muestras de dieta por tratamiento y para obtener la diferencia de peso, todas las larvas se pesaron al inicio y final del bioensayo.

Diseño experimental y análisis estadístico

Para evaluar el efecto del extracto de boldo sobre *S. frugiperda* y *H. zea*, se utilizó un diseño experimental en bloques completos al azar. Para homogeneizar las varianzas, los datos se transformaron a $\sqrt{x} + 0.5$ y se sometieron a un análisis de varianza ANDEVA, ($\alpha = 0.05$) y a una prueba de comparación de medias Tukey con un nivel de significancia del 95% ($p \leq 0.05$) con el programa Statistical Analysis System (SAS) (SAS Institute, 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis del extracto

En el análisis cromatográfico del extracto se identificaron 15 compuestos (Cuadro 1). Los compuestos presentes en mayor concentración fueron: 4-careno (18.14%), 1-8 cineol (5.81%), ascaridol (2.34%), spathulenol (2.07%), óxido piperotónico (1.98%), eugenol metílico (1.54%) y L-pinocarveol (1.3%). Hubo predominancia de monoterpenos, lo cual es característico también en otras especies de la familia Monimiaceae como *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde y *Laurelia sempervirens* (Ruíz & Pav.) Tul. (Bittner *et al* 2009). Los monoterpenos son los responsables del aroma característico de hojas, flores y su aceite esencial pero no son específicos de esta familia sino que también se encuentran en otras especies conocidas por sus propiedades

terapéuticas como *Mentha* spp. (Lamiaceae) (Mastelic y Jerkovic, 2002; Larkov *et al.* 2007; Sigh *et al.* 2008) y *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) (Sigh *et al.* 2008; Marangon *et al.* 2008). El 1-8 cineol ha demostrado propiedades insecticidas fumigantes contra plagas de granos almacenados como *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae) (Lee *et al.* 2003; Negahban *et al.* 2007), *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) (Lee *et al.* 2003; Bittner *et al.* 2008; Bekele y Hassanali, 2001), *Tribolium castaneum* (Herb) (Coleoptera: Tenebrionidae) (Lee *et al.* 2003; Negahban *et al.* 2007), *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae) (Lee *et al.* 2003; Bekele y Hassanali, 2001), *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae) (Bittner *et al.* 2008) y *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae) (Negahban *et al.* 2007). Otro de los compuestos identificados con registro de actividad en insectos es eugenol metílico el cual es una kairomona que se utiliza como atrayente para la mosca oriental de la fruta [*Bactrocera dorsalis* (Hendel)] (Shelly y Edu 2008; Shelly *et al.* 2005; Vargas *et al.* 2000) y la mosca del melón [*Bactrocera cucurbitae* (Coquillett)] (Vargas *et al.* 2000). El Ascaridol se ha identificado como el componente principal del aceite esencial de *Ch. ambrosioides* (Sigh *et al.* 2008) el cual ha mostrado efecto fungicida sobre hongos del genero *Aspergillus*, *Colletotrichum* y *Fusarium* (Marangon *et al.* 2008).

Toxicidad del extracto de *P. boldus*

S. frugiperda

La larva de esta especie es susceptible al extracto de *P. boldus* ya que a partir de la concentración de 2% se obtuvo una mortalidad superior al 80% (Cuadro 2). La mortalidad más alta (100%) se observó a la concentración de 8% pero sin diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) con las concentraciones de 2 y 4% que ocasionaron una mortalidad de 85 y 97.5% respectivamente. La CL_{50} fue de 0.41 mL kg⁻¹ y la CL_{90} de 2.25 mL kg⁻¹. La mortalidad obtenida es superior a la observada por Zapata *et al.* (2006) quienes mezclaron dieta artificial con polvo de *P. boldus* a una concentración de 4% provocando un 80% de mortalidad de larvas de *S. littoralis*.

H. zea

Las larvas de esta especie también fueron susceptibles al extracto en cloruro de metilo, pues éste produjo una mortalidad de 95% a la concentración de 8% (Cuadro 2). Este nivel de mortalidad fue significativamente diferente ($F=16.89$; $df=15,69$; $p = 0.001$) a la que se observó en los demás

tratamientos. La CL_{50} fue de 1.70 mL kg^{-1} y la CL_{90} de 8.31 mL kg^{-1} , mismas que pueden ser consideradas como promisorias en el control de esta plaga en campo.

Efecto de boldo en el ciclo biológico

S. frugiperda

A las concentraciones de 4 y 8% ninguna larva sobrevivió para completar el ciclo. En relación al tamaño y peso de larvas, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones evaluadas (Cuadro 3). Tampoco se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo sin tratar respecto al porcentaje de pupación, tamaño de pupas y el número de éstas que alcanzaron el estado adulto. Cada una de estas variables disminuye en la medida que aumenta la concentración del extracto. El tiempo entre larva-pupa fue significativamente menor ($F=19.27$ $df=8,24$; $p=0.0001$) en el testigo sin tratar con 8.6 días. Sin embargo, no hubo diferencia estadísticas entre tratamientos en lo que respecta al tiempo que transcurre entre pupa y adulto. Wiseman *et al.* (1996) señalan que cuando se alimentan larvas de *S. frugiperda* con dieta mezclada con plantas no huéspedes se reduce la ingesta y con ello el crecimiento y peso de estas debido, seguramente, a algún componente tóxico. Además, la diferencia de peso y duración del ciclo entre las larvas del testigo sin tratar y las alimentadas con dieta mezclada con boldo también se ha observado en extractos de otras especies como *Trichilia* spp (Matos *et al.* 2006; Roel *et al.* 2000; Roel y Vendramim 1999) y *Azadirachta indica* A. Juss (Martinez y van Emdem, 2001).

H. zea

El tamaño de las larvas disminuyó cuando aumentó la concentración del extracto en la dieta. El mayor tamaño se observó en el testigo con 47.6 mm y fue significativamente superior ($F=27.52$ $df=8,20$; $P=0.001$) al que se presentó en los tratamientos restantes (Cuadro 3). A pesar de la diferencia de tamaño, en el peso las larvas no hubo diferencias entre el testigo sin tratar y las concentraciones iguales o inferiores a 2%. En las concentraciones 4 y 8% las larvas pesaron 0.029 y 0.0005 g, respectivamente; siendo estos valores significativamente menores ($F=24.46$ $df=8,20$; $P=0.001$) a los observados en los tratamientos restantes. En las concentraciones de 4 y 8%, ninguna larva alcanzó el estado de pupa, a diferencia del testigo sin tratar donde el 100% alcanzó dicho estado. Este último mostró diferencias significativas con 2% ($F=2.28$ $df=6,14$;

$P=0.039$) que registró un 33.5% de pupación. A la concentración de 2%, las larvas que no alcanzaron a pupar presentaron malformaciones como depresiones en el 4 a 6 segmento abdominal, así como endurecimiento y ennegrecido parcial o total del integumento (Figura 1 a y b). Otras larvas interrumpieron su desarrollo en la etapa inicial de la pupación observándose una ruptura incompleta de la sutura dorsal junto con ennegrecimiento parcial (Figura 1c). Estas malformaciones son estructuralmente similares a las documentadas por Martínez y van Emden (2001) en larvas de *S. littoralis* alimentadas con dieta mezclada con azadirachtina. La emergencia de adultos también se afectó por la concentración de extracto. En la concentración de 2%, ninguna pupa alcanzó el estado adulto lo cual difiere ($F=25.28$ $df=6,14$; $p=0.0001$) de lo observado en los demás tratamientos donde destaca el testigo sin tratar pues el 100% de larvas llegaron al estado adulto. A la concentración de 2% se observaron malformaciones en los adultos, ya que a pesar de haber emergido, no extendieron sus apéndices ambulatorios y alares (Figura 2 a) o lo hicieron de manera parcial (Figura 2b). También se observaron adultos con alas de tamaño normal pero sin desplegarse (Figura 2c).

El tiempo entre una etapa y otra fue significativamente menor para el testigo sin tratar tanto para larva-pupa ($F=9.9$ $df=6,14$; $p=0.0024$) como para pupa-adulto ($F=71.7$ $df=7,17$; $p=0.0001$) con 19 y 21.7 días respectivamente. Los resultados obtenidos son afines a los que obtuvieron Barnby y Klocke (1987) y Grzywacz *et al.* (2005) quienes evaluaron diferentes concentraciones de azadirachtina contra *H. virescens*, encontrando que a medida que aumentaba la concentración en la dieta disminuía el número de pupas obtenidas, su peso y la cantidad y tiempo de las que llegaban a adulto.

Bioensayos de actividad antialimentaria

Bioensayos con posibilidad de elección

Larvas de primer instar.

S. frugiperda

Las larvas neonatas de esta especie se detectaron principalmente en la dieta con concentraciones inferiores a 1% (Cuadro 4). A las 24 h, el testigo tuvo un 55% de las preferencias lo cual no difirió de 0.25 y 0.5% que tuvieron un 35 y 10% respectivamente. En la evaluación a las 48 h solo el testigo y la concentración 0.25% fueron seleccionadas por las larvas con 75 y 25% difiriendo significativamente entre ellas ($F=25.02$; $df=9,27$; $p=0.0001$). A partir de las 72 h y

hasta las 120 h, el testigo sin tratar presentó un 80% de las larvas lo que difiere significativamente ($F=12.85$; $df=9,27$; $p=0.0001$) de la concentración de 0.25% que obtuvo el 20% restante de las preferencias. El consumo de dieta fue mayor cuando disminuyó la concentración de extracto. El consumo de dieta más alto se observó en el testigo sin tratar con 0.044 g y este valor fue significativamente superior ($F=6.49$; $df=19,97$; $p=0.0001$) al que se presentó en los tratamientos restantes.

H. zea

La preferencia de las larvas neonatas fue más amplia al comienzo del bioensayo. Posteriormente, las larvas prefirieron los tratamientos con menor concentración de extracto (Cuadro 4). A las 24 h se detectaron larvas entre el testigo sin tratar y la concentración de 2%. Este amplio espectro de elección inicial, según Gore *et al.* (2005), se debe a un periodo de adaptación al medio. En las evaluaciones posteriores, este espectro de preferencia se reduce si el compuesto en evaluación presenta efecto disuasivo de la alimentación. En la evaluación a las 48 h solo se observaron larvas en el testigo sin tratar y en las concentraciones de 0.25 y 0.5%. El porcentaje de larvas en el testigo sin tratar (46.67%) fue superior al resto de los tratamientos ($F=0.0001$; $df=8,20$; $p=0.0001$). En las 72 h la preferencia por el testigo sin tratar se incrementó a 53.3% manteniendo su diferencia ($F=68.7$; $df=8,20$; $p=0.0001$) con 0.25% que continuó con 33.3 % y con la concentración de 0.5% que disminuyó a 13.3%. En las evaluaciones a las 96 y 120 h, solamente se encontraron larvas en el testigo sin tratar y en la concentración de 0.25% con 80 y 20%; valores que difieren significativamente entre ellos ($F=14.36$; $df=8,20$; $p=0.0001$). La dieta que más consumieron las larvas fue la del testigo sin tratar 0.037g que no difirió estadísticamente de la concentración 0.25% con 0.033g de dieta consumida. Estos valores superaron a los observados en los demás tratamientos ($F=6.97$; $df=15,69$; $p=0.0001$), mismos que fluctuaron entre 0.018 y 0.02g.

Larvas de tercer instar.

Pruebas con posibilidad de elección

S. frugiperda

A medida que aumentó la concentración de extracto en la dieta, aumentaron también los índices de disuasión (IDA) e inhibición (IIA) de la alimentación (Cuadro 5). El IDA fue similar en las

concentraciones de 1, 2, 4 y 8% ($F=3.33$; $df=8,23$; $P=0.0215$) pero difirió de las concentraciones de 0.25 y 0.5% que fueron menores con un IDA de 21.4 y 14.1% respectivamente. El valor de IIA más alto (79.3 %) se observó a la concentración de 8% y difirió estadísticamente del observado a la concentración de 0.25% ($F=3.69$; $df=8,23$; $p=0.0141$) pero no con el rango de concentraciones de 0.5 a 4 %.

Los valores de IDA son menores a los de Zapata *et al.* (2006), quienes mezclando polvo de *P. boldus* con la dieta de *S. littoralis* en concentraciones de 1, 2 y 4% obtuvieron valores de 60.2, 73.8 y 96.2% respectivamente. En IIA la situación es inversa ya que con las mismas concentraciones estos autores no superaron el 22% de inhibición valores menores a los del presente trabajo.

H. zea

La tendencia de directa proporcionalidad dosis-inhibición también se observó en *H. zea* con la diferencia de que en esta especie de insecto tanto IDA como IIA alcanzaron magnitudes mayores (Cuadro 6). El IDA con la concentración de 8% (71.5%) no tuvo diferencias significativas con las concentraciones de 0.5 a 4%, pero sí con la de 0.25% ($F=1.87$; $df=8,23$; $P=0.05$) que fue el menor con 27.3%. La máxima inhibición de la alimentación (IIA) fue de 81.6% con 8%, valor similar al observado en el rango de concentraciones de con 0.5 a 4% que fluctuaron entre 44.3 y 71.9%. La concentración de 0.25% produjo 41.4% de inhibición y este valor fue el único significativamente menor respecto al observado en la concentración de 8% ($F=1.76$; $df=8,23$; $p=0.05$).

Pruebas sin posibilidad de elección

S. frugiperda

La tasa de consumo relativo (TCR) mostró una proporcionalidad inversa con la concentración del extracto ya que mientras esta última aumentó, la TCR disminuyó (Cuadro 6). El mayor consumo fue de $0.124 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ [dieta consumida (g) / (peso inicial larva (g) * periodo alimentación (días)] en el testigo sin tratar que no mostró diferencias significativas con las concentraciones de 0.25 y 0.5%. Los valores más bajos de TCR se observaron en las concentraciones de 1, 2, 4 y 8%, sin diferencia estadística entre ellas, pero significativamente menores que el testigo, y las concentraciones de 0.25 y 0.5% ($F=3.92$; $df=9,27$; $P=0.024$). La inhibición de la alimentación (IIA) se incrementó a medida que aumentó la concentración del extracto, para alcanzar sus

valores más altos en las concentraciones de 1, 2, 4 y 8%, sin diferencias estadísticas entre éstos. Los tratamientos con 0.25 y 0.5% de extracto presentaron los valores más bajos de IIA con 18.52 y 21.81%, difiriendo significativamente ($F=4.03$; $df=8,23$; $p=0.0034$) con los tratamientos de mayor concentración. Los resultados para IIA son menores a los de Zapata *et al* (2006) en larvas de *S. littoralis* quienes indican un 68.9 y 78.1% para 2 y 4%, respectivamente. En el caso de IIC los valores obtenidos por estos autores también fueron mayores con 81.1 y 86.7% con concentraciones de 2 y 4%.

La inhibición del crecimiento (IIC) no mostró diferencia significativa siendo el menor el tratamiento de 0.25% con un IIC de 18.8% y el mayor 8% con 40.1%. El testigo sin tratar y las concentraciones de 0.25 y 0.5% de extracto, sin diferencia estadística entre ellas, mostraron el mayor peso larval (TIP). El resto de los tratamientos fueron significativamente menores ($F=6.09$; $df=9,27$; $p=0.0001$). La eficacia de conversión del alimento ingerido (ECI) también disminuyó a medida que la concentración de extracto en la dieta aumentó. El testigo sin tratar, así como el rango de concentraciones de 0.25 a 2% presentaron, sin diferencia significativa entre ellas, los mayores valores de ECI fluctuando entre 93.3 a 64.3. Los tratamientos de 4 y 8% fueron significativamente menores ($F=1.70$; $df=9,27$; $p=0.035$) con 33.4 y 32.2%. Al aumentar la concentración del extracto en la dieta, ésta se vuelve menos apta para el insecto, afectando su ciclo biológico debido a la menor cantidad de sustrato y energía disponible para producir biomasa. Estos resultados están acorde con los obtenidos con especies de la familia Meliaceae, las cuales han sido documentadas como la más eficaces en el control de larvas del género *Spodoptera* como son; *Azadirachta indica* A. Juss (Martinez y van Emdem, 2001) *Melia azedarach* L. (Schmidt *et al.* 1997) y varias especies del género *Trichilia* (Roel y Vendramim 1999; Roel *et al* 2000; Wheeler e Isman, 2000; Matos *et al.* 2006; Caballero *et al.* 2008).

H. zea

La mayor TCR se obtuvo en el testigo sin tratar ($0.702 \text{ g g}^{-1}\text{d}^{-1}$) y en las concentraciones de 0.25 y 0.5%. El tratamiento de 8% ($0.182 \text{ g g}^{-1}\text{d}^{-1}$), así como las concentraciones de 1, 2, y 4% presentaron los valores más bajos de TCR ($F=4.25$; $df=9,27$; $P=0.012$) (Cuadro 6). La inhibición de la alimentación no mostró diferencias estadísticas entre las concentraciones de 2 a 8% en las que el IIA fluctuó entre 37.3 y 63.1%. En los tratamientos de 0.25 y 0.5% con 17.2 y 25.4% de inhibición fueron significativamente menores que los observados en el resto de los tratamientos

($F=2.95$; $df=8,23$; $P=0.0162$). La inhibición de la alimentación de las larvas produjo una inhibición del crecimiento (IIC) ya que mientras mayor fue la concentración del extracto, mayor fue el valor de IIC. La mayor inhibición la obtuvo en las concentraciones de 2, 4 y 8%, sin diferencias significativas entre ellas ($F=2.95$; $df=8,23$; $p=0.0162$). Esta disminución del crecimiento implicó una menor ganancia de peso de las larvas (TIP) debido a que mientras en el testigo las larvas tuvieron un incremento de peso de $0.361 \text{ g g}^{-1}\text{d}^{-1}$, los tratamientos de 2, 4 y 8% de extracto en dieta, fueron significativamente menores ($F=4.98$; $df=9,27$; $p=0.0004$) con un incremento que fluctuó entre 0.203 y $0.099 \text{ g g}^{-1}\text{d}^{-1}$. El valor de ECI se incrementó a medida que disminuyó la concentración del extracto en la dieta. El máximo se observó en el testigo sin tratar (71.9%), mientras que en los tratamientos con una concentración igual o superior a 0.5%, la ECI fue significativamente menor ($F=2.83$; $df=9,27$; $p=0.009$).

Los resultados que se observaron en *H. zea* concuerdan con los de Barnby y Klocke (1987) quienes al aumentar la concentración de azadirachtina en la dieta obtuvieron una menor cantidad de alimento ingerido, menor ganancia de peso y menor eficacia de conversión del alimento ingerido y digerido por *H. virescens*.

CONCLUSIONES

La toxicidad del extracto en cloruro de metilo de *P. boldus* sobre *S. frugiperda* y *H. zea* junto con su efecto en el ciclo y actividad antialimentaria permiten considerarlo como una alternativa válida en la protección vegetal. Aunque, estos resultados deben ser debidamente validados en campo de manera de asegurar al agricultor que el extracto es una alternativa válida en el manejo integrado de plagas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo técnico al Sr Lauro Hernández Pérez del Laboratorio de Toxicología de Insecticidas, al Dr. Juan Cibrián Tovar y M.C. Julio Cesar Velásquez del Laboratorio de Ecología Química y al M.C. Jorge Valdez Carrasco del Laboratorio de Morfología de insectos del Colegio de Postgraduados.

LITERATURA CITADA

- Alvarez-Coloma, A., A. Neske, S. Popich and A. Bardon. 2007. Toxic effects of annonaceous acetogenics from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Pest. Sci.* 80:63-67.
- Barnby, M., and J. Klocke. 1987. Effects of azadirachtin on the nutrition and development of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Fabr.) (Noctuidae). *J. Insect Physiol.* 33: 69-75.
- Bekele, J., and A. Hassanali. 2001. Blend effects in the toxicity of the essential oil constituents of *Ocimum kilimandscharicum* and *Ocimum kenyense* (Labiataea) on two post-harvest insect pests. *Phytochemistry.* 57: 385-391.
- Bittner, M., M. E. Casanueva, C. Arbert, M., Aguilera, V. Hernández, and J. Becerra. 2008. Effects of essential oils from five plants species against the granary weevil *Sitophilus zeamais* and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera). *J. Chil. Chem. Soc.* 53: 1455-1459.
- Bittner, M., M., Aguilera, V. Hernández, C. Arbert, J. Becerra, and M. E. Casanueva. 2009. Fungistatic activity of essential oils extracted from *Peumus boldus* Mol., *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde and *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul (Chilean monimiaceae). *Chilean Journal of Agricultural Research* 69:30-37.
- Caballero, C., J. López-Olguín, M. Ruíz, F. Ortego, and P. Castañeda. Antifeedant activity and effects of terpenoids on detoxication enzymes of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). *Spanish Journal of Agricultural Research* 6:177-184.
- De Brito, C.H., J.A. Mezzomo, J.L. Batista., M. Barbosa, y A. Murata. 2004. Bioativida de extratos vegetais aquosos sobre *Spodoptera frugiperda* em condições de laboratorio. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* 71:41-45.
- Farrar R., Barbour J., and G. Kennedy 1989. Quantifying food consumption and growth in insects. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 82: 593-598.
- Finney, D. 1971. *Probit Analysis*. Cambridge University Press. Cambridge. UK. 333p.
- Gore, J., J., Adamczyk., C.A. Blanco. 2005. Selective feeding of tobacco budworm and bollworm (Lepidoptera: Noctuidade) on meridic diet with different concentrations of *Bacillus thuringiensis* proteins. *J. Econ. Entomol.* 98(1):88-94.
- Grzywacz, D., A. Richards, R. J. Rabindra, H. Saxena, and O. P. Rupela. 2005. Efficacy of biopesticides and natural products for *Heliothis/Helicoverpa* control. *In: H. C. Sharma*

- (Ed.), *Heliothis/Helicoverpa* Management Emerging Trends and Strategies for Future Research (pp. 371-389). Plymouth, UK. Science Publishers, Inc.
- Isman, M. 2008. Botanical insecticides: for richer, for poorer. *Pest. Manag. Sci.* 64:8-11.
- Kamaraj, C., A.A. Rahuman, and A. Vagaban. 2008a Antifeedant and larvicidal effects of plant extracts against *Spodoptera litura* (F.), *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* Say. *Parasitol Res.* 103:325-331.
- Kamaraj, C., A.A. Rahuman and A. Vagaban. 2008b. Screening for antifeedant and larvicidal activity of plant extracts against *Helicoverpa armigera* (Hübner), *Sylepta derogata* (F.) and *Anopheles stephensi* (Liston). *Parasitol Res.* 103:1361-1368.
- Larkov, O., J. Matasyoh, N. Dudai, E. Lewinsohn, A. Mayer and U. Ravid. 2007. Distribution of piperitone oxide stereoisomers in *Mentha* and *Micromeria* species and their chemical syntheses. *Flavour and Fragrance Journal* 22:328-333.
- Lee, B. H., P. Annis, F. Tumaalii, and S. Lee. 2003. The potential of 1, 8-cineole as a fumigant for stored wheat. pp: 230-234 *In: Proceedings of the Australian postharvest technical conference, 25 - 27 June 2003.* CSIRO. Canberra, Australia.
- Luttrell, R.G., L. Wan, and K. Knighten. 1999. Variation in Susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 92(1):21-32.
- Mancebo, F., L. Hilje, A.G. Mora, and R. Salazar. 2000. Antifeedant activity of *Quassia amara* (Simaroubaceae) extracts on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Crop Protection.* 19(5):301-305.
- Marangon, C.J., G. Newandram, O.D. Dhingra, and M. Moreira. 2008. Composition and antifungal activity of the essential oil of the brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. *J Chem Ecol* 34:1213–1218
- Martínez, S., and H. van Emden. 2001. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. *Neotropical Entomology* 30: 113-125.
- Mastelic, J., and I. Jerkovic. 2002. Free and glycosidically bound volatiles of *Mentha longifolia* growing in Croatia. *Chemistry of Natural Compounds* 38:561-564.
- Matos, A., L. Nebo, E. Calegari, L. Batista-Pereira, P.C. Vieira, J.B. Fernandez, M.F. Da Silva, P. Ferreira, y R. Rodrigues. 2006. Atividade biológica de extratos orgânicos de *Trichilia*

- sp. (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em dieta artificial. *BioAssay* 1:1-7.
- Negahban, M., S. Moharramipour, and F. Sefidkon. 2007. Fumigant toxicity of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser against three stored-product insects. *Journal of Stored Products Research* 43: 123–128
- Pérez, F., G. Silva, M. Tapia, y R. Hepp. 2007. Variación anual de las propiedades insecticidas de *Peumus boldus* sobre *Sitophilus zeamais*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 42(5):633-639.
- Raffa K., and J. Frazier. 1988. A generalized model for quantifying behavioral desensitization to antifeedants. *Ent. Exp. Appl.* 46: 93-100.
- Roel, A., y J. D. Vendramim. 1999. Desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em genotipos de milho tratados com extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* (Swartz). *Scientia Agricola* 56(3):581-586.
- Roel, A., J. D. Vendramim, R. Shiraishi, y N. Frighetto. 2000. Efeito do extrato acetate de etila de *Trichilia pallid* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivencia da lagarta-do-cartucho. *Bragantia* 59(1): 53-58.
- Roel, A., y J. D. Vendramim. 2006. Efeito residual do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) para lagartas de diferentes idades de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciencia Rural* 36(4): 1049-1054.
- Sadek, M. 2003. Antifeedant and toxic activity of *Adhatoda vasica* leaf extract against *Spodoptera littoralis* (Lep. Noctuidae). *J. Appl. Entomol.* 127: 396-404.
- SAS Institute. 1998. Language guide for personal computer release. 6.03 Edition. SAS Institute. Cary. N. C. USA. 1028 p.
- Schmidt, G. H., A. I., Ahmed., and M., Breuer. 1997. Effect of *Melia azedarach* extract on larval development and reproduction parameters of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) and *Agrotis ipsilon* (Hufn.) (Lep. Noctuidae). *Anz. Schädlingkde, Pflanzenschutz, Umweltschutz* .70: 4-12.
- Shelly, T.E. , J. Edu and E. Pahio. 2005. Influence of diet and methyl eugenol on the mating success of males of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera:Tephritidae). *Florida Entomologist* 88: 307-313.

- Shelly, T.E. and J. Edu. 2008. Do methyl eugenol-fed males of the oriental fruit fly (Diptera:Tephritidae) induce female re-mating. *Florida Entomologist* 91:388-393.
- Silva G., A. Lagunes y J. C. Rodríguez 2003. Control de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) con polvos vegetales solos y en mezcla con carbonato de calcio. *Ciencia e Investigación Agraria* 30: 153-160.
- Silva, G., O. Orrego, R. Hepp y M. Tapia. 2005. Búsqueda de plantas con propiedades insecticidas para el control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky en maíz almacenado. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 40: 11-17.
- Singh, H. P., D. R. Batish, R. K. Kohli, S. Mittal and S. Yadav. 2008. Chemical composition of essential oil from leaves of *Chenopodium ambrosioides* from Chandigarh, India. *Chemistry of Natural Compounds* 44:378-379.
- Souza, M., A. Roel, E. J. Arruda e A., S. Marques. 2007. Eficiência de productos vegetais no controle da lagarta-do.cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciênc. Agrotec.* 31: 326-331.
- Vargas, R.I., J.D. Stark, M.H. Kido, H. M. Ketter, and L.C. Whitehand. 2000. Methyl eugenol and cue-lure traps for suppression of male oriental fruit flies and melon flies (Diptera:Tephritidae) in Hawaii: effects of lure mixtures and weathering. *J. Econ. Entomol.* 93:81-87.
- Vogel, H., I. Razmilic., J. San Martín, U. Doll, y B. González. 2005. Plantas Medicinales Chilenas. Experiencias de Domesticación y Cultivo de Boldo, Matico, Bailahuén, Canelo, Peumo y Maqui. Editorial Universidad de Talca. Talca. Chile. 192 p.
- Waldbauer, G. 1968. The consumption and utilization of food by insects. *Adv. Insect Physiol.* 5: 229-288.
- Wheeler, D., and M.B. Isman. 2000. Effect of *Trichilia americana* extract on feeding behavior of asian armyworm, *Spodoptera litura*. *Journal of Chemical Ecology* 26:2791-2800.
- Wiseman, B.R., J.E. Carpenter, and G.S. Wheeler. 1996. Growth inhibition of fall armyworm (Lepidoptera:Noctuidae) larvae reared on leaf diets of non-host plants. *Florida Entomologist* 79:302-311.
- Zalom, F., L.T. Wilson, and M.P. Hoffmann. 1986. Impact of feeding by tomato fruitworm, *Heliothis zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae), and beet armyworm, *Spodoptera exigua*

(Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), on processing tomato fruit quality. J. Econ. Entomol. 79: 822-826

Zapata, N., F. Budia, G. Silva, E. Viñuela, y P. Medina. 2006. Actividad antialimentaria de *Maytenus boaria* Mol., *Peumus boldus* Mol. y *Quillaja saponaria* Mol. sobre *Spodoptera littoralis* Boisd. Bol. San. Veg. Plagas. 32: 125-135.

Cuadro 1.- Principales compuestos presentes en el extracto de *P. boldus* con cloruro de metileno.

Compuesto	Tiempo de Retención (min)	(%)
1R-alpha-pinene	7.93	0.167
m-Cymene	9.25	2.39
1-8-cineol	9.32	5.81
Cis-beta-terpineol	9.78	0.78
L-pinocarveol	10.66	1.3
Pinocarvone	10.89	0.54
Alpha-terpineol	11.25	2.5
4-carene	11.84	18.14
Ascaridole	12.53	2.34
2-ethyl-2-hexenal	12.77	0.69
Methyleugenol	13.80	1.54
Piperitone oxide	13.93	1.98
Albaromadendrene	14.74	0.53
D-nerolidol	15.62	0.36
Spathulenol	15.94	2.07

Cuadro 2.- Mortalidad y concentración letal 50% (CL₅₀) y 90% (CL₉₀), en larvas de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith y *Helicoverpa zea* (Boddie) tratadas con dieta artificial mezclada con un extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus*.

Tratamiento	Mortalidad (%) ± EE	
	<i>Spodoptera frugiperda</i> ¹²	<i>Helicoverpa zea</i> ¹²
Testigo	0.0±0.0 d	0.0±0.0 d
0.2 5	35.0±7.6 c	10.0±4.1 d
0.5	62.5± 8.5b	12.5±5.6 d
1	67.5± 9.2b	15.0±6.7 cd
2	85.0± 5.5ab	30.0±8.9 c
4	97.5± 2.5 ^a	60.0±6.2 b
8	100± 0.0a	95.0±1.7 a
n [†]	200	200
b± ES [¶]	0.71 ±0.11	1.63±0.29
CL ₅₀ [§]	0.41	1.70
(95% LC) ^{&}	(0.28-0.55)	(2.47-3.77)
CL ₉₀ [§]	2.25	8.31
(95% LC) ^{&}	(1.62-3.71)	(15.02-43.4)
Pr>χ ^{2Φ}	0.0001	0.0001

EE = error estándar de la media

¹Dentro de la misma fila, los valores con la misma letra mayúscula no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, p≤0.05).

² Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra minúscula no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, p≤0.05).

[†]= número total de insectos tratados

[¶]=Pendiente (b) ajuste Probit y Error estándar de la pendiente (ES)

[§]= Concentración letal= g kg⁻¹

[&]= Límites de confianza al 95%

^Φ=Probabilidad de que la línea log Dosis-Probit ajuste a una línea recta.

Cuadro 3.- Tamaño y peso final de larvas, porcentaje de pupación y peso de pupas, tiempo entre larva-pupa y pupa-adulto y porcentaje de emergencia de adultos de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith y *Helicoverpa zea* (Boddie) alimentadas con dieta artificial mezclada con un extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus* Molina.

Insecto	Concentración (%)	Tamaño larva \pm EE* (mm)	Peso larva \pm EE* (g)	Pupación \pm EE* (%)	Peso pupa \pm EE* (g)	Larva-Pupa* \pm EE* (LP) ¹ DDI ³	Pupa-adulto* \pm EE* (PA) ² DDI ³	Emergencia Adultos \pm EE * ⁴ (%)
<i>S. frugiperda</i>	Testigo	38.2 \pm 3.6 a	0.57 \pm 0.03 a	100 \pm 0.0 a	0,27 \pm 0.006 a	8.6 \pm 0.4 b	18.6 \pm 0.40 a	100 \pm 0.0 a
	0.25	34.2 \pm 2.7 a	0.52 \pm 0.08 a	95 \pm 9.3 a	0,28 \pm 0.006 a	12.6 \pm 0.74 a	19.0 \pm 0.0 a	90 \pm 6.1 a
	0.5	32.6 \pm 2.6 a	0.52 \pm 0.09 a	80 \pm 9.3 a	0,28 \pm 0.009 a	13.0 \pm 0.63 a	19.0 \pm 0.0 a	80 \pm 9.3 a
	1.0	30.2 \pm 3.1 a	0.48 \pm 0.10 a	80 \pm 5.0 a	0,28 \pm 0.011 a	13.0 \pm 0.0 a	19.0 \pm 0.0 a	80 \pm 9.3 a
	2.0	29.0 \pm 5.6 a	0.43 \pm 0.15 a	80 \pm 5.0 a	0,28 \pm 0.00 a	13.8 \pm 0.48 a	19.0 \pm 0.0 a	80 \pm 5.0 a
	4.0	-	-	-	-	-	-	-
	8.0	-	-	-	-	-	-	-
<i>H. zea</i>	Testigo	47.6 \pm 1.34 a	0.730 \pm 0.01b	100 \pm 0.0a	0.425 \pm 0.02a	19.0 \pm 1.0b	21.7 \pm 0.33a	100 \pm 0.0a
	0.25	32.2 \pm 0.77 b	0.551 \pm 0.01b	89 \pm 11.1a	0.383 \pm 0.01a	21.0 \pm 0.0a	25.0 \pm 0.0b	77.7 \pm 11.1a
	0.5	32.5 \pm 2.80 b	0.545 \pm 0.03b	78 \pm 11.1ab	0.374 \pm 0.04a	23.0 \pm 0.0a	25.0 \pm 0.0b	77.7 \pm 11.1a
	1.0	32.6 \pm 2.13 b	0.488 \pm 0.10b	55 \pm 22.2ab	0.359 \pm 0.05a	23.0 \pm 0.0a	25.0 \pm 0.0b	22.2 \pm 11.0 a
	2.0	32.3 \pm 3.27 b	0.451 \pm 0.10b	34 \pm 19.0b	0.353 \pm 0.04a	23.0 \pm 0.0a	-	0.0 \pm 0.0b
	4.0	21.4 \pm 2.75 c	0.029 \pm 0.01a	-	-	-	-	-
	8.0	5.08 \pm 0.35 d	0.0005 \pm 0.0a	-	-	-	-	-

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

EE= Error estándar de la media

¹LP= Período (días) en que se alcanza el 100% de pupación correspondiente a cada concentración.

²PA= Período (días) en que se alcanzan el 100% de adultos correspondiente a cada concentración.

³DDI= Días después de la infestación

⁴ Se consideró como 100% el número de pupas obtenidas en cada concentración.

Cuadro 4.- Preferencia y consumo de dieta artificial mezclada con diferentes concentraciones de un extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus* Molina de larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith y *Helicoverpa zea* (Boddie).

Insecto	Concentración (%)	Preferencia± EE*					Consumo dieta ± EE* (g)
		24 h (%)	48 h (%)	72h (%)	96 h (%)	120h (%)	
<i>S. frugiperda</i>	Testigo	55.0±22.1a	75.0±9.5a	80.0±14.1a	80.0±14.1a	80.0±14.1a	0.044± 0.005a
	0.25	35.0±15ab	25.0±9.5b	20.0±14.1b	20.0±14.1b	20.0±14.1b	0.021± 0.002b
	0.5	10.0±10ab	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.020± 0.003b
	1.0	0.0±0.0b	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.014± 0.004bc
	2.0	0.0±0.0b	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.007± 0.002c
	4.0	0.0±0.0b	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.007± 0.001c
	8.0	0.0±0.0b	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.006± 0.002c
<i>H. zea</i>	Testigo	40.0±11.5 a	46.67±6.6 a	53.3± 6.6a	73.3±13.3 a	73.3±13.3 a	0.037±0.003 a
	0.25	33.3± 6.6a	33.3± 6.6 b	33.3±6.6 b	26.6±13.3 b	26.6±13.3 b	0.033± 0.003a
	0.5	13.3±6.6 b	20.0±0.0 c	13.3± 0.0c	0.0±0.0 c	0.0±0.0 c	0.018± 0.004b
	1.0	6.67±6.6 b	0.0±0.0 d	0.0±0.0 d	0.0±0.0 c	0.0±0.0 c	0.013± 0.003bc
	2.0	6.67±6.6 b	0.0±0.0 d	0.0±0.0 d	0.0±0.0 c	0.0±0.0 c	0.012± 0.002 bc
	4.0	0.0±0.0 b	0.0±0.0 d	0.0±0.0 d	0.0±0.0 c	0.0±0.0 c	0.012± 0.001bc
	8.0	0.0±0.0 b	0.0±0.0 d	0.0±0.0 d	0.0±0.0 c	0.0±0.0 c	0.002± 0.001c

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

EE= Error estándar de la media

Cuadro 5.- Índice de disuasión de la alimentación (IDA) e índice de inhibición de la alimentación (IIA) en larvas de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith y *Helicoverpa zea* (Boddie) expuestas a dieta artificial con diferentes concentraciones con un extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus* Molina.

Insecto	Concentración (%)	IDA promedio \pm EE (%)	IIA promedio \pm EE (%)
<i>S. frugiperda</i>	Testigo	--	--
	0.25	14.1 \pm 9.7b	21.0 \pm 14.8b
	0.5	21.4 \pm 3.7b	34.7 \pm 5.4ab
	1.0	38.0 \pm 7.9ab	53.6 \pm 8.7ab
	2.0	40.2 \pm 11.7ab	54.7 \pm 10.8ab
	4.0	41.9 \pm 0.54ab	59.1 \pm 0.54a
	8.0	54.4 \pm 2.9a	79.3 \pm 2.3a
	<i>H. zea</i>	Testigo	--
0.25		27.3 \pm 7.2 b	41.4 \pm 9.2 b
0.5		30.8 \pm 10.0 ab	44.3 \pm 12.3 ab
1.0		40.2 \pm 9.8 ab	55.3 \pm 9.7 ab
2.0		42.2 \pm 7.0 ab	58.4 \pm 6.6 ab
4.0		57.3 \pm 7.9 ab	71.9 \pm 6.1 ab
8.0		71.5 \pm 11.7 a	81.6 \pm 8.7 a

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

EE = error estándar de la media

Cuadro 6.- Tasa de consumo relativo (**TCR**), Índice de inhibición de la alimentación (**IIA**) y crecimiento (**IIC**), Tasa de incremento del peso larvario (**TIP**) y Eficiencia de conversión del alimento ingerido (**ECI**) en larvas de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith y *Helicoverpa zea* (Boddie) que se expusieron a dieta artificial con diferentes concentraciones de un extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus* Molina.

Insecto	Concentración (%)	TCR promedio ± EE g g ⁻¹ d ⁻¹	IIA promedio ± EE (%)	IIC promedio ± EE (%)	TIP promedio ± EE g g ⁻¹ d ⁻¹	ECI promedio ± EE (%)
<i>S. frugiperda</i>	Testigo	0.124±0.016 a	--	--	0.168±0.0128 a	93.3±14.4 a
	0.25	0.117±0.034 a	18.52± 10.3 b	18.8±5.4a	0.165±0.0431 a	90.8±29.2 a
	0.5	0.091±0.067 ab	21.81±4.44 b	20.7±3.4a	0.114±0.0157 ab	83.2±5.0 ab
	1.0	0.053±0.019 bc	47.47±13.4 a	21.0±8.9a	0.087±0.0083 bc	66.1±26.6 ab
	2.0	0.051±0.004 bc	48.24±4.17 a	23.9±6.1a	0.077±0.0119 bc	64.3±5.4 ab
	4.0	0.044±0.007 bc	53.10±4.89 a	37.8±9.6a	0.045±0.0119 cd	33.4±4.2 b
	8.0	0.027±0.005 c	68.30±5.34 a	40.1±9.2a	0.011±0.0034 d	32.2±5.1 b
<i>H. zea</i>	Testigo	0.702±0.023 a	--	--	0.361±0.0149 a	71.9±9.87 a
	0.25	0.537±0.008 ab	17.2±1.61 c	23.8±2.69 b	0.347±0.0292 a	63.2±5.31 a
	0.5	0.492±0.112 ab	25.4±7.47 bc	27.1±9.91 b	0.322±0.0308 a	39.1±3.75 b
	1.0	0.432±0.095 bc	30.2±11.0 bc	36.5±7.93 ab	0.255±0.0559 ab	39.9±8.74 b
	2.0	0.361±0.063 bcd	37.3±6.29 abc	43.3±4.54ab	0.203±0.0104 bc	39.3±2.04 b
	4.0	0.239±0.032 cd	52.1±3.54 ab	43.8±5.77 ab	0.195±0.0416 bc	36.7±7.82 b
	8.0	0.182±0.076 d	63.1±14.9 a	57.3±5.03 a	0.099±0.0229 c	33.1±7.60 b

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

EE= Error estándar de la media.

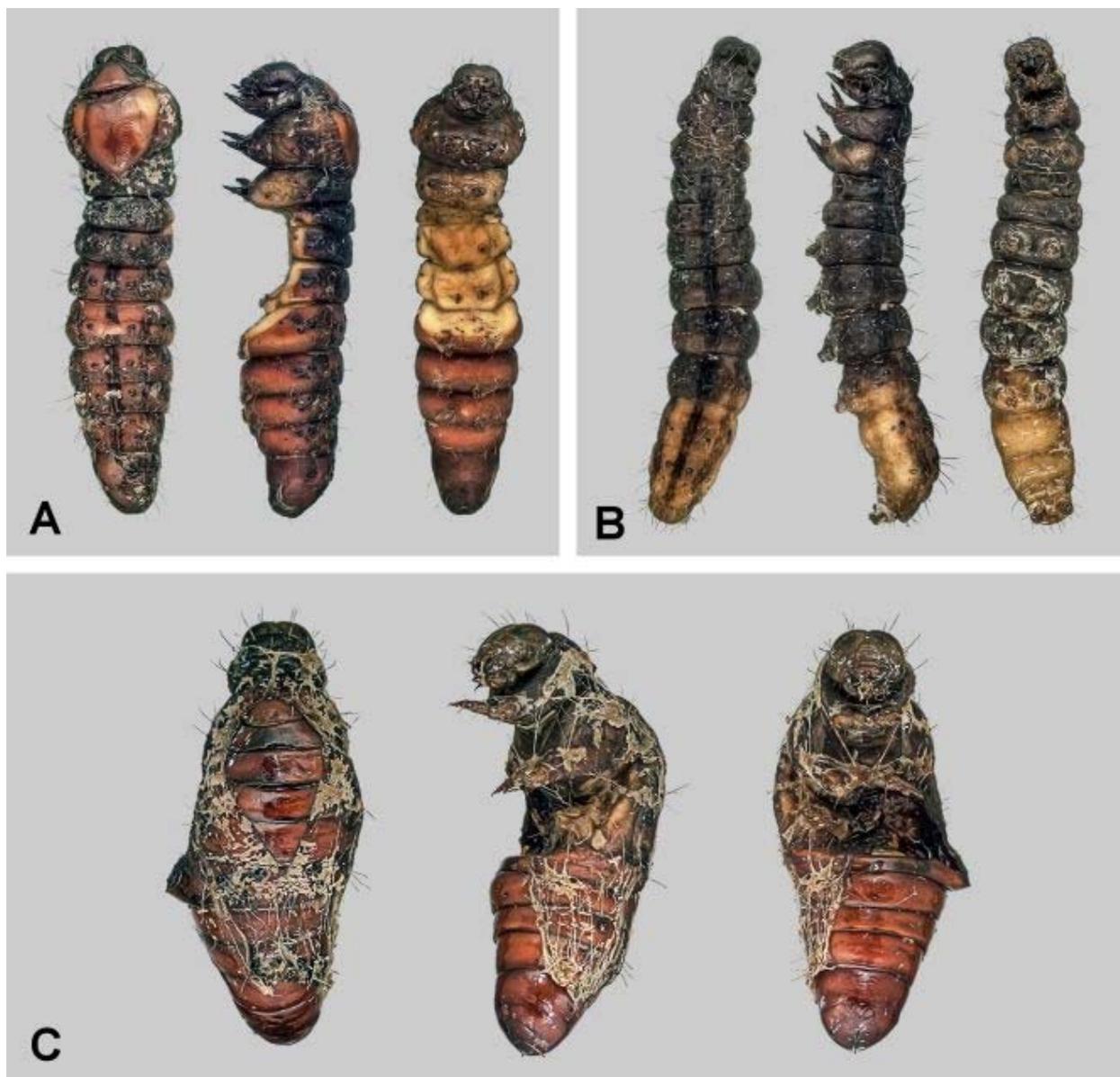


Figura 1.-Malformaciones de larvas de *Helicoverpa zea* alimentadas con dieta mezclada con un extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus* a una concentración de 2%. **A.** Depresiones en 6-7 segmento abdominal. **B.** Ennegrecimiento del integumento **C.** Estadio prepupal ennegrecido y ruptura parcial de la sutura dorsal del exoesqueleto

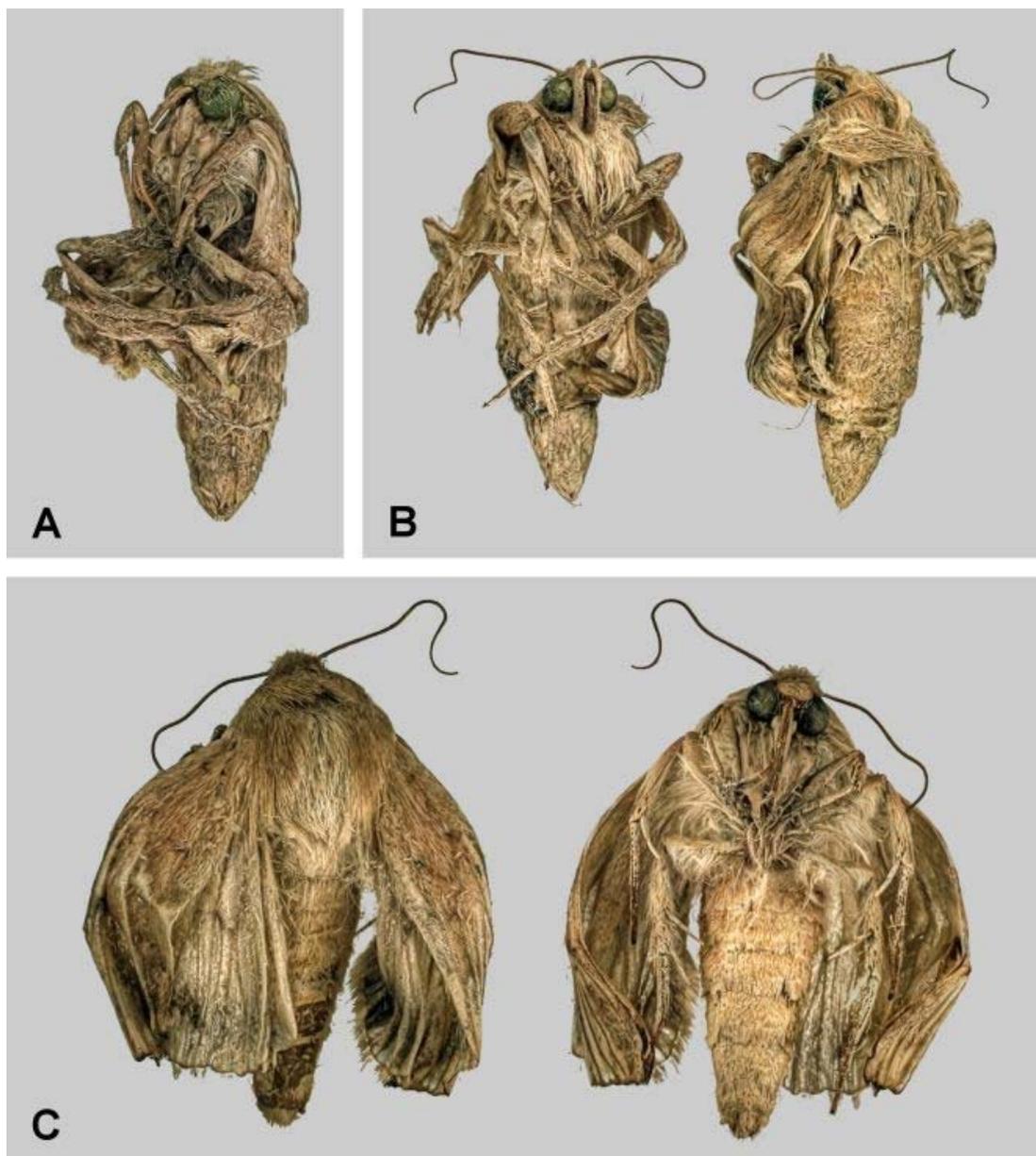


Figura 2.- Malformaciones de adultos de *Helicoverpa zea* provenientes de larvas alimentadas con dieta mezclada con un extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus* a una concentración de 2%. **A.** Falta de extensión de los apéndices ambulatorios y alares **B.** Alas reducidas y no extendidas **C.** Alas de mayor tamaño pero sin extenderse.

CAPITULO 3

TOXICIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE *Peumus boldus* Molina SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) Y *Helicoverpa zea* Bodie

Gonzalo Silva¹, J. Concepción Rodríguez², Angel Lagunes², Celina Llanderal², Raquel Alatorre², A. M. Shelton³ y Carlos A. Blanco⁴.

RESUMEN

Las larvas de *Spodoptera frugiperda* y *Helicoverpa zea* causan daños a muchos cultivos de importancia económica. En laboratorio se evaluó el efecto del aceite esencial de *Peumus boldus* contra estas dos especies de plagas. El aceite mostró mayor toxicidad en *S. frugiperda* que en *H. zea*, ya que la concentración máxima evaluada (8%) causó una mortalidad de 82.5 y 58.3%, respectivamente. Las CL₅₀ y CL₉₀ fueron de 4.1 y 11.36 mL kg⁻¹ para *S. frugiperda* y de 3.91 y 21.29 mL kg⁻¹ para *H. zea*. En *S. frugiperda*, en las concentraciones más altas hubo menor porcentaje de pupas y adultos y se requirió más tiempo para completar el ciclo biológico. En *H. zea*, el aceite a 4% y 8% impidió que las larvas tratadas completaran su ciclo biológico, mientras que a la concentración de 2% se observaron malformaciones en las larvas tratadas y en los adultos que emergieron de éstas. Las larvas neonatas prefirieron alimentarse de la dieta con la menor concentración de aceite esencial. En larvas de tercer instar, en las pruebas con y sin posibilidad de elección, se observó efecto disuasivo de la alimentación debido a que mientras mayor era la concentración de aceite, menor fue el consumo de dieta tratada y la eficacia de conversión del alimento ingerido. El aceite esencial tanto por su toxicidad como por sus efectos en el ciclo y alimentación de las especies estudiadas, presenta potencial para ser considerado como una alternativa en la protección vegetal.

Palabras clave: gusano cogollero, gusano elotero, boldo, monoterpenos

¹Departamento de Producción Vegetal. Facultad de Agronomía. Universidad de Concepción. Vicente Méndez 595. Chillán. Chile. E-mail:gosilva@udec.cl. Autor para correspondencia.

²Programa de Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carretera México-Texcoco. 56230. Montecillo. Estado de México. México.

³Department of Entomology, Cornell University, New York State Agricultural Experiment Station, Geneva, NY 14456, USA

⁴USDA. Animal and Plant Health Inspection Service, Biotechnology Regulatory Services. 4700 River Road, Unit 89, Riverdale, MD 20737, USA.

ABSTRACT

The larvae of *Spodoptera frugiperda* and *Helicoverpa zea* cause damage to many economically important crops. Under laboratory conditions, the effect of essential oil of *Peumus boldus* against these two species of pests was evaluated. The oil showed higher toxicity against *S. frugiperda* than *H. zea*, because the maximum concentration assessed (8%) caused 82.5 and 58.3% mortality respectively. The LC₅₀ and LC₉₀ were 4.1 and 11.36 mL kg⁻¹ for *S. frugiperda* and 3.91 and 21.29 mL kg⁻¹ for *H. zea*. In *S. frugiperda*, the highest concentrations caused the lower percentage of pupae and adults and treated individuals needed more time to complete the life cycle. In *H. zea*, oil at 4 and 8% concentrations prevented the larvae to complete the cycle, while 2% concentration, the treated larvae and adults exhibited malformations. Neonate larvae preferred feeding on the diet with the lowest concentration of essential oil. In third instar larvae, in choice and no choice tests, a feeding deterrent effect was observed at higher oil concentrations. The essential oil of *P. boldus* has the potential to be considered as an alternative in crop protection against these species due to its toxicity and its effects in the cycle and feeding.

INTRODUCCIÓN

Las larvas de los insectos pertenecientes a la familia Noctuidae (Lepidoptera), son consideradas a nivel mundial como plagas importantes por causar daños de relevancia económica a una gran cantidad de plantas cultivadas. Entre estos se encuentran *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) y *Helicoverpa zea* Boddie, que atacan cultivos como maíz (*Zea mays* L.), algodón (*Gossypium hirsutum* L.), soya (*Glycine max* L.) y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), entre otros (Zalom *et al.*, 1986; Lutrell *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2007).

El control de estas plagas se realiza normalmente con aplicaciones de insecticidas sintéticos como piretroides y organofosforados. Sin embargo, la resistencia a este tipo de compuestos está ampliamente documentada (Yu, 1992, Abd-elghafar *et al.*, 1993) y su uso se ha comenzado a restringir bajo rigurosos programas de manejo de la resistencia. En consecuencia, se hace necesario el desarrollo y mejoramiento de alternativas de control que no necesariamente reemplacen a las ya existentes, sino que puedan ser insertas en un programa de manejo integrado y de esta manera disminuir la presión de selección para el desarrollo de resistencia.

Las plantas aromáticas se han empleado desde hace mucho tiempo tanto por sus propiedades medicinales como insecticidas. Su aroma característico proviene de los aceites esenciales y varios

de ellos tienen comprobada actividad fumigante y de contacto (Isman, 2000), además de acción ovicida, antialimentaria y repelente (Sanna *et al.*, 2004). Los aceites esenciales han demostrado tener propiedades insecticidas contra *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera) (Bittner *et al.*, 2008), *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) (Barreita *et al.*, 2004), *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) (Paranagama *et al.*, 2003), *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) (Homoptera: Aphididae) (Sampson *et al.*, 2005), *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae) (Cestari *et al.*, 2004), *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) (Juntarajumnong y Chandrapatya, 2009; Asawalan y Hassalani, 2006; Oliveira *et al.*, 2003; Obeng-Oferi *et al.* 1998), *Sitophilus granarius* L. (Coleoptera: Curculionidae) (Aslan *et al.*, 2004), *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) (Miresmailli e Isman, 2006) *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) (Juntarajumnong y Chandrapatya, 2009), además de acción fungicida contra *Fusarium oxysporum* Schldl, *Botrytis cinerea*, *Bipolaris sorokiniana* (Salgado *et al.*, 2003), *Pythium irregulare* Buisman, *Ceratocystis pilifera* (Fr.) C. Moreau y *Phragmidium violaceum* (Schultz) G. Winter (Bittner *et al.*, 2009) y antimicrobial de amplio espectro (Schwob *et al.*, 2006).

Una de las plantas nativas de Chile que ha mostrado propiedades insecticidas es el boldo (*Peumus boldus* Molina; Monimiaceae), el cual es un árbol que puede alcanzar hasta 20 m de altura. Los polvos, extractos y aceite esencial que se obtienen de follaje y madera de esta especie tienen propiedades insecticidas contra *S. zeamais* (Bittner *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2003 a y b y 2005), *A. obtectus* (Bittner *et al.*, 2008) y *Spodoptera littoralis* Boisd. (Zapata *et al.*, 2006). Las hojas contienen alcaloides, a los que en conjunto se les conoce como boldina, y se les atribuyen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antipiréticas (Vogel *et al.*, 1999). También posee aceites esenciales en concentraciones de 1.5 a 2.4 mL 100 g⁻¹ de materia seca, los cuales tienen propiedades bactericidas y fungicidas. Sin embargo, no se ha estudiado la actividad del aceite esencial de esta planta en el control de *S. frugiperda* y *H.zea*, por lo que el objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad biológica del aceite esencial de hojas de boldo contra larvas de estas especies en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el laboratorio de Toxicología de Insecticidas del Programa de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México, México.

Obtención del aceite

Dada la baja densidad natural de este árbol en México, el material vegetal consistió en hojas deshidratadas de boldo que se adquirieron en el mercado de frutas y hortalizas de la ciudad de Texcoco, Estado de México, México. La identidad taxonómica de esta especie se corroboró de acuerdo a Vogel *et al.*, 2005. Se conservó la lamina foliar completa de las hojas adultas, ya que Pérez *et al.* (2007) demostraron que el follaje de esta planta conserva sus propiedades insecticidas si se le mantiene deshidratado y sin moler, por lo que este se trituró el mismo día de la extracción del aceite con un molino eléctrico para café Braun KSM2-BLK (Braun de México y Cía de C.V., Naucalpan, Estado de México, México). El aceite se obtuvo, de acuerdo a Vogel *et al.* (1997), mediante destilación por arrastre de vapor usando agua destilada. Una vez extraído el aceite, éste se conservó a 4.5 °C en envases de vidrio de color ámbar, hasta su utilización.

Insectos

Las larvas de *S. frugiperda* y *H. zea* provinieron de la colonia permanente del Laboratorio de Toxicología de Insecticidas, las que se mantienen en cámara bioclimática bajo condiciones controladas de 27 ± 1 °C, $70 \pm 5\%$ de humedad relativa y fotoperiodo de 14: 10 horas luz: oscuridad.

Identificación de compuestos

La identificación de los compuestos presentes en boldo se llevó a cabo en el laboratorio de Ecología Química del Programa de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México. El análisis se realizó mediante cromatografía de gases. Se utilizó un equipo Hewlett-Packard (HP) modelo 5890, equipado con un detector de flama y un inyector capilar splitless. Las condiciones del análisis fueron: temperatura del horno de 40 °C durante los primeros dos minutos, para luego comenzar a incrementarse 15 °C por minuto hasta llegar a 250 °C que se mantuvo por dos minutos y aumentar nuevamente en 20 °C por minuto hasta alcanzar

280 °C por un minuto. El modo de inyección fue splitless con columna HP 5MS y el detector a 280 °C. El gas acarreador fue helio a un flujo de 1 mL minuto⁻¹ y el tiempo de análisis fue de 21 minutos.

Bioensayos

Toxicidad del aceite esencial de *P. boldus*

Se utilizaron vasos plásticos (Envases Cuevas S.A. de C.V., Ecatepec, Estado de México, México) de 20 mL de capacidad, en los que con una micropipeta Multipette[®] (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) se colocaron 10 mL de dieta artificial (Tobacco Bollworm, Southland Products, Inc.) mezclada con el aceite esencial de boldo para obtener concentraciones de 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0%. La mezcla se realizó a una temperatura de 40 °C para evitar la degradación de los compuestos activos (Martínez y van Emden, 2001). Una vez que la dieta se enfrió y solidificó, en cada vaso se introdujo una larva neonata de 24 a 72 h de edad. Luego, cada 48 h se evaluó la mortalidad hasta que el 75% de las larvas del testigo alcanzó el estado de pupa. Se consideró como muerta aquella larva que carecía de movimiento después de punzarla con una aguja de disección. El testigo sin tratar consistió en 10 mL de dieta libre de aceite esencial. En total se evaluaron seis concentraciones de boldo y un testigo sin tratar, cada uno con 20 repeticiones y la metodología se repitió cinco veces en diferentes días (100 vasos por tratamiento). Para estimar la concentración letal 50% (CL₅₀) y 90% (CL₉₀), los datos se sometieron a un análisis Probit (Finney, 1971) con el procedimiento PROC PROBIT del programa Statistical Analysis System (SAS) (SAS Institute, 1998).

Efecto de boldo en el ciclo biológico

En vasos plásticos de 20 mL de capacidad, se colocaron 10 mL de dieta artificial mezclada con el aceite esencial para obtener concentraciones de 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0% de aceite esencial en dieta. Para cada tratamiento se prepararon 100 vasos con dieta y en cada uno de ellos se introdujo una larva neonata de menos de 24 h de edad. Se dejó a las larvas alimentarse libremente por 72 h y luego cada 48 h se retiraron aleatoriamente cinco vasos por tratamiento para pesar y medir la longitud de las larvas. Una vez que en el testigo alcanzó un 75% de pupación, las unidades experimentales restantes de todos los tratamientos, se dividieron en 10 repeticiones de 5 vasos cada una. De cada repetición se evaluó el porcentaje de larvas que alcanzaron el estado de

pupa, el peso de éstas, el número que llegó a adulto y el tiempo transcurrido entre los estados de larva-pupa y pupa-adulto.

Bioensayos de actividad antialimentaria

Bioensayos con posibilidad de elección

Larvas de primer instar

La preferencia alimentaria de larvas neonatas se evaluó con un dispositivo de elección (choice arena) (Gore *et al.*, 2005), consistente de una caja Petri plástica de 5 cm de diámetro y 1.5 cm de altura (Industrias Technicare, Atizapan de Zaragoza, Estado de México, México). En el centro de la caja Petri se ubicó una larva neonata de 24 h de edad y alrededor de ella se colocó un círculo de dieta de 1.5 cm de diámetro y 0.25 cm de altura, de cada tratamiento: 0 (testigo), 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0%. Finalmente, la caja Petri se cubrió con su tapa perforada y se cubrió internamente con tela de organza para permitir la ventilación. Diariamente, y durante cinco días, por cinco minutos se evaluó la preferencia de la larva para alimentarse de cada una de las concentraciones estudiadas. Para evaluar la preferencia de alimento, los restos de las siete dietas se deshidrataron en una estufa a 40 °C por 48 h para obtener su peso seco, el que se comparó con el peso seco de círculos de dieta intactos deshidratados al comienzo del bioensayo. Cada tratamiento tuvo 10 repeticiones y la metodología se repitió cinco veces en el tiempo. En cada repetición, los tratamientos se ubicaron de manera aleatoria para evitar interferencias de factores externos como luz y temperatura, entre otros.

Larvas de tercer instar.

Pruebas con posibilidad de elección

En el caso de larvas del tercer instar, la dieta se preparó en una cubetera de hielo (Imperial Plastic[®] Inc, Lakeville, MN, USA) vaciando 2 mL de dieta en cada cavidad. Como dispositivo de elección se utilizó una caja Petri plástica de 9 cm de diámetro por 3 cm de alto, con la tapa perforada y cubierta internamente con tela de organza para permitir el intercambio gaseoso. Para mantener la humedad relativa, en la base de la caja se colocó un trozo de papel filtro humedecido y sobre éste se colocaron dos cubos de dieta, uno a la concentración requerida y otro sin tratar. Luego, cada caja se infestó con una larva de tercer instar a la que se le permitió alimentarse libremente durante 72 h con la dieta de su preferencia. Las concentraciones evaluadas fueron: 0

(testigo), 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0% de aceite esencial en dieta y cada tratamiento constó de 20 repeticiones. La metodología se repitió cinco veces en diferentes días (100 cajas Petri por tratamiento). Al final del bioensayo, los restos de dieta se deshidrataron en una estufa a 40 °C por 72 h para obtener su peso seco (Zapata *et al.* 2006) y con los valores obtenidos se calculó el índice de disuasión de la alimentación (**IDA**) $IDA = ((Ic - It)/(Ic + It)) * 100$ (Sadek, 2003) y el índice de inhibición de la alimentación (**IIA**) $IIA = ((Ic - It)/Ic) * 100$ (Raffa y Frazier, 1988), donde Ic = Ingestión de alimento no tratado, It = Ingestión de alimento tratado.

Pruebas sin posibilidad de elección

El experimento se realizó de la manera indicada anteriormente, pero con la diferencia de que la larva de cada caja Petri, tenía acceso a dos cubos de dieta de 2 x 2 cm del mismo tratamiento. Los tratamientos evaluados fueron los indicados en las pruebas con posibilidad de elección. Con los valores de peso seco obtenidos se calcularon los índices de inhibición de la alimentación (**IIA**) (Raffa y Frazier, 1988) e inhibición del crecimiento (**IIC**) $IIC = [(Pc - Pt)/Pc] * 100$, donde Pc = Peso larvas testigo (g) y Pt = Peso larvas tratadas (g); Tasa de consumo relativo (**TCR**) $TCR = IaL / (PiL * T)$, donde IaL = ingestión de alimento durante el período experimental (g), PiL = peso inicial de la larva (g) y T = duración del experimento (días); Tasa de incremento de peso larvario (**TIP**) $TIP = \Delta P / (PiL * T)$, donde ΔP = Incremento del peso larval durante el período experimental, PiL = peso inicial de la larva (g) y T = duración del experimento (días) (Farrar *et al.*, 1989) y eficiencia de conversión del alimento ingerido (**ECI**) $ECI = (TIP/TCR) * 100$ (Waldbauer, 1968).

Para calcular los índices antes señalados, al principio de los bioensayos se deshidrataron y pesaron 20 muestras de dieta por tratamiento y para obtener la diferencia de peso, todas las larvas se pesaron al inicio y al final del bioensayo.

Diseño experimental y análisis estadístico

Para evaluar el efecto del extracto de boldo sobre *S. frugiperda* y *H. zea*, se utilizó un diseño experimental en bloques completos al azar con 7 tratamientos y 20 repeticiones. Para homogeneizar las varianzas, los datos se transformaron a $\sqrt{x + 0.5}$ y se sometieron a un análisis de varianza ANDEVA, ($\alpha = 0.05$) y a una prueba de comparación de medias Tukey con un nivel

de significancia del 95% ($p \leq 0.05$) con el programa Statistical Analysis System (SAS) (SAS Institute, 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis del aceite esencial

El rendimiento de aceite fue de 2.88% pues con 60 g de polvo de *P. boldus* se obtuvieron 2.0 mL de aceite esencial. Este valor se encuentra en el rango señalado por Vogel *et al.* (1997), quienes indican que *P. boldus* tiene una concentración de aceite esencial de 1.5 a 2.4 mL 100 g⁻¹ de materia seca.

En el análisis cromatográfico del extracto se identificaron 15 compuestos (Cuadro 1) siendo los de mayor concentración: β -cimeno (12.15%), 2-careno (11.68%), terpineol (7.95%), 1-8 cineol (5.81%), p-cimen-8-ol (4.88), trans-pinocarveol (4.73), linalol (4.24), ascaridol (4.21%) y eugenol metílico (2.1%). Todos estos compuestos pertenecen al grupo de los monoterpenos, lo cual es típico en los aceites esenciales debido a que estos le otorgan el aroma característico. Además, estos compuestos son también comunes en otras especies de la familia Monimiaceae como *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde y *Laurelia sempervirens* (Ruíz & Pav.) Tul. (Bittner *et al.*, 2009). Desde el punto de vista de la protección vegetal, Lee *et al.*, (1999) señalan que los monoterpenos afectan la actividad alimentaria normal de lepidópteros como *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Específicamente destaca la presencia de 1-8 cineol, compuesto que ha sido documentado con actividad fumigante contra coleópteros que atacan granos almacenados como *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae) (Lee *et al.*, 2003; Negahban *et al.*, 2007), *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) (Lee *et al.*, 2003; Bittner *et al.*, 2008; Bekele y Hassanali, 2001), *Tribolium castaneum* (Herb) (Coleoptera: Tenebrionidae) (Lee *et al.*, 2003; Negahban *et al.*, 2007), *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae) (Lee *et al.*, 2003; Bekele y Hassanali, 2001), *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae) (Bittner *et al.*, 2008) y *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae) (Negahban *et al.*, 2007). Por otra parte, Karamnderes *et al.* (2002), documentan que el aceite esencial de especies del género *Achillea* contiene un porcentaje de 1-8 cineol de 43%, mostrando éste un efecto fungicida y bactericida inclusive a bajas concentraciones.

Otro de los compuestos identificados con registro de actividad en insectos es el eugenol metílico, el cual según Obeng-Ofori y Reichmuth (1997), es el principal componente del aceite esencial de *Ocimum suave* (Wild) y ha mostrado actividad insecticida contra *S. granarius*, *S. zmais*, *T. castaneum* y *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae). Este compuesto también ha sido identificado como una kairomona atrayente para *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Shelly y Edu, 2008; Shelly *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2000) y *Bactrocera cucurbitae* (Coquillet) (Vargas *et al.*, 2000). El ascaridol se ha identificado como el componente principal del aceite esencial de *Ch. ambrosioides* (Sigh *et al.*, 2008; Dembitsky *et al.*, 2008) que ha mostrado efecto insecticida sobre *S. zmais* (Tavares y Vendramim, 2005 a y b), nematocida sobre *Meloidogyne incognita* y *Aphelenchoides besseyi* (Yao-Pin *et al.*, 2007), fungicida sobre *Aspergillus*, *Colletotrichum* y *Fusarium* (Marangon *et al.*, 2008) y alelopatía contra algunas especies de harvenses (Hegazy y Farrag, 2007).

Toxicidad del aceite esencial de *P. boldus*

S. frugiperda

La toxicidad en las larvas de *S. frugiperda* mostró tener correlación positiva ($r^2=0.95$) con la concentración del extracto de aceite. La mortalidad más alta (82.5%) se obtuvo en el tratamiento con aceite al 8% (Cuadro 2) el cual fue significativamente mayor ($F=12.25$ $df= 8.23$; $P=0.029$) a todos los restantes tratamientos. Las concentraciones entre 0.25 a 2% no superaron el 10% de mortalidad, no difiriendo significativamente del testigo sin tratar. Las CL_{50} y CL_{90} fueron de 4.1 y 11.36 mL kg^{-1} respectivamente, lo cual implica que para eliminar el 90% de la población se requiere de una concentración de 12% de aceite esencial de *P. boldus*. La mortalidad fue menor a la documentada por Zapata *et al.* (2006) quienes mezclaron dieta artificial con polvo de *P. boldus* a una concentración de 4% y provocaron una mortalidad superior al 80% en larvas de *S. littoralis*. Además, la toxicidad del aceite esencial de *P. boldus* es menor a la que se obtuvo en *S. frugiperda* con otras especies de plantas como *Aegeratum conyzoides* L. (Asteraceae) (Lima *et al.*, 2010), *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) (Labinas *et al.*, 2002) y *Piper hispidinervum* C. DC. (Piperaceae), todas con 100% de mortalidad en concentraciones iguales o menores a 3%.

H. zea

Esta especie fue menos susceptible al aceite esencial que *S. frugiperda*, debido a que la concentración de 8% provocó un 58.3% de mortalidad y sin diferencias significativas con 2 y 4% que no superaron el 35%. Las CL_{50} y CL_{90} fueron de 3.91 y 21.29 mL kg⁻¹, resultado que no permite considerar este aceite esencial como una alternativa práctica para el control de *H. zea*, ya que dado el rendimiento de la extracción, se requiere de 660g de material vegetal para obtener el aceite necesario. La baja susceptibilidad contrasta con la efectividad del aceite esencial de otras especies como *Chloroxylon swietenia* DC (Rutaceae) que causó 100% de mortalidad de *H. zea* a las 20 h de evaluación (Kiran *et al.* 2007).

Efecto de boldo en el ciclo biológico*S. frugiperda*

El tamaño de las larvas disminuyó a medida que aumentó la concentración de aceite esencial en la dieta. El mayor tamaño se alcanzó en el testigo (32.4 mm) y en las concentraciones de 0.25 (30.6 mm) a 4% (26.8 mm), sin diferencia significativa entre ellas (Cuadro 3). El menor tamaño se observó en 8% con 23.7 mm, que fue significativamente menor ($F=2.03$ $df=9,27$; $P=0.042$) que el testigo, pero no que las restantes concentraciones de aceite esencial evaluadas. Una tendencia similar se observó en el peso de las larvas donde no hubo diferencias significativas entre el testigo y los tratamientos de 0.25 a 2%, fluctuando entre 0.36 a 0.31 g. Sin embargo, las concentraciones de 4 y 8% mostraron menor peso de las larvas con 0.24 y 0.20 g respectivamente, siendo ambas significativamente menores ($F=5.25$ $df=9,27$; $P=0.0004$) a los otros tratamientos. La cantidad de larvas que alcanzaron el estado de pupa también disminuyó con el incremento de la concentración de aceite. En el testigo, 0.25% y 0.5 %, se observó una pupación superior al 90%. Los valores más bajos se presentaron en el aceite al 4 y 8%, con porcentajes de mortalidad de 52 y 44, respectivamente, siendo éstos significativamente menores ($F=12.60$ $df=10,34$; $P=0.0001$) a los que se presentaron en el resto de los tratamientos. Aunque el número de pupas fue menor en las concentraciones mayores del aceite esencial, éstas no mostraron un menor peso, ya que no hubo diferencias significativas entre 0.5 a 8% pero sí con el testigo ($F=3.06$ $df=10,34$; $P=0.0026$). En la emergencia de adultos se reflejó el efecto de la concentración de aceite esencial, ya que mientras el testigo, 0.25 y 0.5 % superaron el 80% de emergencia, la mayor concentración (8%) solo tuvo un 24%, que fue significativamente menor

($F=3.06$ $df=10,34$; $P=0.0026$) a todos los demás tratamientos. El tiempo entre larva-pupa y pupa-adulto fue significativamente menor en el testigo con 16.8 ($F=0.0$ $df=10,34$; $P=0.0001$) y 22 días, respectivamente ($F=5.43$ $df=10,34$; $P=0.0001$). En ambas evaluaciones las concentraciones del aceite esencial de *P. boldus* no difirieron significativamente entre ellas. Estas tendencias son similares a las que se han observado con otras especies como *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) (El-Aziz y El-Hawary, 1997), *Brassica alba* L. (Brassicaceae) (El-Aziz y Sharaby, 1997) y *Pelargonium graveolens* (Linn.) (Geraniaceae) (El-Aziz, 1998) en las que sólo el 50% de las larvas alimentadas con dieta mezclada con los respectivos aceites esenciales, alcanzó el siguiente estado biológico, las larvas y pupas fueron de menor tamaño, los adultos ovipositaron menos y los huevos presentaron menor viabilidad.

H. zea

El peso larval a la concentración de aceite de 8%, con 0.41 g, fue significativamente menor ($F=2.8$ $df=9,27$; $P=0.0123$) que el testigo y los tratamientos de 0.25 a 1% de aceite esencial, que fluctuaron entre 0.55 a 0.58 g. Esta diferencia de peso se reflejó en el número de larvas que mudó a pupa, ya que tanto en 4 como en 8% de concentración de aceite, ninguna larva alcanzó este estado, mientras que el testigo con un 90% de larvas que llegaron a pupa mostró diferencias significativas ($F=15.74$; $df=11,41$; $P=0.0001$) con los demás tratamientos (Cuadro 3). El aceite esencial de *P. boldus* tiene una acción tóxica lenta sobre *H. zea*, ya que estas mismas concentraciones en los estudios de toxicidad no superaron el 60% de mortalidad pero a la vez no permitieron que los insectos completaran el ciclo. Independiente de la cantidad de pupas obtenidas en cada tratamiento, todas tuvieron un peso entre 0.47 y 0.41 g. La concentración de aceite al 2% provocó malformaciones de larvas tratadas que se manifestaron como endurecimiento y ennegrecimiento del integumento (Figura 1 a y b), junto con la ruptura parcial de las suturas dorsales, lo que les impidió el paso al siguiente estado. La similitud en el peso pupal de todos los tratamientos no significó que todos los ejemplares tuvieran la misma aptitud biológica, ya que en el paso a adulto, el testigo con 95.8% fue significativamente mayor ($F=7.78$; $df=11,41$; $P=0.0001$) a todos los tratamientos. El aceite al 2% nuevamente provocó malformaciones, pues se observaron adultos con las alas reducidas (Figura 1c) que murieron a las 24 h de emerger. El tiempo entre larva-pupa en el testigo (19.1 días) fue significativamente menor ($F=3.51$; $df=10,35$; $P=0.0016$) al resto de los tratamientos. El tiempo necesario para la

transformación pupa-adulto en el testigo y en aceite al 0.25% (23 días), fueron significativamente menores en relación a los demás tratamientos, que requirieron de 24 días ($F=10.41$; $df=9,29$; $P=0.0001$).

Bioensayos de actividad antialimentaria

Bioensayos con posibilidad de elección

Larvas de primer instar.

S. frugiperda

La preferencia alimentaria de las larvas neonatas de *S. frugiperda* se observó mayoritariamente en la dieta con menor concentración de aceite esencial, encontrándose larvas solamente en el testigo y en los tratamientos de 0.25 y 0.5 % (Cuadro 4). A las 24 h el testigo registró el 50% de las larvas, mientras que el aceite a 0.25 y 0.5% tuvieron 30 y 20% de larvas, respectivamente, difiriendo significativamente los tres entre sí ($F=51.35$; $df=8,20$; $P=0.0001$). En la evaluación a las 48 h, el testigo aumentó a 60% siendo significativamente mayor ($F=44.82$; $df=8,20$; $P=0.0001$) a los tratamientos de 0.25% que disminuyó de 30 a 20% y a 0.5 % que se mantuvo en 20% de preferencia. En las 72 y 96 h, la preferencia en el testigo disminuyó a 53.3% siendo aún significativamente mayor ($F=7.92$; $df=8,20$; $P=0.0007$) a lo observado en el aceite al 0.25%, donde la preferencia se incrementó a 26.7% y a la concentración de 0.5 % que continuó con 20% de presencia de larvas. En la evaluación a las 120 h, el testigo disminuyó la preferencia a 46.7% sin diferencia significativa con el 40% observado en la concentración de 0.25%, aunque sí hubo diferencia estadística en la preferencia observada entre la concentración de 0.25 y 0.5% ($F=8.06$; $df=8,20$; $P=0.0005$). El consumo de dieta disminuyó cuando aumentó la concentración del aceite esencial en la dieta, siendo el consumo del testigo con 0.039 g estadísticamente mayor ($F=4.85$; $df=15,69$; $P=0.0001$) a todos los tratamientos.

H. zea

La preferencia alimentaria de las larvas se manifestó por la dieta con menor concentración de aceite esencial. A las 24 h se observaron larvas en el testigo y en las concentraciones de 0.25 a 2% de aceite esencial. La mayor preferencia la presentó el testigo con 44% aunque sin diferencias significativas con 0.25 y 0.5% que tuvieron un 33.3 y 13.3% de las preferencias respectivamente. El 1 y 2% de aceite que tuvieron 6.7% de las preferencias fueron significativamente menores al

testigo ($F=2.61$; $df=8,20$; $P=0.031$). De las 48 a las 120 h la selección de dieta por parte de las larvas se concentró en el testigo, con porcentajes de 0.25 y 0.5. Según Gore *et al.* (2005), la mayor amplitud inicial de las preferencias se debe a que al principio existe un periodo de adaptación al ambiente para luego manifestarse el efecto real del tratamiento. A las 48 h, el testigo y 0.25% no difirieron entre sí con preferencias de 46.7 y 40%, respectivamente; estos valores fueron significativamente mayores ($F=5.33$; $df=8,20$; $P=0.0021$) a los observados en la concentración de 0.5% que tuvo 13.3% de preferencia. En la evaluación a las 72 h el testigo aumentó su porcentaje de preferencia larval a 53.3%, difiriendo significativamente ($F=25.82$; $df=8,20$; $P=0.0001$) con el 40% observado en la concentración 0.25% y con el 6.7% de preferencia de la concentración 0.5%. A las 96 y 120 h, en el testigo se siguió incrementando la preferencia hasta llegar a 60% y mantuvo la diferencia significativa ($F=28.07$; $df=8,20$; $P=0.0001$) con las concentraciones 0.25 y 0.5%. El consumo de la dieta también se vio afectado por la concentración de aceite en la dieta, siendo el testigo el más consumido con 0.018 g, que difiere significativamente ($F=4.79$; $df=15,69$; $P=0.0001$) de todas las concentraciones de aceite esencial iguales o superiores a 0.5%.

Larvas de tercer instar.

Pruebas con posibilidad de elección

S. frugiperda

La concentración de aceite esencial en la dieta tiene una directa proporcionalidad con la inhibición de la alimentación. Esta tendencia se observa en los índices de disuasión (IDA) e inhibición (IIA) de la alimentación donde el mayor valor se obtuvo con la concentración más alta (Cuadro 5). En el caso de IDA, la concentración de 8% obtuvo una disuasión de 60.5% que no difiere de la observada en las concentraciones de 2 y 4%, pero sí ($F=2.01$; $df=8,23$; $P=0.005$) con las concentraciones menores a 1% que presentaron un mínimo de 15.3%. En IIA se observa la misma tendencia con un máximo de 74.3% al 8% de aceite esencial, pero sin diferencias con 2 y 4%. El mínimo fue de 23.5% con la concentración 0.25% que es significativamente menor ($F=1.97$; $df=8,23$; $P=0.007$) a todos los restantes tratamientos. Los valores de IDA son menores a los de Zapata *et al.* (2006), quienes mezclando polvo de *P. boldus* con la dieta de *S. littoralis* en concentraciones de 1, 2 y 4% obtuvieron valores de 60.2, 73.8 y 96.2%, respectivamente. En IIA la situación es inversa, ya que con las mismas concentraciones estos autores no superaron el 22%

de inhibición. Una tendencia similar se obtuvo con el aceite esencial de otras especies como *Achillea millefolium* L. (Asteraceae), *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) (Castro *et al.* 2006) y *C. winterianus* (Labinas *et al.* 2002), donde en las pruebas con posibilidad de elección, las larvas siempre prefirieron consumir la dieta testigo en lugar que la mezclada o impregnada con aceite esencial.

H. zea

En esta especie se observó la misma tendencia que con *S. frugiperda*, pero con la diferencia de que se alcanzaron valores más altos. En IDA, la máxima disuasión se observó en las concentraciones de 8% (90.9%) y en 4% (70.6%) sin diferencia estadística entre ellas, pero sí con las restantes concentraciones que tuvieron un mínimo de 13.6% ($F=29.46$; $df=8,23$; $P=0.0001$) (Cuadro 5). Con IIA se obtuvo la misma tendencia, ya que no hubo diferencias estadísticas entre las concentraciones 4 y 8% donde la máxima supresión de la alimentación fue 94.5% mostrando diferencias significativas ($F=47.99$; $df=8,23$; $P=0.0001$) con las concentraciones de 0.25 a 2% que fluctuaron entre 23.8 y 80%.

Pruebas sin posibilidad de elección

S. frugiperda

Las pruebas sin posibilidad de elección mostraron que no existen diferencias significativas entre los tratamientos en el consumo de la dieta (TCR) fluctuando entre $0.36 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (dieta consumida (g) / (peso inicial larva (g) * periodo alimentación (días)) para el testigo y $0.27 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para 8% de aceite esencial (Cuadro 6). Esta similitud en la preferencia de alimentación se tradujo en que tampoco hubo diferencias significativas en la inhibición de la alimentación (IIA) y del crecimiento (IIC). Sin embargo, el incremento de peso (TIP) fue significativamente menor ($F=2.62$; $df=9,27$; $P=0.039$) en los tratamientos que contenían una concentración de aceite esencial igual o superior a 1%. Las larvas que se alimentaron con la dieta que contenía mayor concentración de aceite esencial tuvieron menor peso y considerando los resultados obtenidos en el bioensayo de efecto en el ciclo se puede inferir que muchas de éstas no llegarán al estado adulto. La disminución del consumo de la dieta con el aumento de la concentración de aceite esencial es consistente con los resultados que se han observado en otras especies contra *S. frugiperda*. Castro *et al.* (2006) documentan que en pruebas sin posibilidad de elección las larvas

siempre consumieron menos del alimento con mayor concentración de aceite esencial de *A. millefolium* y *T. vulgaris*. Resultados similares obtuvieron también El-Aziz y El-Hawary, (1997) con *O. basilicum* y El-Aziz, (1998) con *P. graveolens*.

H. zea

La concentración de aceite en la dieta no afectó de modo significativo su consumo (TCR) por parte de las larvas (Cuadro 6), ya que se alimentaron de manera similar de todos los tratamientos y aunque la inhibición de la alimentación (IIA) aumentó en la medida que la concentración de aceite esencial también lo hacía, no hubo diferencias significativas. Sin embargo, en la evaluación del crecimiento de la larva sí se observaron diferencias ($F=2.11$; $df=8,23$; $P=0.05$) donde las concentraciones de 4 y 8% con 59.1 y 61.9% de IIC fueron significativamente mayores al 37.3% de inhibición de la concentración 0.25%. Esta inhibición del crecimiento también afectó la ganancia de peso (TIP), debido a que hubo diferencia significativa ($F=2.11$; $df=8,23$; $P=0.05$) entre el testigo que fue el mayor con $0.53 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y todos los restantes tratamientos que tuvieron el mínimo con $0.11 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$. La diferencia de peso se corroboró con la eficacia de conversión (ECI) del alimento ingerido ya que el testigo tuvo 94.3% mientras que el tratamiento de 8% solo alcanzó un 35.2%. Este último no tuvo diferencias estadísticas con las concentraciones de 0.5 a 4% pero sí con 0.25% ($F=1.56$; $df=9,27$; $P=0.015$). La disminución en el consumo de dieta coincide con los resultados de otras especies como *C. swietenia*, cuyo aceite esencial está clasificado como deterente de la alimentación de *H. armigera* (Kiran *et al.* 2007).

CONCLUSIONES

El aceite esencial de *P. boldus* presenta una mayor toxicidad sobre *S. frugiperda* que en *H. zea*, aunque sus propiedades como supresor de la alimentación e influencia en el ciclo biológico permiten considerarlo como una opción prometedora en el control de ambas especies. Sin embargo, los resultados deben ser verificados para asegurar su eficacia tanto en condiciones controladas como en pruebas de campo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo técnico al Sr. Lauro Hernández Pérez del Laboratorio de Toxicología de Insecticidas, al Dr. Juan Cibrián Tovar y al M.C. Julio Cesar Velázquez del

Laboratorio de Ecología Química y al M.C. Jorge Valdez Carrasco del Laboratorio de Morfología de Insectos del Colegio de Postgraduados.

LITERATURA CITADA

- Abd-elghafar, S.F., C.O. Knowles, and M.L. Wall. 1993. Pyrethroid resistance in two field strains of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 86: 1651-1655.
- Asawalam, E.F., and A. Hassanali. 2006. Constituents of the essential oil of *Vernonia amygdalina* as maize weevil protectants. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 6:95-102.
- Aslan, I., H. Ozbek, S. Kordali, O. Çalmasur and A., Cakir. 2004. Toxicity of essential oil vapors obtained from *Pistacia* spp. to the granary weevil, *Sitophilus zeamais* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Plant Diseases and Protection* 111: 400-407.
- Barreira, E., S. de Moraes, M. Lima and E. Pinho. 2004. Larvicidal activity of essential oils from brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 541-544.
- Bekele, J., and A. Hassanali. 2001. Blend effects in the toxicity of the essential oil constituents of *Ocimum kilimandscharicum* and *Ocimum kenyense* (Labiataea) on two post-harvest insect pests. *Phytochemistry* 57: 385-391.
- Bittner, M., M. E. Casanueva., C. Arbert, M. Aguilera, V. Hernández and J. Becerra. 2008. Effects of essential oils from five plants species against the granary weevil *Sitophilus zeamais* and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera). *J. Chil. Chem. Soc.* 53: 1455-1459.
- Bittner, M., M. Aguilera, V. Hernández, C. Arbert, J. Becerra and M. E. Casanueva. 2009. Fungistatic activity of essential oils extracted from *Peumus boldus* Mol., *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde and *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul (Chilean monimiaceae). *Chilean Journal of Agricultural Research* 69:30-37.
- Castro, D.P., M. Cardoso, J.C. Moraes, N.M. Santos e D.P. Baliza. 2006. Não-preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. *Rev. Bras. Pl. Med.* 8:27-32.
- Cestari, I., S. Sarti, C. Waid y A. Castello. 2004. Evaluation of the potential insecticide activity of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil against the head lice *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). *Neotropical Entomology* 33: 805-807.

- Dembitsky, V., I. Shkrob and L.O. Hanus. 2008. Ascaridole and related peroxides from the genus *Chenopodium*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc 152: 209-215.
- El-Aziz, S. 1998. Essential oil of geranium *Pelargonium graveolens* (Linn.) as a feeding deterrent, growth retardant and oviposition repellent for the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). J. Egypt Ger. Soc. Zool. 25: 47-58.
- El-Aziz, S. and A. Sharaby. 1997. Some biological effects of white mustard oil, *Brassica alba* against the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.). Anz. Schädlingsskde Pflanzenschutz Umweltschutz 70: 62-64.
- El-Aziz, S. and F. El-Hawary. 1997. Inhibitory effects of some essential oils on the development of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.). J. Egypt Ger. Soc. Zool. 25: 117-130.
- Farrar R., J. Barbour, and G. Kennedy 1989. Quantifying food consumption and growth in insects. Ann. Entomol. Soc. Am. 82: 593-598.
- Finney, D. 1971. Probit Analysis. Cambridge University Press. Cambridge. UK. 333 p.
- Gore, J., J. Adamczyk and C.A. Blanco. 2005. Selective feeding of tobacco budworm and bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) on meridic diet with different concentrations of *Bacillus thuringiensis* proteins. J. Econ. Entomol. 98(1): 88-94.
- Hegazy, A.K. and H.F. Farrag. 2007. Allelopathic potential of *Chenopodium ambrosioides* on germination and seedling growth of some cultivated and weed plants. Global Journal of Biotechnology & Biochemistry 2: 1-9.
- Isman, M.B. 2000. Plant essential oil for pest and disease management. Crop Protection 19: 603-608.
- Juntarajumnong, K.K. and A. Chandrapatya. 2009. Repellency, fumigant and contact toxicities of *Litsea cubeba* (Lour.) Persoon against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). Kasetsart J. (Nat. Sci.) 43: 56 – 63.
- Karamenderes, C., Ü. Karabay and U. Zeybek. 2002. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of some *Achillea* L. species in Turkey. Acta Pharmaceutica Turcica 44: 221-225.
- Kiran, J.R., P. S. Devi and K. J. Reddy. 2007. Bioactivity of essential oils and sesquiterpenes of *Chloroxylon swietenia* DC against *Helicoverpa armigera*. Current Science 93: 544-548.

- Labinas, M. and W.B. Crocomo. 2002. Effect of java grass (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) essential oil on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae). *Acta Scientiarum* 24: 1401-1405.
- Lee, S., R. Tsao and J.R. Coats. 1999. Influence of dietary applied monoterpenoids and derivates on survival and growth of the european corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 92: 56-67.
- Lee, B. H., P. Annis, F. Tumaalii and S. Lee. 2003. The potential of 1, 8-cineole as a fumigant for stored wheat. pp: 230-234 *In: Proceedings of the Australian postharvest technical conference, 25 - 27 June 2003.* CSIRO. Canberra, Australia.
- Lima, R., M. Cardoso, J. Moraes, M. Andrade, B. Melo, V. Rodrigues. 2010. Caracterização química do óleo esencial de *Aegeratum conyzoides* L. sobre a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biosci. J.* 26: 1-5.
- Lima, R., M. Cardoso, J. Moraes, B. Melo, V. Rodrigues e P.L. Guimaraes. 2009. Atividade inseticida do óleo esencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Amazonica* 39: 377-382.
- Marangon, C.J., G. Newandram, O.D. Dhingra, and M. Moreira. 2008. Composition and antifungal activity of the essential oil of the brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. *J Chem. Ecol.* 34: 1213–1218
- Miresmailli, S. and M.B. Isman. 2006. Efficacy and persistence of rosemary oil as an acaricide against twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) on greenhouse tomato. *J. Econ. Entomol.* 99: 2015-2023.
- Negahban, M., S. Moharramipour and F. Sefidkon. 2007. Fumigant toxicity of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser against three stored-product insects. *Journal of Stored Products Research* 43: 123–128
- Obeng-Oferi, D., Ch. Reichmuth, A. Bekeles and A. Hassanali. 1998. Toxicity and protectant potential of camphor, a major component of essential oil of *Ocimum kilimandscharicum*, against four stored product beetles. *Int. J. Pest Manag.* 44: 203-209.
- Oliveira, S. de, J. Vendramim, J. Ribeiro e J. Barbosa. 2003. Bioativida de diversos pós de origem vegetal em relação a *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). *Ciênc. Agrotec.* 27: 1231-1236.

- Paranagama, P., Ch. Adhikari, K. Abeywickrama and P. Bandara. 2003. Deterrent effects of some Sri Lankan essential oils on oviposition and progeny production of the cowpea bruchid, (*Callosobruchus maculatus* F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Food, Agriculture & Environment* 1(2): 254-257
- Raffa K. and J. Frazier. 1988. A generalized model for quantifying behavioral desensitization to antifeedants. *Ent. Exp. Appl.* 46: 93-100.
- Regnault-Roger, C. 1997. The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integrated Pest Management Reviews* 2: 25-34.
- Sadek, M. 2003. Antifeedant and toxic activity of *Adhatoda vasica* leaf extract against *Spodoptera littoralis* (Lep. Noctuidae). *J. Appl. Entomol.* 127: 396-404.
- Salgado, A.P., M. Cardoso, P. De Souza, J. De Souza, C. Abreu e J.B. Pinto. 2003. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. *Ciênc. e Agrotec.* 27: 249-254
- Sampson, B., N. Tabanca, N. Kirimer, B. Dermirci, K. Husnu, I. Khan, J. Spiers and B. Wedge. 2005. Insecticidal activity of 23 essential oils and their major compounds against adult *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) (Aphididae: Homoptera). *Pest Manag. Sci.* 61:1122–1128
- Sanna, G., E. Bazzoni and M. Moretti. 2004. Microencapsulated essential oils active against Indian meal moth. *Bol. San. Veg. Plagas* 30:125-132.
- SAS Institute. 1998. Language guide for personal computer release. 6.03 Edition. SAS Institute. Cary. N. C. USA. 1028 p.
- Shelly, T.E. , J. Edu and E. Pahio. 2005. Influence of diet and methyl eugenol on the mating success of males of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera:Tephritidae). *Florida Entomologist* 88: 307-313.
- Shelly, T.E. and J. Edu. 2008. Do methyl eugenol-fed males of the oriental fruit fly (Diptera:Tephritidae) induce female re-mating?. *Florida Entomologist* 91: 388-393.
- Schwob, I., J. Vianno, G. Jann-Para, J.M. Bessiere and M. Dherbomez. 2006. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum hyssopifolium* spp. *hyssopifolium* from southeast France. *J. Essent. Oil Res.* 18: 469-471.
- Singh, H. P., D. R. Batish, R. K. Kohli, S. Mittal and S. Yadav. 2008. Chemical composition of essential oil from leaves of *Chenopodium ambrosioides* from Chandigarh, India.

Chemistry of Natural Compounds 44: 378-379.

- Silva, G., A. Lagunes y J. Rodríguez. 2003a. Control de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) con polvos vegetales solos y en mezcla con carbonato de calcio en maíz almacenado. *Cienc. Inv. Agr.* 30: 153-160.
- Silva, G., D. Pizarro, P. Casals y M. Berti. 2003b. Evaluación de plantas medicinales en polvo para el control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky en maíz almacenado. *Rev. Bras. Agrocienc.* 9: 383-388.
- Silva, G., O. Orrego, R. Hepp, y M. Tapia. 2005. Búsqueda de plantas con propiedades insecticidas para el control de *Sitophilus zeamais* en maíz almacenado. *Pesq. Agropec. Bras.* 40: 11-17.
- Tavares, M.A-G. y J.D. Vendramim. 2005a. Bioatividade da Erva-de-Santa-Maria, *Chenopodium ambrosioides* L., sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). *Neotropical Entomology* 34: 319-323.
- Tavares, M.A-G. e J.D. Vendramim. 2005b. Atividade inseticida da Erva-de-Santa-Maria *Chenopodium ambrosioides* L., em relação a *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 (Coleoptera: Curculionidae). *Arq. Inst. Biol.* 72: 51-55.
- Vargas, R.I., J.D. Stark, M.H. Kido, H. M. Ketter and L.C. Whitehand. 2000. Methyl eugenol and cue-lure traps for suppression of male oriental fruit flies and melon flies (Diptera: Tephritidae) in Hawaii: effects of lure mixtures and weathering. *J. Econ. Entomol.* 93: 81-87.
- Vogel, H., I. Razmilic y U. Doll. 1997. Contenido de aceite esencial y alcaloides en diferentes poblaciones de boldo (*Peumus boldus* Mol.). *Cienc. Invest. Agrar.* 24: 1-6.
- Vogel, H., I., Razmilic., P., Muñoz, U., Doll, and J. San Martín. 1999. Studies of genetic variation of essential oil and alkaloid content in Boldo (*Peumus boldus*). *Planta Med.* 65: 90-91.
- Waldbauer, G. 1968. The consumption and utilization of food by insects. *Adv. Insect Physiol.* 5: 229-288.
- Yao-Pin, Y., Y. Ming-jen and H. Wen-Feng. 2007. Synthesis and nematocidal activity of ascaridole derivated against *Meloidogyne incognita* and *Aphelenchoides besseyi*. *J. Pestic. Sci.* 32: 49-52.

- Yu, S.J. 1992. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 85: 675-682.
- Zapata, N., F. Budia, G. Silva, E. Viñuela y P. Medina. 2006. Actividad antialimentaria de *Maytenus boaria* Mol., *Peumus boldus* Mol. y *Quillaja saponaria* Mol. sobre *Spodoptera littoralis* Boisd. *Bol. San. Veg. Plagas* 32: 125-135.

Cuadro 1.- Principales compuestos presentes en el aceite esencial de *Peumus boldus*.

Compuesto	Tiempo de Retención (min)	(%)
1R-Alpha-pineno	6.71	0.26
Campheno	6.9	0.01
Beta-mirceno	7.41	0.69
Beta-cimeno	7.93	12.15
1-8 cineol	8.06	5.81
L-fencheno	8.62	1.92
Linalol	8.73	4.24
Trans-pinocarveol	9.26	4.73
Terpineol	9.68	7.95
p-Cimen-8-ol	10.00	4.88
2-cereno	10.36	11.68
Borneol acetato	10.88	1.99
Epoxido de ascaridol	11.16	4.21
Copaeno	12.15	0.36
Metileugenol	12.36	2.1

Cuadro 2.- Mortalidad y concentración letal 50% (CL₅₀) y 90% (CL₉₀), en larvas de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith y *Helicoverpa zea* (Boddie) tratadas con dieta artificial mezclada con aceite esencial de *Peumus boldus*.

Concentración	Mortalidad (%) ± EE	
	<i>Spodoptera frugiperda</i> ¹	<i>Helicoverpa zea</i> ¹
Testigo	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 b
0.25	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 b
0.5	2.5 ± 2.5 c	12.5 ± 7.9 b
1	5.0 ± 3.3 c	16.6 ± 11.7b
2	7.5 ± 5.3 c	25.0 ± 4.8ab
4	52.5 ± 6.9 b	33.3 ± 15.2ab
8	82.5 ± 5.3 a	58.3 ± 7.9 a
n [†]	200	200
b ± ES [¶]	1.0 ± 0.31	1.32 ± 0.29
CL ₅₀ [§]	4.1	3.91
(95% LC) ^{&}	(2.81-6.88)	(6.4-16.1)
CL ₉₀ [§]	11.36	21.29
(95% LC) ^{&}	(6.79-42.3)	(59.3-707.7)
Pr > χ ^{2Φ}	0.0001	0.0001

EE = error estándar de la media

¹ Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra minúscula no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, p ≤ 0.05).

[†] = número total de insectos tratados

[¶] = Pendiente (b) ajuste Probit y Error estándar de la pendiente (ES)

[§] = Concentración letal = mL kg⁻¹

[&] = Límites de confianza al 95%

^Φ = Probabilidad de que la línea log Dosis-Probit ajuste a una línea recta.

Cuadro 3.- Tamaño y peso final de larvas, porcentaje de pupación y peso de pupas, tiempo entre larva-pupa y pupa-adulto y porcentaje de emergencia de adultos de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith y *Helicoverpa zea* (Boddie), alimentadas con dieta artificial mezclada con aceite esencial de *Peumus boldus* Molina.

Insecto	Concentración (%)	Tamaño larva \pm EE* (mm)	Peso larva \pm EE* (g)	Pupación \pm EE* (%)	Peso pupa \pm EE* (g)	Larva-Pupa* \pm EE* (LP) ¹ DDI ³	Pupa-adulto* \pm EE* (PA) ² DDI ³	Emergencia Adultos \pm EE * ⁴ (%)
<i>S. frugiperda</i>	Testigo	32.4 \pm 1.8a	0.36 \pm 0.019a	100 \pm 0.0a	0.31 \pm 0.005a	16.8 \pm 0.0a	22 \pm 0.0a	88 \pm 4.9a
	0.25	30.6 \pm 2.3a	0.34 \pm 0.025a	96 \pm 4.0a	0.30 \pm 0.011ab	16.2 \pm 0.0b	23 \pm 0.0b	88 \pm 4.9a
	0.5	29.4 \pm 1.6a	0.33 \pm 0.021a	92 \pm 8.0ab	0.27 \pm 0.005bc	16.0 \pm 0.0b	23 \pm 0.0b	80 \pm 12.6ab
	1.0	28.8 \pm 0.9ab	0.33 \pm 0.018a	80 \pm 0.0bc	0.27 \pm 0.015bc	16.0 \pm 0.0b	23 \pm 0.0b	64 \pm 7.5bc
	2.0	27.8 \pm 1.3ab	0.31 \pm 0.022a	76 \pm 4.0c	0.26 \pm 0.008c	16.0 \pm 0.0b	23 \pm 0.0b	56 \pm 7.5c
	4.0	26.8 \pm 1.9ab	0.24 \pm 0.017b	52 \pm 4.9d	0.26 \pm 0.016c	16.0 \pm 0.2b	23 \pm 0.0b	48 \pm 4.9c
	8.0	23.7 \pm 1.2b	0.2 \pm 0.021b	44 \pm 7.4d	0.24 \pm 0.011c	16.0 \pm 0.2b	23 \pm 0.0b	24 \pm 4.0d
<i>H. zea</i>	Testigo	39.7 \pm 2.3a	0.64 \pm 0.02 a	90 \pm 4.47a	0.47 \pm 0.026a	19.1 \pm 0.25a	23.0 \pm 0.0a	95.8 \pm 4.2a
	0.25	36.2 \pm 0.8a	0.58 \pm 0.02 ab	70.8 \pm 4.16b	0.45 \pm 0.025ab	18.1 \pm 0.30b	23.1 \pm 0.16a	58.3 \pm 10.5b
	0.5	34.9 \pm 2.1a	0.55 \pm 0.05abc	58.3 \pm 7.68b	0.41 \pm 0.023ab	17.8 \pm 0.38b	23.8 \pm 0.16a	41.2 \pm 13.9b
	1.0	34.3 \pm 2.8a	0.55 \pm 0.05abc	54.1 \pm 8.33bc	0.42 \pm 0.009ab	17.7 \pm 0.22b	24.0 \pm 0.0b	41.2 \pm 10.6b
	2.0	34.1 \pm 2.8a	0.49 \pm 0.06bcd	37.5 \pm 10.7cd	0.41 \pm 0.026ab	17.6 \pm 0.10b	24.0 \pm 0.0b	33.3 \pm 10.6b
	4.0	33.5 \pm 2.2a	0.42 \pm 0.045cd	0.0 \pm 0.0e	--	--	--	--
	8.0	32.1 \pm 0.8a	0.41 \pm 0.027d	0.0 \pm 0.0e	--	--	--	--

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

EE= Error estándar de la media

¹LP= Período (días) en que se alcanza el 100% de pupación correspondiente a cada concentración.

²PA= Período (días) en que se alcanzan el 100% de adultos correspondiente a cada concentración.

³DDI= Días después de la infestación

⁴ Se consideró como 100% el número de pupas obtenidas en cada concentración.

Cuadro 4.- Preferencia y consumo de dieta artificial mezclada con diferentes concentraciones de aceite esencial de *Peumus boldus* Molina de larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith y *Helicoverpa zea* (Boddie).

Insecto	Concentración (%)	Preferencia ± EE					Consumo dieta (g)
		24 h (%)	48 h (%)	72 h (%)	96 h (%)	120 h (%)	
<i>S. frugiperda</i>	Testigo	50.0±5.7a	60.0±10a	53.3±23.1a	53.3±15.2 a	46.7±11.5a	0.039±0.0029a
	0.25	30.0±0.0b	20.0±0.0b	26.7±15.3b	26.7±5.7 b	40.0±10.0a	0.025±0.0035b
	0.5	20.0±5.7c	20.0±5.7b	20.0±10.0c	20.0±10.0c	13.3±5.7 b	0.025±0.0048b
	1.0	0.0±0.0d	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0b	0.019±0.0058bc
	2.0	0.0±0.0d	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0b	0.018±0.0031bc
	4.0	0.0±0.0d	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0b	0.009±0.0019cd
	8.0	0.0±0.0d	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0b	0.003±0.0010d
<i>H. zea</i>	Testigo	40.0±10.0a	46.7±10.0a	53.3±5.7a	60.0±5.7a	60.0±5.7a	0.018±0.002a
	0.25	33.3±5.7ab	40.0±5.7a	40.0±5.7b	33.3±0.0b	33.3±0.0b	0.013±0.002ab
	0.5	13.3±11.5abc	13.3±11.5b	6.7±10.0c	6.7±5.7c	6.7±5.7c	0.009±0.001bc
	1.0	6.7±5.7bc	0.0±0.0b	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.007±0.009cd
	2.0	6.7±5.7bc	0.0±0.0b	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.006±0.003cd
	4.0	0.0±0.0c	0.0±0.0b	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.003±0.0009d
	8.0	0.0±0.0c	0.0±0.0b	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.002±0.0003d

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

EE= Error estándar de la media

Cuadro 5.- Índice de disuasión de la alimentación (IDA) e índice de inhibición de la alimentación (IIA) en larvas de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith y *Helicoverpa zea* (Boddie) expuestas a dieta artificial con diferentes concentraciones de aceite esencial de *Peumus boldus* Molina.

Insecto	Concentración (%)	IDA promedio ± EE (%)	IIA promedio ± EE (%)
<i>S. frugiperda</i>	Testigo	--	--
	0.25	15.25±9.01 b	23.51±12.6 b
	0.5	22.92±10.9 b	33.79±13.2 b
	1.0	26.45±0.38 b	41.83±0.47 ab
	2.0	37.79±8.19 ab	53.18± 9.37 ab
	4.0	48.55±15.7 ab	59.48±18.5 ab
	8.0	60.47±9.18 a	74.13±7.23 a
	<i>H. zea</i>	Testigo	--
0.25		13.6±8.80 a	23.8±5.91 a
0.5		16.5±7.30 b	28.2±4.87 b
1.0		63.5±4.30 b	77.6±2.95 b
2.0		67.3±1.94 b	80.3±1.45 b
4.0		70.6±2.42 c	82.2±3.59 c
8.0		90.9±2.43 c	94.5±3.68 c

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

EE = error estándar de la media

Cuadro 6.- Tasa de consumo relativo (**TCR**), Índice de inhibición de la alimentación (**IIA**) y crecimiento (**IIC**), Tasa de incremento del peso larvario (**TIP**) y Eficiencia de conversión del alimento ingerido (**ECI**) en larvas de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith y *Helicoverpa zea* (Boddie) que se expusieron a dieta artificial con diferentes concentraciones de aceite esencial de *Peumus boldus* Molina.

Insecto	Concentración (%)	TCR promedio ±	IIA promedio ±	IIC promedio ±	TIP promedio ±	ECI promedio ±
		EE g g ⁻¹ d ⁻¹	EE (%)	EE (%)	EE g g ⁻¹ d ⁻¹	EE (%)
<i>S. frugiperda</i>	Testigo	0.36±0.07 a	--	--	0.53±0.17 a	98.9±2.12 a
	0.25	0.33±0.04 a	29.3±0.77 a	27.0±1.84 a	0.33±0.04 ab	98.9±6.87 a
	0.5	0.31±0.01 a	31.1±3.16 a	27.2±1.26 a	0.28±0.01 b	90.9±7.38 a
	1.0	0.28±0.02 a	35.2±1.59 a	27.6±5.74 a	0.25±0.03 b	90.1±1.94 a
	2.0	0.28±0.03 a	34.3±8.72 a	31.7±6.88 a	0.23±0.06 b	87.5±25.9 a
	4.0	0.27±0.007 a	35.8±4.48 a	33.2±5.52 a	0.17±0.04 b	63.7±15.3 a
	8.0	0.27±0.036 a	42.3±13.2 a	36.9±6.46 a	0.14±0.04 b	55.6±18.3 a
<i>H. zea</i>	Testigo	0.43±0.05 a	--	--	0.53±0.076 a	94.3±10.9 a
	0.25	0.42±0.02 a	40.1±4.90 a	37.3± 5.08 b	0.31±0.023 b	88.1±11.6 a
	0.5	0.38±0.08 a	40.3±2.09 a	47.5±5.27 ab	0.25±0.018 b	80.4±20.5 ab
	1.0	0.37±0.06 a	40.5±9.56 a	47.8±7.50 ab	0.22±0.014 bc	79.2±17.1 ab
	2.0	0.37±0.03 a	40.8±4.10 a	52.3±3.75 ab	0.21±0.028 bc	58.3±17.4 ab
	4.0	0.33±0.07 a	52.2±6.15 a	59.1±5.34 a	0.19±0.044 bc	52.1±9.29 ab
	8.0	0.32±0.09 a	54.4±7.15 a	61.9±2.24 a	0.11±0.026 c	35.2±10.7 b

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

EE= Error estándar de la media.

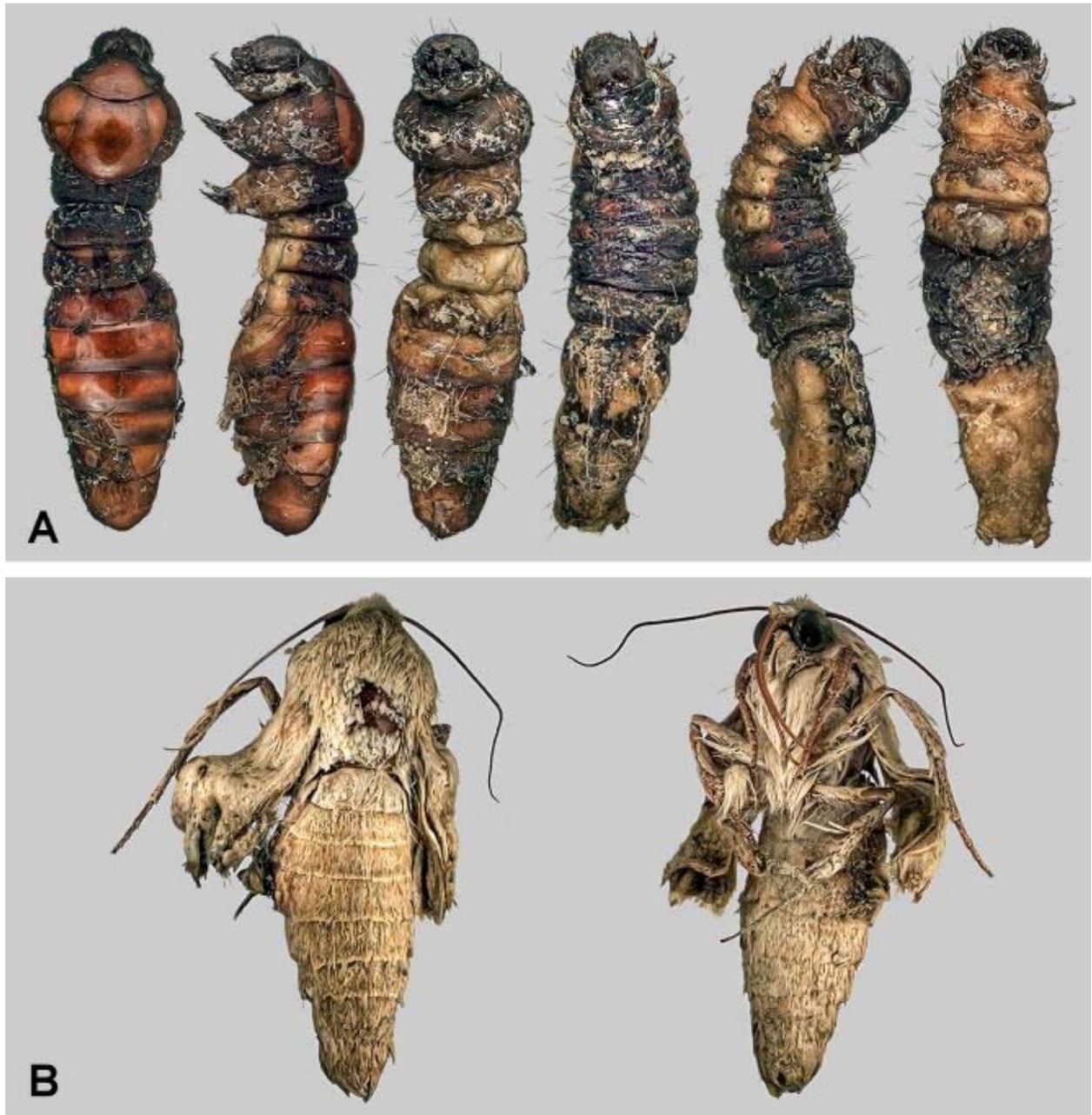


Figura 1.- A. Endurecimiento y ennegrecimiento del integumento de la larva B. Falta de despliegue de apéndice ambulatorios y desarrollo parcial de alas.

CAPITULO 4

ACCIÓN CONJUNTA DE UN EXTRACTO EN CLORURO DE METILENO DE *Peumus boldus* Molina Y SUS PRINCIPALES COMPONENTES, CON *Bacillus thuringiensis* Berliner SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)

Gonzalo Silva¹, J. Concepción Rodríguez², Angel Lagunes², Celina Llanderal², Raquel Alatorre², A. M. Shelton³ y Carlos A. Blanco⁴.

RESUMEN

Se evaluó en laboratorio la actividad insecticida de un extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus* y dos de sus principales componentes (boldina y eucaliptol) solos y en mezcla con *Bacillus thuringiensis*, para el control de *Spodoptera frugiperda*. Las mezclas se realizaron en proporciones de 1:1, 1:10 y 1:20. Las variables evaluadas fueron mortalidad, peso de las larvas y porcentaje de éstas que alcanzaron el tercer instar, junto con un índice de combinación (IC). En las evaluaciones individuales, *B. thuringiensis* tuvo una mortalidad máxima de 77% mientras que el extracto, boldina y eucaliptol mostraron 97.9, 60.4 y 50%, respectivamente. Al aumentar la concentración de tóxico, disminuyó el peso de las larvas y el número de éstas que alcanzó el tercer instar. Solo en la combinación *B. thuringiensis*-boldina la interacción fue significativa, indicando que en esta mezcla es relevante tanto la proporción como la concentración. En *B. thuringiensis*-extracto y *B. thuringiensis*-eucaliptol la interacción no fue significativa, siendo en ambos casos de mayor importancia la concentración que la proporción. La pérdida de peso y el porcentaje de larvas que llegó a tercer instar en los bioensayos con mezclas mostró la misma tendencia que en la evaluación de los compuestos solos. Solamente las combinaciones de *B. thuringiensis*-extracto y *B. thuringiensis*-boldina en la proporción 1:1 tienen efecto sinérgico.

Palabras clave: gusano cogollero, insecticidas vegetales, Cry1Aa, Cry1Ac

¹Departamento de Producción Vegetal. Facultad de Agronomía. Universidad de Concepción. Vicente Méndez 595. Chillán. Chile. E-mail:gosilva@udec.cl. Autor para correspondencia.

²Programa de Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carretera México-Texcoco. 56230. Montecillo. Estado de México. México.

³Department of Entomology, Cornell University, New York State Agricultural Experiment Station, Geneva, NY 14456, USA

⁴USDA. Animal and Plant Health Inspection Service, Biotechnology Regulatory Services. 4700 River Road, Unit 89, Riverdale, MD 20737, USA.

ABSTRACT

Under laboratory conditions, the insecticidal activity of a methylene chloride extract of *Peumus boldus* and two of its main components (Boldine and Eucalyptol) alone and mixed with *Bacillus thuringiensis* was evaluated against *Spodoptera frugiperda*. The mixtures were prepared in ratios of 1:1, 1:10 and 1:20. The variables evaluated were mortality, larval weight and percentage of larvae that reached the third instar; additionally a combination index (CI) was determined. In the evaluations of single compounds, the highest mortality achieved with *B. thuringiensis*'s was 77%, while in the extract, boldine and eucalyptol these values were 97.9, 60.4 and 50% respectively. As the toxic concentration increased, the larval weight and the number of them that reached the third instar decreased. Only the *B. thuringiensis*-boldine interaction was significant, indicating that both the proportion and the concentration are important. In *B. thuringiensis*-extract and *B. thuringiensis*-eucalyptol mixtures, the interaction was not significant; in both cases the concentration was more relevant than the ratio. Larval weight loss and the percentage of larvae that reached the third instar in bioassays with mixtures showed the same trend as in the evaluation of the singly compounds. In the *B. thuringiensis*- extract and *B. thuringiensis*-boldine mixtures, only the ratio 1:1 have synergistic effect.

INTRODUCCION

Las larvas de lepidópteros, por su hábito de alimentación, provocan importantes daños a las plantas cultivadas. Usualmente su control se realiza con insecticidas sintéticos como piretroides u organofosforados. Sin embargo, los problemas derivados de su uso como son la contaminación del ambiente, intoxicaciones y desarrollo de resistencia, han hecho que se consideren otros métodos de control como el empleo de insecticidas de origen natural (Isman, 2006).

Los insecticidas microbiales y vegetales son los dos grupos de productos naturales más utilizados en el control de plagas agrícolas. En el primer grupo destaca *Bacillus thuringiensis* Berliner, una bacteria que forma cristales de δ -endotoxinas (Gill *et al.* 1992), las cuales provocan poros en las células epiteliales del intestino medio de los insectos susceptibles y alteran el balance osmótico de las células causando lisis y destrucción del intestino (Yu, 2008). Existe una gran variedad de formulaciones comerciales de esta bacteria recomendadas principalmente para el control de lepidópteros y dípteros plaga. Además, los avances en la ingeniería genética han permitido la inserción del gen de *B. thuringiensis* en importantes cultivos agrícolas como algodónero

(*Gossypium hirsutum* L.) y maíz (*Zea mays* L.), siendo estos capaces de expresar una alta concentración de δ -endotoxina, como la Cry1Ac (Perlak *et al.* 1993) y autoprotgerse de los daños de larvas de lepidópteros como *Heliothis virescens* (Fabricius), *Pectinophora gossypiella* (Saunders) y *Helicoverpa zea* (Boddie) (Kozziel *et al.*, 1993, Perlak *et al.*, 1993, Benedict *et al.*, 1994, Feldman y Stone 1997). Sin embargo, ya se han detectado casos de resistencia, lo cual ha disminuido el potencial de esta bacteria como agente controlador (Tabashnik, 1994 y 2008).

Por otra parte, los insecticidas de origen vegetal son una de las primeras opciones de control de plagas utilizadas por el ser humano (Isman, 2006). Los primeros insecticidas vegetales fueron tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Solanaceae), Riania (*Ryania speciosa* Valh) (Flacuortiaceae), Sabadilla (*Schoenocaulon officinale* (Schlecht.) A. Gray) (Liliaceae), Rotenona (*Derris* spp) (Fabaceae) y Piretro (*Tanacetum cinerariaefolium* (Trev.) Bocc. (Asteraceae) (Roel *et al.*, 2000). En la actualidad la investigación se encuentra completamente vigente, pero focalizada en otras especies como *Azadirachta indica* A. Juss, *Melia azedarach* L. (Meliaceae) (De Brito *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2007), *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) (Mancebo *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2007) y *Annona cherimolia* Miller (Álvarez-Coloma *et al.*, 2007) entre otras.

El Boldo (*Peumus boldus* Molina: Monimaceae) es un árbol nativo de Chile tradicionalmente conocido por sus propiedades medicinales (Vogel *et al.* 2005), aunque estudios recientes han demostrado que polvos y extractos obtenidos de follaje y madera de esta planta tienen propiedades insecticidas contra *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Silva *et al.* 2003 y 2005) y *Spodoptera littoralis* Bois. (Zapata *et al.*, 2006).

Una estrategia tanto de manejo de plagas como de la resistencia a insecticidas, es la mezcla de compuestos de diversa naturaleza química como pueden ser los microbiales con los vegetales. Un ejemplo exitoso de esta estrategia fue documentado por Trisyono y Whalon (1999) quienes mezclaron *B. thuringiensis* con *A. indica*, obteniendo un efecto sinérgico que requirió de una menor dosis de la bacteria. Sin embargo, existen antecedentes de que algunos compuestos vegetales como los taninos pueden afectar la acción biocida de *B. thuringiensis* (Lüthy *et al.*, 1985; Bauce *et al.*, 2006), por lo que cada caso debe ser evaluado por separado. Por tanto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar en laboratorio la actividad biológica de un extracto en cloruro de metileno de hojas de boldo y sus dos principales componentes solos y en mezcla con *B. thuringiensis* contra larvas de *S. frugiperda*.

MATERIALES Y METODOS

La investigación se realizó en el laboratorio de Toxicología de Insecticidas del Programa de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México, México.

Insectos

Las larvas de *S. frugiperda* y *H. zea* provinieron de la colonia permanente del Laboratorio de Toxicología de Insecticidas, las que se mantienen en cámara bioclimática bajo condiciones controladas de 27 ± 1 °C, $70 \pm 5\%$ de humedad relativa y fotoperiodo de 14: 10 horas luz: oscuridad.

Obtención del extracto

En un sistema de extracción Soxhlet se colocaron 400 g de polvo utilizando cloruro de metileno como solvente (Kamaraj *et al.* 2008a). La extracción se realizó durante 120 h y posteriormente el extracto se concentró en un rotovapor a 40 °C hasta sequedad (Kamaraj *et al.* 2008b). El extracto concentrado se utilizó como solución madre y hasta su utilización se depositó en un frasco de color ámbar y se almacenó a 4°C.

Compuestos solos

Los compuestos que se evaluaron solos fueron el alcaloide Boldina, el cual según Vogel *et al.* (2005) se encuentra en hojas secas de boldo en concentraciones máximas de 0.34%, y Eucaliptol (1,8-cineol) el cual según el análisis cromatográfico realizado con anterioridad al experimento se encuentra presente en una concentración de 5.81%. Estos compuestos se obtuvieron de Sigma-Aldrich Química S.A. de C.V. (Toluca, Estado de México, México) ambos con 99% de pureza. Como fuente de *Bacillus thuringiensis* Berliner se utilizó el insecticida comercial Crymax (Syngenta Agro S.A. de C.V., México DF, México) que contiene delta-endotoxinas Cry 1Aa y Cry 1Ac (Baun *et al.* 1999) de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* EG 7841 (Kaur, 2000) y que se recomienda en dosis de 0.75 kg ha⁻¹. Los extractos de *P. boldus*, Boldina y Eucaliptol, se evaluaron en concentraciones de 0.25, 0.5, 1, 2, 4 y 8% mientras que *B. thuringiensis* se evaluó en dosificaciones de 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 y 1.5 kg ha⁻¹.

Mezclas

La evaluación de la acción conjunta se realizó con la metodología de Ahmad *et al.* (2009), la cual consiste en evaluar mezclas en proporciones de 1:1, 1:10 y 1:20, para luego con la concentración letal 50% (CL₅₀) de los compuestos solos y de las mezclas calcular un índice de combinación (CI) el cual si CI= 1 existe efecto aditivo, si CI<1 hay efecto sinergista y si CI>1 hay un efecto antagonista entre los componentes de la mezcla. Todas las mezclas se evaluaron en concentraciones de 0.25, 0.5, 1, 2, 4 y 8%. Para estimar la concentración letal 50% (CL₅₀), los datos se sometieron a un análisis Probit (Finney, 1971) con el procedimiento PROC PROBIT del programa Statistical Analysis System (SAS) (SAS Institute, 1998).

Bioensayo

Se utilizó la metodología descrita por Sims *et al.* (1996), que consistió en colocar 1 mL de dieta artificial (Tobacco Bollworm, Southland Products, Inc., USA) en cada cavidad de una charola para bioensayos alimentarios (Bio-assay Tray, Bio-Ba-128, C-D. International, Inc., USA). Una vez que la dieta solidificó, se agregaron en cada cavidad 200 µL del tratamiento en la concentración a evaluar. Luego, se colocó una larva neonata (4 - 6 h de edad) y se cubrió con un plástico autoadherente que permite el intercambio gaseoso (Pull'n Peel Tab Bio-CV-16, C-D International, Inc., USA). Posteriormente, las charolas se transfirieron a una cámara bioclimática a las condiciones antes mencionadas. Se realizaron cinco repeticiones de 32 larvas, incluyendo un testigo sin tratar que consistió en agua destilada. Cinco días después de la infestación con las larvas se evaluó la mortalidad y en los casos en que ésta fue inferior a 10% en el testigo, se corrigió con la fórmula de Abbott's (Abbott 1925), considerándose como muerta aquella larva que no mostraba movimientos coordinados al tocarla con un pincel.

Los tratamientos se prepararon utilizando agua destilada y 0.5 mL de Tween-20 como agente compatibilizador de la solución.

Diseño experimental y análisis estadístico

Para evaluar el efecto del extracto de boldo, eucaliptol y boldina solos sobre *S. frugiperda* y *H. zea*, se utilizó un diseño experimental en bloques completos al azar. En el caso de las combinaciones se utilizó el mismo diseño experimental, pero con un arreglo factorial. Para uniformizar las varianzas, los datos se transformaron a $\sqrt{x + 0.5}$ y se sometieron a un análisis de

varianza ANDEVA, ($\alpha = 0.05$) y a una prueba de comparación de medias Tukey con un nivel de significancia del 95% ($p \leq 0.05$) con el programa Statistical Analysis System (SAS) (SAS Institute, 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Compuestos solos

Toxicidad

La toxicidad *B. thuringiensis* en su dosis máxima (1.5 kg ha^{-1}) no superó el 80% de mortalidad de larvas de *S. frugiperda* (Cuadro 1) con una CL_{50} y CL_{90} de 0.35 y 1.18 kg ha^{-1} , respectivamente. Estos resultados contrastan con los datos proporcionados en la etiqueta donde el fabricante recomienda una dosis máxima de 0.75 kg ha^{-1} . El extracto en cloruro de metilo de *P. boldus* mostró mejores resultados al obtener un 97.9% de mortalidad con la concentración de 8% y con valores de 0.029 y 3.94 mL L^{-1} para la CL_{50} y CL_{90} , respectivamente (Cuadro 2). Sin embargo, cuando se evaluaron sus dos componentes, el alcaloide boldina no superó el 60% de mortalidad mientras que el monoterpeno eucaliptol apenas alcanzó el 50%. En el análisis de las concentraciones letales, boldina mostró una CL_{90} de 195.37 mL L^{-1} , la cual es demasiado alta ya que si se considera que la concentración de este compuesto en la planta no supera el 0.4% (Vogel *et al.* 2005), su uso para el control de este insecto no es viable. En el caso de eucaliptol, la CL_{50} y CL_{90} fueron de 4.32 y 227.4 mL L^{-1} , lo cual tampoco lo transforma en una opción efectiva para el control de *S. frugiperda*, aunque no se debe descartar su potencial para el control de plagas de granos almacenados donde por su acción fumigante se requiere de menores concentraciones (Regnault-Roger, 1997; Lee *et al.*, 2003) y donde el boldo ya ha mostrado tener potencial de control (Silva *et al.*, 2003 y 2005).

Peso larvas y efecto en el ciclo

B. thuringiensis

El peso de las larvas sobrevivientes en los tratamientos fue mayor en la medida que la concentración de *B. thuringiensis* disminuyó (Cuadro 3). El mayor peso se registró en el testigo con 0.015 g sin diferencias significativas con el tratamiento de 0.125 kg ha^{-1} de *B. thuringiensis*. Las larvas tratadas con las concentraciones de 0.25 a 1.5 kg ha^{-1} tuvieron un peso significativamente menor ($F=8.08$ $df=8,20$; $P=0.0008$) al observado en las larvas del testigo, el

único tratamiento en el que las larvas alcanzaron el tercer instar. Por tanto, las dosis bajas evaluadas también afectan a las larvas pero requieren de mayor tiempo para que se manifiesten los efectos.

Extracto, boldina y eucaliptol

En los casos del extracto, boldina y eucaliptol se observa la misma tendencia, ya que siempre el mayor peso de larva se observó en el testigo (Cuadro 4). En el extracto no hay diferencias significativas en el peso de las larvas del testigo con las de las diferentes concentraciones evaluadas. En las larvas sobrevivientes se observó que un 31% del testigo alcanzó el tercer instar sin mostrar diferencias significativas con los tratamientos de 0.25 y 0.5% con 18.7 y 16.6%, respectivamente. En 4% ninguna larva alcanzó este instar siendo estadísticamente diferente ($F=5.66$ $df=8,20$; $P=0.029$) al testigo y a las concentraciones de 0.25 a 1% de extracto.

En boldina el testigo no mostró diferencias significativas con las concentraciones de 0.25 a 1%, fluctuando el peso entre 0.043 a 0.02 g. Las larvas de las concentraciones de 4 y 8% tuvieron, en ambos casos, un peso de 0.01 g, que fue significativamente menor ($F=2.87$ $df=8,20$; $P=0.048$) a los restantes tratamientos. Las larvas sobrevivientes que alcanzaron el tercer instar se observaron en mayor porcentaje en el testigo y 0.25 a 2% fluctuando entre 22.9 a 43.7%. El menor porcentaje de larvas que llegaron al tercer instar se observó en la concentración de 8% con 6.2%, siendo significativamente menor ($F=3.00$ $df=8,20$; $P=0.020$) al resto de los tratamientos evaluados.

El eucaliptol no mostró diferencias significativas con el testigo en el peso de larvas en ninguna de sus concentraciones. Sin embargo, en lo que respecta al porcentaje de larvas que alcanzaron el tercer instar 4 y 8% presentaron valores significativamente más bajos que el testigo y las concentraciones de 0.25 a 1%, ($F=2.60$ $df=8,20$; $P=0.035$) que fueron cercanas a 50% (Cuadro 4).

Mezclas

Solamente en la combinación de *B. thuringiensis*-boldina la interacción es significativa (Cuadro 5). Es decir, en esta mezcla es tan relevante la proporción en que se encuentran ambos elementos, como la concentración en que se utiliza ésta para el control de *S. frugiperda*. En los casos de *B. thuringiensis*-extracto y *B. thuringiensis*-eucaliptol la interacción no fue significativa, siendo en ambos casos de mayor significancia la concentración pero no la proporción.

B. thuringiensis* – Extracto de *P. boldus

Toxicidad

En las tres proporciones en que se evaluó la mezcla de *B. thuringiensis* con el extracto de *P. boldus* se alcanzaron mortalidades superiores al 90% (Cuadro 6). En la proporción 1:1 la mortalidad máxima fue de 93.7% con 8% de extracto que difiere significativamente ($F=5.91$ $df=7,17$; $P=0.0063$) de todas las demás concentraciones. Esta misma diferencia se obtuvo en las proporciones de 1:10 ($F=25.40$ $df=7,17$; $P=0.0001$) y 1:20 ($F=34.86$ $df=7,17$; $P=0.0001$) con 97.9 y 100%, respectivamente.

Peso larvas y efecto en el ciclo

Las larvas fueron de menor peso cuando la concentración de la mezcla, independientemente de la proporción, fue mayor (Cuadro 6). En las proporciones de 1:1 ($F=16.6$; $df=8,20$; $P=0.0001$) y 1:10 ($F=32.76$; $df=8,20$; $P=0.0001$) el menor peso se observó en las larvas del testigo y la concentración de 0.25 % con diferencia significativa de los restantes tratamientos. En 1:20 el testigo tuvo el mayor peso siendo diferente estadísticamente ($F=44.43$; $df=8,20$; $P=0.0001$) de todos los tratamientos con extracto de *P. boldus*. El porcentaje de larvas que alcanzó el tercer instar también fue menor cuando más alta fue la concentración del extracto. En 1:1, el testigo y 0.25% tuvieron un porcentaje de larvas de tercer instar de 85.4 y 70.8%, respectivamente siendo ambos estadísticamente superiores ($F=32.93$; $df=8,20$; $P=0.0001$) que los restantes tratamientos. En las proporciones de 1:10 ($F=32.93$; $df=8,20$; $P=0.0001$) y 1:20 ($F=32.93$; $df=8,20$; $P=0.0001$) el testigo fue significativamente mayor a todos los tratamientos con 91.9 y 93.7 % de larvas de tercer instar.

***B. thuringiensis* – Boldina**

Toxicidad

El análisis factorial de la mortalidad producida por la mezcla de *B. thuringiensis* – Boldina indica que no existen diferencias significativas en la proporción de los componentes pero sí en la concentración en que se utilice (Cuadro 7). En la proporción 1:1 la mayor mortalidad se obtuvo con el tratamiento de 8% con 95.8% pero sin diferencias significativas con 2 y 4%. Con la proporción de 1:10, las concentraciones de 4 y 8% no difieren entre sí con una mortalidad superior al 95%, pero son significativamente mayores ($F=34.02$; $df=7,17$; $P=0.0001$) que los

restantes tratamientos que fluctúan entre 6.25 y 81.3%. En la proporción de 1:20 el tratamiento con 8% tuvo la mortalidad más alta con 89.5%, siendo significativamente mayor ($F=10.57$; $df=7,17$; $P=0.0004$) a todas las demás concentraciones.

Peso de larvas y efecto en el ciclo

Independiente de la proporción en que se realizó la mezcla de *B. thuringiensis* con boldina se observa una tendencia inversa entre la concentración y el peso y número de larvas que alcanzó el tercer instar (Cuadro 8). En el peso de las larvas, el testigo siempre fue significativamente mayor con 0.12, 0.18 y 0.15g para 1:1 ($F=18.55$; $df=7,17$; $P=0.0001$), 1:10 ($F=35.47$; $df=7,17$; $P=0.0001$) y 1:20 ($F=43.41$; $df=7,17$; $P=0.0001$), respectivamente. En todas las proporciones, el porcentaje de larvas que alcanzó el tercer instar fue mayor en el testigo con 62.5, 72.9 y 75%, respectivamente. En 1:1 los tratamientos a la concentración de 1 a 4% tuvieron 0% de larvas de tercer instar difiriendo significativamente con el testigo ($F=8.14$; $df=7,17$; $P=0.0001$) pero no con 0.25 y 0.5%. La misma diferencia estadística se observó en 1:10 ($F=13.44$; $df=7,17$; $P=0.004$) y 1:20 ($F=107.8$; $df=7,17$; $P=0.0001$).

***B. thuringiensis* – Eucaliptol**

Toxicidad

La mortalidad provocada por la mezcla de *B. thuringiensis* – eucaliptol en sus tres proporciones no superó el 50% (Cuadro 9) siendo la más baja de todas las combinaciones evaluadas. Esto confirma que la mezcla de eucaliptol con *B. thuringiensis* no es efectiva en el control de larvas de *S. frugiperda* y si se considera que la interacción dosis-proporción no es significativa, se puede inferir que no existe un efecto de potenciación o aditivo entre los componentes de la mezcla.

Peso larvas y efecto en el ciclo

Las larvas del testigo tuvieron el mayor peso en la proporción 1:1 siendo significativamente superior a las concentraciones de 1 a 8% ($F=8.07$; $df=8,20$; $P=0.0009$). En las proporciones de 1:10 ($F=14.66$; $df=8,20$; $P=0.0001$) y 1:20 ($F=16.47$; $df=8,20$; $P=0.0001$) el testigo con 0.18 y 0.15g, respectivamente fue estadísticamente mayor a todos los restantes tratamientos. En el porcentaje de larvas que alcanzó el tercer instar en 1:1 ($F=9.25$; $df=8,20$; $P=0.0003$) y 1:10

($F=15.90$; $df=8,20$; $P=0.0001$) el testigo alcanzó un 75 y 81.2 % de larvas de tercer instar mostrando diferencias estadísticas con los tratamientos de 2 a 8% que no superaron el 50%. En el caso de 1:20 la diferencia fue aún mayor debido a que el testigo con 81.2% de larvas de tercer instar fue significativamente mayor ($F=24.41$; $df=8,20$; $P=0.0001$) a todas las concentraciones de la mezcla.

Acción conjunta

Los resultados muestran que solamente las combinaciones de *B. thuringiensis*-extracto y *B. thuringiensis*-boldina en la proporción 1:1 tuvieron un índice de combinación (IC) menor a 1 lo cual según Ahmad *et al.* (2009) significa que tienen efecto sinergista (Cuadro 10). Resultados similares han sido documentados en otros insectos y especies vegetales como es el caso de Neem (*Azadirachta indica* J.; Meliaceae) (Trisyono y Whalon, 1999) y limoides derivados de cítricos (Murray *et al.* 1993) que muestran efecto sinergista con *B. thuringiensis* en el control de *Leptinotarsa decemlineata* L. (Coleoptera: Chrysomelidae). Las restantes combinaciones tienen un IC superior a 1, lo cual indica que tienen efecto antagonista para el control de *S. frugiperda*. Es decir, la mezcla de *B. thuringiensis* en cualquier proporción con eucaliptol y en las proporciones de 1:10 y 1:20 con el extracto de *P. boldus* o boldina disminuye su toxicidad. Esta disminución en la efectividad de *B. thuringiensis* cuando se mezcla con compuestos vegetales ya ha sido documentada por otros autores como Lüthy *et al.* (1985 a y b) quienes indican que los cristales de *B. thuringiensis* pierden parcialmente su actividad cuando se les mezcla con una solución que contenga taninos y de ahí que las larvas que se alimentan de plantas con alto contenido de estos compuestos son menos susceptibles a la δ -endotoxina. Lord y Undeen (1990) y Appel y Schultz (1994) señalan que la mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) y *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Limantriidae) provocada por *B. thuringiensis* está inversamente correlacionada con la concentración de compuestos fenólicos y ácido tánico. Otro antecedente lo aportan Bauce *et al.* (2006) quienes indican que una alta concentración de taninos antagoniza con *B. thuringiensis* disminuyendo la mortalidad de *Choristoneura fumiferana* (Clemens) (Lepidoptera: Tortricidae) de 83 a 43%. Por último, Gibson *et al.* (1995) señalan que el ácido tánico provoca que el efecto letal de *B. thuringiensis* sobre *Heliothis virescens* se produzca de manera más lenta.

CONCLUSIONES

Los resultados permiten concluir que el tratamiento con mayor efecto insecticida sobre *Spodoptera frugiperda* es el extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus* con que se comprueba la hipótesis de que los extractos presentan mayor actividad que sus componentes aislados. Además, cuando se mezcla el extracto y dos de sus principales componentes con *Bacillus thuringiensis* no se observa un efecto de potenciación relevante. Esto permite considerar al extracto por si solo como una opción viable para la protección de cultivos aunque los resultados deben ser verificados en pruebas de mayor envergadura para asegurar su eficacia tanto en condiciones controladas como de campo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo técnico al Sr. Lauro Hernández Pérez del Laboratorio de Toxicología de Insecticidas, al Dr. Juan Cibrián Tovar y al M.C. Julio Cesar Velázquez del Laboratorio de Ecología Química y al M.C. Jorge Valdez Carrasco del Laboratorio de Morfología de insectos del Colegio de Postgraduados.

LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- Ahmad, M., M.A. Saleem and A.H. Sayyed. 2009. Efficacy of insecticide mixtures against pyrethroid- and organophosphate-resistant populations of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). Pest Manag Sci 65: 266-274.
- Alvarez-Coloma, A., A. Neske, S. Popich and A. Bardon. 2007. Toxic effects of annonaceous acetogenics from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Pest. Sci. 80: 63-67.
- Appel, H. and J.C. Schultz. 1994. Oak tannins effectiveness of thricide (*Bacillus thuringiensis*) in the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). J. Econ. Entomol. 87: 1736-1742.
- Bauce, E., M. Kumbasli, K. Van Frankenhuyzen and N. Carisey. 2006. Interactions among white spruce tannins, *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, and spruce budworm (Lepidoptera: tortricidae), on larval survival, growth, and development. J. Econ. Entomol. 99: 2038-2047.

- Baun, J.A., T.B. Johnson, and B.C. Carlton. 1999. *Bacillus thuringiensis*. Natural and recombinant bioinsecticides products. pp. 189-209. *In*: F.R. Hall and J.J. Menn (eds). Methods in Biotechnology, Vol 5: Biopesticides: Use and Delivery. Humana Press Inc. Totowa, NJ. USA.
- Benedict, J. H., E. S. Sachs, J. L. Halcomb, D. R. Ring, B. Cook, D. M. Stelly, D. W. Altman, R. J. Kohel, J. C. Correa, M. W. Goynes, J. F. Taylor, and S. K. Davis. 1994. Feeding preference and movement of tobacco budworm and bollworm in mixed stands of transgenic *Bt* and non-*Bt* cotton. Annual Plant Resistance to Insects Newsletter 20: 31-32.
- De Brito, C.H., J.A. Mezzomo, J.L. Batista., M. Barbosa e A. Murata. 2004. Bioatividade de extratos vegetais aquosos sobre *Spodoptera frugiperda* em condições de laboratorio. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica) 71: 41-45.
- Feldman, J. and T. Stone 1997. The development of a comprehensive resistance management plan for potatoes expressing the cry3A endotoxin, pp 49-61. *In*: N. Carozzi and M. Koziel [eds.]. Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants. Taylor and Francis, London.
- Finney, D. 1971. Probit Analysis. Cambridge University Press. Cambridge. UK. 333p.
- Gibson, D., L. Greenspan, S.B. Krasnoff and R.E.B. Ketchum. 1995. Increased efficacy of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in combination with tannic acid. J. Econ. Entomol. 88: 270-277.
- Gill, S., E. Cowles and P. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annu. Rev. Entomol. 37: 615-636.
- Isman, M.B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and increasingly regulated world. Annu. Rev. Entomol. 51: 45-66.
- Kamaraj, C., A.A. Rahuman, and A. Vagaban. 2008a Antifeedant and larvicidal effects of plant extracts against *Spodoptera litura* (F.), *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* Say. Parasitol Res. 103: 325-331.
- Kamaraj, C., A.A. Rahuman and A. Vagaban. 2008b. Screening for antifeedant and larvicidal activity of plant extracts against *Helicoverpa armigera* (Hübner), *Sylepta derogata* (F.) and *Anopheles stephensi* (Liston). Parasitol Res. 103: 1361-1368.

- Kaur, S. 2000. Molecular approaches towards developments of novel *Bacillus thuringiensis* biopesticides. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16:781-793.
- Koziel, M. K., F. L. Belang, C. Bowman, N. B. Carozzi, R. Crenshaw, L. Crossland, J. Dawson, N. Desai, M. Hill, S. Kadwell, K. Launis, K. Lewis, D. Addox, K. Mcpherson, M. R. Mefhji, E. Merlin, R. Rhodes, G. W. Warren, M. Wright, and S. Evola. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology* 11: 194-200.
- Lee, B.H., P. Annis, F. Tumaalii and S. Lee. 2003. The potential of 1,8-cineole as a fumigant for stored wheat. pp: 230-234 *In: Proceedings of the Australian Postharvest Technical Conference, Canberra. 25-27 June 2003. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO), Canberra, Australia.*
- Lord, J.C. and A. H. Undeen. 1990. Inhibition of the *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxin by dissolved tannins. *Environ. Entomol.* 19: 1547-1551.
- Lüthy, P., C. Hofmann, F. Jaquet and R. Hütter. 1985a. Inactivation of delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* by plants extracts. *Experientia* 41:540.
- Lüthy, P., C. Hofmann and F. Jaquet. 1985b. Inactivation of delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* by tannin. *FEMS Microbiology Letters* 28: 31-33.
- Mancebo, F.,L. Hilje, A.G. Mora and R. Salazar. 2000. Antifeedant activity of *Quassia amara* (Simaroubaceae) extracts on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Crop Protection* 19(5): 301-305.
- Murray, K.D., A.R. Alford, E. Groden, F.A. Drummond, R. H. Storch, M.D. Bentley and P.M. Sugathapala. 1993. Interactive effects of an antifeedant used with *Bacillus thuringiensis* var. San Diego delta endotoxin on Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 86: 1793-1801.
- Perlak, F., T. B. Stone, Y. M. Muskopf, L. J. Petersen, G. B. Parker, S. A. Mcpherson, J. Wyman, S. Love, D. Biever, G. Reed and D. Fischhoff. 1993. Genetically improved potatoes; protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Molecular. Biol.* 22: 313-321.
- Regnault-Roger, C. 1997. The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integrated Pest Management Reviews* 2: 25-34.

- Roel, A., J. D. Vendramim, R. Shiraishi y N. Frighetto. 2000. Efeito do extrato acetate de etila de *Trichilia pallid* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivencia da lagarta-do-cartucho. *Bragantia* 59(1): 53-58.
- SAS Institute. 1998. Language guide for personal computer release. 6.03 Edition. SAS Institute. Cary. N. C. USA. 1028 p.
- Silva G., A. Lagunes y J. C. Rodríguez 2003. Control de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) con polvos vegetales solos y en mezcla con carbonato de calcio. *Ciencia e Investigación Agraria* 30: 153-160.
- Silva, G., O. Orrego, R. Hepp y M. Tapia. 2005. Búsqueda de plantas con propiedades insecticidas para el control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky en maíz almacenado. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 40: 11-17.
- Sims, S. B., J. T. Greenplate, T.B. Stone, M. A. Caprio and F. L. Gould. 1996. Monitoring strategies for early detection of Lepidoptera resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins, pp. 229-242. *In*: T. M. Brown [ed.], *Molecular Genetics and Evolution of Pesticide Resistance*. ACS Symposium Series No. 645. American Chemical Society, Washington, DC.
- Souza, M., A. Roel, E. J. Arruda e A., S. Marques. 2007. Eficiência de productos vegetais no controle da lagarta-do.cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciênc. Agrotec.* 31: 326-331.
- Tabashnik, B. E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Entomol.* 39: 47-79.
- Tabashnik, B., A.J., Gassman, D.W. Crowder and Y. Carrière. 2008. Insect resistance to *Bt* crops: evidence versus theory. *Nature Biotechnology* 26(2): 199-202.
- Trisyono, A. and M.E. Whalon. 1999. Toxicity of neem applied alone and in combination with *Bacillus thuringiensis* to Colorado potato beetle (Coleoptera:Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 92(6): 1281-1288.
- Vogel, H., I. Razmilic., J. San Martín, U. Doll, y B. González. 2005. *Plantas Medicinales Chilenas. Experiencias de Domesticación y Cultivo de Boldo, Matico, Bailahuén, Canelo, Peumo y Maqui*. Editorial Universidad de Talca. Talca. Chile. 192 p.

Zapata, N., F. Budia, G. Silva, E. Viñuela y P. Medina. 2006. Actividad antialimentaria de *Maytenus boaria* Mol., *Peumus boldus* Mol. y *Quillaja saponaria* Mol. sobre *Spodoptera littoralis* Boisd. Bol. San. Veg. Plagas. 32: 125-135.

Cuadro 1.- Mortalidad y concentración letal 50% (CL₅₀) y 90% (CL₉₀), en larvas de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith tratadas con *B. thuringiensis* (Crymax¹).

Tratamiento (kg H ⁻¹)	Mortalidad ² (%) ± EE
Testigo	0.0±0.0 e
0.12 5	29.1±11.02d
0.25	47.9±4.16 c
0.5	56.2±3.6 bc
0.75	68.7±3.6 ab
1.0	75.0±3.6 ab
1.5	77.1±2.1 a
n [†]	240
b± ES [¶]	0.81 ±0.15
CL [§] ₅₀ (95% LC) ^{&}	0.35 (0.48-0.63)
CL [§] ₉₀ (95% LC) ^{&}	1.18 (1.68-3.1)
Pr>χ ^{2Φ}	0.0001

EE = error estándar de la media

¹ Crymax, insecticida formulado con delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* EG 7841 (Syngenta Agro S.A. de C.V., México DF, México).

²Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra minúscula no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, p≤0.05).

[†]= número total de insectos tratados

[¶]=Pendiente (b) ajuste Probit y Error estándar de la pendiente (ES)

[§]= Concentración letal= kg H⁻¹

[&]= Límites de confianza al 95%

^Φ=Probabilidad de que la línea log Dosis-Probit ajuste a una línea recta.

Cuadro 2.- Mortalidad y concentración letal 50% (CL₅₀) y 90% (CL₉₀), en larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) tratadas con un extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus*, boldina y eucaliptol.

Tratamiento	Mortalidad (%) ± EE		
	Extracto completo	Boldina	Eucaliptol
Testigo	0.0±0.0 d	0.0±0.0 b	0.0±0.0 d
0.2 5	41.6±7.5 c	43.7±3.6 a	22.9±4.1 c
0.5	43.7±9.5 c	45.8±2.1 a	27.1±8.3 bc
1	47.9±5.5 bc	45.8±8.3 a	29.1±5.5 bc
2	50.0±7.2 bc	47.9±2.1 a	31.2±9.5 bc
4	68.7±3.6 b	58.3±11.2 a	41.6±9.1 ab
8	97.9±2.1 a	60.4±6.4 a	50.0±5.0 a
n [†]	240	240	240
b± ES [¶]	0.97 ±0.29	0.29±0.14	1.63±0.29
CL ₅₀ [§]	0.029	0.0005	4.32
(95% LC) ^{&}	(0.74-2.07)	(1.14-12.87)	(11.4-367)
CL ₉₀ [§]	3.94	195.37	227.4
(95% LC) ^{&}	(15.2-386322)	(25850-6.4 x 10 ¹⁵)	(5475-3624,682,232)
Pr>χ ^{2Φ}	0.0001	0.0001	0.0001

EE = error estándar de la media

¹Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra minúscula no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, p≤0.05).

[†]= número total de insectos tratados

[¶]=Pendiente (b) ajuste Probit y Error estándar de la pendiente (ES)

[§]= Concentración letal= mL L⁻¹

[&]= Límites de confianza al 95%

^Φ=Probabilidad de que la línea log Dosis-Probit ajuste a una línea recta.

Cuadro 3.- Peso y porcentaje de larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) que alcanzaron el tercer instar tratadas con diferentes concentraciones de *B. thuringiensis* (Crymax¹).

Tratamiento (Kg H ⁻¹)	Peso larvas ² (g ± EE)	Larvas tercer instar ² (% ± EE)
Testigo	0.015±0.003 d	19.1±10.8 a
0.12 5	0.006±0.00002d	0.0±0.0 b
0.25	0.004±0.001c	0.0±0.0 b
0.5	0.003±0.0009 bc	0.0±0.0 b
0.75	0.003±0.00005 ab	0.0±0.0 b
1.0	0.002±0.001 ab	0.0±0.0 b
1.5	0.001±0.0002 a	0.0±0.0 b

EE = error estándar de la media

¹ Crymax, insecticida formulado con delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* EG 7841 (Syngenta Agro S.A. de C.V., México DF, México).

²Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra minúscula no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 4.- Peso y porcentaje de larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) que alcanzaron el tercer instar, tratadas con un extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus*, Boldina y Eucaliptol.

Tratamiento	Extracto		Boldina		Eucaliptol	
	Peso larvas ¹ (g ± EE)	Larvas tercer instar ¹ (% ± EE)	Peso larvas ¹ (g ± EE)	Larvas tercer instar ¹ (% ± EE)	Peso larvas ¹ (g ± EE)	Larvas tercer instar ¹ (% ± EE)
Testigo	0.03±0.008 a	31.25±3.6 a	0.043±0.005 a	43.7±0.0 a	0.042±0.012 a	56.2±6.2 a
0.2 5	0.015±0.005 a	18.7±9.5 ab	0.04±0.004 ab	29.1±7.5 ab	0.037±0.01 a	50.0±0.0 a
0.5	0.014±0.003 a	16.6±5.5 abc	0.025±0.01 abc	22.9±5.5 ab	0.036±0.007 a	50.0±13.0 a
1	0.0016±0.003 a	6.25±6.25 bcd	0.02±0.002 abc	22.9±2.1 ab	0.032±0.006 a	48.7±4.7 a
2	0.007±0.001 a	2.1±2.1 d	0.018±0.01 bc	20.8±7.5 ab	0.026±0.006 a	37.5±7.2 ab
4	0.006±0.003 a	0.0±0.0 d	0.01±0.003 bc	16.6±2.1 b	0.022±0.007 a	27.1±2.1 b
8	--	--	0.01±0.005 c	6.2±6.2 c	0.025±0.02 a	25.0±0.0 b

EE = error estándar de la media

¹ Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra minúscula no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 5.- Fuentes de variación, error y coeficiente de variación para el efecto insecticida del extracto en cloruro de metileno de *P. boldus*, Eucaliptol y Boldina, contra *S. frugiperda* en laboratorio.

Fuente de variación	Extracto	Eucaliptol	Boldina
Concentración	0.0001*	0.0001*	0.0001*
Proporción	0.0054*	0.072	0.0341*
Concentración * Proporción	0.1337	0.993	0.0337*
Error	0.787	0.706	1.23
Coeficiente de variación (%)	18.3	29.2	21.6

*Significativo prueba de Tukey, $p \leq 0.05$

Cuadro 6.- Peso y porcentaje de larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) que alcanzaron el tercer instar tratadas con diferentes concentraciones de un extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus*, en combinación con *B. thuringiensis* (Crymax²) en proporciones de 1:1, 1:10 y 1:20.

Concentración	1:1			1:10			1:20		
	Mortalidad ¹ (%)	Peso larvas ¹ (g ± EE)	Larvas tercer instar ¹ (% ± EE)	Mortalidad ¹ (%)	Peso larvas ¹ (g ± EE)	Larvas tercer instar ¹ (% ± EE)	Mortalidad (%)	Peso larvas ¹ (g ± EE)	Larvas tercer instar ¹ (% ± EE)
Testigo	0.0±0.0 d	0.14±0.00a	85.4±2.1 a	0.0±0.0d	0.18±0.02a	91.9±5.5 a	0.0±0.0d	0.15±0.01a	93.7±3.6a
0.2 5	24.9±3.6c	0.14±0.002a	70.8±2.1 a	6.25±6.25d	0.14±0.04a	72.9±7.5 b	20.1±5.5d	0.07±0.01b	62.5±9.5b
0.5	52.1±14.5bc	0.07±0.02b	37.5±9.4 b	31.2±3.6c	0.06±0.0006b	43.7±3.6 c	27.1±5.5d	0.07±0.008b	52.1±5.5b
1	58.3±9.1b	0.06±0.01b	33.3±7.5 bc	33.3±2.1c	0.08±0.007b	35.4±5.5 cd	56.2±3.6c	0.04±0.006c	10.4±5.5c
2	66.6±5.5b	0.05±0.008bc	18.7±3.6 cd	54.1±9.1bc	0.03±0.004c	18.7±3.6 de	58.3±12.6c	0.03±0.007c	6.25±3.6c
4	75.0±7.2 b	0.04±0.006c	8.3±2.1 d	68.7±7.2 b	0.03±0.01c	10.4±7.5 e	79.1±5.5b	0.014±0.002d	0.0±0.0c
8	93.7±2.1 a	0.03±0.0c	0.0±0.0 e	97.9±9.1 a	0.008±0.008d	0.0±0.0 f	100±0.0a	0.005±0.004e	0.0±0.0c

EE = error estándar de la media

¹ Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra minúscula no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

² Crymax, insecticida formulado con delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* EG 7841 (Syngenta Agro S.A. de C.V., México DF, México).

Cuadro 7.- Porcentaje de mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) tratadas con diferentes concentraciones de Boldina en combinación con *B. thuringiensis* (Crymax¹) en proporciones de 1:1, 1:10 y 1:20.

Concentración ¹	Mortalidad (%)		
	1:1 ³	1:10 ³	1:20 ³
Testigo	0.0±0.0 c A	0.0±0.0 d A	0.0±0.0 d A
0.2 5	22.9±9.1b A	6.25±3.6 d A	20.8±5.5 d A
0.5	27.1±5.5 b A	29.1±12.6 c A	33.3±7.5 cd A
1	50.0±10.8 b A	77.1±5.5 b A	43.7±3.6 bcd A
2	85.4±7.5 a A	81.3±7.2 b A	56.2±9.5 bc A
4	87.5±6.3 a A	95.8±2.1 a A	66.6±8.3 b A
8	95.8±4.2 a A	100±0.0 a A	89.5±8.9 a A

EE = error estándar de la media

¹ Crymax, insecticida formulado con delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* EG 7841 (Syngenta Agro S.A. de C.V., México DF, México).

² Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra minúscula no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

³ Dentro de la misma fila, los valores con la misma letra mayúscula no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 8.- Peso y porcentaje de larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) que alcanzaron el tercer instar tratadas con diferentes concentraciones de Boldina en combinación con *B. thuringiensis* (Crymax²) en proporciones de 1:1, 1:10 y 1.20.

Concentración	1:1		1:10		1.20	
	Peso larvas ¹ (g ± EE)	Larvas tercer instar ¹ (% ± EE)	Peso larvas ¹ (g ± EE)	Larvas tercer instar ¹ (% ± EE)	Peso larvas ¹ (g ± EE)	Larvas tercer instar ¹ (% ± EE)
Testigo	0.12±0.00a	62.5±12.3 a	0.18±0.02 a	72.9±5.5 a	0.15±0.01 a	75.0±7.2 a
0.2 5	0.03±0.003b	8.3±8.3 b	0.05±0.008b	18.7±10.8 b	0.03±0.002b	0.0±0.0 b
0.5	0.03±0.008b	4.1±4.1 b	0.04±0.008b	8.3±8.3 bc	0.03±0.004b	0.0±0.0 b
1	0.02±0.006bc	0.0±0.0 b	0.02±0.001b	0.0±0.0 c	0.02±0.004c	0.0±0.0 b
2	0.01±0.007bc	0.0±0.0 b	0.02±0.004b	0.0±0.0 c	0.01±0.002c	0.0±0.0 b
4	0.01±0.003c	0.0±0.0 b	--	--	0.01±0.002c	0.0±0.0 b
8	--	--	--	--	--	--

EE = error estándar de la media

¹ Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra minúscula no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

² Crymax, insecticida formulado con delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* EG 7841 (Syngenta Agro S.A. de C.V., México DF, México).

Cuadro 9.- Peso y porcentaje de larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) que alcanzaron el tercer instar tratadas con diferentes concentraciones de Eucaliptol en combinación con *B. thuringiensis* (Crymax²) en proporciones de 1:1, 1:10 y 1:20.

Concentración	1:1			1:10			1:20		
	Mortalidad ¹ (%)	Peso larvas ¹ (g ± EE)	Larvas tercer instar ¹ (% ± EE)	Mortalidad ¹ (%)	Peso larvas ¹ (g ± EE)	Larvas tercer instar ¹ (% ± EE)	Mortalidad (%)	Peso larvas ¹ (g ± EE)	Larvas tercer instar ¹ (% ± EE)
Testigo	0.0±0.0c	0.17±0.06a	75.0±3.6 a	0.0±0.0c	0.18±0.02a	81.2±7.2a	0.0±0.0c	0.15±0.01a	81.2±3.6a
0.2 5	10.4±7.5b	0.18±0.02a	62.5±9.5ab	18.7±7.2b	0.17±0.01b	58.3±7.5ab	12.5±3.6b	0.14±0.07b	68.7±3.6b
0.5	12.5±3.6ab	0.14±0.04a	60.4±5.5ab	20.8±11.5b	0.15±0.02b	56.2±6.2ab	18.7±6.2b	0.14±0.01b	50.0±3.6b
1	22.9±5.5ab	0.14±0.09b	52.1±4.1ab	29.1±5.5ab	0.14±0.06b	47.9±4.1ab	20.8±2.1ab	0.14±0.01b	50.0±3.6b
2	27.1±5.5ab	0.12±0.09b	50.0±10.8b	31.2±6.6 ab	0.14±0.09b	47.9±2.1b	22.9±8.3ab	0.14±0.01b	44.3±0.5b
4	29.1±9.1ab	0.12±0.09b	50.0±9.8 b	37.5±0.0 ab	0.14±0.01b	39.5±7.5b	29.1±2.1ab	0.14±0.02b	39.5±9.1c
8	35.4±5.5 a	0.10±0.05b	22.9±5.5 c	50.0±5.0 a	0.14±0.14b	39.5±3.9 c	39.5±3.9 a	0.11±0.11b	22.9±2.1d

EE = error estándar de la media

¹ Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra minúscula no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

² Crymax, insecticida formulado con delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* EG 7841 (Syngenta Agro S.A. de C.V., México DF, México).

Cuadro10.- Efecto de la mezcla en diferentes proporciones de *B. thuringiensis* (Crymax¹) con un extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus*, Boldina y Eucaliptol.

Tratamiento	Proporción	Índice de combinación (CI) ²
<i>Bacillus thuringiensis</i> -Metileno	1:1	0.87
<i>Bacillus thuringiensis</i> -Metileno	1:10	2.5
<i>Bacillus thuringiensis</i> -Metileno	1:20	2.6
<i>Bacillus thuringiensis</i> -Boldina	1:1	0.5
<i>Bacillus thuringiensis</i> -Boldina	1:10	1.0
<i>Bacillus thuringiensis</i> -Boldina	1:20	8.4
<i>Bacillus thuringiensis</i> -Eucaliptol	1:1	2.2
<i>Bacillus thuringiensis</i> -Eucaliptol	1:10	1.4
<i>Bacillus thuringiensis</i> -Eucaliptol	1:20	1.4

¹ Crymax, insecticida formulado con delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* EG 7841 (Syngenta Agro S.A. de C.V., México DF, México).

²Si CI= 1 efecto aditivo, CI<1 efecto sinergista, CI>1 efecto antagonista.

CAPITULO 5

EFICACIA DE UN EXTRACTO DE BOLDO EN CLORURO DE METILENO (*Peumus boldus* Molina) SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) Y *Helicoverpa zea* Bodie

Gonzalo Silva¹, J. Concepción Rodríguez², Angel Lagunes², Celina Llanderal², Raquel Alatorre², A. M. Shelton³ y Carlos A. Blanco⁴.

RESUMEN

Debido a su tipo de alimentación, las larvas de lepidópteros son importantes plagas de cultivos agrícolas a nivel mundial. En laboratorio e invernadero se evaluó la actividad biológica de un extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus* contra *Spodoptera frugiperda* y *Helicoverpa zea*. En *S. frugiperda* a una concentración de 8% se alcanzó el 100% de mortalidad. En *H. zea* este mismo tratamiento eliminó el 68.7% de la población. Las CL₅₀ y CL₉₀ para *S. frugiperda* fueron de 1.96 y 6.53 mL kg⁻¹ y de 2.29 y 69.2 mL kg⁻¹ para *H. zea*. La inhibición de la alimentación aumentó cuando se incrementó la concentración de extracto, aunque en ambas especies no superó el 70%. En la inyección del extracto se obtuvo mayor mortalidad en *S. frugiperda* (100%) que en *H. zea* (55%) pero no se observó un efecto regulador del crecimiento. En las pruebas en invernadero el extracto no disminuyó de manera significativa el daño de *S. frugiperda* al follaje de plantas de maíz. Sin embargo, en ambas especies hubo disminución en la oviposición, destacándose los tratamientos con 4 y 8% de extracto que en *S. frugiperda* tuvieron cero oviposturas y en *H. zea* uno y cero huevos, respectivamente. El extracto de esta planta tiene potencial para constituirse en una alternativa eficaz de control de estos insectos.

Palabras clave: gusano cogollero, gusano elotero, insecticidas vegetales

¹Departamento de Producción Vegetal. Facultad de Agronomía. Universidad de Concepción. Vicente Méndez 595. Chillán. Chile. E-mail:gosilva@udec.cl. Autor para correspondencia.

²Programa de Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carretera México-Texcoco. 56230. Montecillo. Estado de México. México.

³Department of Entomology, Cornell University, New York State Agricultural Experiment Station, Geneva, NY 14456, USA

⁴USDA. Animal and Plant Health Inspection Service, Biotechnology Regulatory Services. 4700 River Road, Unit 89, Riverdale, MD 20737, USA.

ABSTRACT

Due to its feeding habits, the lepidopterus larvae are worldwide important pests of agricultural crops. Under laboratory and greenhouse conditions, the biological activity of a methylene chloride extract of *Peumus boldus* against *Spodoptera frugiperda* and *Helicoverpa zea* was evaluated. In *S. frugiperda* the 8% concentration caused 100% mortality. In *H. zea*, this treatment eliminated 68.7% of the treated population. The LC₅₀ and LC₉₀ for *S. frugiperda* were 1.96 and 6.53 mL kg⁻¹ and 2.29 and 69.2 mL kg⁻¹ for *H. zea*. The feeding inhibition increased as the extract concentration increased, although in both species did not exceed 70%. In extract injection the mortality was higher in *S. frugiperda* (100%) than in *H. zea* (55%) but did not showed a growth regulator effect. In the greenhouse test, the extract did not decrease significantly the foliage damage of *S. frugiperda* to corn plants. But in both species, oviposition decreased, especially in treatments with 4 and 8% extract concentration which lead to zero egg masses in *S. frugiperda* and one and zero eggs, respectively in *H. zea*. The extract of this plant has the potential to become an effective alternative control of these insects.

INTRODUCCIÓN

Los insectos causan importantes pérdidas a las plantas cultivadas tanto por su alimentación como por ser vectores de patógenos. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) y *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae) son dos plagas de relevancia mundial debido a que se alimentan de una amplia gama de cultivos. Durante muchos años el control de estos insectos se ha realizado con insecticidas sintéticos del grupo de los piretroides y de los organofosforados, pero su uso irracional ha provocado problemas como presencia de residuos peligrosos, eliminación de enemigos naturales, intoxicación de usuarios (Roel y Vendramim, 2006) y resistencia (Yu, 1992, Abd-elghafar *et al.*, 1993). Los avances tecnológicos han hecho que en la actualidad para estas dos plagas se cuente con cultivos genéticamente modificados como maíz (*Zea mays* L.) y algodónero (*Gossypium hirsutum* L.) capaces de expresar las delta endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* Berliner, lo cual les permite autodefenderse del ataque de estos insectos y a la vez limita el uso de insecticidas convencionales (Buntin *et al.*, 2001; Gore *et al.*, 2001; Adamcyk and Gore, 2004). Sin embargo, el problema no está solucionado pues ya se han registrado los primeros antecedentes de resistencia (Matten *et al.* 2008, Tabashnik *et al.* 2008), por lo que existe

la posibilidad para nuevas opciones que constituyan alternativas eficaces y económicamente viables de integrar en un programa de manejo de la resistencia.

El uso de compuestos vegetales en el control de plagas es antigua, pero problemas derivados de periodos cortos de protección y de la variación en la concentración de los compuestos activos debido a la variedad, zona geográfica y época del año, han impedido su uso masivo (Isman, 2006). En el caso de *S. frugiperda* y *H.zea* los compuestos vegetales que han mostrado tener efectividad son principalmente de plantas de la familia Meliaceae como *Trichilia pallida* Swartz (Roel *et al.*, 2000; Roel y Vendramim, 1999 y 2006), *Azadirachta indica* J., *Melia azedarach* L., *Anacardium occidentale* L. y *Guarea trichilioides* L. (De Brito *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2007), además de Annonaceae con *A. cherimolia* Miller (Alvarez-Coloma *et al.*, 2007).

El boldo (*Peumus boldus* Molina; Monimiaceae), es un árbol del bosque nativo de Chile que es conocido por poseer propiedades antioxidantes (Quezada *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2000; Russo *et al.*, 2004; Vogel *et al.*, 2005), antitumorales (Russo *et al.*, 2004), antiinflamatorias (Young *et al.*, 2000; Vogel *et al.*, 2005) y antimicrobianas (Vogel *et al.*, 2005; Mazutti *et al.*, 2008). Además, los polvos, extractos y aceite esencial que se obtienen del follaje y madera de esta planta han mostrado propiedades insecticidas contra *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) (Bittner *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2003 a y b y 2005), *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera) (Bittner *et al.*, 2008) y *Spodoptera littoralis* Boisd. (Zapata *et al.*, 2006). El objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad biológica en laboratorio e invernadero, de un extracto de hojas de boldo en cloruro de metileno contra *S. frugiperda* y *H. zea*

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el laboratorio e invernaderos del área de Toxicología de Insecticidas del Programa de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

Material vegetal

El material vegetal se adquirió en el mercado de frutas y hortalizas de la ciudad de Texcoco, Estado de México, México. Este consistió en hojas deshidratadas de boldo las cuales fueron corroboradas taxonómicamente de acuerdo a Vogel *et al* (2005). Pérez *et al.* (2007), demostraron

que el follaje de esta planta conserva sus propiedades insecticidas si se le mantiene como hojas deshidratadas, por lo que este fue seleccionado dejando solamente las hojas adultas y con su lámina foliar completa, para luego ser triturado el mismo día que se utilizó, con un molino eléctrico para café Braun KSM2-BLK (Braun de México y Cía de C.V., Naucalpan, Estado de México, México) y homogenizado con un tamiz de 250 micrones (DUAL Manufacturing Co. Chicago. IL. USA).

Insectos

Las larvas de *S. frugiperda* y *H. zea* provinieron de la colonia del Laboratorio de Toxicología de Insecticidas que se mantiene en una cámara bioclimática bajo condiciones controladas de 27 ± 1 °C, $70 \pm 5\%$ de humedad relativa y fotoperiodo de 14: 10 horas luz: oscuridad.

Obtención del extracto

En un sistema de extracción Soxhlet se colocaron 400 g de polvo utilizando cloruro de metileno como solvente (Kamaraj *et al.* 2008a). La extracción se realizó durante 120 h y posteriormente el extracto se concentró con un rotovapor a 40°C hasta sequedad (Kamaraj *et al.* 2008b). El extracto concentrado se utilizó como solución madre y hasta su utilización se depositó en un frasco de color ámbar y se almacenó a 4°C.

Bioensayos

Toxicidad

Se utilizó la metodología descrita por Sims *et al.* (1996) que consistió en colocar 1 mL de dieta artificial (Tobacco Bollworm, Southland Products, Inc., USA) en cada cavidad de una charola para bioensayos (Bio-assay Tray, Bio-Ba-128, C-D. International, Inc., USA). Una vez que la dieta solidificó, se agregaron 200 µL del extracto en la concentración a evaluar. Luego, en cada cavidad se introdujo una larva neonata (4-6 h de edad) y se cubrió con plástico autoadherente que permite el intercambio gaseoso (Pull'n Peel Tab Bio-CV-16, C-D International, Inc., USA). Posteriormente, las charolas se transfirieron a una cámara bioclimática a las condiciones señaladas para la cría masiva. Se evaluaron concentraciones de 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0% de extracto con cinco repeticiones de 32 larvas, incluyendo un testigo sin tratar que consistió en agua destilada. Cinco días después de la infestación con las larvas se evaluó la mortalidad y cuando

ésta fue inferior al 10% , se corrigió con la fórmula de Abbott's (Abbott, 1925). El criterio de mortalidad consistió en considerar muerta a una larva si ésta no mostraba movimientos coordinados al ser tocada con un pincel.

Inhibición de la alimentación

La evaluación de la repelencia y del efecto antialimentario se realizó con la metodología de El-Aziz y El-Hawary (1997). Con un sacabocados de 5 cm de diámetro se obtuvieron discos foliares de hojas de chile (*Capsicum annuum* L.) Cv. California Wonder (Rancho Los Molinos S.A. de CV., Tepoztlan, Morelos, México) cultivadas con anterioridad en invernadero y libre de plaguicidas. Luego, la mitad del disco se sumergió durante 15 s en el extracto de boldo en concentraciones de 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0% mientras que la otra mitad se sumergió por el mismo tiempo, en agua destilada. Una vez que la superficie foliar del disco se secó, éste se colocó en el centro de una caja Petri (Industrias Technicare, Atizapan de Zaragoza, Estado de México, México) acondicionada con el fondo recubierto con 20 mL de una solución de agar-agua a 1.5% (Escoubas *et al.*, 1993). Cada caja se infestó con una larva de tercer instar a la que se dejó alimentarse libremente por 18 h. Los restos no consumidos de los discos foliares se montaron en hojas de papel blanco, se escanearon en una impresora multifuncional Canon Pixma MP 160 con una resolución de 2400 ppi y se almacenaron en formato Tagged Image File Format (TIFF). La cuantificación del área consumida se realizó mediante análisis digital de imágenes de acuerdo a O'Neal *et al.* (2002) y Bakr (2005) y con los resultados obtenidos se calculó el índice de actividad antialimentaria (AA), $AA = (1 - T/C) * 100$, donde T= porcentaje consumido de área foliar tratada y C= porcentaje consumido de área foliar testigo (El-Aziz y El-Hawary, 1997).

Inyección

Esta evaluación se realizó según la metodología de Wheeler e Isman (2001), que consiste en seleccionar larvas de quinto instar recién mudadas, a las que se les inyectó, entre el quinto y sexto segmento abdominal un μL del extracto de *P. boldus*. Las concentraciones se prepararon como una solución en agua destilada más 0.5 mL de Tween-20 (Sigma-Aldrich Química S.A. de C.V., Toluca, Estado de México, México) como agente emulsificante. Los tratamientos evaluados fueron 0 (testigo), 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0% y se inyectaron con una microjeringa Hamilton (Hamilton Company, Reno, Nevada, USA) de 10 μL . Una vez inyectadas, las larvas

correspondientes a cada tratamiento se colocaron en vasos plásticos de 20 mL de capacidad con 10 mL de dieta artificial y se ubicaron en una cámara bioclimática a las condiciones señaladas para la cría masiva. Cada tratamiento tuvo 10 repeticiones y el testigo consistió en inyectar a las larvas 1.0 µL de agua destilada más 0.5 mL de Tween-20. Como medida de prevención se dejó un grupo de larvas a las que solamente se pinchó con la jeringa, con el objetivo de tener la seguridad de que la larva no sufrió daño físico producto de las punciones. A los cinco días a partir de la inyección, se evaluó la mortalidad y se registró el número individuos que mudaron al estado de pupa, así como el peso de las pupas y el número de ellas que alcanzó el estado adulto. El experimento se repitió cinco veces en diferentes días.

Invernadero

Obtención de las plantas

Maíz

En macetas de 5 L de capacidad que contenían una mezcla de peat most y agrolita en una proporción de 3:1, se sembraron cinco semillas de maíz (*Zea mays* L.) Cv. Cacahuazintle por maceta. Estas se dejaron germinar y crecer hasta que alcanzaron el estado de cinco hojas, momento en que se seleccionaron dos del total de plantas emergidas, con las que se realizaron los experimentos.

Tomate

En una charola de germinación que contenía peat moss y agrolita en una proporción de 3:1, se sembró en cada cavidad una semilla de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) Cv. H 792 (Rancho Los Molinos S.A. de Cv., Tepoztlan, Morelos, México). Cuando las plantas tuvieron dos hojas verdaderas se trasplantaron de manera individual a macetas de 5 L con el mismo sustrato antes señalado y una vez que tuvieron 10 hojas, se seleccionaron las plantas individuales que se utilizaron en los experimentos.

Preparación y aspersión del extracto

El extracto se preparó en un volumen de un L de agua destilada al que se agregó la cantidad de extracto requerida para obtener las concentraciones de 1, 2, 4 y 8 % más 0.5 mL de Tween-20 como agente emulsificante de la solución. La aplicación se realizó hasta punto de goteo con una

aspersora de compresión manual SwissMex Modelo SWETI0125-R01 (SwissMex-Rapid S.A. de C.V., Lagos de Moreno, Jalisco, México) de 1.5 L de capacidad.

Daño al Follaje

Dada la poca relevancia de *H. zea* como agente causal de daño al follaje de plantas cultivadas (Alvarado-Rodríguez *et al.*, 1982; Burkett *et al.*, 1983), esta evaluación solamente se realizó para *S. frugiperda*. Se utilizó la metodología de Viana *et al.* (2007) que consistió en seleccionar cuatro macetas con dos plantas de maíz por tratamiento, las que fueron asperjadas con el extracto a la concentración requerida. Una vez que el follaje estuvo seco (≈ 20 min), las macetas se infestaron con 20 larvas neonatas de *S. frugiperda* de menos de 24 h de edad. Para evitar escapes, cada maceta se cubrió con una jaula entomológica modelo Riverside de 25 x 25 x 15 cm provista de una funda de tela de organza. Las plantas se regaron con agua cada 48 h y 10 días después de la infestación se contabilizó el número de larvas sobrevivientes y el instar en que se encontraban de acuerdo al tamaño de su cápsula cefálica (Villa y Catalán, 2004). Se evaluaron los tratamientos de 1, 2, 4 y 8 % de extracto más el insecticida comercial Baytroid 0.5 CE (Cyflutrin: Piretroide) (Bayer de México S.A. de C.V.) en su dosis comercial (0.75 L ha^{-1}), más un testigo al que sólo se le asperjó agua destilada con tween-20. Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones constituidas por una maceta con dos plantas de maíz. El daño foliar se cuantificó mediante análisis digital de imágenes de acuerdo a O'Neal *et al.* (2002) y Bakr (2005).

Oviposición

Las pruebas de oviposición se realizaron para *S. frugiperda* y *H. zea* según el método de El-Aziz (1998). En jaulas entomológicas de 60 x 60 x 90 cm se colocó aleatoriamente una planta de maíz en el caso de *S. frugiperda* (Viana *et al.* 2007) y de tomate en el de *H. zea* (Alvarado-Rodríguez *et al.*, 1982; Zalom *et al.*, 1983), asperjadas con las respectivas concentraciones del extracto (1, 2, 4 y 8 %) y Baytroid 0.5 CE. En seguida, se liberaron 10 parejas de adultos a los que se les dejó copular libremente y cada 24 horas se contabilizó el número de posturas, las cuales se retiraron y se trasladaron al laboratorio donde se colocaron en cajas Petri con un papel filtro humedecido y en una cámara bioclimática a las condiciones señaladas para registrar el porcentaje de eclosión. Con el objetivo de evaluar si había algún efecto en el ciclo, se seleccionaron 100 larvas recién eclosionadas que se dividieron en cinco grupos de 20. Cada larva se colocó individualmente en

vasos plásticos (Envases Cuevas S.A. de C.V., Ecatepec, Estado de México, México) de 20 mL de capacidad que contenían 10 mL de dieta artificial, mismos que se almacenaron en una cámara bioclimática para que las larvas completaran su ciclo, evaluándose el peso del tercer instar, el porcentaje y peso de pupas y el número de ellas que alcanzaba el estado adulto.

Diseño experimental y análisis estadístico

Para evaluar el efecto del extracto de boldo sobre *S. frugiperda* y *H. zea* en laboratorio e invernadero, se utilizó un diseño experimental en bloques completos al azar. Para uniformizar las varianzas, los datos se transformaron a $\sqrt{x} + 0.5$ y se sometieron a un análisis de varianza ANDEVA ($\alpha = 0.05$) y a una prueba de comparación de medias Tukey con un nivel de significancia del 95% ($p \leq 0.05$), con el programa Statistical Analysis System (SAS) (SAS Institute, 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Toxicidad

S. frugiperda

La mortalidad más alta (100%) se obtuvo en el tratamiento de 8% de extracto (Cuadro 1). Este valor fue significativamente mayor ($F=49.32$ $df=9,27$; $P=0.0001$) que todos los demás tratamientos, que no superaron el 45% de mortalidad. Las CL_{50} y CL_{90} fueron de 1.96 y 6.53 mL kg^{-1} , respectivamente, lo cual implica que para eliminar el 90% de la población se requiere de una concentración de 7%, lo que permite considerarlo como una alternativa con potencial para el control de este insecto. Sin embargo, la mortalidad es menor a la observada por Zapata *et al.* (2006) quienes mezclaron dieta artificial con polvo de *P. boldus* a una concentración de 4% y obtuvieron una mortalidad superior al 80% en larvas de *S. littoralis*.

H. zea

Este insecto mostró menor susceptibilidad al extracto de boldo, ya que con la concentración máxima (8%) se obtuvo un 68.7% de mortalidad, valor que no difirió del 56.2 y 50% de los tratamientos de 2 y 4% (Cuadro 1). Los restantes tratamientos no superaron el 30% de mortalidad y fueron significativamente menores ($F=16.13$ $df=9,27$; $P=0.0001$) a los antes mencionados. La CL_{50} y CL_{90} fueron de 2.29 y 69.2 mL kg^{-1} , respectivamente, lo cual ratifica la menor

sensibilidad de las larvas al extracto, ya que para eliminar al 90% de la población se requiere una concentración de casi 70%, lo cual no es una opción práctica para un programa de manejo integrado de *H. zea*.

Inhibición de la alimentación

S. frugiperda

La inhibición de la alimentación aumentó en la medida que la concentración del extracto se incrementó (Cuadro 2). Entre los tratamientos de 0.5 a 8% no hubo diferencia significativa, fluctuando la actividad antialimentaria (AA) de 50.1 a 61.9%. El tratamiento de 0.25% de concentración de extracto con una AA de 37.8% fue significativamente menor ($F=2.18$ $df=8,23$; $P=0.004$) a los demás. Los valores obtenidos son mayores a los observado por Zapata *et al.* (2006), quienes al mezclar polvo de *P. boldus* con la dieta de *S. littoralis* en concentraciones de 1, 2 y 4% no superaron el 22% de inhibición.

H. zea

La mayor AA se obtuvo con las concentraciones de 2, 4 y 8% con una inhibición alimentaria de 42.0, 63.9 y 69.8%, respectivamente, no mostrando diferencias significativas entre ellos (Cuadro 2). Los restantes tratamientos no superaron el 20% teniendo todos diferencias estadísticas ($F=9.9$ $df=8,23$; $P=0.0001$) con 4 y 8%. Estos resultados son superiores a los observados en otras especies. Hough-Goldstein (1990), utilizando la misma metodología, evaluó el efecto de los extractos de siete plantas, encontrando que se requieren concentraciones mayores a 10% para que los adultos de *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) no ingieran los discos foliares. Además, Hough-Goldstein y Hahn (1992) agregan que mientras más tiempo permanezca el extracto sobre la superficie foliar, mayor será el período de inhibición de la alimentación por lo que recomiendan aplicar los extractos en combinación con un surfactante.

Inyección

S. frugiperda

La mortalidad tuvo directa proporcionalidad con el incremento de la concentración del extracto. Los tratamientos de 2, 4 y 8% mostraron una mortalidad superior al 95% (Cuadro 3), mientras

que 0.25, 0.5 y 1% fluctuaron entre 50 y 75% de mortalidad, resultando significativamente menores a 4 y 8% ($F=5.28$, $df=8,23$; $P=0.0028$). En las larvas que mudaron a pupa, el mayor porcentaje se presentó en el testigo con 87.5% que fue significativamente diferente ($F=10.59$; $df=8,27$; $P=0.0001$) a todos los tratamientos que incluían el extracto que mostraron valores mínimos de 5% y máximos de 50%. Todas las larvas que alcanzaron el estado de pupa pudieron completar el ciclo en un plazo de 21 días. No se observaron malformaciones como suele suceder con algunos reguladores del crecimiento como los inhibidores de la quitina (Yu, 2008), sino que el efecto del extracto consistiría en un aumento de la toxicidad en el tiempo.

H. zea

Esta especie fue menos susceptible al extracto de *P. boldus*. La mayor mortalidad se obtuvo en las concentraciones de 1 a 8%, fluctuando de 30 a 55% (Cuadro 3) sin diferencias estadísticas entre ellos. En el paso a pupa no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, con valores máximos de 90 % para el testigo y mínimos de 45% para 8%. Los sobrevivientes tardaron 19 días en pasar de pupa a adulto, aunque hubo diferencias significativas en la cantidad de individuos que lograron llegar de pupa a adulto ($F=2.76$; $df=9,27$; $P=0.0302$), ya que en la concentración de 8% sólo 25% de las pupas llegaron a adulto, mientras que en el testigo lo hizo el 85%. Al igual que con *S. frugiperda* no se observaron malformaciones, lo que permite inferir que el efecto en el ciclo es más cercano a una toxicidad acumulada en el tiempo, que a uno regulador del crecimiento.

Daño Follaje

Las diferentes concentraciones del extracto de *P. boldus* no protegieron la planta con la misma efectividad que el insecticida piretroide (Cuadro 4). El daño foliar en el tratamiento con cyflutrina fue de 3.7%, mostrando diferencias significativas ($F=7.27$; $df=8,23$; $P=0.0001$) con las diferentes concentraciones del extracto de *P. boldus* y el testigo cuyo daño foliar fluctuó entre 39.8 y 42%. Estos resultados concuerdan con Viana *et al.* (2007) quienes obtuvieron menor daño en plantas tratadas con el insecticida convencional clorpirifós que con un extracto de neem (*Azadirachta indica* J.), llegando incluso a aplicar hasta tres veces el extracto de esta Meliaceae, para poder equiparar el nivel de protección del insecticida. En el tratamiento con cyflutrina, 10 días después de la infestación no hubo larvas sobrevivientes. En las plantas tratadas con el extracto y el testigo

se observó entre 35 a 55% de sobrevivencia de larvas, sin diferencias significativas tanto para el número de larvas recuperadas como para el tamaño y peso de éstas. Sin embargo, la ausencia de larvas no necesariamente implica una mayor eficacia, ya que Lima *et al.* (2009) documentan que las plantas tratadas con concentraciones de 10 mL L⁻¹ de un extracto de *A. indica* mostraron una menor sobrevivencia de larvas de *S. frugiperda* y a pesar de ello, las plantas mostraron un daño foliar similar a los restantes tratamientos. Por otra parte, cuando se analiza el instar al que pertenece cada una de las larvas sobrevivientes se puede inferir que el extracto alteró su ciclo biológico. Este efecto se manifiesta en un atraso del desarrollo, ya que las larvas sobrevivientes de la concentración de 8%, correspondieron en 2.5% al segundo instar, 75.2% al tercer instar y 24.8% al cuarto, mientras que el testigo tuvo 22% de tercer instar, 76% de cuarto y 2% de quinto instar. Además, el testigo y la menor concentración del extracto (1%), fueron los únicos tratamientos en los que se encontraron larvas de quinto instar, lo cual refuerza el hecho de que el extracto afecta el desarrollo normal del ciclo de *S. frugiperda*. Estos antecedentes son similares a los de Torrecillas y Vendramim, (2001) y Viana *et al.* (2007), quienes indican que mientras mayor es la concentración del extracto y el período de exposición, mayor es el efecto negativo en el ciclo del insecto.

Oviposición

S. frugiperda

Las plantas asperjadas con los tratamientos de 4 y 8% no fueron seleccionadas por las hembras para ovipositar (Cuadro 5), como ocurrió con los otros tratamientos a partir de los dos días después de la infestación (DDI). En el testigo y en el tratamiento con cyflutrina se observaron en promedio 0.3 y 0.7 masas de huevecillos, aunque estos tratamientos no difieren significativamente de los restantes en los que no hubo masas. A los 3 DDI, el rango de tratamientos seleccionados por las hembras para ovipositar se amplió incluyendo también a las concentraciones de 1 y 2%, aunque dado el bajo número de posturas no se registraron diferencias entre tratamientos, situación que se repitió a los 5 DDI. El máximo de posturas se registró a los 4 DDI siendo los mayores valores el testigo y cyflutrina con 4.7 y 3.0 posturas, respectivamente, mostrando diferencias significativas ($F=4.96$; $df=7,17$; $P=0.0083$) con 4 y 8%.

Los tratamientos testigo, cyflutrina y las concentraciones de 1 y 2% del extracto tuvieron el mayor número de huevos con 502, 238 y 413 huevos, respectivamente, sin mostrar diferencias

estadísticas entre ellos (Cuadro 5). En el porcentaje de eclosión no se registraron diferencias significativas entre tratamientos, fluctuando entre 60 y 94.8% (Cuadro 6).

En la evaluación del desarrollo de las larvas que eclosionaron de los huevos colectados en las plantas asperjadas, el testigo y los tratamientos de 1 y 2% del extracto tuvieron un peso larval de 0.53, 0.47 y 0.32 g, que fueron significativamente menores que el de cyflutrina que registró el mayor peso con 0.67g ($F=1.796$; $df=8,23$; $P=0.039$). Sin embargo, en el número de éstas que llegaron a pupa no hubo diferencias entre tratamientos. Finalmente, en el paso de pupa-adulto, la cyflutrina con un 46.6% de adultos fue significativamente menor ($F=1.44$; $df=8,23$; $P=0.035$) al testigo y a las concentraciones de 1 y 2% de extracto que tuvieron entre 66.0 y 86.6 % de adultos, respectivamente.

H. zea

Este insecto oviposita de manera individual, por lo que se realizó un conteo diario de huevos y no de masas como sucedió con *S. frugiperda*. La oviposición comenzó a los 2 DDI y se prolongó hasta los 5 DDI, concentrándose en la zona ventral de la lámina foliar lo que concuerda con Zalom *et al.* (1983) y Snodderly y Lambdin (1982). El mayor número de huevos se obtuvo en el testigo y con cyflutrina con 46.6 y 23.3 huevos totales promedio por repetición (Cuadro 7), que no son estadísticamente diferentes entre sí pero significativamente superiores ($F=11.02$; $df=7,17$; $P=0.0004$) a los observados en los tratamientos con el extracto. En este período y al igual que con *S. frugiperda*, se destacan los tratamientos de 4 y 8% con 0 y 1 posturas respectivamente. La oviposición no se produjo de manera constante durante el período de evaluación, ya que a los 2 DDI, probablemente por un período de adaptación al medio, las hembras seleccionaron para oviponer a las plantas testigo y asperjadas con cyflutrina y 1, 2 y 4% de extracto. Estos tratamientos no tuvieron diferencias significativas entre ellos pero son estadísticamente diferentes ($F=4.06$; $df=7,17$; $P=0.023$) a la concentración de 8% en la que no hubo posturas. A partir de los 3 DDI el rango de selección disminuyó concentrándose en el testigo, cyflutrina y 1 y 2% de extracto sin diferencias a los 3 y 5 DDI. A los 4 DDI nuevamente el testigo y cyflutrina concentraron la oviposición con 26 y 12 huevos respectivamente, siendo significativamente ($F=2.84$; $df=7,17$; $P=0.0326$) mayores a todos los tratamientos. Los resultados de este experimento siguen la misma tendencia que Hough-Goldstein y Hahn (1992) quienes encontraron que en comparación al testigo, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) ovipone

significativamente menos en plantas tratadas con un extracto de *Tanacetum vulgare* L. (Compositae). El único tratamiento en que se observó eclosión de los huevos fue en el testigo con 89% mientras que en los restantes todos los huevos recolectados y acondicionados con las mismas características, no se mostraron viables. Esto también coincide con Hough-Goldstein y Hahn (1992) en cuyo experimento el porcentaje de eclosión de las posturas en zonas tratadas con el extracto es menor, además de que las larvas eclosionadas se alimentan menos provocando un menor daño foliar.

Estos resultados abren una nueva perspectiva en el control de estos insectos ya que independiente de la toxicidad que puedan registrar, la inhibición total de la oviposición que se registra en 4 y 8% podría, en el futuro, incluirlos como parte de una mezcla en la que otro compuesto natural, como *B. thuringiensis*, ejerza la acción tóxica sobre las larvas y que el extracto de *P. boldus* inhiba la oviposición de los adultos que no son afectados por el primero, reduciendo la presencia de la plaga a las migraciones de otros lugares y no a la F₁ de la población ya establecida en el cultivo. Además, Zehnder *et al.* (1995) indican que el monitoreo de posturas de *H. zea* como criterio para la aplicación de insecticidas, permite reducir el número de estas sin afectar la calidad y rendimiento del tomate.

CONCLUSIONES

La toxicidad del extracto de *P. boldus* en cloruro de metileno fue mayor en *S. frugiperda* que *H. zea* y aunque su actividad antialimentaria fue similar, las pruebas en invernadero señalaron que no se reduce el daño foliar, pero sí la oviposición. El extracto de *P. boldus* se considera una opción con perspectivas de uso en el manejo de estas plagas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo técnico al Sr. Lauro Hernández Pérez del Laboratorio de Toxicología de Insecticidas, al Dr. Juan Cibrián Tovar y al M.C. Julio Cesar Velázquez del Laboratorio de Ecología Química y al M.C. Jorge Valdez Carrasco del Laboratorio de Morfología de Insectos del Colegio de Postgraduados.

LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Adamecyk, J. J. and J. Gore. 2004. Laboratory and field performance of cotton containing CRY1AC, CRY1AF, and both CRY1AC and CRY1AF (Widestrike) against beet armyworm and fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist* 87: 427-432.
- Abd-elghafar, S.F., C.O. Knowles and M.L. Wall. 1993. Pyrethroid resistance in two field strains of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 86: 1651-1655.
- Alvarado-Rodríguez, B., T.F. Leigh and W.H. Lange. 1982. Oviposition site preference by tomato fruitworm (Lepidoptera: Noctuidae) on tomato, with notes on plant phenology. *J. Econ. Entomol.* 73:895-898.
- Alvarez-Coloma, A., A. Neske, S. Popich, y A. Bardon. 2007. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Pest. Sci.* 80: 63-67.
- Bakr, E.M. 2005. A new software for measuring leaf area, and area damaged by *Tetranychus urticae* Koch. *JEN* 129: 173-175.
- Bittner, M., M. E. Casanueva, C. Arbert, M. Aguilera, V. Hernández and J. Becerra. 2008. Effects of essential oils from five plants species against the granary weevil *Sitophilus zeamais* and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera). *J. Chil. Chem. Soc.* 53: 1455-1459.
- Buntin, G. D., R. D. Lee, D. M. Wilson and R. McPherson. 2001. Evaluation of Yieldgard transgenic resistance for control fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) on corn. *Florida Entomologist* 84: 37-42.
- Burkett, G., J.C. Schneider and F.M. Davis. 1983. Behavior of the tomato fruitworm, *Heliothis zea* (Bodie) (Lepidoptera: Noctuidae), on tomato. *Environ. Entomol.* 12: 905-910.
- De Brito, C.H., J.A. Mezzomo, J.L. Batista, M. Barbosa e A. Murata. 2004. Bioatividade de extratos vegetais aquosos sobre *Spodoptera frugiperda* em condições de laboratório. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* 71: 41-45.

- El-Aziz, S. and F. El-Hawary. 1997. Inhibitory effects of some essential oils on the development of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.). J. Egypt Ger. Soc. Zool. 25: 117-130.
- El-Aziz, S. 1998. Essential oil of geranium *Pelargonium graveolens* (Linn.) as a feeding deterrent, growth retardant and oviposition repellent for the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). J. Egypt Ger. Soc. Zool. 25: 47-58.
- Escoubas P., L. Lajide y J. Mitzutani 1993. An improved leaf-disk antifeedant bioassay and its application for the screening of Hokkaido plants. Ent. Exp. Appl. 66: 99-107.
- Gore, J., J. Adamczyk and C.A. Blanco. 2005. Selective feeding of tobacco budworm and bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) on meridic diet with different concentrations of *Bacillus thuringiensis* proteins. J. Econ. Entomol. 98(1): 88-94.
- Henderson, C.F., and E.W. Tilton. 1955. Test with acaricides against the brown wheat mite. J. Econ. Entomol. 48: 157-161.
- Hough-Goldstein, J. 1990. Antifeedant effects of common herbs on the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). Environ. Entomol. 19: 234-238.
- Hough-Goldstein, J. and S.P. Hahn. 1992. Antifeedant oviposition deterrent activity of an aqueous extract of *Tanacetum vulgare* L. on two cabbage pests. Environ. Entomol. 21: 837-844.
- Isman, M.B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and increasingly regulated world. Annu. Rev. Entomol. 51:45-66.
- Kamaraj, C., A.A. Rahuman and A. Vagaban. 2008a. Antifeedant and larvicidal effects of plant extracts against *Spodoptera litura* (F.), *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* Say. Parasitol Res. 103: 325-331.
- Kamaraj, C., A.A. Rahuman and A. Vagaban. 2008b. Screening for antifeedant and larvicidal activity of plant extracts against *Helicoverpa armigera* (Hübner), *Sylepta derogata* (F.) and *Anopheles stephensi* (Liston). Parasitol Res. 103: 1361-1368.
- Lima, M.P., J. V. de Oliveira e E.J. Marques. 2009. Manejo da lagarta-do-cartucho em milho com formulações de nim e *Bacillus thuringiensis* subsp. aizawai. Ciência Rural. 39: 1215-1218.
- Matten, S.R., G.P. Head and H.D. Quemada. 2008. How governmental regulation can help or hinder the integration of *Bt* crops within IPM programs. p 27-39. In J. Romeis, A.M.

- Shelton and G.G. Kennedy (eds). Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs. Springer. USA.
- Mazutti, M., A. J. Mossi, R. L. Cansian, M. L. Corazza, C. Dariva and J. V. Oliveira. 2008. Chemical profile and antimicrobial activity of Boldo (*Peumus boldus* MOLINA) extracts obtained by compressed carbon dioxide extraction. Brazilian Journal of Chemical Engineering 25: 427-434.
- O'Neal, M, D., A. Landis and R. Isaacs. 2002. An inexpensive, accurate method for measuring leaf area and defoliation, through digital image analysis. J. Econ. Entomol. 95:1190-1194.
- Pérez, F., G. Silva, M. Tapia y R. Hepp. 2007. Variación anual de las propiedades insecticidas de *Peumus boldus* sobre *Sitophilus zeamais*. Pesquisa Agropecuaria Brasileira. 42: 633-639.
- Quezada, N., M. Ascencio, J. M. Del Valle, J. M. Aguilera and B. Gómez. 2004. Antioxidant activity of crude extract, alkaloid fraction, and flavonoid fraction from Boldo (*Peumus boldus* Molina) leaves. Journal of Food Science 69: 371-376.
- Roel, A., J. D. Vendramim, R. Shiraishi, y N. Frighetto. 2000. Efeito do extrato acetate de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivencia da lagarta-do-cartucho. Bragantia 59: 53-58.
- Roel, A., e J. D. Vendramim. 1999. Desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em genotipos de milho tratados com extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* (Swartz). Scientia Agricola 56: 581-586.
- Roel, A. e J. D. Vendramim. 2006. Efeito residual do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) para lagartas de diferentes idades de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Ciencia Rural 36: 1049-1054.
- Russo, A., V. Cardile, F. Sánchez, N. Troncoso, A. Vanella and J. A., Garbarino. 2004. Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. Life Sciences 76: 545-558.
- SAS Institute. 1998. Language guide for personal computer release. 6.03 Edition. SAS Institute. Cary. N. C. USA. 1028 p.
- Sims, S. B., J. T. Greenplate, T.B. Stone, M. A. Caprio, and F. L. Gould. 1996. Monitoring strategies for early detection of Lepidoptera resistance to *Bacillus thuringiensis*

- insecticidal proteins, pp. 229-242. *In*: T. M. Brown [ed.], Molecular Genetics and Evolution of Pesticide Resistance. ACS Symposium Series No. 645. American Chemical Society, Washington, DC.
- Snodderly, L.J., and P.L. Lambdin. 1982. Oviposition and feeding sites of *Heliothis zea* on tomato. *Environ. Entomol.* 11: 513-515.
- Souza, M., A. Roel, E. J. Arruda e A., S. Marques. 2007. Eficiência de productos vegetais no controle da lagarta-do.cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciênc. Agrotec.* 31: 326-331.
- Tabashnik, B., A.J., Gassman, D.W. Crowder and Y. Carrière. 2008. Insect resistance to *Bt* crops: evidence versus theory. *Nature Biotechnology* 26(2): 199-202.
- Torrecilas, S.M., e J.D. Vendramim. 2001. Extrato aquoso de ramos de *Trichilia pallida* e o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* en genotipos de milho. *Scientia Agricola* 58: 27-31.
- Viana, P., H. T. Prates e P.E. Ribeiro. 2007. Efeito de extratos de nim e métodos de aplicação sobre o dano foliar e desenvolvimento da lagarta-do.cartucho, *Spodoptera frugiperda*, em milho. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo.* 6: 17-25.
- Villa, M.M., y E. Catalán. 2004. Determinación de estadios larvales de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae) para la construcción de un modelo de predicción. *Folia Entomol. Mex.* 43: 307-312.
- Vogel, H., I. Razmilic., J. San Martín, U. Doll, y B. González. 2005. Plantas Medicinales Chilenas. Experiencias de Domesticación y Cultivo de Boldo, Matico, Bailahuén, Canelo, Peumo y Maqui. Editorial Universidad de Talca. Talca. Chile. 192 p.
- Wheeler, D., M. B. Isman. 2002. Antifeedant and toxic activity of *Trichilia americana* extract against the larvae of *Spodoptera litura*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 98: 9-16.
- Young, Y., J. J. H. Song, E. S. Han and C. S. Lee. 2000. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacological Research* 42: 361-371.
- Yu, S.J. 1992. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 85:675-682.

- Yu, S.J. 2008. The toxicology and biochemistry of insecticides. CRC Press. Boca Raton. Florida. USA.
- Zalom, F.G., L.T. Wilson and R. Smith. 1983. Oviposition patterns by several lepidopterus pests on processing tomatoes in California. Environ. Entomol. 12: 1133-1137.
- Zehnder, G.W., E.J. Sikora and W.R. Goodman. 1995. Treatment decisions based on egg scouting for tomato fruitworm, *Helicoverpa zea* (Boddie), reduce insecticide use in tomato. Crop Protection 14: 683-687.

Cuadro 1.- Mortalidad y concentración letal 50% (CL₅₀) y 90% (CL₉₀), en larvas de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith y *Helicoverpa zea* (Boddie) tratadas con dieta artificial mezclada con un extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus*.

Tratamiento	Mortalidad (%) ± EE	
	<i>Spodoptera frugiperda</i> ¹	<i>Helicoverpa zea</i> ¹
Testigo	0.0±0.0 d	0.0±0.0 e
0.2 5	6.25±3.6 c	18.75±1.4 d
0.5	12.5±5.1 c	31.7±5.7dc
1	31.3±2.16 b	27.5±5.2 bcd
2	37.7±0.75 b	50.0±10.2 abc
4	43.5±2.9 b	56.2±7.4 ab
8	100±0.0 a	68.7±10.8 a
n [†]	200	200
b± ES [¶]	2.46 ±0.44	0.85±0.13
CL ₅₀ [§]	1.96	2.29
(95% LC) ^{&}	(0.97-3.80)	(1.51-391.02)
CL ₉₀ [§]	6.53	69.2
(95% LC) ^{&}	(3.47-38.2)	(26.95-43.4)
Pr>χ ^{2Φ}	0.0001	0.0001

EE = error estándar de la media

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra minúscula no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, p≤0.05).

[†]= número total de insectos tratados

[¶]=Pendiente (b) ajuste Probit y Error estándar de la pendiente (ES)

[§]= Concentración letal= g kg⁻¹

[&]= Límites de confianza al 95%

^Φ=Probabilidad de que la línea log Dosis-Probit ajuste a una línea recta.

Cuadro 2.- Índice de actividad antialimentaria (AA) en larvas de tercer instar de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith y *Helicoverpa zea* (Boddie) expuestas a discos foliares tratados con diferentes concentraciones de un extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus* Molina.

Insecto	Concentración (%)	AA promedio \pm EE (%)
<i>S. frugiperda</i>	0.25	37.8 \pm 7.6 b
	0.5	50.1 \pm 1.7ab
	1.0	51.9 \pm 4.51a
	2.0	53.4 \pm 3.9a
	4.0	53.3 \pm 1.89a
	8.0	61.9 \pm 3.01a
<i>H. zea</i>	0.25	0.0 \pm 0.0 c
	0.5	17.3 \pm 5.6 b
	1.0	17.1 \pm 6.4 b
	2.0	42.0 \pm 9.9 ab
	4.0	63.9 \pm 10.8 a
	8.0	69.8 \pm 86.8 a

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

EE = error estándar de la media

Cuadro 3.- Efecto de la inyección de 1 μ L de un extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus* Molina en larvas de quinto instar de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith y *Helicoverpa zea* (Boddie).

Insecto	Concentración (%)	Mortalidad \pm EE (%)	Pupas \pm EE ¹ (%)	Adultos \pm EE ² (%)
<i>S. frugiperda</i>	0.0	--	87.5 \pm 7.21a	100.0 \pm 0.0a
	0.25	50.0 \pm 10.0 c	50.0 \pm 10.0 b	100.0 \pm 0.0a
	0.5	65.0 \pm 16.8 c	35.0 \pm 17.1 b	100.0 \pm 0.0a
	1.0	75.0 \pm 9.5 bc	25.0 \pm 9.57 bc	100.0 \pm 0.0a
	2.0	95.0 \pm 5.0 ab	5.0 \pm 5.0 c	100.0 \pm 0.0a
	4.0	100.0 \pm 0.0 a		
	8.0	100.0 \pm 0.0 a		
<i>H. zea</i>	0.0		90.0 \pm 5.7a	85.0 \pm 5.0 a
	0.25	15.0 \pm 5.0 b	85.0 \pm 5.0a	65.0 \pm 15.0 ab
	0.5	20.0 \pm 8.1 b	80.0 \pm 8.1 a	60.0 \pm 16.3 ab
	1.0	30.0 \pm 10.0 ab	70.0 \pm 10.0ab	60.0 \pm 8.1 abc
	2.0	30.0 \pm 7.0 ab	70.0 \pm 5.7ab	60.0 \pm 11.5 abc
	4.0	40.0 \pm 14.4 ab	60.0 \pm 14.1ab	35.0 \pm 9.57 bc
	8.0	55.0 \pm 9.54 a	45.0 \pm 9.5 b	25.0 \pm 9.57 c

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

EE = error estándar de la media

¹Se considero como 100% el número de larvas inicial

²Se calculó considerando como 100% el número de pupas obtenidas en cada tratamiento

Cuadro 4.- Porcentaje de área foliar dañada de plantas de maíz tratadas con diferentes concentraciones de un extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus* Molina y dosis comercial de Cyflutrina infestadas con larvas por *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith y efecto del extracto en el desarrollo larval.

Concentración (%)	Área foliar dañada (%) ± EE	Larvas Sobrevivientes n ± EE	Tamaño Larvas Sobrevivientes (mm) ± EE	Peso Larvas Sobrevivientes (g) ± EE	Larvas Segundo Instar (%) ± EE	Larvas tercer Instar (%) ± EE	Larvas cuarto Instar (%) ± EE	Larvas quinto Instar (%) ± EE
Testigo	42.1±9.1 a	11.0±0.6 a	13.1±0.5 a	0.033±0.001 a	0.0±0.0 a	22.0±8,3 a	76.0±7.4 a	2.0±2.0 a
1.0	36.3±4.0 a	9.0±1.1 a	12.8±0.4 a	0.032±0.002 a	0.0±0.0 a	39.8±4.3 a	53.1±2.5 a	7.1± 7.1 a
2.0	36.1±1.3 a	8.0±1.5 a	12.8±0.8 a	0.031±0.006 a	0.0±0.0 a	46.8±2.5 a	53.2±9.1 a	0.0±0.0 a
4.0	34.9±1.9 a	8.0±0.7 a	12.2±0.4 a	0.030±0.002 a	0.0±0.0 a	64.2±5.4 a	35.8±3.9 a	0.0±0.0 a
8.0	39.8±7.1 a	7.0±1.4 a	12.1±0.5 a	0.026±0.002 a	2.5±2.5 a	75.2±9.8 a	24.8±3.8 a	0.0±0.0 a
Cyflutrina	3.7±1.0 b	0.0±0.0 b						

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

EE = error estándar de la media

n= Número

Cuadro 5.- Número promedio de masas y total de huevos de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, depositados en plantas de maíz tratadas con diferentes concentraciones de un extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus* Molina y la dosis comercial de Cyflutrina.

Concentración (%)	Masas de huevos				Total de huevos
	2 DDI ¹ n ± EE	3 DDI ¹ n ± EE	4 DDI ¹ n ± EE	5 DDI ¹ n ± EE	n ± EE
Testigo	0.3±0.3 a	2.0±0.6 a	4.7±1.4 a	1.3±0.3 a	772±243 a
1.0	0.0±0.0 a	1.3±0.7 a	2.3±0.9 ab	1.0±0.6 a	502±117 a
2.0	0.0±0.0 a	0.3±0.3 a	0.7±0.3 bc	1.3±0.6 a	238±229 a
4.0	0.0±0.0 a	0.0±0.0 a	0.0±0.0 c	0.0±0.0 a	0.0±0.0 b
8.0	0.0±0.0 a	0.0±0.0 a	0.0±0.0 c	0.0±0.0 a	0.0±0.0 b
Cyflutrina	0.7±0.6 a	1.0±0.5 a	3.0±1.5 ab	0.7±0.6 a	413±229 a

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

EE = error estándar de la media

n= Número

¹DDI= Días Después de la Infestación

Cuadro 6.- Efecto en el ciclo de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith de diferentes concentraciones de un extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus* Molina y dosis comercial de Cyflutrina.

Concentración (%)	Eclosión Huevos (%) \pm EE	Peso Larvas g \pm EE	Pupas (%) \pm EE	Peso Pupa g \pm EE	Adultos (%) \pm EE
Testigo	94.8 \pm 1.8 a	0.53 \pm 0.08 ab	83.3 \pm 3.3 a	0.30 \pm 0.008 a	86.6 \pm 4.2 a
1.0	81.1 \pm 13.2 a	0.47 \pm 0.04 ab	80.0 \pm 5.1 a	0.29 \pm 0.007 a	80.0 \pm 7.3 a
2.0	69.9 \pm 12.6 a	0.32 \pm 0.06 b	56.6 \pm 9.5 a	0.27 \pm 0.007 a	66.0 \pm 4.2 ab
Cyflutrina	87.8 \pm 5.1 a	0.67 \pm 0.09 a	80.0 \pm 7.3 a	0.32 \pm 0.02 a	46.6 \pm 11.1 b

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

EE = error estándar de la media

Cuadro 7.- Número promedio de oviposturas de *Helicoverpa zea* (Boddie) en plantas de *Lycopersicon scullentum* tratadas con diferentes concentraciones de un extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus* Molina y dosis comercial de Cyflutrina.

Concentración (%)	2 DDI ¹ n ± EE	3 DDI ¹ n ± EE	4 DDI ¹ n ± EE	5 DDI ¹ n ± EE	Total n ± EE
Testigo	6.6±5.2 a	11.6±10.1 a	26.0±17.1 a	2.33±2.33 a	46.6±16.5a
1.0	3.0±1.4 ab	0.0±0.0 a	2.33±1.85 b	1.3±12.5a	6,6±0.3 b
2.0	1.3±1.0 ab	0.0±0.0 a	2.33±2.33b	4.3± 4.3a	8.0±4.1 b
4.0	1.0±0.7 ab	0.0±0.0 a	0.0±0.0 b	0.0±0.0 a	1.0±1.0 b
8.0	0.0±0.0 b	0.0±0.0 a	0.0±0.0 b	0.0±0.0 a	0.0±0.0 b
Cyflutrina	5.0±3.6 ab	1±0.5 a	12.0±2.0 ab	5.3±2.7a	23.3±8.7 a

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

EE = error estándar de la media

¹DDI= Días Después de la Infestación

CONCLUSIONES GENERALES

El polvo, extracto en cloruro de metileno y aceite esencial de *Peumus boldus* Molina presentan toxicidad sobre larvas neonatas y de tercer instar de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) y *Helicoverpa zea* Boddie.

El polvo, extracto en cloruro de metileno y aceite esencial de *Peumus boldus* Molina alargan el ciclo de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) y *Helicoverpa zea* Boddie.

El polvo, extracto en cloruro de metileno y aceite esencial de *Peumus boldus* Molina tienen efecto antialimentario en larvas neonatas y de tercer instar de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) y *Helicoverpa zea* Boddie.

La mezcla de la dieta con polvos, extractos o aceite esencial de *Peumus boldus* Molina reduce el tamaño y peso de las larvas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) y *Helicoverpa zea* Boddie.

El aceite esencial y el extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus* Molina producen malformaciones de larvas y adultos de *Helicoverpa zea* Boddie.

El extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus* Molina no reduce de manera significativa el daño foliar de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) a las plantas de maíz.

El extracto en cloruro de metileno de *Peumus boldus* Molina en altas concentraciones reduce la oviposición de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) y *Helicoverpa zea* Boddie.