

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION
ESCUELA DE POSGRADUADOS

RECIBIDO

"EFECTOS DE EXTRACTOS VEGETALES SOBRE LARVAS DE
Hypsipyla grandella (ZELLER) Y SU SISTEMICIDAD EN ÁRBOLES DE CEDRO"

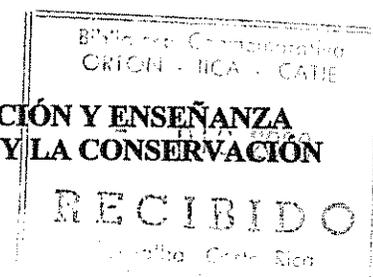
POR

FRANCISCO SOTO MONTERROSA

CATIE

Turrialba, Costa Rica
2000

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE EDUCACIÓN PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACIÓN
ESCUELA DE POSGRADUADOS



**EFFECTOS DE EXTRACTOS VEGETALES SOBRE
LARVAS DE *Hypsipyla grandella* (ZELLER) Y
SU SISTEMICIDAD EN ÁRBOLES DE CEDRO**

Tesis sometida a la consideración de la Escuela de Posgrado, Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza y como requisito parcial para optar por el grado de:

Magister Scientiae

Por
Francisco Soto Monterrosa

Turrialba, Costa Rica
Diciembre, 2000

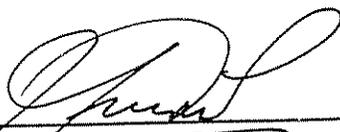
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y la Escuela de Posgraduados del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:



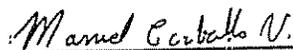
Luko Hilje, Ph.D.
Consejero Principal



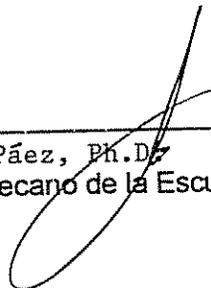
Gerardo Mora, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



María Elena Aguilar, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



Manuel Carballo, M.Sc.
Miembro Comité Consejero



Gilberto Páez, Ph.D.
Director y Decano de la Escuela de Posgraduados



Francisco Soto
Candidato

*A la naturaleza,
por regalarnos
la belleza y la vida de un árbol,
por sorprendernos
con la misteriosa estrategia de un insecto,
y por esconder nuestra armonía
en las primitivas moléculas del bosque*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luko Hilje, coordinador académico de nuestra maestría y mi profesor consejero, por su esfuerzo, ayuda y enseñanzas, por sus excelentes cualidades como profesor, investigador y ser humano, y por invitarme a trabajar con él y con *Hypsipyla grandella*.

Al Dr. Gerardo Mora, director de CIPRONA y miembro del Comité Consejero, por brindar la indispensable ayuda para la obtención de los extractos vegetales, y por sus importantes comentarios y valiosos aportes para esta investigación.

A la Dra. María Elena Aguilar, directora de la Unidad de Biotecnología del CATIE y miembro del Comité Consejero, por poner a disposición el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y por sus claras instrucciones y valiosos aportes en estas prácticas.

Al M.Sc. Manuel Carballo, investigador de la Unidad de Fitoprotección y miembro del Comité Consejero, por sus acertadas sugerencias y su sincero apoyo en momentos claves de este trabajo.

Al Programa de Becas Japón – BID, por haber financiado mis estudios y esta investigación.

Al Dr. Gilberto Páez, director y decano de nuestra Escuela de Postgrado, por colaborar en la revisión de la parte estadística de la investigación y por estar siempre disponible a escuchar las diversas inquietudes estudiantiles.

Al Sr. Arturo Ramírez, “Arturito” (Laboratorio de Entomología del CATIE), por su eficiente e inteligente trabajo en el mantenimiento de la colonia de *Hypsipyla* y por su desinteresada ayuda en los momentos que más se necesitaba.

Al Sr. Juan Carlos Brenes (Laboratorio de CIPRONA), por realizar arduamente el laborioso trabajo de extracción y fraccionamiento de los materiales vegetales.

Al Sr. Edgard Esquivel (Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CATIE), por sus valiosas instrucciones en las prácticas de cultivo de tejidos y por su desinteresada ayuda en el mantenimiento del cultivo.

Al Lic. Johny Pérez, analista de la Unidad de Bioestadística del CATIE, por su valiosa ayuda y su excelente trabajo en los análisis estadísticos de esta investigación.

Al personal administrativo de la Escuela de Postgrado.

Al personal de la Biblioteca Conmemorativa Orton.

A todas las personas que de cualquier forma colaboraron y brindaron su ayuda intelectual o logística para la realización de esta investigación y este documento: Dr. Bernal Valverde, M.Sc. Roger Villalobos, Ing. Rafael Ocampo, Sr. Arturo Gamboa, Sr. Guido Sanabria, Ing. Juan L. Ortiz, Ing. Alfredo Caballero, Lic. Rigoberto Aguilar, Sra. Rosemary Garro, Sra. Giselle Alvarado, Sr. Claudio Arroyo, Ing. Jeffrey Venegas y Sr. Carlos Fuentes.

A mi madre, Eva, por el esfuerzo de toda una vida y por la educación que me obsequió.

CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
CONTENIDO	v
RESUMEN	vii
SUMMARY	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ANEXOS	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	2
1.1.1. Objetivo general	2
1.1.2. Objetivos específicos	2
1.2. Hipótesis	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Importancia económica	4
2.2. Patrones de comportamiento	5
2.3. Abundancia estacional	9
2.4. Antecedentes del manejo de <i>H. grandella</i>	9
2.5. Potencial de manejo mediante repelentes y disuasivos	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Localización	16
3.2. Selección y preparación de los extractos vegetales	16
3.3. Larvas de <i>H. grandella</i>	18
3.4. Tratamientos y diseño experimental	18
3.4.1. Efecto fagodisuasivo de las fracciones de <i>Q. amara</i>	19

3.4.2. Sistemicidad de extractos con actividad biológica sobre <i>H. grandella</i>	22
3.5. Variables de respuesta	24
3.6. Análisis estadístico	25
4. RESULTADOS	28
4.1. Efecto fagodisuasivo de las fracciones de <i>Q. amara</i>	28
4.1.1. Bioanálisis general de laboratorio	28
4.1.2. Experimento de invernadero	31
4.1.3. Bioanálisis específicos de laboratorio	41
4.2. Sistemicidad de extractos con actividad biológica sobre <i>H. grandella</i>	44
5. DISCUSIÓN	56
6. CONCLUSIONES	68
7. RECOMENDACIONES	69
8. LITERATURA CITADA	70
9. ANEXOS	78

Soto, F. 2000. Efectos de extractos vegetales sobre larvas de *Hypsipyla grandella* (Zeller) y su sistemicidad en árboles de cedro. Tesis Mag. Sci., CATIE, Turrialba, Costa Rica. 104 p.

Palabras claves: *Hypsipyla grandella*, Meliaceae, extractos vegetales, fracciones, fagodisuasión, efecto insecticida, actividad sistémica.

RESUMEN

Se estudió el efecto fagodisuasivo de las fracciones acuosa, metanólica y etérea de un extracto de la madera de hombre grande (*Quassia amara*, Simaroubaceae) sobre larvas de *Hypsipyla grandella*, así como la actividad sistémica de extractos de hombre grande, follaje de ruda (*Ruta graveolens*, Rutaceae), frutos de tacaco cimarrón (*Sechium pittieri*, Cucurbitaceae) y un producto comercial (Azatín) derivado de las semillas de nim (*Azadirachta indica*, Meliaceae).

Para el primer tema, se efectuaron varios tipos de experimentos. El primero consistió en un bioanálisis general de laboratorio, exponiendo larvas de instar III a discos foliares de cedro impregnados con las fracciones a varias concentraciones; se utilizó un diseño de bloques al azar, y se realizaron evaluaciones diarias para medir el porcentaje de consumo en los discos, la mortalidad y los efectos en el desarrollo. Este se complementó con un experimento de invernadero, inoculando larvas de instar I en plantas de cedro tratadas con las fracciones, en el brote principal, mediante un diseño completamente al azar que permitió medir los efectos de las larvas sobre las plantas (número de orificios, montículos, brotes caídos y túneles). De ambos experimentos se seleccionaron la fracción metanólica y la etérea, por ser las más promisorias como fagodisuasivas, y se realizó un bioanálisis específico para cada una, con larvas de instar III; éstas se expusieron a discos impregnados con concentraciones crecientes de la fracción metanólica (0,00625, 0,02, 0,0625, 0,2, 0,625%) y de la fracción etérea (0,0014, 0,0044, 0,014, 0,044, 0,14%), mediante un diseño de bloques al azar, y se midió el porcentaje de consumo en los discos y la mortalidad a la primera semana después de la exposición. Se determinó que las fracciones metanólica y etérea fueron fagodisuasivas para las larvas, y que la primera lo hizo a apenas el 0,0625%, mientras que los resultados para la fracción etérea no fueron claros.

Para el segundo tema, se utilizó como herramienta la técnica de cultivo de tejidos, pues los extractos evaluados fueron adicionados a los medios de plantas cultivadas *in vitro*. La actividad sistémica de los extractos evaluados fue determinada mediante bioanálisis, en un diseño completamente al azar. Los extractos se compararon con el carbofurán, que es un insecticida de sistemicidad reconocida sobre larvas de *H. grandella*. Al exponer larvas de instar I a folíolos provenientes de las plantas tratadas, se comprobó un efecto fagodisuasivo en aquellas expuestas al hombre grande, ruda y tacaco cimarrón, y un efecto insecticida en las expuestas al Azatín.

Soto, F. 2000. Effects of plant extracts on *Hypsipyla grandella* (Zeller) larvae and their systemic activity in Spanish cedar trees. Mag. Sci. Thesis, CATIE, Turrialba, Costa Rica. 104 p.

Key words: *Hypsipyla grandella*, Meliaceae, plant extracts, fractions, phagodeterrence, insecticidal effect, systemic activity.

SUMMARY

The phagodeterrent effect of aqueous, methanolic, and ethereal fractions from bitterwood extract (*Quassia amara*, Simaroubaceae) on *Hypsipyla grandella* larvae was studied, as well as the systemic activity of extracts from bitterwood, rue leaf (*Ruta graveolens*, Rutaceae), and tacaco "cimarrón" fruit (*Sechium pittieri*, Cucurbitaceae), and of a commercial product (Azatin) derived from neem seeds (*Azadirachta indica*, Meliaceae).

Several types of experiments were performed for the first topic. The first consisted of a general laboratory bioassays, exposing instar III larvae to Spanish cedar leaf disks impregnated with the fractions at different concentrations. A random block design was used and daily evaluations were practiced to measure percentage consumption on disks, mortality, and effects on development. This was complemented with a greenhouse experiment, inoculating instar I larvae in cedar plants treated with fractions, at the terminal bud through a completely random design that allowed to measure the effects of larvae on plants (number of orifices, mounds, fallen buds, and tunnels). Methanolic and ethereal fractions were selected from both experiments as being the most promising phagodeterrents and specific bioassays were performed for each, with instar III larvae. These were exposed to disks impregnated with increasing concentrations of the methanolic fraction (0.00625, 0.02, 0.0625, 0.2, 0.625%) and of the ethereal fraction (0.0014, 0.0044, 0.014, 0.044, 0.14%), through a random block design. Percentage consumption on disks and mortality to first week after exposure were measured. Methanolic and ethereal fractions were determined to be phagodeterrent to larvae, and the former did so at just 0.0625%, while results for the ethereal fraction were not clear.

For the second topic, tissue culture technique was used as the tool, as extracts evaluated were added to the media of *in vitro* culture plants. Systemic activity of extracts evaluated was determined through bioassays, in a completely random design. Extracts were compared with carbofuran, which is an insecticide of renown systemic activity on *H. grandella* larvae. In exposing instar I larvae to leaves from treated plants, a phagodeterrent effect was evidenced in those exposed to bitterwood, rue, and tacaco "cimarrón", and also an insecticidal effect on those exposed to Azatin.

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Porcentaje promedio de consumo en discos foliares de cedro impregnados con las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> , al exponer larvas de instar III de <i>H. grandella</i> , durante 24 h.	29
Figura 2	Duración promedio (en días) de los instares IV y V y la pupa, para larvas de <i>H. grandella</i> expuestas a las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> , durante el instar III.	29
Figura 3	Peso promedio de las pupas provenientes de larvas de <i>H. grandella</i> expuestas a las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> , durante el instar III.	30
Figura 4	Número de días transcurridos desde el inicio del experimento hasta la emergencia de los adultos provenientes de larvas de <i>H. grandella</i> expuestas a las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> , durante el instar III.	30
Figura 5	Porcentaje de mortalidad acumulada de larvas de <i>H. grandella</i> , durante los primeros siete días del experimento, luego de su exposición a discos foliares de cedro tratados con las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> , durante 24 h.	32
Figura 6	Porcentaje de mortalidad total en larvas de <i>H. grandella</i> expuestas a discos foliares de cedro tratados con las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> , durante 24 h y en el instar III.	32
Figura 7	Porcentaje promedio de adultos de <i>H. grandella</i> emergidos, provenientes de larvas expuestas a discos foliares tratados con las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> , durante 24 h y en el instar III.	33
Figura 8	Número promedio de orificios encontrados en plantas de cedro, tratadas con las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> , dos días después de la inoculación con larvas de instar I de <i>H. grandella</i> .	33
Figura 9	Número promedio de montículos (resultado de tres evaluaciones), encontrados en plantas de cedro tratadas con las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> e inoculadas con larvas de instar I de <i>H. grandella</i> .	35
Figura 10	Número promedio de montículos encontrados en plantas de cedro, tratadas con las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> , dos días (A), una semana (B) y dos semanas (C) después de la inoculación con larvas de instar I de <i>H. grandella</i> .	36
Figura 11	Número promedio de brotes caídos (resultado de tres evaluaciones), encontrados en plantas de cedro tratadas con las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> e inoculadas con larvas de instar I de <i>H. grandella</i> .	37
Figura 12	Número promedio de brotes caídos en plantas de cedro, tratadas con las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> , dos días (A), una semana (B) y dos semanas (C) después de la inoculación con larvas de instar I de <i>H. grandella</i> .	39
Figura 13	Número promedio de túneles encontrados en los estratos superior e inferior de plantas de cedro tratadas con las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> , cuatro semanas después de la inoculación con larvas de instar I de <i>H. grandella</i> .	40

Figura 14	Longitud promedio de los túneles encontrados en los estratos superior e inferior de plantas de cedro tratadas con las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> , cuatro semanas después de la inoculación con larvas de instar I de <i>H. grandella</i> .	40
Figura 15	Porcentaje promedio de consumo en discos foliares de cedro tratados con concentraciones crecientes de la fracción metanólica del extracto de <i>Q. amara</i> , al exponer larvas de instar III de <i>H. grandella</i> , durante 24 h.	42
Figura 16	Relación entre el consumo de discos foliares de cedro, por larvas de instar III de <i>H. grandella</i> , y concentraciones crecientes del extracto crudo de <i>Q. amara</i> relativas a las concentraciones de la fracción metanólica. La línea continua muestra la tendencia teórica esperada.	42
Figura 17	Porcentaje de mortalidad acumulada de larvas de <i>H. grandella</i> , durante los primeros siete días del experimento, luego de su exposición a discos foliares de cedro tratados con concentraciones crecientes de la fracción metanólica del extracto de <i>Q. amara</i> , durante 24 h y en el instar III.	43
Figura 18	Relación entre el porcentaje de mortalidad, al segundo día después de iniciado el consumo de discos foliares de cedro tratados con concentraciones crecientes de la fracción metanólica del extracto de <i>Q. amara</i> , y el porcentaje de consumo de dichos discos por larvas de instar III de <i>H. grandella</i> .	45
Figura 19	Porcentaje promedio de consumo en discos foliares de cedro tratados con concentraciones crecientes de la fracción etérea del extracto de <i>Q. amara</i> , al exponer larvas de instar III de <i>H. grandella</i> , durante 24 h.	45
Figura 20	Porcentaje de mortalidad acumulada de larvas de <i>H. grandella</i> , durante los primeros siete días del experimento, luego de su exposición a discos foliares de cedro tratados con concentraciones crecientes de la fracción etérea del extracto de <i>Q. amara</i> , durante 24 h y en el instar III.	46
Figura 21	Porcentaje promedio de consumo (resultado de tres evaluaciones) en folíolos provenientes de plantas cultivadas <i>in vitro</i> en medios con diferentes extractos vegetales, al exponer larvas de instar I de <i>H. grandella</i> , durante 24 h.	48
Figura 22	Porcentaje promedio de consumo en folíolos provenientes de plantas de cedro cultivadas <i>in vitro</i> en medios con diferentes extractos vegetales, al exponer larvas de instar I de <i>H. grandella</i> , durante 24 h, y para las evaluaciones realizadas tres días (A), una semana (B) y dos semanas (C) después de la siembra.	49
Figura 23	Porcentaje promedio de mortalidad acumulada (resultado de tres evaluaciones) de larvas de <i>H. grandella</i> , durante los primeros siete días de cada experimento, luego de su exposición a folíolos provenientes de plantas de cedro cultivadas <i>in vitro</i> en medios con diferentes extractos vegetales.	50

Figura 24	Porcentaje de mortalidad acumulada de larvas de <i>H. grandella</i> , durante los primeros siete días de cada experimento, luego de su exposición a folíolos provenientes de plantas de cedro cultivadas <i>in vitro</i> en medios con diferentes extractos vegetales, y tomados tres días (A), una semana (B) y dos semanas (C) después de la siembra.	52
Figura 25	Porcentaje de mortalidad total (promedio de tres evaluaciones) de larvas de <i>H. grandella</i> expuestas a folíolos provenientes de plantas de cedro cultivadas <i>in vitro</i> en medios con diferentes extractos vegetales, durante 24 h y en el instar I.	54
Figura 26	Porcentaje de mortalidad total de larvas de <i>H. grandella</i> expuestas a folíolos provenientes de plantas de cedro cultivadas <i>in vitro</i> en medios con diferentes extractos vegetales, y para las evaluaciones realizadas tres días (A), una semana (B) y dos semanas (C) después de la siembra.	55

LISTA DE ANEXOS

		Pág.
Anexo 1	Ingredientes y preparación de la dieta artificial para las larvas de <i>Hypsipyla grandella</i> .	79
Anexo 2	Cálculo de las concentraciones de las fracciones (RxC) del extracto de <i>Q. amara</i> preparadas para los bioanálisis de laboratorio.	80
Anexo 3	Porcentajes promedio de consumo en discos foliares de cedro impregnados con las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> , al exponer larvas de instar III de <i>H. grandella</i> , durante 24 h.	81
Anexo 4	Duración promedio (en días) de los instares IV y V y de la pupa, para larvas de <i>H. grandella</i> expuestas a las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> , durante el instar III.	82
Anexo 5	Peso promedio de las pupas provenientes de larvas de <i>H. grandella</i> expuestas a las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> , durante el instar III.	83
Anexo 6	Número de días transcurridos desde el inicio del experimento hasta la emergencia de los adultos provenientes de larvas de <i>H. grandella</i> expuestas a las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> , durante el instar III.	83
Anexo 7	Porcentaje de mortalidad acumulada de larvas de <i>H. grandella</i> , durante los primeros siete días del experimento, luego de su exposición a discos foliares de cedro tratados con las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> , durante 24 h y en el instar III.	84
Anexo 8	Porcentaje de mortalidad total en larvas de <i>H. grandella</i> expuestas a discos foliares de cedro tratados con las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> , durante 24 h y en el instar III.	85
Anexo 9	Porcentaje promedio de adultos de <i>H. grandella</i> emergidos, provenientes de larvas expuestas a discos foliares de cedro tratados con las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> , durante 24 h y en el instar III.	85
Anexo 10	Número promedio de orificios encontrados en plantas de cedro tratadas con las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> , dos días después de la inoculación con larvas de instar I de <i>H. grandella</i> .	86
Anexo 11	Número promedio de montículos (resultado de tres evaluaciones), encontrados en plantas de cedro tratadas con las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> e inoculadas con larvas de instar I de <i>H. grandella</i> .	86
Anexo 12	Número promedio de montículos, para cada una de las evaluaciones, encontrados en plantas de cedro tratadas con las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> e inoculadas con larvas de instar I de <i>H. grandella</i> .	87
Anexo 13	Número promedio de brotes caídos (resultado de tres evaluaciones), encontrados en plantas de cedro tratadas con las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> e inoculadas con larvas de instar I de <i>H. grandella</i> .	88

Anexo 14	Número promedio de brotes caídos, para cada una de las evaluaciones, encontrados en plantas de cedro tratadas con las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> e inoculadas con larvas de instar I de <i>H. grandella</i> .	89
Anexo 15	Número promedio de túneles (por planta) encontrados en los estratos superior e inferior de plantas de cedro tratadas con las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> , cuatro semanas después de la inoculación con larvas de instar I de <i>H. grandella</i> .	90
Anexo 16	Número promedio de larvas o pupas de <i>H. grandella</i> (por planta) encontradas en los estratos superior e inferior de plantas de cedro tratadas con las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> , cuatro semanas después de la inoculación con larvas de instar I de <i>H. grandella</i> .	91
Anexo 17	Longitud promedio de los túneles encontrados en los estratos superior e inferior de plantas de cedro tratadas con las diferentes fracciones del extracto de <i>Q. amara</i> , cuatro semanas después de la inoculación con larvas de instar I de <i>H. grandella</i> .	92
Anexo 18	Porcentaje promedio de consumo en discos foliares de cedro impregnados con concentraciones crecientes de la fracción metanólica del extracto de <i>Q. amara</i> , al exponer larvas de instar III de <i>H. grandella</i> , durante 24 h.	93
Anexo 19	Porcentaje de mortalidad acumulada de larvas de <i>H. grandella</i> , durante los primeros siete días del experimento, luego de su exposición a discos foliares de cedro tratados con concentraciones crecientes de la fracción metanólica del extracto de <i>Q. amara</i> , durante 24 h y en el instar III.	94
Anexo 20	Porcentaje promedio de consumo en discos foliares de cedro impregnados con concentraciones crecientes de la fracción etérea del extracto de <i>Q. amara</i> , al exponer larvas de instar III de <i>H. grandella</i> , durante 24 h.	95
Anexo 21	Porcentajes de mortalidad acumulada de larvas de <i>H. grandella</i> , durante los primeros siete días del experimento, luego de su exposición a discos foliares de cedro tratados con concentraciones crecientes de la fracción etérea del extracto de <i>Q. amara</i> , durante 24 h y en el instar III.	96
Anexo 22	Porcentaje promedio de consumo (resultado de tres evaluaciones) en folíolos provenientes de plantas cultivadas <i>in vitro</i> en medios con diferentes extractos vegetales, al exponer larvas de instar I de <i>H. grandella</i> , durante 24 h.	97
Anexo 23	Porcentaje promedio de consumo en folíolos provenientes de plantas de cedro cultivadas <i>in vitro</i> en medios con diferentes extractos vegetales, al exponer larvas de instar I de <i>H. granella</i> , durante 24 h, y para las evaluaciones realizadas tres días, una semana y dos semanas después de la siembra de las plantas en los medios.	98

Anexo 24	Porcentaje promedio de mortalidad acumulada (resultado de tres evaluaciones) de larvas de <i>H. grandella</i> , durante los primeros siete días de cada experimento, luego de su exposición a folíolos provenientes de plantas de cedro cultivadas <i>in vitro</i> en medios con diferentes extractos vegetales.	99
Anexo 25	Porcentaje de mortalidad promedio acumulada de larvas de <i>H. grandella</i> , durante los primeros siete días del experimento, luego de su exposición a folíolos provenientes de plantas de cedro cultivadas <i>in vitro</i> en medios con diferentes extractos vegetales, y tomados tres días después de realizada la siembra.	100
Anexo 26	Porcentaje de mortalidad promedio acumulada de larvas de <i>H. grandella</i> , durante los primeros siete días del experimento, luego de su exposición a folíolos provenientes de plantas de cedro cultivadas <i>in vitro</i> en medios con diferentes extractos vegetales, y tomados una semana después de realizada la siembra.	101
Anexo 27	Porcentaje de mortalidad promedio acumulada de larvas de <i>H. grandella</i> , durante los primeros siete días del experimento, luego de su exposición a folíolos provenientes de plantas de cedro cultivadas <i>in vitro</i> en medios con diferentes extractos vegetales, y tomados dos semanas después de realizada la siembra.	102
Anexo 28	Porcentaje promedio de mortalidad total (resultado de tres evaluaciones) de larvas de <i>H. grandella</i> expuestas a folíolos provenientes de plantas cultivadas <i>in vitro</i> en medios con diferentes extractos vegetales, durante 24 h y en el insta I.	102
Anexo 29	Porcentaje de mortalidad total de larvas de <i>H. grandella</i> , expuestas a folíolos provenientes de plantas de cedro cultivadas <i>in vitro</i> en medios con diferentes extractos vegetales, y para las evaluaciones realizadas tres días, una semana y dos semanas después de la siembra de las plantas en los medios.	104

1. INTRODUCCIÓN

Los bosques naturales en los trópicos han sido objeto de los cambios acelerados en los decenios anteriores. El incremento de la población humana, acompañado de las tecnologías modernas y la globalización de los mercados, junto a otros factores, ha resultado en una pérdida anual de 17 millones de hectáreas de bosque y en una degradación de más del doble de esta área perdida (FAO 1990).

Varias especies neotropicales de la familia Meliaceae, pertenecientes a los géneros *Carapa*, *Cedrela* y *Swietenia*, ofrecen madera de gran valor comercial, por lo que en los últimos años sus reservas naturales han disminuido rápidamente debido a la explotación intensiva y a la tala de los bosques para la agricultura y la ganadería (Becker 1973a). En 1992 y 1994, la caoba (*Swietenia macrophylla* King) fue propuesta para su inclusión en la lista de especies de CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species*) y aunque no necesariamente se encuentra amenazada de extinción, podría llegar a estarlo si el comercio de su madera no es regulado para que se realice en forma compatible con su sobrevivencia y conservación (Snook 1996).

Una solución para disminuir la presión sobre los bosques naturales, es optar por el establecimiento de plantaciones forestales. Sin embargo, aunque se ha intentado establecer plantaciones de caobas y cedros en varios países latinoamericanos desde hace más de un siglo (Newton *et al.* 1993), la mayoría de estos intentos han fracasado debido a los daños provocados por la larva del microlepidóptero *Hypsipyla grandella* (Zeller) (Pyrallidae) en los brotes jóvenes de las plantas (Becker 1973a). Lo anterior ha impedido que esta solución de manejo de dichas especies sea aplicada a escala comercial en el neotrópico (Newton *et al.* 1993).

Aunque se han investigado varias opciones para el manejo de esta plaga (Grijpma 1973a, Whitmore 1976a, 1976b, Newton *et al.* 1993), sus resultados son poco factibles en términos operativos y económicos. Dado el nivel de tolerancia tan bajo, de apenas una larva por árbol, se justificaría el empleo de un enfoque preventivo, basado en sustancias que afecten el comportamiento o la fisiología de *H. grandella*.

Sin embargo, aún existe muy poca información sobre el efecto disuasivo de productos de origen vegetal sobre *H. grandella*. Mancebo (2000a, c), al evaluar 29 tipos de extractos, documentó un fuerte

efecto fagodisuasivo sobre larvas de *H. grandella* de los extractos alcohólicos de la madera y el follaje del hombre grande (*Quassia amara*, Simaroubaceae). Tanto la madera como el follaje de *Q. amara* contienen cuasinoídes, entre los que destacan la cuasina y neocuasinas (Polonsky 1973), y es posible que estas u otras sustancias actúen como disuasivos de la alimentación o la oviposición en algunos insectos. Estos resultados sugieren además la necesidad de evaluar los efectos de las fracciones de la madera y el follaje de *Q. amara* como fagodisuasivos de las larvas de *H. grandella*.

Mancebo (2000b, d) también reportó la actividad biológica del follaje de la ruda (*Ruta graveolens*, Rutaceae) y del fruto del tacaco cimarrón (*Sechium pittieri*, Cucurbitaceae), como también de algunas formulaciones comerciales del nim (*Azadirachta indica*, Meliaceae), entre otros, sobre larvas de instar III de *H. grandella*. Se hace necesario, entonces, evaluar el comportamiento sistémico de estos extractos vegetales en plantas de cedro como fundamento científico para, eventualmente, promover la utilización de extractos en forma rústica o semirústica, como se hace actualmente con el nim (*Azadirachta indica*, Meliaceae) en varios países (Schmutterer *et al.* 1980, 1984, 1987).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Evaluar el efecto fagodisuasivo de varias fracciones de un extracto de la madera de *Quassia amara*, así como la capacidad de sistémica de éste y de otros extractos vegetales, para fundamentar su posible utilización dentro de programas de manejo integrado de *Hypsipyla grandella*.

1.1.2 Objetivos específicos

- a. Determinar si las larvas de *H. grandella* muestran fagodisuasión en respuesta a varias fracciones de un extracto de la madera de *Q. amara*.
- b. Establecer la dosis mínima a la cual cada una de las fracciones de *Q. amara* causaría fagodisuasión en las larvas de *H. grandella*.

- c. Documentar la actividad sistémica de un extracto de la madera de *Q. amara*, así como de otros extractos vegetales que causan efectos adversos sobre las larvas de *H. grandella*.

1.2 HIPÓTESIS

- a. Algunas sustancias presentes en diferentes fracciones de un extracto de la madera de *Q. amara* actúan como fagodisuasivas en las larvas de *H. grandella*.
- b. El efecto fagodisuasivo sobre las larvas de *H. grandella* depende de la concentración de cada fracción de *Q. amara*.
- c. Las sustancias presentes en un extracto de la madera de *Q. amara* y en otros extractos vegetales, y que causan efectos adversos sobre las larvas de *H. grandella*, tienen actividad sistémica en plantas de cedro.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia económica

La caoba y el cedro, pertenecientes a los géneros *Swietenia* y *Cedrela*, respectivamente, pertenecen a la familia Meliaceae y tienen su distribución natural limitada exclusivamente a América Latina y las islas del Caribe. Son dos especies forestales cuyas maderas tienen un prestigio mundial y están bien cotizadas en el mercado internacional. (Grijpma y Ramalho 1969). González (1973) describe a la madera de estas especies como fácil de secar y de trabajar, moderadamente o muy durable, dimensionalmente estable y de figura atractiva, a menudo realmente bella.

No obstante el alto valor económico que tienen estas especies para el continente, ha sido virtualmente imposible, hasta el momento, cultivarlas económicamente en plantaciones en América Latina, debido a los frecuentes ataques de la larva de *H. grandella*, que barrena varias partes del árbol, y principalmente los brotes. Los daños causados son generalmente la muerte del brote terminal y, en consecuencia, la formación de numerosos brotes secundarios que producen deformaciones del tronco. Los repetidos ataques disminuyen también el crecimiento, o incluso pueden causar la muerte de árboles jóvenes (Grijpma y Ramalho 1969, Becker 1973a).

H. grandella tiene una distribución muy amplia en el continente americano, desde Florida (EE. UU.) hasta Argentina, incluyendo las islas del Caribe. Se ha registrado en Argentina, Barbados, Belice, Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, EE. UU., Granada, Guatemala, Guyana, Haití, Honduras, Jamaica, Martinica, México, Panamá, Paraguay, Perú, Puerto Rico, Surinam, Trinidad, Tobago y Venezuela (Becker 1973a). La larva puede atacar al menos las siguientes 17 especies de la familia Meliaceae: *Cedrela mexicana*, *C. odorata*, *C. angustifolia*, *C. tonduzii*, *C. salvadorensis*, *C. fissilis*, *C. lilloi*, *C. tubiflora*, *Swietenia macrophylla*, *S. mahagoni*, *Carapa guianensis*, *C. procera*, *Guarea caoba*, *G. trichilioides*, *Khaya senegalensis*, *K. nyasica* y *Trichilia sp.* (Becker 1973a). Entre ellas sobresalen, por su alto valor económico, las caobas (*Swietenia spp.*) y los cedros (*Cedrela spp.*).

Aunque las caobas y cedros podrían alcanzar hasta 40 m de altura y diámetros de hasta 2 m bajo condiciones favorables (Pennington y Styles, en Newton *et al.* 1993), ello pocas veces es posible, ya que el ataque del insecto generalmente se presenta desde el estado de plántula. Además, debido a

que el nivel de tolerancia de daño se alcanza con apenas una larva por árbol, y a que la fecundidad de la hembra es de 200-300 huevos (Grijpma 1971, Samaniego y Sterringa 1976), los cuales deposita en grupos de 1-3 por árbol (Grijpma 1974, en Newton *et al.* 1993), bastan pocas hembras para infestar toda una plantación.

Estas situaciones han desestimulado la siembra de caoba y cedro en todo el continente. Por ejemplo, como resultado del ataque de *H. grandella*, los intentos de reforestación con meliáceas fueron abandonados en Puerto Rico, pues entre 1935 y 1943 unos 835.000 árboles de caoba y 1.000.000 de cedro fueron destruidos por el ataque de este insecto; en Guatemala fueron diezmadas 250 ha de dichas especies, en plantaciones de dos años de edad; en Perú, fueron atacadas plantaciones de cuatro meses de edad, en 10% para caoba y 60% para cedro; en Cuba, el 90% de 1.800.000 plántulas de cedro vendidas a productores, murió como consecuencia de sus ataques (Newton *et al.* 1993).

2.2 Patrones de comportamiento

Un conocimiento más completo del comportamiento de selección del hospedante para *H. grandella*, podría revelar nuevas posibilidades de métodos de manejo basados en su manipulación, por ejemplo mediante sustancias que alteren algunos aspectos etológicos. Por ejemplo, Grijpma y Gara (1970a, 1970b) y Ramírez (1964) estudiaron el comportamiento de *H. grandella* con relación a la selección del hospedante, oviposición y vuelo de los adultos y a las preferencias alimentarias de las larvas.

Se cree que las hembras adultas seleccionan a sus nuevos hospedantes durante la noche, pues el insecto es de hábitos nocturnos. Algunas observaciones indican que una hembra coloca entre uno y siete huevos cada vez, aunque lo más común es que coloque dos o tres, sobre uno o varios árboles; ellas pueden repetir la oviposición durante varias noches (Ramírez 1964). Los huevos tienen forma elíptica y aplastada, y su corion es arrugado; son amarillo pálido cuando frescos y rojos después de 24 h de colocados (Becker 1973a).

La hembra adhiere los huevos en la superficie de los folíolos o del tallo con una sustancia que segrega en sus glándulas coleteriales. El corion de los huevos ya eclosionados puede persistir adheridos al árbol durante varias semanas (Ramírez 1964). Becker (1973a) observó que en las plantas jóvenes la oviposición ocurre a lo largo de los tallos, en el pecíolo de las hojas y en los

folíolos, generalmente cerca de las venas; además, en los árboles adultos ocurre en las ramas jóvenes, aunque también en los frutos, durante la época seca y al final del desarrollo de éstos. Ramírez (1964) indica que pueden ser colocados en cualquier parte en el tallo, y especialmente cerca de las axilas y en las cicatrices de las hojas caídas, aunque excepcionalmente aparecen en o cerca de la yema terminal. Asimismo, los huevos pueden ser depositados muy cerca del suelo, sobre plantas herbáceas alrededor del tronco y hasta en los ápices de hojas de las hierbas que están en contacto con el tronco del árbol. Aparentemente, las hembras prefieren depositar sus huevos sobre el tallo durante los primeros días de la oviposición y después lo hacen sobre los folíolos (Ramírez 1964).

La eclosión de los huevos es más frecuente durante las primeras horas de la noche. Las larvas comen parte del corion al emerger, y las que nacen en las hojas prueban en varios lugares del folíolo, penetrando a veces en la nervadura principal de éste, o en el raquis de la hoja donde suelen permanecer 2-4 días, antes de trasladarse al tallo. Otras larvas penetran en el tallo directamente, sin atacar previamente las hojas. Al emerger, las larvas comienzan a caminar alimentándose un tanto al azar en diferentes puntos, hasta encontrar un sitio propicio para penetrar, el cual generalmente es la yema terminal; también puede ser alguna yema lateral o la cicatriz reciente de una hoja caída. En apenas un minuto, una larva recién emergida puede recorrer largas distancias en el árbol (Ramírez 1964).

Grijpma y Gara (1970b) y Grijpma (1973b) demostraron que las larvas de *H. grandella* prefieren alimentarse de hospedantes nativos. Cuando en sus experimentos observaron larvas alimentándose de especies meliáceas exóticas, como *Toona ciliata* var. *australis* y *Khaya ivorensis*, o de una especie no meliácea, como *Aucoumea klaineana*, las larvas abandonaban estos hospedantes o morían, porque presumiblemente faltaba un adecuado estímulo gustativo. Además, comprobaron que las hembras reducían su actividad de oviposición debido a compuestos volátiles, y posiblemente tóxicos, provenientes de *T. ciliata*.

Es muy difícil observar el ataque de una larva durante los dos primeros días. Al inicio del ataque la larva hace un túnel de forma irregular, un poco más ancho que el diámetro de su cuerpo, y luego agranda el túnel, comiendo hacia los lados. Si penetra en el raquis de la hoja, profundiza unos 4 mm en 48 h, pero si ataca directamente el tallo penetra apenas unos 2 mm y luego procura ampliar el diámetro del túnel (Ramírez 1964).

A las 72 h de emergencia, la larva completa el primer instar, mide unos 5 mm de longitud y ha penetrado hasta 1,2 cm de profundidad; su orificio de entrada es de 1,5 mm de diámetro, en un ápice tierno y delgado. Una larva de 2,5-3 cm de longitud puede barrenar 2,8 cm del tallo, diariamente. Por lo general, los túneles completos pueden medir 10-30 cm, según el diámetro y edad del tallo. Cuando los ataques no se producen en la yema apical, sino en una yema axilar, la larva hace un túnel de 4-5 cm hacia arriba y después barrena hacia abajo. Las larvas se alimentan hasta consumir todos los tejidos internos del tallo, al punto que pueden dejar intacta únicamente la corteza formando una especie de tubo, mientras que en los tallos ya leñosos pueden incluso alcanzar el cambium, dejando casi solamente la epidermis (Ramírez 1964). A veces llegan hasta a circundar completamente el tallo y lo matan de esta manera.

A medida que aumenta el tamaño de la larva, así como la profundidad de la galería, se va acumulando excremento en forma de un polvo fino en el orificio de entrada. Este polvo, que es el resultado de la limpieza que la larva hace en el túnel, se torna más grueso, abundante y visible después de tres días de iniciado el ataque, y protege su entrada de insectos como hormigas y evita el exceso de humedad (Ramírez 1964). Cuando la larva cesa su actividad y está lista para transformarse en pupa, teje su capullo cerca del orificio de entrada u otro orificio secundario que haya abierto al alimentarse; estos orificios secundarios también son cubiertos con excremento y resultan de la alimentación de la larva desde el cilindro central hacia las hojas.

Los adultos emergen durante las primeras horas de la noche, normalmente antes de las 21 h (Ramírez 1964), cuando la cantidad de luz es de 0-15 unidades lux (después de las 18 h) (Sliwa y Becker 1973). Las hembras son fecundadas e inician la oviposición en la misma noche en que emergen (Ramírez 1964). Sliwa y Becker (1973) describen en detalle el comportamiento de post-emergencia, e indican que hay un período de desplazamiento, así como de expansión y secamiento de las alas, unos 10 min a partir de la emergencia, cuando la cantidad de luz es de 0-10 unidades lux (antes de las 19 h).

Después se manifiestan las actividades de llamada, cortejo y cópula, iniciadas por la hembra, que se torna sexualmente activa 5 h después de un período de total oscuridad (0 lux) (Sliwa y Becker 1973). La señal de llamada se expresa como un doblamiento dorsal del abdomen hacia arriba, y entre las alas, a lo cual el macho responde volando hacia la hembra y permaneciendo a 10-15 cm de ella. Tras el cortejo de los machos, la cópula se presenta 6,5-10 h después de iniciado el período total de oscuridad total, la cual ocurre en posición posterior-posterior, permaneciendo así por unas 2

h. Samaniego y Sterringa (1976) demostraron, en pruebas con adultos en cautiverio, que a las 120 h de permanencia en jaulas se logró el 100% de hembras copuladas, aunque desde las 72 h se obtenía el mayor número de huevos fértiles por hembra.

Posteriormente, las hembras de *H. grandella* seleccionan su hospedante, como resultado de una respuesta olfativa a los compuestos volátiles que emanan de las hojas frescas del árbol (Grijpma y Gara 1970a); de hecho, los adultos pueden detectar a su hospedante desde fuera de una plantación de meliáceas. También es posible que las hembras detecten compuestos volátiles que emanan de túneles viejos, hechos en ataques anteriores, en áreas ya infestadas.

Asimismo, *H. grandella* no se dispersa fácilmente desde un área infestada hacia otras, pues existe una estrecha relación entre la emergencia del adulto y la selección de un nuevo hospedante dentro de la misma área infestada. Las experiencias de campo demuestran que una vez que una parcela es invadida por la plaga, la incidencia de la infestación aumenta rápidamente y eventualmente toda la plantación es atacada. Finalmente, cuando la plantación es totalmente destruida, los adultos se dispersan para establecerse en una nueva (Grijpma y Gara 1970a). Aunque es difícil que el insecto se disperse entre árboles que disten más de 10 m uno del otro, puede identificar las plantaciones de cedro y caoba, y es muy raro encontrar una plantación sin ataques (Faurby y Barahona 1998).

Aparentemente, durante el día los adultos descansan en plantas herbáceas cercanas a su hospedante, confundiendo sus alas y los diseños de sus cuerpos con el material vegetal (Grijpma y Gara 1970a). Es prácticamente imposible localizar a las palomillas dentro de una plantación durante el día, y la mejor oportunidad para observarlas es durante la noche, mientras ovipositan. Durante la noche también se da la máxima actividad de vuelo (Ramírez 1964). Además, puesto que los árboles con alturas mayores a 6 m no son seriamente atacados, se puede asumir que el vuelo de selección de hospedantes ocurre a bajas alturas, es decir, las correspondientes a las de las plántulas o de los árboles jóvenes (Grijpma y Gara 1970a). Si *H. grandella* se encuentra presente en grandes cantidades, un mismo árbol puede sufrir 2 a 4 ataques antes de superar la altura de 5 a 6 m a la que ya no se dan los ataques (Faurby y Barahona 1998).

2.3 Abundancia estacional

Aunque el conocimiento de los patrones de abundancia de *H. grandella* podría permitir la predicción de sus picos poblacionales, y optimizar así el manejo de esta plaga, existen pocos estudios confiables y de largo plazo, para determinar dichos patrones.

En realidad, la abundancia de *H. grandella* puede variar durante el año, en respuesta a varios factores, como la precipitación y la radiación solar. En Perú, Dourojeanni (1963) observó que la mayor oviposición ocurre en los meses lluviosos (diciembre-febrero), cuando es más corto el ciclo de vida del insecto y hay gran abundancia de brotes tiernos. Esto fue confirmado por Yamazaki *et al.* (1990), quienes detectaron dos picos poblacionales, coincidentes con el aumento en la cantidad de brotes de cedro y caoba; el daño comenzó a aumentar desde el inicio de la estación lluviosa (septiembre) y alcanzó su nivel máximo en octubre. Durante la época seca, por lo general la población del insecto se mantuvo a niveles bajos.

Esta información en general coincide con las observaciones de otros autores, tanto en Venezuela (Tillmanns 1964) como en Florida (Howard 1991), pero no en Turrialba, Costa Rica, que es una zona sin estacionalidad climática marcada. Allí, Taveras (1999) determinó que la precipitación no fue un factor determinante de la abundancia de *H. grandella*, aunque sí lo fueron la disponibilidad de brotes y la temperatura. De hecho, Taveras (1999) documentó que los picos poblacionales de esta plaga se pueden predecir mediante el método de grados-día, el cual se basa en el requerimiento de temperatura para el crecimiento y desarrollo de los insectos (Pruess 1983). Ella determinó que cada pico está espaciado por 1881 grados-día, lo cual podría permitir la concentración de las medidas de manejo de esta plaga, incluyendo el empleo de repelentes o disuasivos, justo antes de que los picos se presenten (Taveras 1999).

2.4 Antecedentes del manejo de *H. grandella*

En América, el problema principal para la regeneración y establecimiento a gran escala de las especies comerciales de *Cedrela* y *Swietenia* es *H. grandella*. La necesidad de establecer plantaciones comerciales ha promovido estudios para encontrar prácticas de manejo de esta plaga pero, a pesar de considerables esfuerzos de investigación, ningún método de control está actualmente disponible con este fin (Mayhew y Newton 1998).

Sería deseable desarrollar un enfoque y prácticas de manejo integrado de plagas (MIP) (Newton *et al.* 1993, Speight 1996), para lo cual es necesario el conocimiento del comportamiento de alimentación de la larva y de búsqueda por parte de los adultos; del impacto de ataque, umbrales económicos y densidades críticas; de la respuesta del árbol al ataque; de las variaciones genéticas en susceptibilidad entre especies de meliáceas, así como dentro de una misma especie, según el lugar y región geográfica de proveniencia; de la bioquímica de los árboles; y de los agentes de control biológico (Speight 1996).

Los programas de MIP enfatizan el control biológico, el mejoramiento genético y las prácticas silviculturales, acerca de los cuales se ha realizado considerable investigación con *H. grandella* (Grijpma 1973a, Whitmore 1976a, 1976b).

Con respecto al control biológico, Del Pozo (1973) sugirió desde 1968 la utilización de parasitoides, y proporcionaron una lista de enemigos naturales pertenecientes a las familias Braconidae, Chalcididae, Ichneumonidae y Tachinidae. Posteriormente, Becker (1973b) recopiló información sobre 13 especies de parasitoides de las familias Braconidae, Chalcididae y Trichogrammatidae, así como de un nemátodo (Mermithidae). Sin embargo, ellos no controlan de manera eficiente las poblaciones de la plaga cuando se establecen plantaciones con fines comerciales (Newton *et al.* 1993). Asimismo, se destacan las investigaciones sobre el hongo *Metarhizium anisopliae* y la bacteria *Bacillus thuringiensis* como posibles agentes entomopatógenos de *H. grandella* (Berríos 1972, Jiménez 1973, Hidalgo-Salvatierra 1976).

Desde el punto de vista del mejoramiento fitogenético, se ha sugerido que los mayores progresos, en cuanto a resistencia, posiblemente se logren mediante la selección por tolerancia (Chaplin 1980, en Mesén 1999), la cual alude al grado en que un árbol puede crecer aún en presencia de una plaga o en un ambiente adverso manteniendo, a pesar de ello, su valor económico (Zobel y Talbert 1988, en López *et al.* 1997). Newton *et al.* (1995) presentaron evidencias de variación genética en la dominancia apical entre progenies de *C. odorata*, como respuesta a tratamientos de simulación del ataque de *H. grandella*, lo cual abre posibilidades para la identificación y selección de genotipos que pueden responder produciendo un solo eje al ser atacados, manteniéndose el valor económico del fuste. Además, este tipo de resistencia no se rompería ante la posible aparición de diferentes razas del insecto, puesto que no involucra ausencia de ataque sino una forma especial de respuesta a éste (Mesén 1999).

En Costa Rica se han efectuado varios intentos para desarrollar técnicas de propagación vegetativa de varias especies de meliáceas, e identificar patrones de variación genética que confieran resistencia al ataque de *H. grandella* (Peter 1992). Se ha tratado de encontrar variación en la resistencia a nivel de procedencias, familias o individuos de *C. odorata* y *S. macrophylla*, para posteriormente clonar los árboles resistentes (Newton *et al.* 1992, en Mesén 1999). Por ejemplo, López *et al.* (1997) documentaron que las procedencias de cedro de la zona atlántica (húmeda) de Costa Rica, aunque superiores en altura, fueron más susceptibles (mayores promedios en intensidad y frecuencia de ataques) que los de la zona pacífica (seca); además, aunque hubo variación en la resistencia al ataque entre los genotipos de distintas procedencias o clones, no hubo diferencias respecto a la capacidad de recuperación en ninguna de las procedencias evaluadas. Por su parte, Newton *et al.* (1999) encontraron que en un período de 84 semanas, los ataques de *H. grandella* en cedro y caoba variaron significativamente de acuerdo a la procedencia.

Finalmente, las prácticas silviculturales se refieren al establecimiento y diseño de la plantación (Faurby y Barahona 1998), además de la calidad del sitio seleccionado para plantar las meliáceas, las podas de formación, los métodos de siembra y la diversificación de las plantaciones. Weaver y Bauer (1986) señalaron que, probablemente, el mejor método silvicultural es la siembra de meliáceas dentro del bosque secundario (en plantaciones en líneas y mixtas), para simular las condiciones del bosque natural e impedir la fácil localización de los hospedantes de *H. grandella*. También, las condiciones de sombra de las plantaciones en línea estimulan ciertas características agronómicas (como la fertilidad y textura del suelo, y el control de malezas), así como el desarrollo de un único brote principal, que podría aumentar la tolerancia al ataque de la plaga; además, el crecimiento rápido permite que los árboles alcancen mayores dimensiones en altura y diámetro en menor tiempo, y esto les permite evadir o reducir el efecto del ataque. No obstante, Gara *et al.* (1976) encontraron que los árboles de crecimiento más rápido producen más hojas frescas y, por consiguiente, están más sujetos al ataque.

Por su parte, Faurby y Barahona (1998) recomiendan establecer los árboles de cedro bastante distanciados y mantener el terreno, entre ellos, ocupado con otros cultivos, rastrojos o malezas. La convivencia con el monte o el cultivo vecino puede ser una protección para el cedro, que es capaz de sobreponerse a la competencia de las hierbas. Una limpieza total de la vegetación adyacente puede dejarlo al descubierto ante la plaga, por lo que es recomendable realizar limpiezas mínimas.

En experimentos realizados en Brasil, mediante un sistema de enriquecimiento del bosque natural con árboles de *S. macrophylla* no hubo daños del insecto, lo cual se atribuyó a la combinación de las bajas densidades de plantaciones iniciales (100 árboles/ha), a la sombra lateral y al mantenimiento de algunas de las condiciones ecológicas del bosque original (Yared y Carpenezzi 1981). Otros ejemplos de diversificación de plantaciones son los de *C. tonduzii* plantada entre hileras de *Cordia alliodora* en Costa Rica, y los de *S. macrophylla* y *C. odorata* interplantadas con *Cybistax donnel-smithii* y *Tabebuia microphylla* en experiencias a gran escala en Guatemala (Hilje *et al.* 1991); en ambos casos, entre 7 y 10 años después de establecidas las plantaciones, la incidencia del daño de *H. grandella* no sobrepasaba el 10%.

2.5 Potencial de manejo mediante repelentes y disuasivos

El combate químico de *H. grandella* es difícil por las siguientes razones (Grijpma y Ramalho 1969, Wilkins 1972). En primer lugar, cuando el huevo (depositados generalmente en los tallos, el haz de los folíolos o las axilas de las hojas) eclosiona, la larva penetra rápidamente en los tejidos de la planta, y es probable que el tiempo en que sería susceptible a los insecticidas no sobrepase de unas pocas horas; la eclosión es más frecuente en las primeras horas de la noche, lo que dificulta su combate químico; el costo del combate es muy alto, dada la alta frecuencia de ataques debido al corto ciclo de vida del insecto; y la persistencia de los insecticidas en condiciones tropicales es baja, debido a las altas temperaturas y frecuentes lluvias.

Una opción es el uso de insecticidas sistémicos (Grijpma y Ramalho 1969), los cuales podrían garantizar que la larva consuma la sustancia tóxica mientras se alimenta, o que tome una dosis letal desde que comienza a barrenar el tallo (Wilkins 1972); presumiblemente, el tejido vascular siempre contiene concentraciones del insecticida superiores a las de la médula, por lo que si un insecticida sistémico es capaz de matar las larvas, lo haría desde que éstas comienzan a barrenar la superficie de la planta. Otra ventaja importante es que, una vez dentro de la planta, solo afectan a aquellos insectos que se encuentren atacando a la planta y no a otras especies benéficas (Wilkins 1972). Sin embargo, la desventaja de su uso, aparte de su inestabilidad en los ambientes tropicales, reside en los métodos de aplicación; éstos podrían ser muy caros si se requirieran aplicaciones frecuentes, así como perjudiciales para el ambiente, si se tratara de un insecticida muy tóxico que demandara una amplia cobertura.

Además, los insecticidas sistémicos usualmente no son persistentes, por lo que la duración de la protección que confieren es limitada (Wilkins 1972). Por tanto, para mejorar el efecto de los insecticidas sistémicos, se desarrollaron investigaciones sobre nuevos métodos de liberación, en los cuales el insecticida se combinaba química o físicamente con un polímero sintético o natural para permitir un escape gradual y un abastecimiento continuo de las sustancias activas hacia el sistema vegetal. Las características de *H. grandella* sugieren que este método de insecticidas de liberación lenta o controlada puede ser una solución práctica para el problema del ataque del barrenador en las plantaciones de meliáceas, pues asegura una concentración tóxica del insecticida en las plantas por un período de tiempo prolongado (Wilkins *et al.* 1976). Allan *et al.* (1970) evaluaron 28 insecticidas sistémicos en cedro amargo, y documentaron que el carbofurán, metomil, fosfamidón, monocrotofós e isolán aportaron una protección completa de los árboles en pruebas de invernadero, y determinaron la efectividad de los dos primeros aún 23 días después de aplicados. Wilkins *et al.* (1976) evaluaron los cinco insecticidas en sistemas de liberación lenta en el campo y encontraron un buen grado de control de todos ellos durante los 18 meses de observaciones.

Otra posibilidad poco explorada, con un fuerte enfoque preventivo, sería la utilización de sustancias repelentes o disuasivas de los adultos o las larvas de *H. grandella*, en formulaciones de liberación controlada. Aunque se ha demostrado que muchas sustancias de origen vegetal pueden tener estos tipos de actividad sobre insectos, muy pocas han sido identificadas (Renwick 1990). Dichas sustancias representan un grupo de compuestos con potencial de aplicación en el manejo de insectos, al igual que sucede con las feromonas sexuales y las de agregación, que ya tienen aplicación comercial (Warthen 1990).

Para que este tipo de sustancias afecte el comportamiento de un insecto herbívoro, deben ser reconocidos por su sistema quimiosensorial al estimular receptores específicos. *H. grandella* posee receptores asociados con la fagodisuasión en órganos sensoriales (sensillas estilocónicas) ubicados en las maxilas (Schoonhoven 1980), por lo que se justifica el empleo de sustancias que demuestren tener este tipo de actividad.

Si bien existe un interés creciente de la industria agroquímica en la búsqueda de principios activos de origen vegetal (Pillmoor *et al.* 1993), este interés ha sido escaso en cuanto a los repelentes y disuasivos, debido a que su producción es tan compleja como la de un insecticida y su efecto no anula el problema de la plaga, sino que lo transfiere al campo de otro productor (Schoonhoven 1982). Sin embargo, en la actualidad hay intentos para desarrollarlos contra ciertas plagas (Pickett

et al. 1997). Dichas sustancias serían de particular importancia contra plagas con un umbral económico tan bajo como el de *H. grandella*, y que ataca especies de alto valor comercial como la caoba y el cedro.

Warthen (1990) define cinco tipos de sustancias, según su efecto en el comportamiento de los insectos: a) repelentes, los cuales alejan a los insectos de la planta; b) supresores, que inhiben la iniciación de la alimentación o la oviposición del insecto en el hospedante; c) disuasivos, que interrumpen la continuación de la alimentación o la oviposición del insecto; d) antibióticos, que interfieren metabólicamente en el crecimiento y desarrollo normales; y e) anorexigénicos, que producen pérdida del apetito. No siempre es sencillo separar los efectos particulares de las sustancias clasificadas en estas cinco categorías, y menos aún de las primeras tres, por lo que se requieren bioensayos, complementados con otras metodologías etológicas muy refinadas, para precisar su efecto específico.

Los repelentes, a diferencia de los disuasivos, pueden ahuyentar al insecto que los percibe, aunque éste no haya hecho contacto con la planta que los emite, por lo que deben ser sustancias volátiles (Norris 1990). En realidad, la mayoría de los compuestos volátiles son repelentes para algunas especies o biotipos de insectos, aunque podrían actuar como atrayentes para otras especies, por lo que cuando se alude a ellos se debe identificar con claridad la especie o biotipo que es afectada por cierto compuesto volátil (Norris 1990).

Por su parte, los disuasivos son sustancias que inhiben la alimentación o la oviposición de un insecto, en un lugar donde el insecto se alimentaría u ovipositaría en ausencia de dicha sustancia (Dethier 1960, en Warthen 1990). Las sustancias inhibidoras de la alimentación (fagodisuasivos) o de la oviposición (ovidisuasivos) no matan al insecto directamente, sino que éste permanece cerca de la planta tratada y muere por inanición (Munakata 1977, en Warthen 1990). Tanto los disuasivos como los estimulantes se encuentran en la superficie de la planta y determinan las señales de aceptación del hospedante para la alimentación o la oviposición.

La mayoría de constituyentes químicos de las plantas parecen estar involucrados en todas las respuestas del comportamiento del insecto (Renwick 1990). Así, la selección del hospedante por parte de los insectos herbívoros está determinada por sustancias volátiles y no volátiles que actúan como atrayentes y/o disuasivos en los posibles hospedantes (Warthen 1990). Asimismo, la

oviposición es un paso crítico en el ciclo de vida de los insectos herbívoros, pues el éxito de la prole depende de calidad nutritiva de la planta seleccionada por la madre (Renwick 1990).

Desde el punto de vista aplicado, se ha observado que cuando los compuestos fagodisuasivos puros se estudian individualmente, a la misma concentración en que ocurren en las plantas, son menos activos que en la planta en sí, y que tales sustancias siempre son disuasivas, pero a altas dosis; sin embargo, cuando todos los componentes individuales se combinan, hay un efecto aditivo que produce una disuasión comparable al efecto causado por la planta misma (Warthen 1990).

En el caso de plagas con un umbral económico tan bajo como el de *H. grandella*, algunas sustancias repelentes o disuasivas de los adultos podrían emplearse durante el período crítico de protección, que es de 5-8 años, según la zona geográfica, cuando ya sea posible obtener una troza de valor comercial (Cibrián *et al.* 1995). Sin embargo, hay muy poca información sobre dichos efectos en este insecto. Por ejemplo, Mancebo *et al.* (2000a, 2000c, 2000d), al evaluar 29 tipos de extractos, documentó un fuerte efecto fagodisuasivo de los extractos alcohólicos de la madera y el follaje del hombre grande (*Quassia amara*, Simaroubaceae), así como del follaje de la ruda (*Ruta graveolens*, Rutaceae) sobre la larva de dicho insecto. Por su parte, Warthen (1990) señala que la azadiractina, presente en la semilla del árbol de nim (*Azadirachta indica*), tiene actividad fagodisuasiva sobre *H. grandella*. Esto no fue corroborado por Mancebo *et al.* (2000b), quienes encontraron que la formulación comercial Azafín (300.000 ppm de azadiractina) produjo un efecto insecticida sobre larvas de instar III, mientras que la formulación Nim 80 (de menor concentración de azadiractina) produjo un efecto en el desarrollo de las larvas. Mancebo *et al.* (2000d) también determinaron el efecto insecticida del extracto del fruto de tacaco cimarrón (*Sechium pittieri*).

No obstante, el restringido ámbito de hospedantes de *H. grandella*, que incluye solamente especies de la familia Meliaceae, sugiere que podría haber otras plantas, sobre las cuales hay referencias de tipo etnobotánico o anecdótico, que podrían causar diversos efectos biológicos en los adultos o larvas del insecto.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización

Los experimentos se realizaron en los laboratorios de Entomología y de Cultivo de Tejidos, así como en un invernadero, en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), en Turrialba, Costa Rica. Este lugar se encuentra a 9°52'N y 83°38'O y 640 msnm y sus variables climáticas son de 22°C, 2479 mm, 87% HR y 11,82 uJ/m², en promedio (Jiménez 1994).

3.2 Selección y preparación de los extractos vegetales

Se evaluaron los siguientes cuatro extractos vegetales: madera de hombre grande (*Quassia amara*, Simaroubaceae), follaje de ruda (*Ruta graveolens*, Rutaceae), fruto de tacaco cimarrón (*Sechium pittieri*, Cucurbitaceae) y Azatín. El último es un extracto comercial de la semilla del árbol de nim (*Azadirachta indica*, Meliaceae) formulado como un concentrado emulsificable. Contiene 3% de azadiractina (30,000 ppm), más 27% de otros compuestos de la planta y un 70% de ingredientes inertes (AgriDyne Technologies, Utah). La azadiractina es un tetranortriterpenoide altamente oxidado (Jacobson 1988) que constituye el ingrediente activo de esta formulación. Es considerada la sustancia de mayor actividad biológica contra insectos, y se encuentra principalmente en las semillas y hojas del árbol de nim (Broughton *et al.* 1980, Soon y Bottrell 1994).

El hombre grande se recolectó en la Reserva Indígena de Keköldi (Talamanca, Costa Rica), la ruda en Turrialba (Cartago) y el tacaco cimarrón en Orosi (Cartago). Los extractos crudos de madera de hombre grande y de ruda se prepararon de la misma forma, a diferencia de la fracción semi-purificada de tacaco cimarrón (Castro *et al.* 1997). La preparación de los tres se realizó en el Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA), de la Universidad de Costa Rica.

Para preparar los extractos crudos de madera de hombre grande y de ruda, las muestras del material vegetal pertinente se secaron en un horno de convección (Mem Mert ®) a 40°C. Se molieron y luego se maceraron en etanol al 80% por 24 h a temperatura ambiente. Las disoluciones obtenidas se filtraron en papel Whatman N° 4 y el residuo sólido se extrajo de nuevo con etanol al 80% para aumentar el rendimiento del proceso. Los productos de las dos extracciones se unieron y luego se

concentraron al vacío en un baño de agua a 40°C, utilizando un evaporador rotatorio Büchi (EL 131). Posteriormente, el extracto de ruda fue pasado por un liofilizador LABCONCO (Serie 85004) para eliminar el agua remanente de los residuos y así fue utilizado en los experimentos (Juan Carlos Brenes 2000, CIPRONA, com. pers.). El extracto de hombre grande fue utilizado en una suspensión acuosa.

En el caso del tacaco cimarrón, los frutos frescos se extrajeron con metanol y el extracto fue concentrado *in vacuo* para obtener una suspensión acuosa que fue pasada a través de una columna de gel MCI (Mitsubishi Chemical Industry) Diaion HP-20. La columna fue lavada con agua, metanol/agua al 50%, metanol y acetato de etilo. La tercera fracción fue concentrada *in vacuo* en un evaporador rotatorio Büchi y luego eliminada el agua remanente en un liofilizador LABCONCO (Gerardo Mora 2000, CIPRONA, com. pers.).

Las fracciones del extracto crudo de la madera de hombre grande (*Q. amara*) fueron preparadas de la siguiente forma. Se preparó una columna con 100 g de gel MCI Diaion HP-20, con una altura de 31 cm y un diámetro de 4,5 cm. La columna se lavó con una serie de disolventes, en el siguiente orden: agua, metanol, metanol/agua al 50%, y agua. Posteriormente, se colocaron 10 g del extracto liofilizado, a los que se pasaron, a temperatura ambiente, 500 ml de cada uno de los siguientes disolventes: agua, metanol, metanol/agua al 50% y éter dietílico. El procedimiento se repitió cuatro veces hasta completar 40 g de liofilizado. Las extracciones de un mismo disolvente se unieron para conformar las cuatro fracciones. Éstas se evaporaron en un evaporador rotatorio Büchi y se les eliminó el agua remanente en un liofilizador LABCONCO (Juan Carlos Brenes 2000, CIPRONA, com. pers.), y así fueron utilizadas.

A partir de 40 g de liofilizado del extracto de madera de hombre grande, el proceso de fraccionamiento permitió obtener 9,2 g de liofilizado de la fracción acuosa, 2,5 g de liofilizado de la fracción metanólica y 0,56 g de liofilizado de la fracción etérea. La fracción de metanol/agua sufrió contaminación con hongos, por la que no fue utilizada.

Todos los extractos liofilizados o en solución se mantuvieron herméticos, en refrigeración y en la oscuridad; para evitar su descomposición química o su contaminación con hongos.

3.3 Larvas de *H. grandella*

Las larvas de *H. grandella* se tomaron de una colonia existente en el Laboratorio de Entomología del CATIE. El mantenimiento normal de la colonia se realiza de la siguiente forma. Los dos primeros instares larvales se alimentan con hojas tiernas de árboles de cedro (*C. odorata*), para posteriormente alimentarse con dieta artificial (Vargas y Shannon, inédito) (Anexo 1), dentro de frascos de vidrio de 30 ml. Las larvas se mantienen en una cámara bioclimática (Percival I-35L), a 25°C y un fotoperíodo de 8L : 16O, hasta que alcanzan el estadio de pupa. Las pupas se transfieren a jaulas de muselina, de 50 x 50 x 55 cm (ancho x largo x alto), las cuales se cuelgan dentro de un invernadero donde, al emerger, ocurre la cópula. Las hembras depositan los huevos en las paredes de las jaulas, que son llevadas al laboratorio cada tres días. Allí, son lavadas con agua, en un recipiente, para provocar el desprendimiento de los huevos. Éstos se depositan en el fondo del recipiente, por un movimiento giratorio del agua, de donde son recogidos con una jeringa y transferidos a pequeños trozos de papel que se colocan en cajas plásticas que contienen follaje de cedro.

Puesto que para los diferentes experimentos se utilizaron larvas de diversos instares, éstos se reconocieron mediante la observación del tamaño de la cápsula cefálica (Ramírez 1964), complementado con el tiempo de desarrollo de cada instar larval de *H. grandella* a 25°C (Taveras 1999).

3.4 Tratamientos y diseño experimental

Se efectuaron dos tipos de experimentos. El primero consistió en evaluar el efecto fagodisuasivo de varias fracciones de un extracto de la madera de hombre grande, el cual incluyó bioanálisis de laboratorio y evaluaciones en el invernadero.

El segundo experimento se refirió a la determinación del efecto sistémico de extractos que causaron fagodisuasión o mortalidad sobre larvas de *H. grandella* en experimentos previos (Mancebo *et al.* 2000a): madera de hombre grande, follaje de ruda, fruto de tacaco cimarrón y Azatín. Para este experimento se utilizó la técnica de cultivo de tejidos e incluyó únicamente bioanálisis de laboratorio.

3.4.1 Efecto fagodisuasivo de las fracciones de *Q. amara*

Bioanálisis general de laboratorio. Se evaluó el efecto fagodisuasivo de las fracciones acuosa, metanólica y etérea del extracto de madera. Dichas fracciones se evaluaron a la concentración que cada una tuvo en una mezcla de extracto crudo de *Q. amara* al 10% p/v (peso/volumen), según el rendimiento del proceso de fraccionamiento de cada una (Anexo 2).

Según lo anterior, los tratamientos correspondientes se aplicaron a las siguientes concentraciones (en p/v): fracción acuosa al 2,3% (en agua), fracción metanólica al 0,625% (en metanol) y fracción etérea al 0,14% (en éter dietílico). Como testigo absoluto se utilizó un extracto crudo de *Q. amara* al 10% (en agua), que se diluyó desde la concentración de 21,2% con la que fue extraído en el proceso, así como otros tres testigos relativos, correspondientes a cada uno de los disolventes (agua, metanol y éter dietílico).

La preparación de las mezclas a ser aplicadas se realizó el mismo día de su utilización, disolviendo el producto liofilizado de cada fracción en el respectivo disolvente. Se adicionó el agente tensoactivo Nu Film 17 (96% de ingrediente activo) (Millar Chemical Corp. Fertilizer. EE.UU.) a una concentración del 0,03%, para favorecer la distribución del extracto sobre la superficie de la hoja. Este agente también se agregó los disolventes (testigos).

La aplicación de los tratamientos se hizo a discos de hoja de cedro de 2,3 cm de diámetro, para lo cual cada disco se sumergió en el respectivo tratamiento por 10 seg y se dejó secar a temperatura ambiente, antes de exponerlo a las larvas de instar III de *H. grandella*. A cada larva, que había estado en ayuno por 3 h dentro de frascos de vidrio de 30 ml, se le suministró un disco impregnado con el tratamiento respectivo.

Los discos se cortaron, con un sacabocados, de hojas de cedro frescas, tiernas, sanas y bien formadas, recolectadas del campo el mismo día. Se evitó que los discos contuvieran parte de la nervadura central del folíolo, para que la larva no barrenase allí. Bajo la tapa de rosca de cada frasco se prensó un pedazo de papel toalla levemente mojado, para mantener suficiente humedad. Las larvas que se utilizarían en un mismo bloque se extrajeron de una sola caja (mediante un pincel fino), para tener mayor uniformidad genética.

Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar, con submuestreo, con cuatro repeticiones. Cada bloque estuvo representado por una bandeja, y la unidad experimental estuvo conformada por ocho larvas, cada una de las cuales fue considerada una submuestra. Las larvas (submuestras) se aleatorizaron dentro de cada unidad experimental, al igual que los tratamientos dentro de cada bloque. Las bandejas se colocaron dentro de una cámara bioclimática (Percival I-35L), a 25°C y 8L : 16O. El orden en que las bandejas estaban una sobre otra se cambiaba diariamente para conseguir una mayor uniformidad entre bloques respecto al efecto de la luz dentro de la cámara bioclimática. Además, esto era conveniente para cambiar la secuencia en que se hacían las evaluaciones de los bloques cada día.

Después de un período de 24 h de exposición al disco impregnado, cada larva se transfirió a un frasco de vidrio de 30 ml que contenía aproximadamente 6 ml de dieta artificial, donde se dejó hasta que alcanzara el estadio de pupa. La dieta se reemplazó si cambiaba de color o apariencia, por volverse inapropiada como alimento para las larvas. Conforme aparecían las pupas se pesaron en una balanza electrónica METTLER PM 60 y se colocaron en vasos plásticos de 20 ml, hasta la emergencia del adulto, o hasta que murieran (en un período de 20 días después de su aparición).

Experimento de invernadero. Se incluyeron los mismos tratamientos evaluados en el bioanálisis anterior, pero aplicados directamente a árboles de cedro. Se utilizó un diseño completamente al azar, con ocho repeticiones, y la unidad experimental estuvo constituida por un árbol.

Los árboles, de 50-75 cm de altura y aproximadamente seis meses de edad, estaban sembrados en macetas de 2000 ml (COMTEC 300), las cuales se colocaron sobre el piso de un invernadero. A los árboles se les eliminaron las hojas inferiores, dejando solamente las ocho hojas superiores en cada uno, las cuales también se podaron a la altura del quinto par de folíolos más viejos para evitar el contacto entre hojas de árboles vecinos en el arreglo espacial del experimento. Los árboles se obtuvieron a partir de semilla de una misma progenie, de Pococí, Limón, Costa Rica.

Los tratamientos se aplicaron solamente en la parte terminal de cada árbol (brote terminal y tres hojas más jóvenes), después de lo cual se demarcó una línea entre las partes tratada y no tratada. La aplicación se efectuó fuera del invernadero, para evitar la contaminación entre los tratamientos. Esto se hizo con un atomizador DeVilbiss 15 de punta ajustable (The DeVilbiss, EE.UU.), conectado a una bomba de vacío marca GAST, modelo DOA-P104-AA (GAST Manufacturing

Corp. Benton Harbor, Michigan) y con una presión constante de $0,7 \text{ kg/cm}^2$. Las disoluciones se prepararon el mismo día de su aplicación.

Cada árbol se inoculó con tres larvas de primer instar de *H. grandella* 30 min después de aplicar los tratamientos, para que los extractos se secaran. Los daños se evaluaron dos días, una semana y dos semanas después de la inoculación. Un mes después los árboles se cortaron en la base para medir la longitud de los túneles hechos por las larvas.

Bioanálisis específicos de laboratorio. Se evaluaron solamente las fracciones del extracto de *Q. amara* correspondientes a los liofilizados de las fracciones metanólica y etérea, ya que fueron las que mostraron un efecto fagodisuasivo más definido. Los tratamientos correspondieron a las concentraciones en que cada fracción se encontraría dentro del extracto crudo de *Q. amara* cuando éste fuera aplicado a dosis de 0,1, 0,32, 1,0, 3,2 y 10 % (p/v) y según los rendimientos obtenidos en el proceso de fraccionamiento (Anexo 2).

Por tanto, se evaluaron los siguientes tratamientos (concentraciones, p/v): 0,0062, 0,02, 0,062, 0,2 y 0,62% (fracción metanólica) y 0,0014, 0,0044, 0,014, 0,044 y 0,14% (fracción etérea). Estas mezclas se prepararon por dilución, a partir de la disolución de mayor concentración de cada fracción. Se compararon con un testigo absoluto (agua destilada) y con el testigo correspondiente al respectivo disolvente. Para los tratamientos de la fracción metanólica se utilizó una mezcla disolvente (v/v) de 20 metanol/ 80 agua, con 0,03% de agente tensoactivo Nu Film 17 (96% de ingrediente activo) (Millar Chemical Corp. Fertilizer. USA), y para la fracción etérea una mezcla de 20 éter dietílico/ 80 agua, con un 0,03% del agente emulsificante Citowett (100% de ingrediente activo) (BASF Alemania).

Los demás procedimientos metodológicos fueron similares a los del bioanálisis general, excepto que las evaluaciones para detectar mortalidad se realizaron por un máximo de dos semanas, sin esperar que las larvas alcanzaran el estadio adulto. Esto obedeció a que en el bioanálisis general se encontró que las variables relacionadas con el ciclo de vida no fueron afectadas por dichos tratamientos.

3.4.2 Sistemicidad de extractos con actividad biológica sobre *H. grandella*

En este experimento se utilizó como herramienta la técnica de cultivo de tejidos, pues los extractos evaluados se adicionaron a medios de cultivo de plantas cultivadas *in vitro*. Posteriormente, la actividad sistémica de las sustancias en las plantas fue determinada por la técnica de bioensayo de sustancias fagodisuasivas, que se describió anteriormente.

Como tratamientos se incluyeron cuatro extractos que causaron fagodisuasión o mortalidad en larvas de *H. grandella* en experimentos previos (Mancebo *et al.* 2000a): madera de hombre grande, follaje de ruda, fruto de tacaco cimarrón y Azatín. Estos se compararon con un testigo relativo (carbofurán) y uno absoluto (agua destilada). El carbofurán posee efecto insecticida sobre larvas de *H. grandella* y actúa sistémicamente en árboles de cedro (Wilkins 1972). Es un carbamato que actúa como insecticida y nematocida sistémico y de acción estomacal, con un DL_{50} de 8 mg/kg en ratas, y no es fitotóxico. Fue introducido al mercado como "Furadán" (FMC Corp. y Mobay Chem. Corp. 1967) (British Crop Protection Council 1974, Thompson 1992), que es una formulación de ingrediente activo al 48% (p/v) en suspensión concentrada.

Se utilizaron plantas de cedro cultivadas *in vitro* provenientes de semilla de una misma progenie (Pococí, Limón). Para la germinación de semillas se utilizó un medio de cultivo semisólido a base de agua, agar al 0,7 y sacarosa al 3 %. Estas plantas se utilizaron para el cultivo de microestacas y ápices (explantes primarios a partir de las plantas germinadas), para lo cual se utilizó el medio básico MS (Murashige y Skoog 1962), suplementado con 0,5 mg/l de 2-ip (6- γ , γ -dimethylamino purina), 3 % de sacarosa y 0,7% de agar (Difco Bacto Agar) como gelificante. El pH de todos los medios de cultivo fue ajustado a un valor de 5,7. Todos los suplementos fueron adicionados a los medios antes de ser esterilizados en autoclave a 121°C y 12 bares de presión por 20 minutos.

Las condiciones del cultivo para todas las etapas fueron un fotoperíodo de 12O : 12O y $28 \pm 2^\circ$ C en el cuarto de cultivo.

Los extractos liofilizados de madera de hombre grande, follaje de ruda, y fruto de tacaco cimarrón se disolvieron en agua bidestilada a una concentración del 10 % (p/v), mientras que el Azatín se diluyó al 10% (v/v) en agua. El carbofurán se preparó como una solución acuosa al 1% (p/v) de ingrediente activo, a partir de la formulación comercial de Furadán.

Todos ellos se centrifugaron a 30 rps durante 5 min, para decantar los sedimentos insolubles, y luego se tamizaron en papel de filtro Reeve Angel N° 802, de superficie crepé para rápida filtración, para separar los sólidos suspendidos. Además, las mezclas que tuvieron un pH inferior a 5 (hombre grande, ruda y carbofurán) fueron llevadas a este valor, para evitar un cambio grande en el pH del medio de cultivo (5,7) al cual serían posteriormente adicionadas, pero sin afectar mucho el pH original de las mezclas y no interferir en los posibles efectos fagodisuasivo o insecticida de las sustancias presentes. Finalmente, los extractos y el carbofurán se esterilizaron en frío usando filtros de acetato de celulosa de 0,22 μm y 150 ml de capacidad, y de membrana de baja composición de proteínas.

En frascos de vidrio de 250 ml se colocaron 27 ml de medio de cultivo básico MS (Murashige y Skoog 1962), suplementado con sacarosa al 3% y solidificado con agar al 0,7%, en ausencia de 2-ip. El medio se esterilizó en autoclave a 121°C y 12 bares de presión por 20 min, y, antes que solidificara en los frascos, se le agregaron 3 ml del extracto vegetal o carbofurán esterilizados en frío, y se mezclaron por agitación manual. Las mediciones se realizaron con pipetas estériles graduadas de 25 y 10 ml (VWR – brand), dentro de una cámara de flujo laminar. Los medios se dejaron enfriar y solidificar a temperatura ambiente. Los extractos liofilizados quedaron a una concentración aproximada del 1% (p/v), el Azatín al 1% (v/v), y el carbofurán al 0,1% (p/v) en los medios de cultivo semisólidos.

Las plantas, de dos meses de edad y provenientes de microestacas o ápices de plantas germinadas de 45 días de edad, fueron trasplantadas a los medios con extractos vegetales, colocándose una planta por cada frasco. Cada tratamiento estuvo representado por 25 plantas.

Para determinar la actividad sistémica de los extractos, se efectuaron evaluaciones tres días, una semana y dos semanas después del trasplante. Para ello se tomaron folíolos de alguna de las tres hojas superiores de cada planta, descartándose las plantas con síntomas de fitotoxicidad o cuyos medios de cultivo estaban contaminados. Los folíolos se colocaron individualmente en bolsas de polietileno y de cierre rápido, se les asignó un código (por tratamiento y repetición) y se trasladaron al Laboratorio de Entomología.

Los bioanálisis se efectuaron utilizando un diseño completamente al azar, con seis tratamientos y 25 repeticiones. Para ello los folíolos se colocaron en la parte inferior de frascos de vidrio de 30 ml, y sobre ellos se colocó una larva de *H. grandella* del instar I o II, que había estado en ayuno por 3 h.

Los demás procedimientos metodológicos fueron similares a los del bioanálisis general para efectos fagodisuasivos. Se realizó una evaluación un día después de haber expuesto las larvas a los folíolos, y luego evaluaciones diarias, hasta que ellas completaron su desarrollo.

3.5 Variables de respuesta

El criterio para determinar *fagodisuasión* fue la nula o poca tasa de consumo del tejido foliar tratado con los extractos, durante las primeras 24 h de exposición a dicho tejido, y la posterior sobrevivencia de las larvas. El *efecto insecticida* se juzgó mediante la mortalidad de las larvas durante o después de dicha exposición. Los *efectos sobre el desarrollo* se determinaron mediante la duración de los instares larvales y el peso de la pupa.

Por su parte, la sistemicidad de cada extracto se evaluó mediante el porcentaje de consumo en los folíolos o el número de larvas muertas, durante o después de la exposición de las larvas a los folíolos tomados de plántulas de cedro tratadas con los extractos.

Por tanto, para los experimentos realizados en el laboratorio (bioanálisis y sistemicidad) se registraron las siguientes variables:

a. Porcentaje del área foliar consumida en el disco o el folíolo. Se calculó a las 24 h de exposición a la larva, según la escala visual del programa Distrain 1.0 (Tomerlin y Howell 1988). Para esto el evaluador se adiestró previamente y realizó prácticas antes de cada evaluación.

b. Número de larvas muertas. Se evaluó para el día de exposición al disco o al folíolo, y luego diariamente, cuando las larvas se encontraban en la dieta artificial. Los criterios de mortalidad de las larvas fueron la ausencia de movimiento, el cambio de color a una tonalidad negruzca y una apariencia blanda y húmeda, o bien si se encontraban deshidratadas y adheridas a la superficie foliar o del frasco. Las larvas que sólo sufrieron inapetencia o efectos de debilitamiento a causa de algún tratamiento, mostraban síntomas de cambio a una coloración negruzca o rojiza oscura, poca movilidad y segregación de seda, y adelgazamiento. Aquellas que se consideraban como sanas fueron las que se tenían coloración amarilla o verdusca, muy móviles y con buena segregación de seda, con cuerpos gruesos y, muchas veces, en plena actividad alimenticia.

c. Efecto sobre el desarrollo. Para el experimento de bioanálisis general se determinaron los tiempos de duración de los instares larvales IV y V, y de la pupa. Para esto se anotaron las fechas en las que ocurrieron las mudas larvales, la conversión a pupa y la emergencia del adulto. Las mudas larvales eran determinadas al encontrar las cápsulas cefálicas dentro del frasco. Además se contó el número de días transcurrido hasta que las larvas alcanzaron el estadio de adultos.

d. Peso de la pupa. Al igual que el punto anterior, solamente para los experimentos que incluyeron bioanálisis, las pupas fueron pesadas un día después del empupamiento, extrayéndolas de la seda que las protegía.

En cuanto a los experimentos de aplicación de extractos en el invernadero, se evaluaron las siguientes variables:

a. Número de orificios. Se determinó el número de perforaciones en el brote terminal y en las axilas de la planta, dos días después de la inoculación con las larvas.

b. Número de montículos, y brotes y "ramas" desprendidos. Se evaluaron estos factores, pues son el resultado de la alimentación de las larvas dentro del tallo de la planta. Se hizo para evaluaciones de dos días, una semana y dos semanas después de la inoculación de las larvas.

c. Número y longitud de túneles, y número de larvas o pupas. De igual forma, esta variable es el resultado de la alimentación de las larvas en el tallo de la planta, pero sólo se evaluó cuatro semanas después de la inoculación.

3.6 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza, mediante la prueba de F, y para comparar las medias de cada tratamiento se utilizó la prueba de jerarquización múltiple de Tukey, con un valor de significancia fijo ($\alpha=0,05$). Se utilizó el paquete estadístico SAS (SAS Institute 1985).

Para los experimentos de bioanálisis de las fracciones del extracto de *Q. amara* se utilizó un modelo lineal, en el que se representó la interacción entre los tratamientos y las repeticiones como término

de error para los tratamientos, para así separar la influencia del error de muestreo sobre el error experimental.

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \beta\tau_{ij} + \lambda_k$$

Y_{ijk} = Variable aleatoria de respuesta

μ = Media verdadera poblacional

τ_i = Efecto de la i-ésima concentración del extracto

β_j = Efecto del j-ésimo bloque

$\beta\tau_{ij}$ = Error experimental

λ_k = Error de muestreo

Para los experimentos de invernadero se utilizó un modelo que representó el efecto anidado de la planta dentro del tratamiento, lo cual indica que cada planta colocada individualmente en la maceta correspondiente podría tener respuestas diferentes al ataque de las larvas.

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \beta\tau_{j(i)} + \lambda_k + \tau\lambda_{ik} + \theta_{k(j)}$$

Y_{ijk} = Variable aleatoria de respuesta

μ = Media verdadera poblacional

τ_i = Efecto del i-ésimo extracto

β_j = Efecto de la j-ésima repetición

$\beta\tau_{j(i)}$ = Efecto de la parcela grande (extractos)

λ_k = Efecto de la k-ésima evaluación

$\tau\lambda_{ik}$ = Efecto del i-ésimo extracto y la k-ésima evaluación

$\theta_{k(j)}$ = Error de la parcela pequeña

En los análisis de varianza del número de orificios, montículos y brotes caídos fue requerida una transformación logarítmica de los datos para validar los supuestos de normalidad en los que se fundamenta este análisis, y las diferencias entre tratamientos se determinaron con base a estas transformaciones.

Para los experimentos de sistemicidad, el modelo estadístico (para un diseño irrestrictamente al azar) fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij} = Variable aleatoria de respuesta

μ = Media verdadera poblacional

τ_i = Efecto del tratamiento i ésimo

ε_{ij} = Error experimental

4. RESULTADOS

4.1 EFECTO FAGODISUASIVO DE LAS FRACCIONES DE *Quassia amara*

4.1.1 Bioanálisis general de laboratorio

Efecto fagodisuasivo. Con respecto al consumo de los discos foliares de cedro, hubo grandes diferencias entre los tratamientos ($F= 19,39$, g.l.= 6, $p < 0,01$) (Fig. 1, Anexo 3). Los menores valores de consumo se observaron en los discos tratados con las fracciones etérea y metanólica, así como con el extracto crudo de *Q. amara*, los cuales no difirieron entre sí ($p > 0,05$), pero sí con respecto a la fracción acuosa. De hecho, el consumo en los discos tratados con ésta no difirió del respectivo testigo en agua, y en ambos tratamientos alcanzó los valores más altos, de 15-20%.

Por su parte, hubo un contraste marcado ($p < 0,05$) entre el consumo en los discos tratados con la fracción etérea y el respectivo testigo, pero no entre la fracción metanólica y su testigo ($p > 0,05$). Asimismo, el consumo en los discos tratados con cada uno de los disolventes (testigos) no difirió entre sí.

Efectos sobre el desarrollo. En cuanto a la duración del instar IV, hubo grandes diferencias entre algunos tratamientos ($F= 10,63$, g.l.= 6, $p < 0,01$), aunque las tendencias fueron algo erráticas (Fig. 2, Anexo 4). La duración de este instar fue mayor para las larvas que se alimentaron de los discos tratados con las fracciones etérea y metanólica, y con el extracto crudo de *Q. amara*, las cuales no difirieron entre sí ($p > 0,05$). Sin embargo, al comparar cada una de las tres fracciones con su respectivo testigo, en ningún caso hubo diferencias en la duración del instar IV. Si hubo entre el extracto crudo y la fracción metanólica con respecto a la fracción acuosa ($p < 0,05$) y entre el extracto crudo y los tratamientos testigos.

Los tratamientos no difirieron ($p > 0,05$) con respecto a la duración del instar V y de la pupa (Fig. 2, Anexo 4), y tampoco al comparar los pesos de las pupas (Fig. 3, Anexo 5). Tampoco en cuanto al número de días transcurridos desde el día que se inició el experimento hasta la emergencia de los adultos (Fig. 4, Anexo 6).

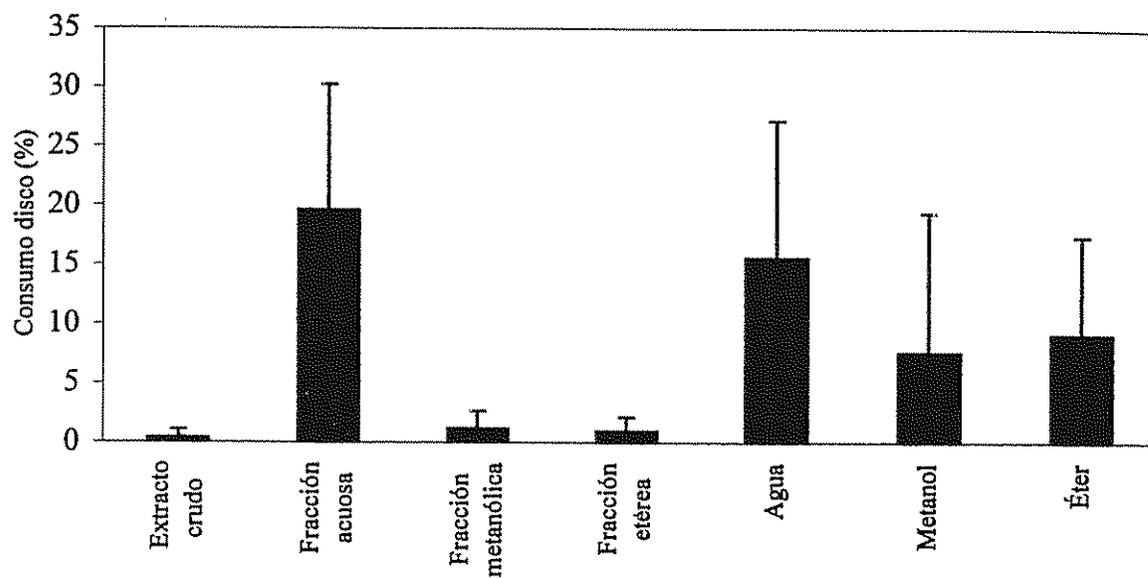


Figura 1. Porcentaje promedio de consumo en discos foliares de cedro impregnados con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, al exponer larvas de instar III de *H. grandella*, durante 24 h.

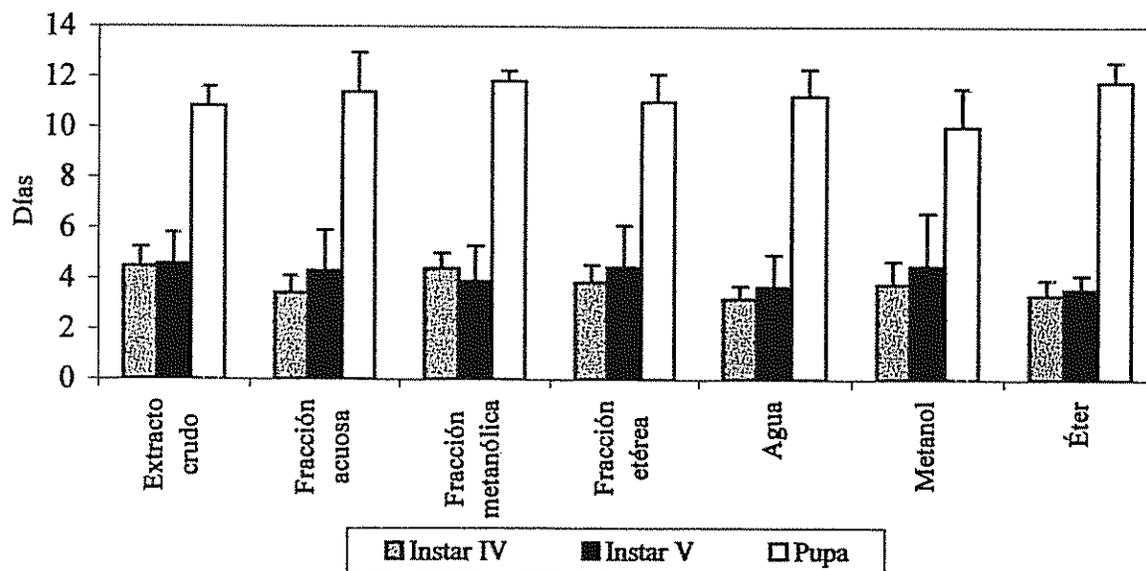


Figura 2. Duración promedio (en días) de los instares IV y V y la pupa, para larvas de *H. grandella* expuestas a las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara* durante el instar III.

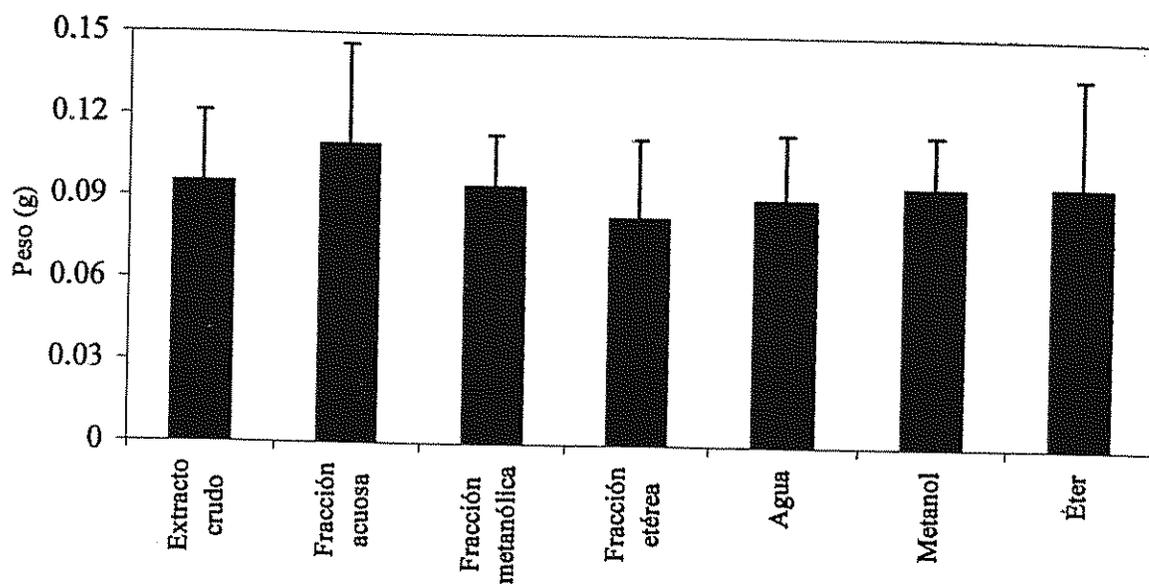


Figura 3. Peso promedio de las pupas provenientes de larvas de *H. grandella* expuestas a las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, durante el instar III.

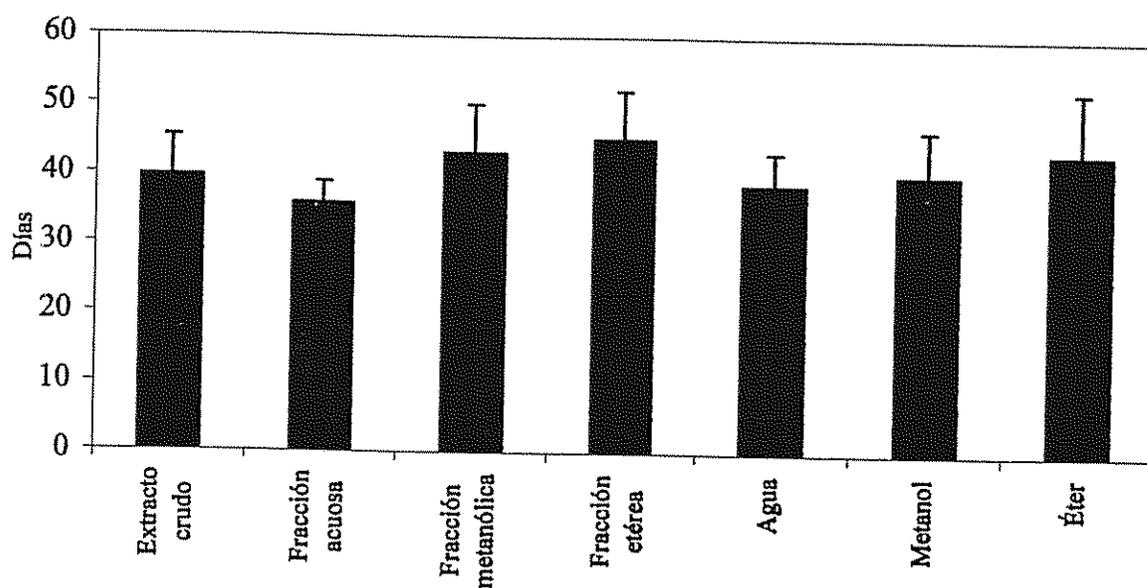


Figura 4. Número de días transcurridos desde el inicio del experimento hasta la emergencia de los adultos provenientes de larvas de *H. grandella* expuestas a las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, durante el instar III.

Mortalidad. En relación con la mortalidad causada por los tratamientos, no hubo diferencias durante el primer día en el que las larvas estuvieron expuestas a los discos foliares ($F = 0,67$, g.l. = 3, $p > 0,05$), ni durante el segundo día, cuando ya estaban en la dieta artificial ($F = 1,20$, g. l. = 3, $p > 0,05$) (Fig. 5, Anexo 7). Las diferencias respecto a las mortalidades acumuladas para la primera semana de observaciones, se manifestaron entre los días 3 y 7 ($p < 0,05$), y los tratamientos que difirieron entre sí durante este período fueron la fracción metanólica, con los mayores valores de mortalidad (44%), y la acuosa, con los menores (12%). En general, la mortalidad debida al tratamiento con la fracción metanólica fue seguida por la del extracto crudo de *Q. amara* y la de la fracción etérea, respectivamente, pero sin diferencias entre ellos.

Asimismo, en cuanto a la mortalidad acumulada hasta que las larvas empuparon (mortalidad total), los mayores valores (62-66%) se presentaron en los tratamientos con las fracciones etérea y metanólica, y los menores (22%) en la fracción acuosa. Sin embargo, estos valores no difirieron de los de los demás tratamientos (Fig. 6, Anexo 8).

Por otra parte, los tratamientos no difirieron ($F = 1,15$, g.l. = 6, $p > 0,05$) con respecto al número de adultos que emergieron, provenientes de las larvas expuestas a las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, durante el instar III (Fig. 7, Anexo 9).

4.1.2 Experimento de invernadero

Orificios y montículos. En cuanto al número de orificios presentes en los árboles de cedro dos días después de su inoculación con larvas de instar I, hubo grandes diferencias entre los tratamientos ($F = 16,33$, g.l. = 6, $p < 0,01$) (Fig. 8, Anexo 10). Dicho número fue nulo para la fracción metanólica y el extracto crudo de *Q. amara*, y muy bajo para la fracción etérea, los cuales no difirieron entre sí ($p > 0,05$), pero sí de los testigos respectivos. La fracción acuosa no difirió de los tres testigos, y entre éstos solamente difirieron el agua y el éter.

Con respecto al número de montículos hubo grandes diferencias entre los tratamientos ($F = 69,11$, g.l. = 6, $p < 0,01$), entre las fechas de evaluación ($F = 12,43$, g.l. = 2, $p < 0,01$), así como en las interacciones entre tratamientos y evaluaciones ($F = 3,18$, g.l. = 12, $p < 0,01$).

Al comparar los tratamientos, como promedio de las tres evaluaciones, hubo cantidades casi nulas de montículos en las plantas tratadas con el extracto crudo de *Q. amara* y con las fracciones

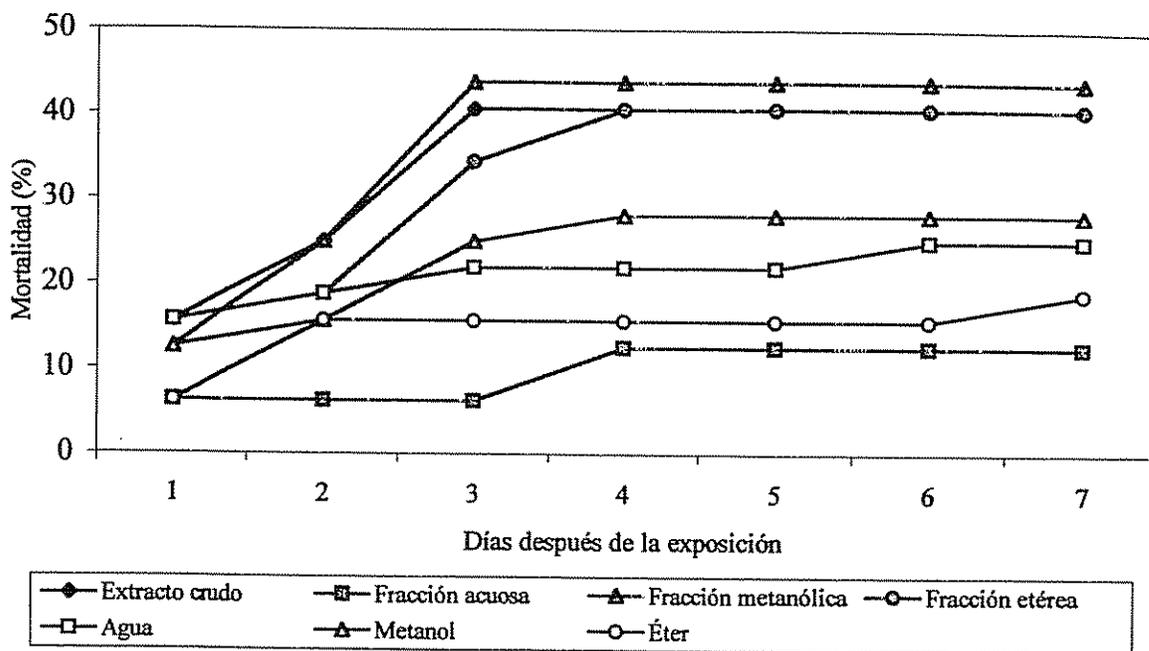


Figura 5. Porcentaje de mortalidad acumulada de larvas de *H. grandella*, durante los primeros siete días del experimento, luego de su exposición a discos foliares de cedro tratados con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, durante 24 h.

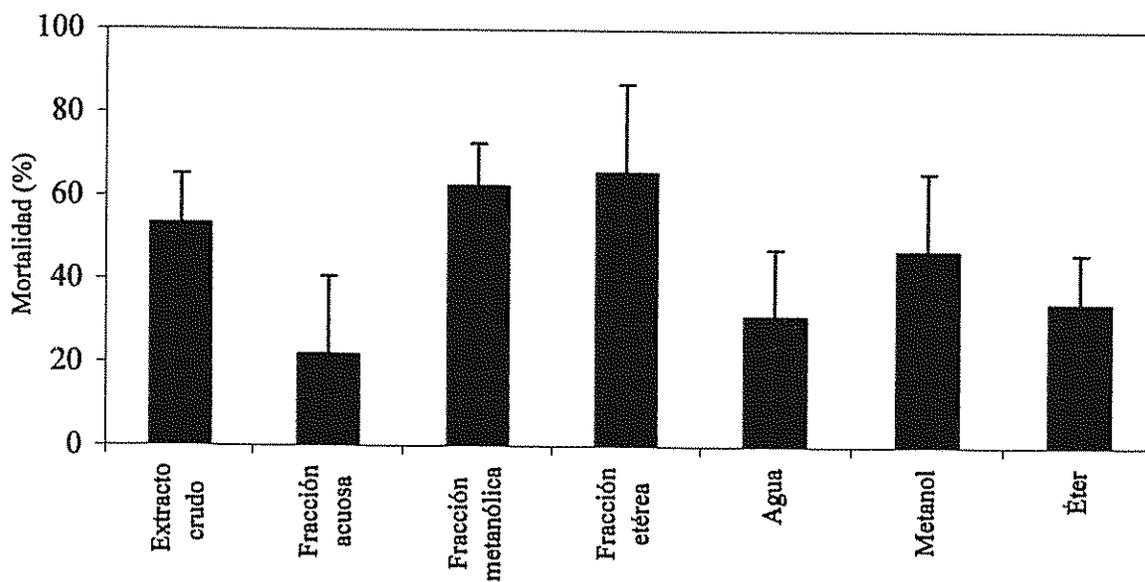


Figura 6. Porcentaje de mortalidad total en larvas de *H. grandella* expuestas a discos foliares de cedro tratados con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, durante 24 h y en el instar III.

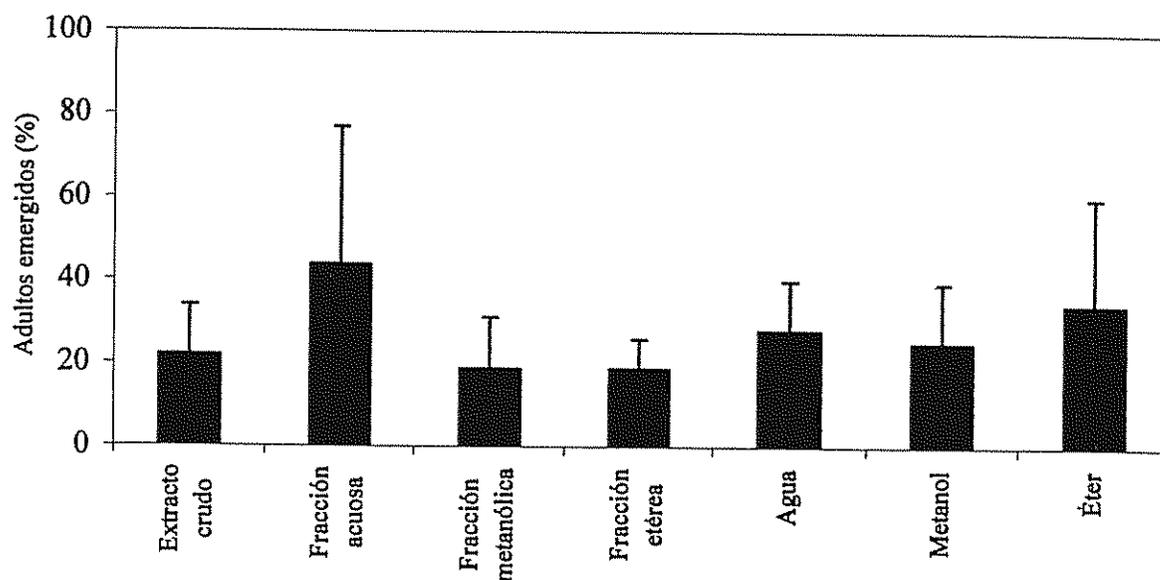


Figura 7. Porcentaje promedio de adultos de *H. grandella* emergidos, provenientes de larvas expuestas a discos foliares tratados con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, durante 24 h y en el instar III.

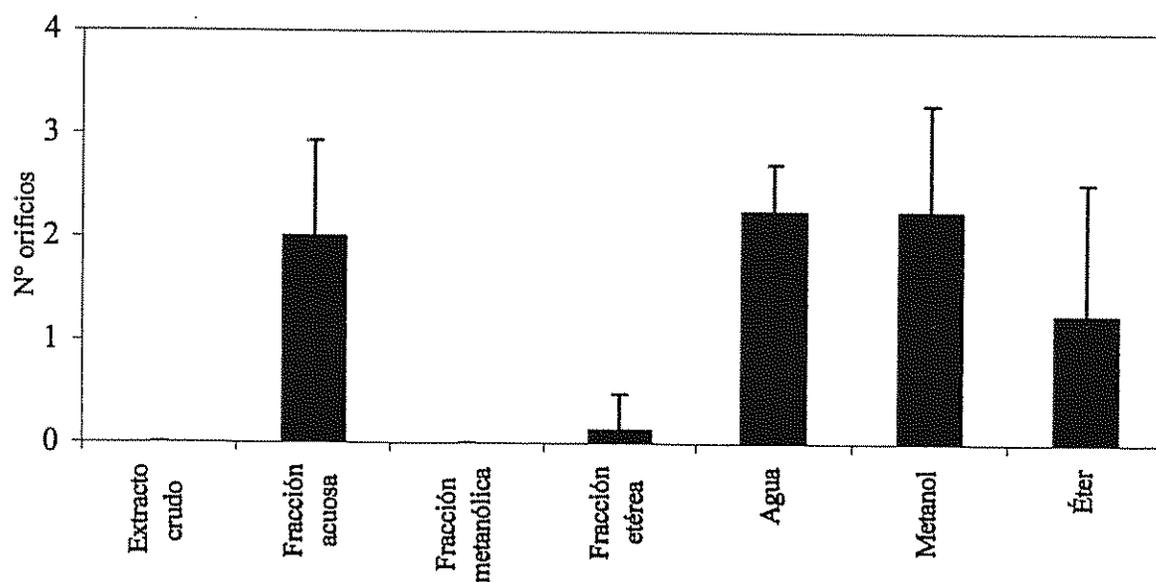


Figura 8. Número promedio de orificios encontrados en plantas de cedro, tratadas con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, dos días después de la inoculación con larvas de instar I de *H. grandella*.

metanólica y etérea. Estos tratamientos no difirieron entre sí ($p > 0,05$), pero sí de los testigos respectivos y de la fracción acuosa. Esta fracción mostró las mayores cantidades de montículos, seguida por los testigos de metanol y agua, pero sin diferir de ellos, y luego por el testigo de éter, difiriendo de él ($p < 0,05$) (Fig. 9, Anexo 11).

En las tres evaluaciones (Fig. 10, Anexo 12), el número de montículos fue nulo o muy bajo en las plantas tratadas con el extracto crudo de *Q. amara*, y con las fracciones metanólica y etérea, sin diferir entre ellos ($p > 0,05$), pero sí de sus respectivos testigos y de la fracción acuosa ($p < 0,05$). La fracción acuosa sólo difirió de su testigo en la tercera evaluación. Entre los testigos de agua y metanol siempre hubo efectos semejantes ($p > 0,05$), y entre los de metanol y éter sólo en la primera evaluación. Los testigos de agua y éter siempre difirieron ($p < 0,05$).

En la última evaluación, se observó que los brotes apicales de las plantas tratadas con la fracción acuosa y el agua estaban totalmente destruidos por el ataque de las larvas, por lo que se registraron menos montículos para dicha evaluación. Éste no fue el caso de las plantas tratadas con la fracción etérea, en las que el número de montículos disminuyó entre la primera y la segunda evaluaciones.

Brotes caídos y túneles. Con respecto al número de brotes caídos en las plantas debido al ataque de las larvas, hubo diferencias entre tratamientos ($F = 75,91$, g.l. = 6, $p < 0,01$), entre evaluaciones ($F = 26,56$, g.l. = 2, $p < 0,01$), y para las interacciones entre tratamientos y evaluaciones ($F = 5,76$, g.l. = 12, $p < 0,01$).

Como promedio de las tres evaluaciones, no hubo caída de brotes en las plantas tratadas con el extracto crudo de *Q. amara* ni la fracción etérea, y muy poca en las tratadas con la fracción metanólica, sin existir diferencias entre ellas ($p > 0,05$). El tratamiento del testigo de metanol mostró la mayor cantidad de brotes caídos, seguido por la fracción acuosa y el testigo de agua, pero sin diferir entre sí ($p > 0,05$). Estos difirieron de los tres primeros, y todos difirieron del testigo de éter ($p < 0,01$) (Fig. 11, Anexo 13).

Para las tres evaluaciones no hubo ningún brote caído en las plantas tratadas con el extracto crudo de *Q. amara* ni con la fracción etérea, y sólo un promedio de 0.12 brotes en las tratadas con la fracción metanólica, para la última evaluación.

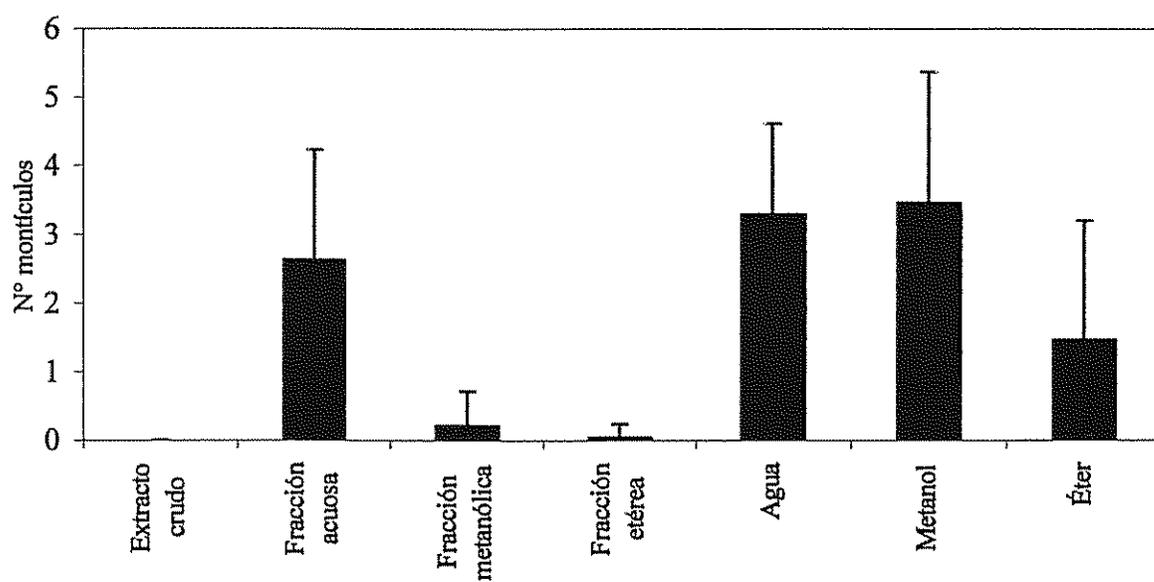


Figura 9. Número promedio de montículos (resultado de tres evaluaciones), encontrados en plantas de cedro tratadas con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara* e inoculadas con larvas de instar I de *H. grandella*.

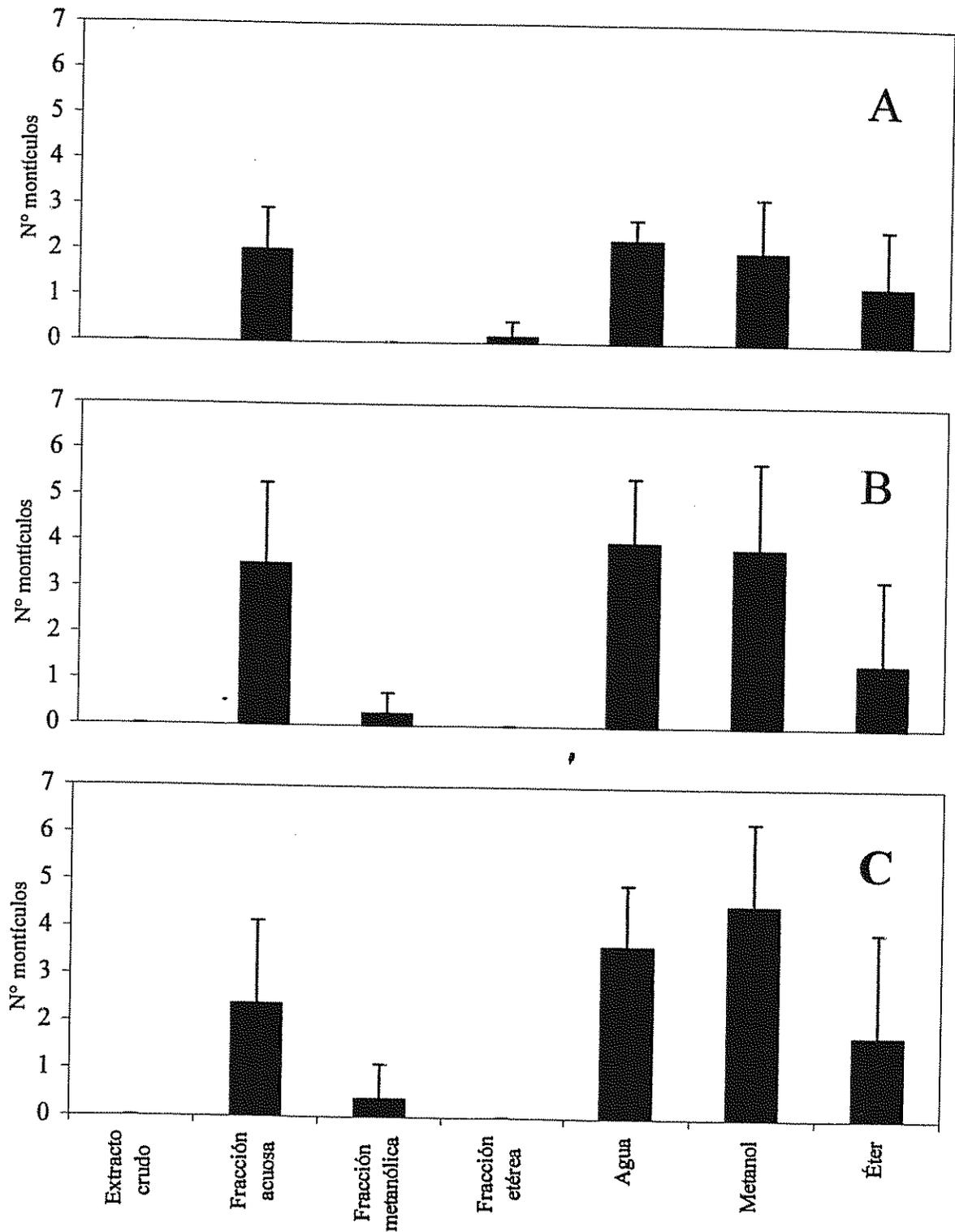


Figura 10. Número promedio de montículos encontrados en plantas de cedro, tratadas con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, dos días (A), una semana (B) y dos semanas (C) después de la inoculación con larvas de instar I de *H. grandella*.

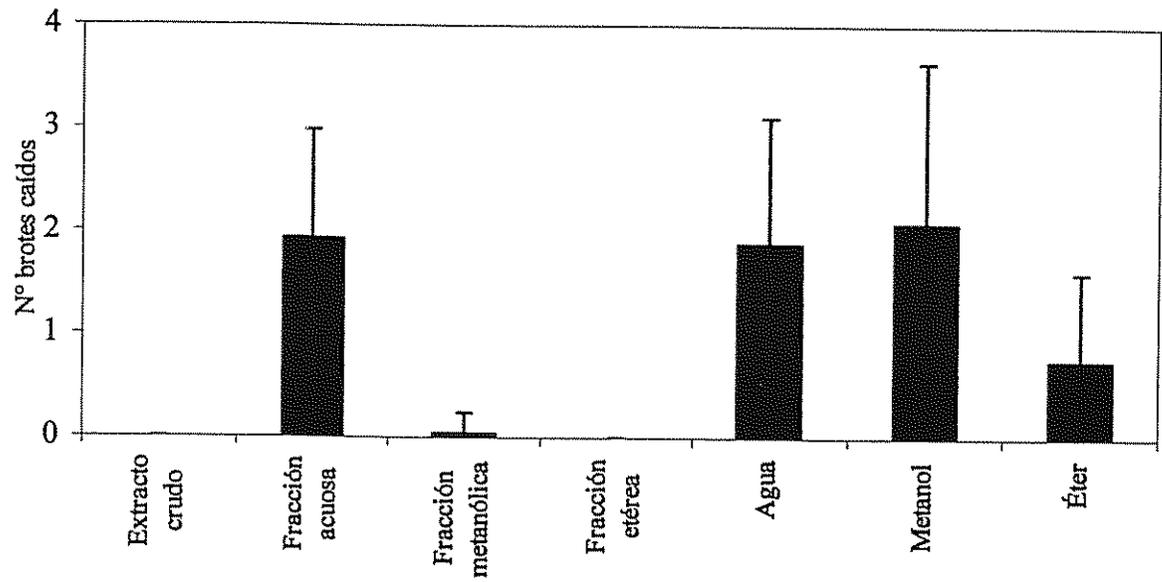


Figura 11. Número promedio de brotes caídos (resultado de tres evaluaciones), encontrados en plantas de cedro tratadas con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara* e inoculadas con larvas de instar I de *H. grandella*.

Estos tratamientos no difirieron entre sí ($p > 0,05$), pero sí de todos los demás en las tres evaluaciones ($p < 0,05$), excepto con el testigo de éter en la primera evaluación. Por su parte, el tratamiento de la fracción acuosa y su respectivo testigo tuvieron efectos similares en las tres evaluaciones. Al comparar las interacciones de los testigos y las evaluaciones, se obtuvieron tendencias erráticas (Fig. 12, Anexo 14).

En la última evaluación, realizada cuatro semanas después de la inoculación, hubo grandes diferencias en el número de túneles encontrados en el estrato superior de las plantas ($F = 17,93$, g.l. = 6, $p < 0,01$) (Fig. 13, Anexo 15). No hubo túneles en las plantas tratadas con el extracto crudo ni con la fracción etérea, y hubo un promedio de 0,12 para la fracción meanólica. Estos tratamientos no difirieron entre sí, pero sí lo hicieron de sus respectivos disolventes y de la fracción acuosa. El testigo de agua y metanol tuvieron un promedio de un túnel por planta, seguidos por la fracción acuosa, que tuvo un promedio de 0,75. Estos tratamientos tuvieron la mayor cantidad de túneles y no difirieron entre ellos, pero sí de los demás. La fracción acuosa no difirió del testigo de éter, el cual tuvo un promedio de 0,5 túneles por planta. Con respecto a las cantidades de larvas o pupas encontradas en los túneles de las plantas, los tratamientos difirieron mucho ($F = 4,71$, g.l. = 6, $p < 0,01$). Las diferencias fueron encontradas entre los testigos de agua y metanol, que presentaron un promedio de 0,87 larvas por planta, y el extracto crudo y la fracción etérea que no presentaron ninguna larva (Anexo 16).

Hubo diferencias respecto a las cantidades de túneles encontrados en el estrato inferior de las plantas ($F = 2,5$, g. l. = 6, $p < 0,05$), pues hubo presencia de ellos en las tratadas con el testigo de agua y metanol y con la fracción acuosa (Fig. 13, Anexo 15). Sin embargo, no se detectaron diferencias individuales entre los tratamientos. No hubo diferencias en las cantidades de larvas encontradas en el estrato inferior de las plantas ($F = 0,07$, g. l. = 6, $p > 0,05$), aunque hubo un promedio de 0,25 en las plantas tratadas con la fracción acuosa y el metanol, y 0,38 en las tratadas con agua (Anexo 16).

Al realizar la medición de la longitud de los túneles de las plantas, no hubo diferencias entre los tratamientos respecto a los túneles encontrados en el estrato superior ($F = 0,29$, g.l. = 4, $p > 0,05$), ni tampoco entre los del estrato inferior ($F = 0,03$, g.l. = 2, $p > 0,05$) (Fig. 14, Anexo 17). A diferencia de los túneles del estrato superior, los del estrato inferior fueron más cortos y semejaron cavidades en forma de galerías, pues la larva barrenó en todas direcciones.

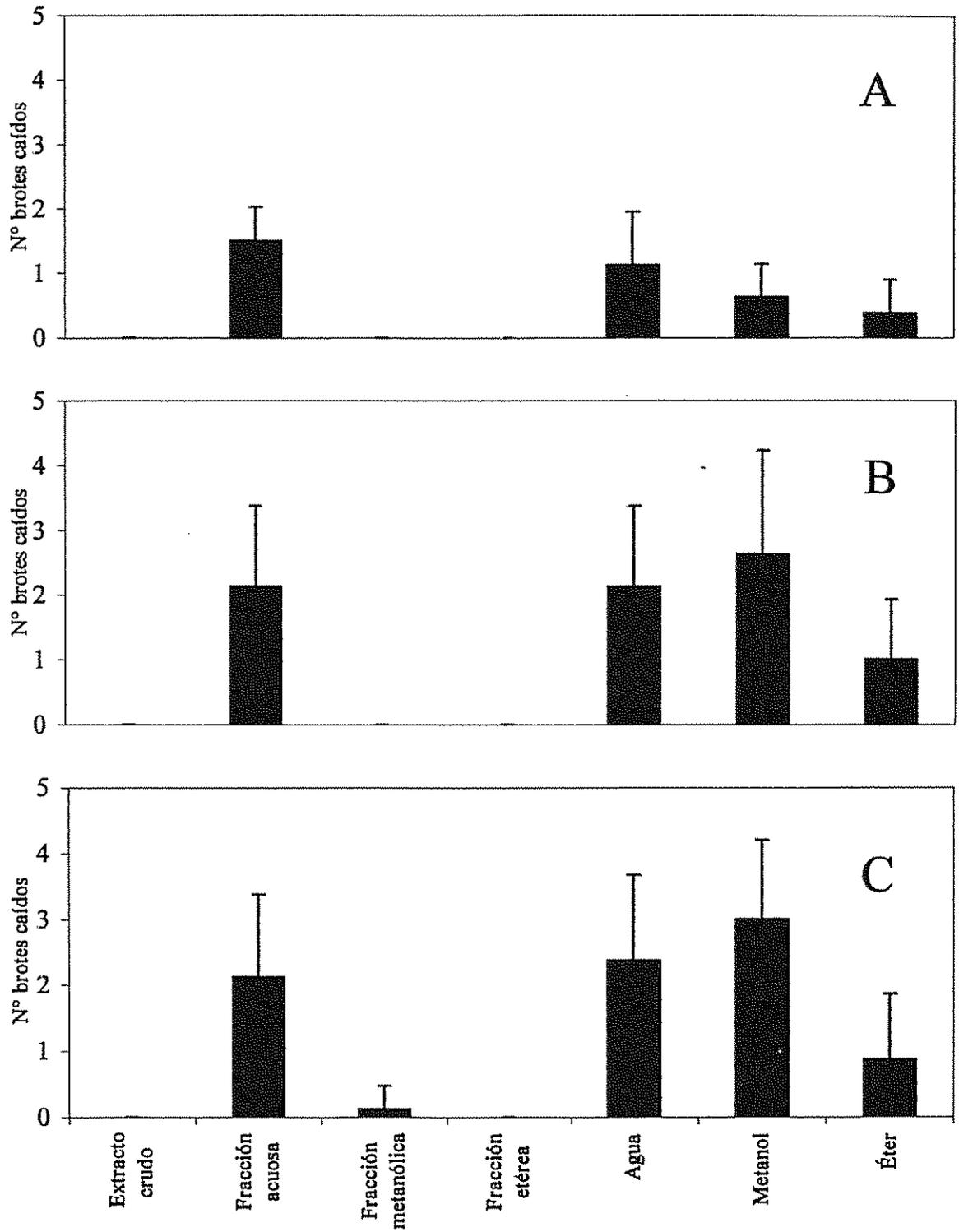


Figura 12. Número promedio de brotes caídos en plantas de cedro, tratadas con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, dos días (A), una semana (B) y dos semanas (C) después de la inoculación con larvas de instar I de *H. grandella*.

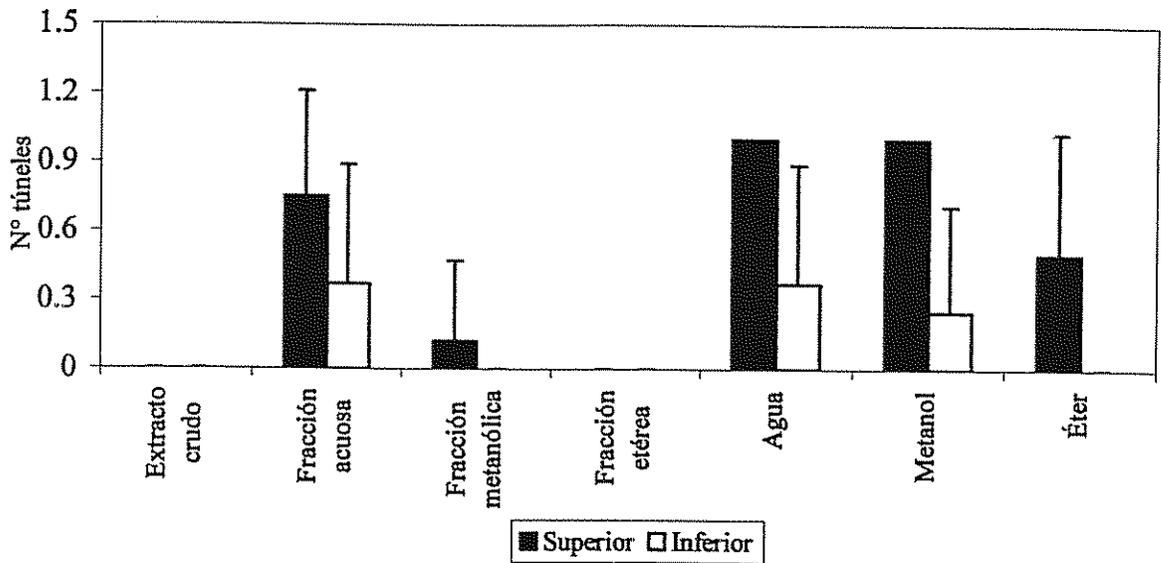


Figura 13. Número promedio de túneles encontrados en los estratos superior e inferior de plantas de cedro tratadas con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, cuatro semanas después de la inoculación con larvas de instar I de *H. grandella*.

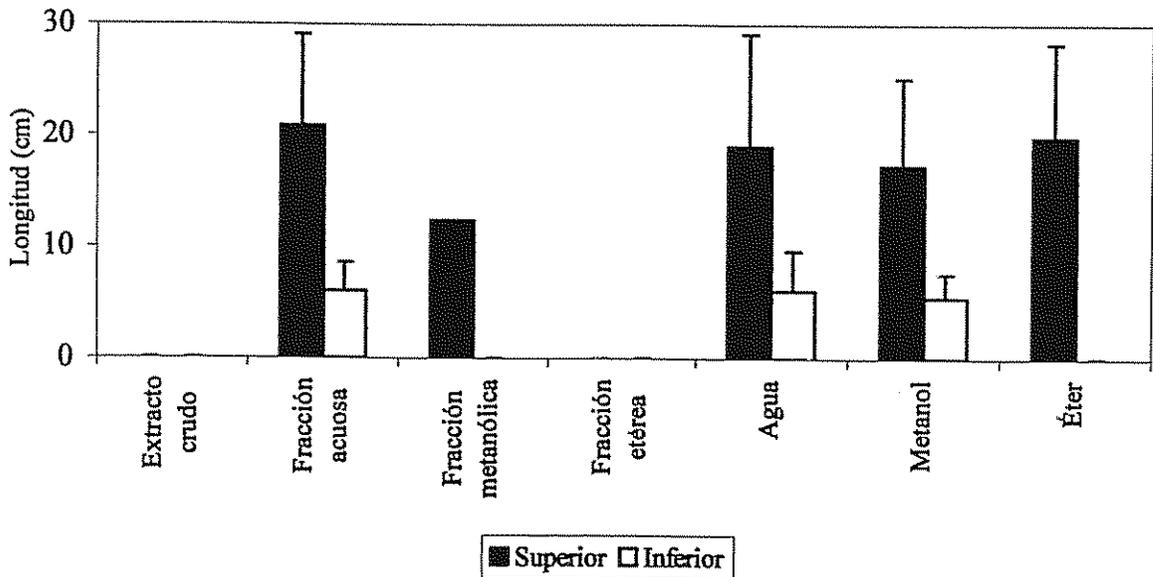


Figura 14. Longitud promedio de los túneles encontrados en los estratos superior e inferior de plantas de cedro tratadas con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, cuatro semanas después de la inoculación con larvas de instar I de *H. grandella*.

4.1.3. Bioanálisis específicos de laboratorio

4.1.3.1. Fracción metanólica de *Q. amara*

Efecto fagodisuasivo. Con respecto al consumo de los discos foliares de cedro, hubo grandes diferencias entre tratamientos ($F = 25,95$, g.l. = 6, $p < 0,01$) (Fig. 15, Anexo 18). Los discos impregnados con las cuatro concentraciones más altas tuvieron los menores porcentajes de consumo, y no hubo diferencias entre ellos ($p > 0,05$). Los testigos de agua y disolvente tampoco difirieron entre sí, pero sí de los anteriores ($p < 0,05$), y fueron semejantes al tratamiento con la menor concentración; éste se asemejó ($p > 0,05$), además, al de concentración inmediatamente superior.

Al incrementarse la concentración de la fracción se redujo el porcentaje de consumo en los discos (Fig. 16). El mejor ajuste de la curva de respuesta se encontró con un modelo logarítmico ($R^2 = 0,97$, $p < 0,01$). En la curva se relacionó el porcentaje de consumo como variable dependiente de las concentraciones de extracto crudo que contienen las concentraciones de fracción metanólica utilizadas en los tratamientos.

Mortalidad. En cuanto a los porcentajes de mortalidad acumulada durante la primera semana del experimento, los tratamientos difirieron desde el primer día en que las larvas estuvieron expuestas a los discos foliares, y durante los seis días posteriores, en los que ellas se encontraban en dieta artificial.

Durante el período de observaciones, los más altos porcentajes de mortalidad (53%) correspondieron al tratamiento de la mayor concentración, el cual difirió solamente del testigo de agua ($p < 0,05$) durante los primeros seis días, y del tratamiento de menor concentración desde el día cuarto hasta el sexto (Fig. 17, Anexo 19). El segundo y tercer tratamientos de mayor concentración difirieron algunos días del testigo de agua, pero con tendencias más erráticas. Los menores porcentajes de mortalidad acumulada se observaron en los testigos de agua y del disolvente, los cuales no difirieron entre sí ($p > 0,05$). El disolvente tampoco difirió ($p > 0,05$) de ninguno de los tratamientos de la fracción.

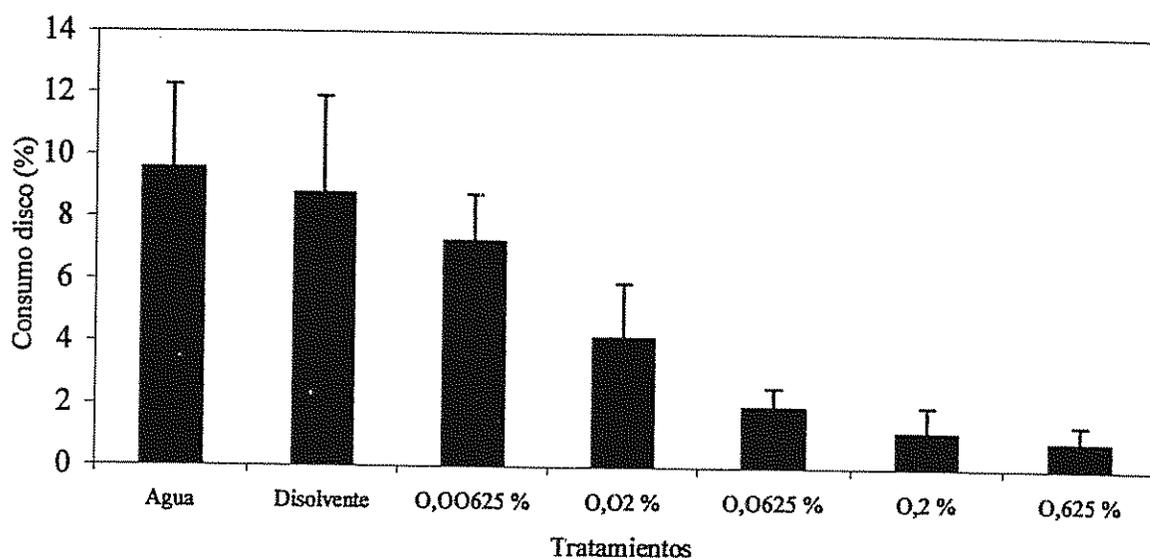


Figura 15. Porcentaje promedio de consumo en discos foliares de cedro tratados con concentraciones crecientes de la fracción metanólica del extracto de *Q. amara*, al exponer larvas de instar III de *H. grandella*, durante 24 h.

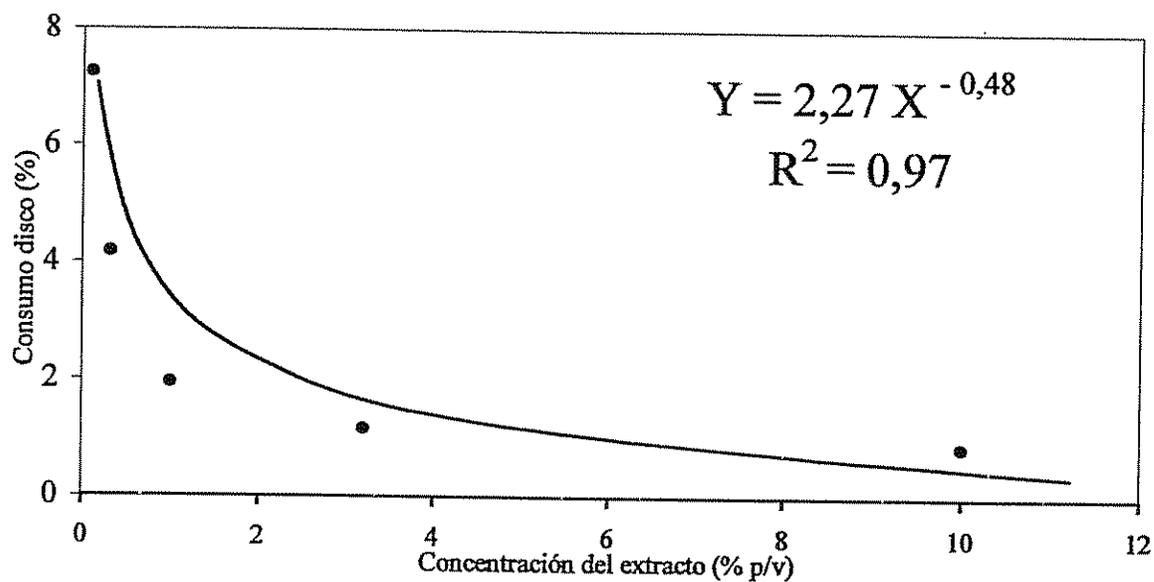


Figura 16. Relación entre el consumo de discos foliares de cedro, por larvas de instar III de *H. grandella*, y concentraciones crecientes del extracto crudo de *Q. amara* relativas a las concentraciones de la fracción metanólica. La línea continua muestra la tendencia esperada (estimada).

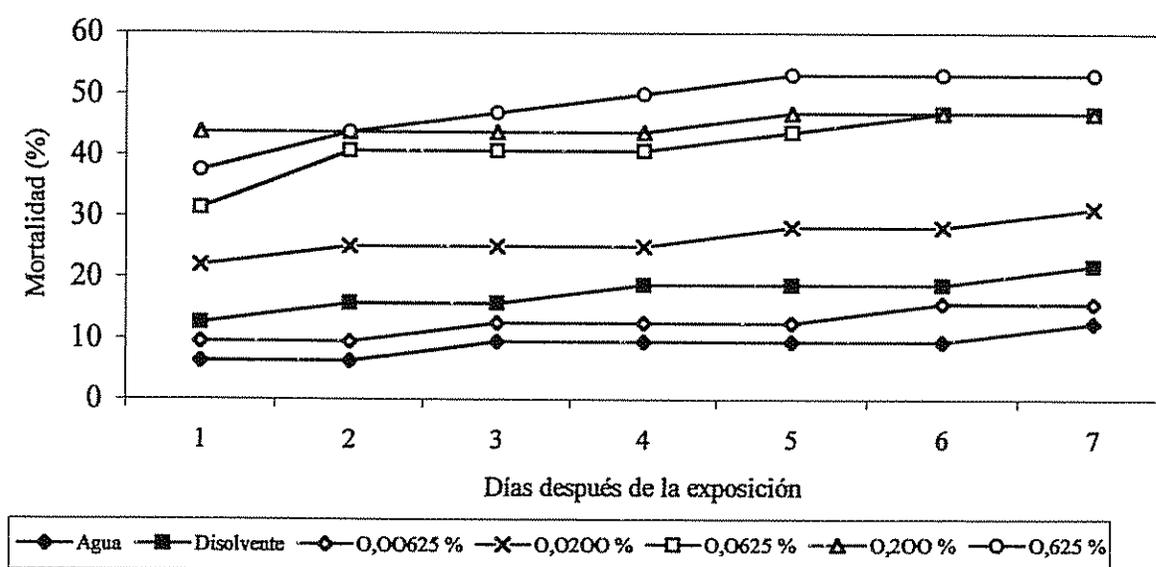


Figura 17. Porcentaje de mortalidad acumulada de larvas de *H. grandella*, durante los primeros siete días del experimento, luego de su exposición a discos foliares de cedro tratados con concentraciones crecientes de la fracción metanólica del extracto de *Q. amara*, durante 24 h y en el instar III.

Al aumentar el porcentaje de consumo de los discos de cedro impregnados con las diferentes concentraciones, disminuyó el porcentaje de mortalidad acumulada medida a los dos días después de iniciado el consumo en dichos discos (Fig. 18). La curva fue mejor ajustada a través de un modelo lineal ($R^2 = 0,93$, $p < 0,01$).

4.1.3.2. Fracción etérea de *Q. amara*

Efecto fagodisuasivo. En cuanto al consumo en los discos foliares de cedro hubo grandes diferencias entre los tratamientos ($F = 67,97$, g.l. = 6, $p < 0,01$). Sin embargo, las diferencias sólo ocurrieron entre el testigo de agua y todos los demás tratamientos ($p < 0,01$), pues los correspondientes a las concentraciones de la fracción etérea y al disolvente fueron semejantes entre sí ($p > 0,05$) (Fig. 19, Anexo 20).

Además, no se pudo determinar una relación entre el porcentaje de consumo en los discos foliares y las dosis utilizadas como tratamiento, como se hizo para la fracción metanólica, pues ningún modelo se ajustó con valores de R^2 significativos.

Mortalidad. Excepto el primer día, en el cual las larvas se encontraban expuestas a los discos foliares, hubo diferencias entre los porcentajes de mortalidad de las larvas durante la semana de observaciones ($p < 0,05$) (Fig. 20, Anexo 21). Los mayores porcentajes de mortalidad en este período ocurrieron a la menor concentración, y los menores con el testigo de agua. Dichos tratamientos difirieron entre sí ($p < 0,05$), y además el testigo de agua difirió del tratamiento de la segunda concentración más alta desde el segundo hasta el sexto día. El tratamiento testigo del disolvente nunca difirió ($p > 0,05$) de ninguno de los tratamientos correspondientes a las concentraciones de la fracción.

4.2. SISTEMICIDAD DE EXTRACTOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA SOBRE *H. grandella*.

Efecto fagodisuasivo. Con respecto al consumo de los folíolos provenientes de plantas de cedro cultivadas *in vitro*, hubo grandes diferencias entre tratamientos ($F = 50,96$, g.l. = 5, $p < 0,01$),

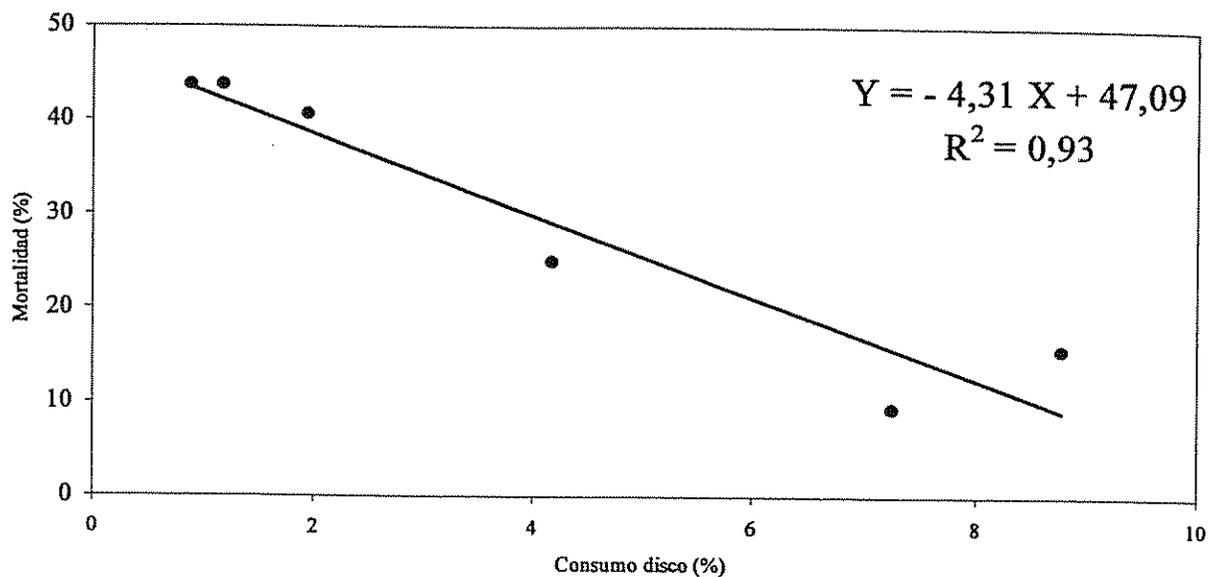


Figura 18. Relación entre el porcentaje de mortalidad, al segundo día después de iniciado el consumo de discos foliares de cedro tratados con concentraciones crecientes de la fracción metanólica del extracto de *Q. amara*, y el porcentaje de consumo de dichos discos por larvas de instar III de *H. grandella*.

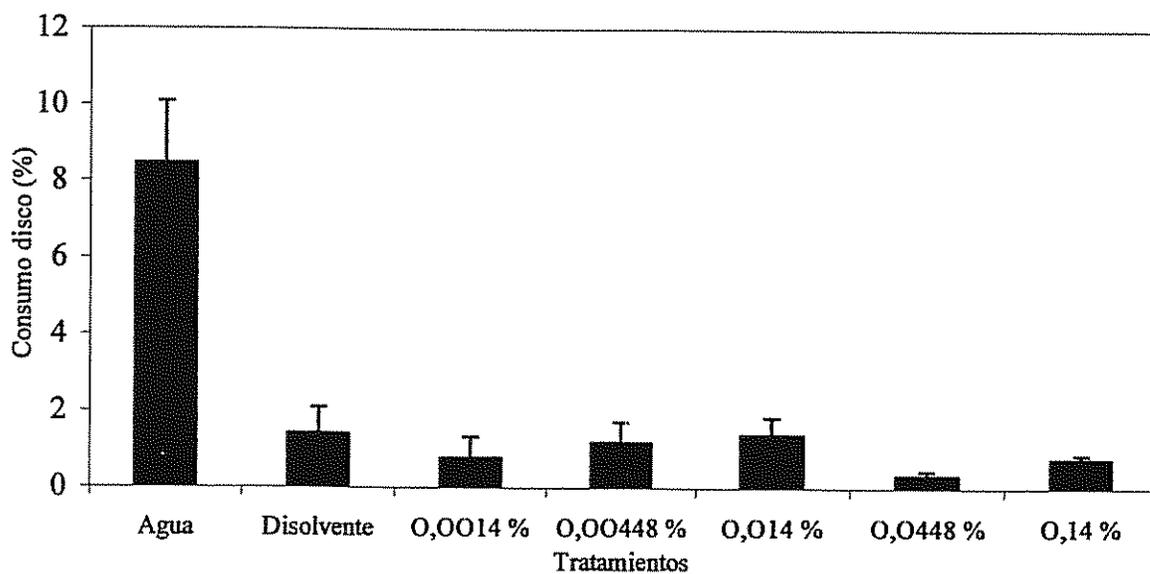


Figura 19. Porcentaje promedio de consumo en discos foliares de cedro tratados con concentraciones crecientes de la fracción etérea del extracto de *Q. amara*, al exponer larvas de instar III de *H. grandella*, durante 24 h.

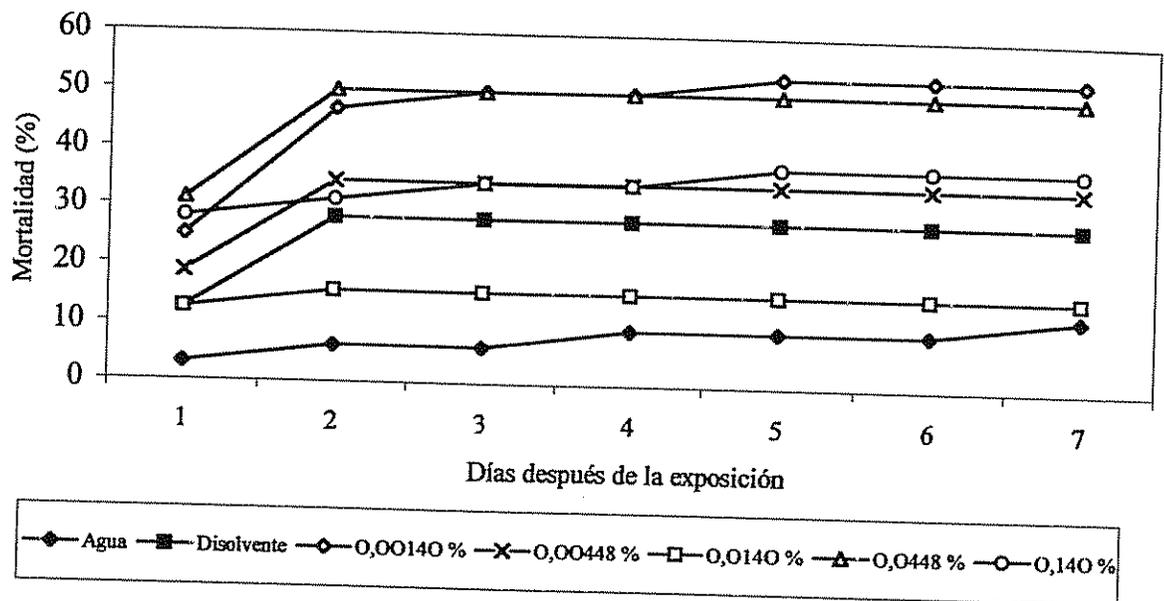


Figura 20. Porcentaje de mortalidad acumulada de larvas de *H. grandella*, durante los primeros siete días del experimento, luego de su exposición a discos foliares de cedro tratados con concentraciones crecientes de la fracción etérea del extracto de *Q. amara*, durante 24 h y en el instar III.

evaluaciones ($F = 4,84$, g.l. = 2, $p < 0,01$), y para las interacciones entre tratamientos y evaluaciones ($F = 3,01$, g.l. = 10, $p < 0,01$).

Entre tratamientos, como promedio de las tres evaluaciones (Fig. 21, Anexo 22), el carbofurán mostró porcentajes nulos de consumo en los folíolos y su efecto sólo fue semejante al del Azatín ($p > 0,05$), el cual fue el extracto que causó los menores porcentajes de consumo. En el testigo (agua) se obtuvieron los mayores porcentajes, difiriendo de todos los demás ($p < 0,05$). Para los extractos vegetales, sólo hubo diferencias entre los folíolos provenientes de plantas cultivadas en medios con tacaco cimarrón y los de aquellos provenientes de plantas cultivadas en medios con hombre grande o Azatín.

Con respecto a las diferencias entre tratamientos para la primera evaluación (Fig. 22A, Anexo 23), realizada tres días después de la siembra de las plantas en los medios de cultivo, el carbofurán impidió el consumo y fue seguido por el Azatín y el hombre grande, sin diferir de ellos ($p > 0,05$). Sin embargo estos tres tratamientos difirieron de los demás ($p < 0,05$). Los mayores porcentajes de consumo correspondieron al testigo de agua, que no difirió del tacaco cimarrón ($p > 0,05$), pero juntos difirieron de los demás tratamientos. La ruda mostró una posición intermedia.

Para la segunda y tercera evaluación, realizadas una y dos semanas después de la siembra de las plantas en los medios de cultivo, respectivamente, hubo tendencias más parecidas entre los tratamientos (Fig. 22A, 22B, Anexo 23). El agua tuvo los mayores porcentajes de consumo, difiriendo de los demás tratamientos ($p < 0,05$). El carbofurán tuvo siempre porcentajes de consumo nulos, pero no difirió de la mayoría de los extractos, excepto del hombre grande en la segunda evaluación ($p < 0,05$), y del tacaco cimarrón en la tercera. En estas evaluaciones, los tratamientos correspondientes a los extractos no difirieron entre sí ($p > 0,05$).

Mortalidad. En cuanto a los porcentajes de mortalidad acumulada durante los primeros siete días de cada uno de los tres experimentos (correspondientes a las tres evaluaciones), hubo diferencias ($p < 0,05$) entre tratamientos, entre evaluaciones, y entre las interacciones de los tratamientos y las evaluaciones para algunos de estos días.

Hubo grandes diferencias ($p < 0,01$) con respecto a la mortalidad acumulada entre tratamientos, como promedio de los tres experimentos (Fig. 23, Anexo 24). El carbofurán causó una mortalidad

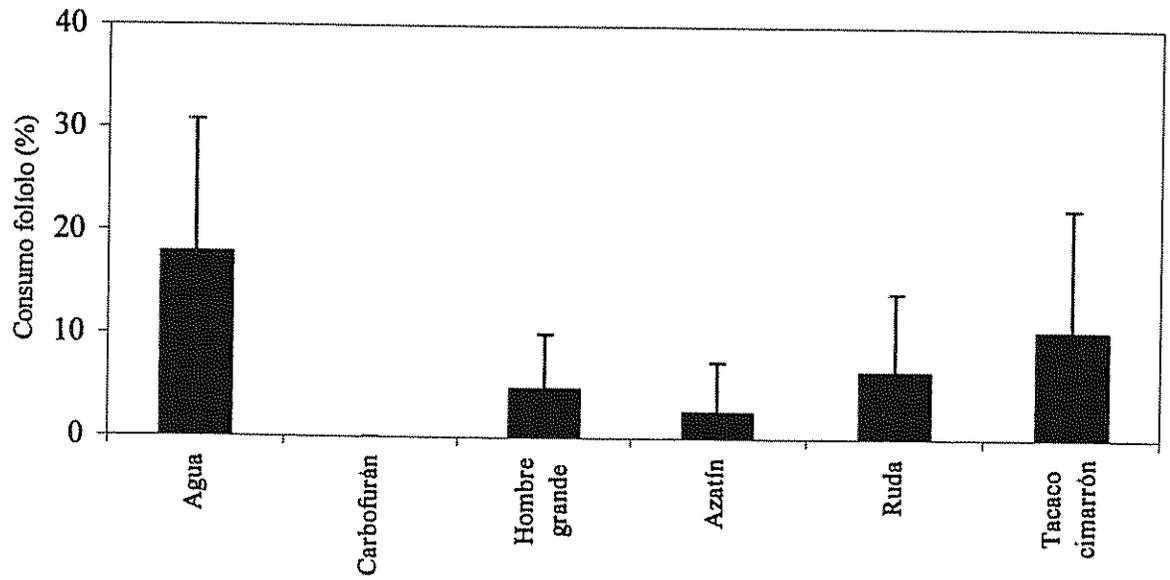


Figura 21. Porcentaje promedio de consumo (resultado de tres evaluaciones) en folíolos provenientes de plantas cultivadas *in vitro* en medios con diferentes extractos vegetales, al exponer larvas de instar I de *H. grandella*, durante 24 h.

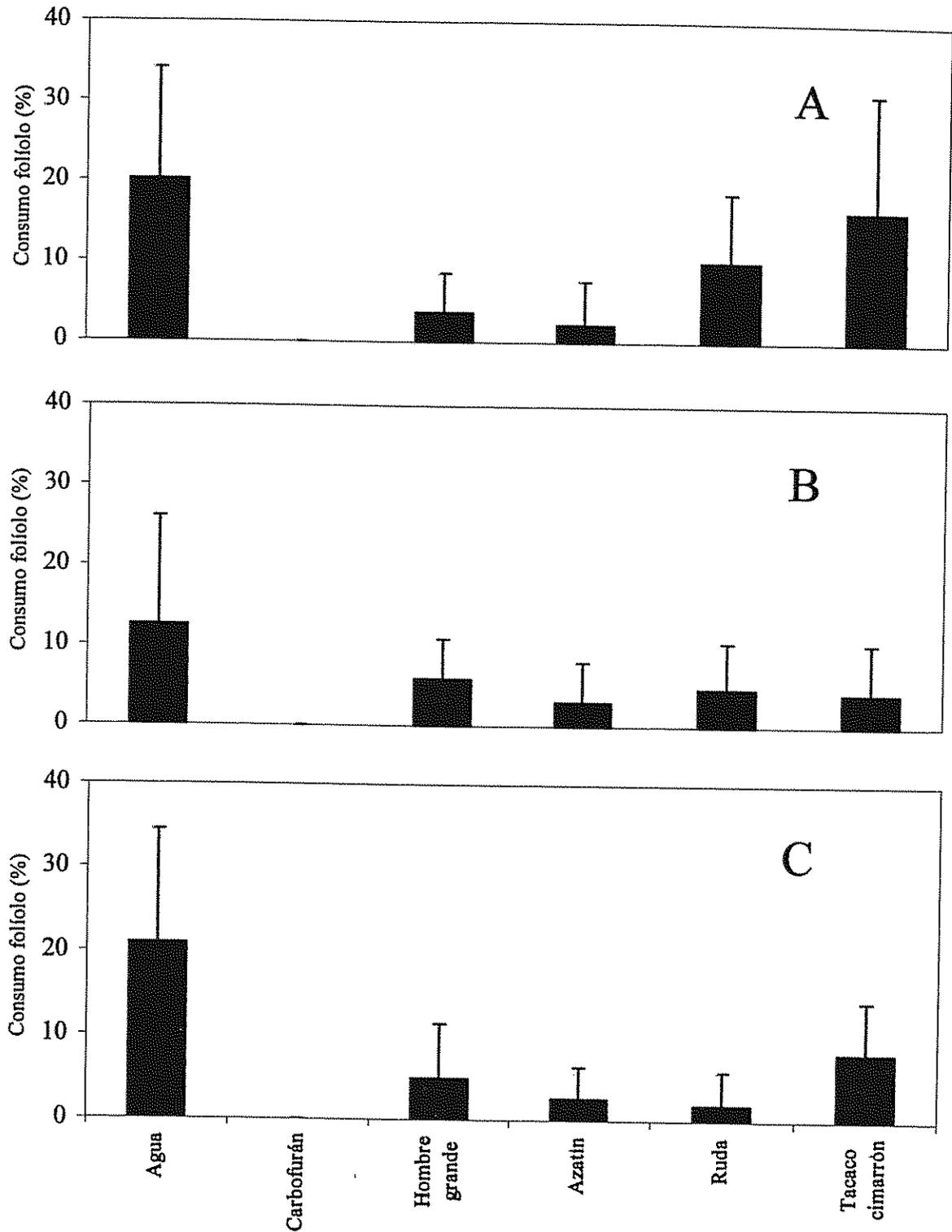


Figura 22. Porcentaje promedio de consumo en folíolos provenientes de plantas de cedro cultivadas *in vitro* en medios con diferentes extractos vegetales, al exponer larvas de instar I de *H. granella*, durante 24 h, y para las evaluaciones realizadas tres días (A), una semana (B) y dos semanas (C) después de la siembra.

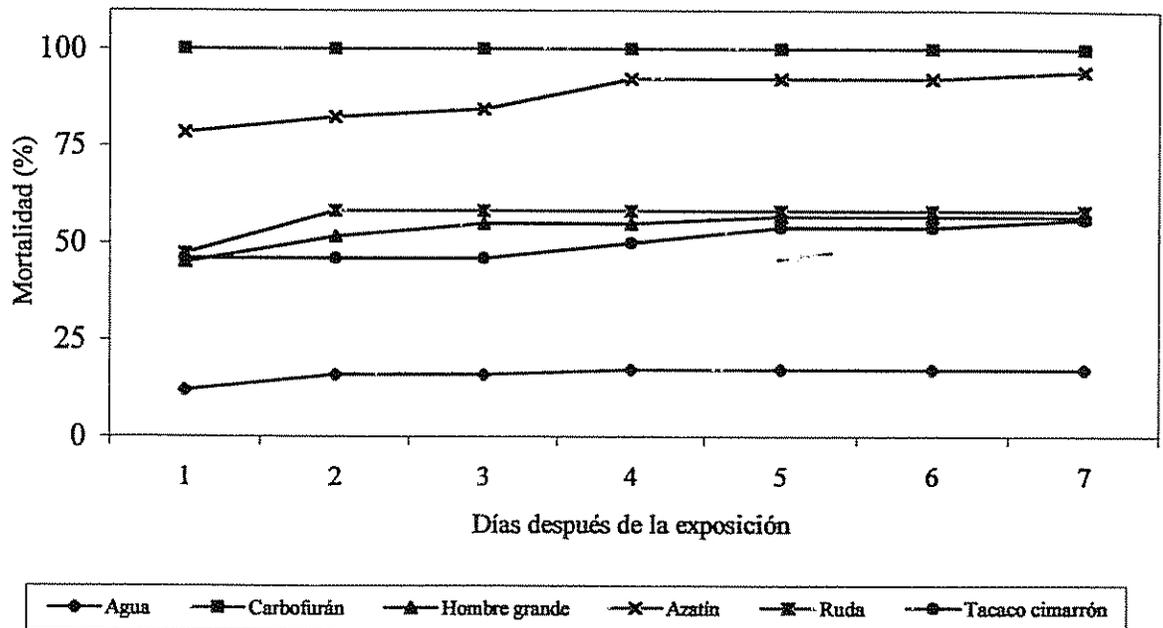


Figura 23. Porcentaje promedio de mortalidad acumulada (resultado de tres evaluaciones) de larvas de *H. grandella*, durante los primeros siete días de cada experimento, luego de su exposición a folíolos provenientes de plantas de cedro cultivadas *in vitro* en medios con diferentes extractos vegetales.

del 100% desde el primer día, y fue seguido por el Azatín, el cual aumentó la mortalidad desde 78 hasta 94 % durante el período de observaciones. Ambos no difirieron entre sí ($p > 0,05$), pero sí de todos los demás ($p < 0,05$). El testigo (agua) mostró la menor mortalidad en los tres experimentos (12–17%), manteniendo su tendencia durante todo el período y difiriendo de los demás tratamientos ($p < 0,05$). Los extractos de ruda, hombre grande y tacaco cimarrón causaron mortalidad intermedia (45–58%), sin diferir entre ellos ($p > 0,05$).

La mortalidad acumulada, como promedio de todos los tratamientos dentro de cada evaluación, difirió ($p < 0,05$) únicamente en los cuatro primeros días del período de observación. En general, fue mayor en la tercera evaluación, seguida por la de la segunda evaluación, pero sin diferir entre sí ($p > 0,05$), aunque sí de la primera evaluación ($p < 0,05$). La mortalidad de la primera y segunda evaluaciones sólo difirieron para el cuarto día ($p < 0,05$).

Para el experimento correspondiente a la evaluación de los tres días después de la siembra hubo una tendencia clara (Fig. 24A, Anexo 25). El carbofurán y el Azatín causaron los mayores porcentajes de mortalidad en este intervalo, sin diferir entre sí ($p > 0,05$), pero sí de los demás tratamientos. Por su parte, el testigo (agua) mostró el menor valor y difirió de los demás durante todo el período ($p < 0,05$), excepto de la ruda en el primer día. Los tratamientos de hombre grande, tacaco cimarrón y ruda no difirieron entre sí ningún día.

En el segundo experimento (correspondiente a la evaluación realizada una semana después de la siembra), las tendencias de mortalidad fueron más erráticas (Fig. 24B, Anexo 26). El carbofurán causó mortalidad del 100% desde el primer día, difiriendo de todos los tratamientos durante todo el período ($p < 0,05$) y fue semejante al Azatín a partir del segundo día ($p > 0,05$). Por su parte, el agua causó el menor porcentaje de mortalidad (24–36%). Sin embargo, a partir del segundo día, este valor difirió mucho ($p < 0,01$) de los valores para el agua en la primera evaluación, y difirió ($p < 0,05$) de los de la tercera evaluación. El tratamiento de agua, además, fue semejante al de hombre grande durante todo el período, a la ruda desde el segundo día y al tacaco cimarrón entre el segundo y cuarto días ($p > 0,05$). Estos extractos fueron semejantes entre sí durante los siete días, y semejantes al Azatín durante el segundo y tercer día ($p > 0,05$). El Azatín no difirió del tacaco cimarrón ni de la ruda el primer día, ni del tacaco cimarrón en el séptimo día.

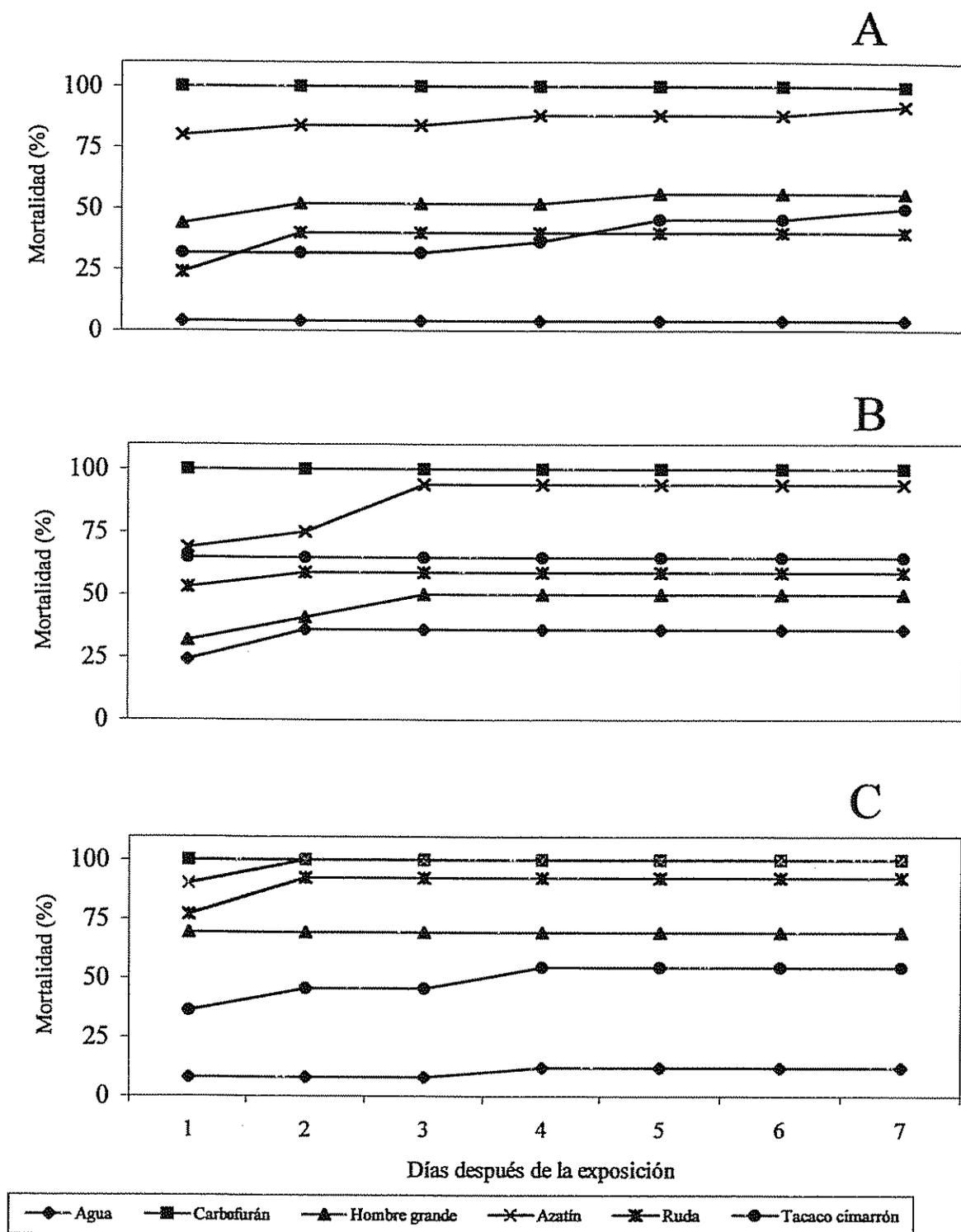


Figura 24. Porcentaje de mortalidad acumulada de larvas de *H. grandella*, durante los primeros siete días de cada experimento, luego de su exposición a folíolos provenientes de plantas de cedro cultivadas *in vitro* en medios con diferentes extractos vegetales, y tomados tres días (A), una semana (B) y dos semanas (C) después de la siembra.

En el último experimento (correspondiente a la evaluación hecha dos semanas después de la siembra), hubo diferencias más claras entre los tratamientos (Fig. 24C, Anexo 27). Durante el período de observación, el carbofurán causó el mayor porcentaje de mortalidad, seguido por el Azatín y la ruda, sin diferir de ellos ($p > 0,05$); estos dos, por su parte, no difirieron del hombre grande. El tacaco cimarrón se asemejó al agua durante los primeros tres días ($p > 0,05$) y juntos difirieron de los demás ($p < 0,05$), pero a partir del cuarto día el tacaco cimarrón difirió del agua y se asemejó a los efectos del hombre grande y la ruda.

Con respecto a la mortalidad acumulada hasta que las larvas empuparon (mortalidad total), hubo diferencias entre tratamientos ($F = 13,45$, g.l. = 5, $p < 0,01$) y entre evaluaciones ($F = 4,39$, g.l. = 2, $p < 0,05$).

Como promedio de las tres evaluaciones, los tratamientos de carbofurán y Azatín causaron mortalidad del 100%, difiriendo de los demás tratamientos ($p < 0,05$). El agua causó la menor mortalidad (59%) y difirió de los demás. Por su parte, los extractos de ruda, hombre grande y tacaco cimarrón causaron mortalidad intermedia (78–81%), y no difirieron entre sí ($p > 0,05$) (Fig. 25, Anexo 28).

Para las tres evaluaciones, los tratamientos de carbofurán y Azatín provocaron mortalidad del 100% en las larvas, y nunca difirieron entre sí ($p > 0,05$). En la primera evaluación, estos tratamientos difirieron de los demás (Fig. 26A, Anexo 29), los extractos de hombre grande, tacaco cimarrón y ruda no difirieron ($p > 0,05$), y sólo la ruda se asemejó al testigo de agua ($p > 0,05$).

Para la segunda evaluación (Fig. 26B, Anexo 29), los únicos tratamientos que difirieron fueron el carbofurán y el agua, al tener valores extremos de mortalidad de 100 y 76%, respectivamente. En la tercera evaluación (Fig. 26C, Anexo 29), el tratamiento de ruda también alcanzó un valor de 100% de mortalidad, por lo que no difirió de carbofurán y Azatín ($p > 0,05$). Estos tratamientos difirieron del hombre grande, tacaco cimarrón y el agua, que causaron mortalidades entre 50 y 63%, sin diferir entre sí ($p > 0,05$).

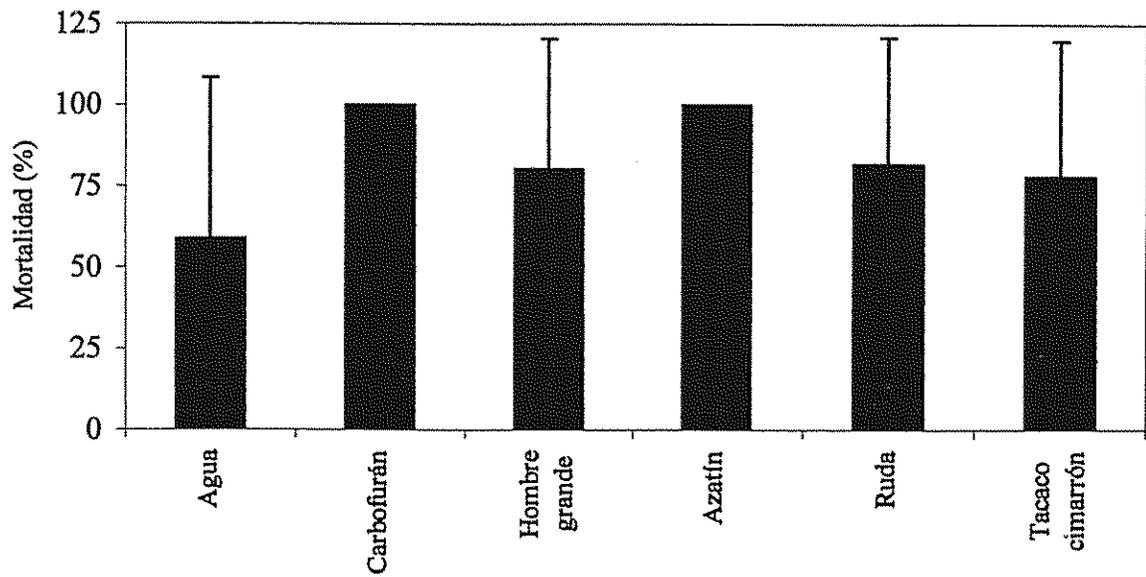


Figura 25. Porcentaje de mortalidad total (promedio de tres evaluaciones) de larvas de *H. grandella* expuestas a folíolos provenientes de plantas de cedro cultivadas *in vitro* en medios con diferentes extractos vegetales, durante 24 h y en el instar I.

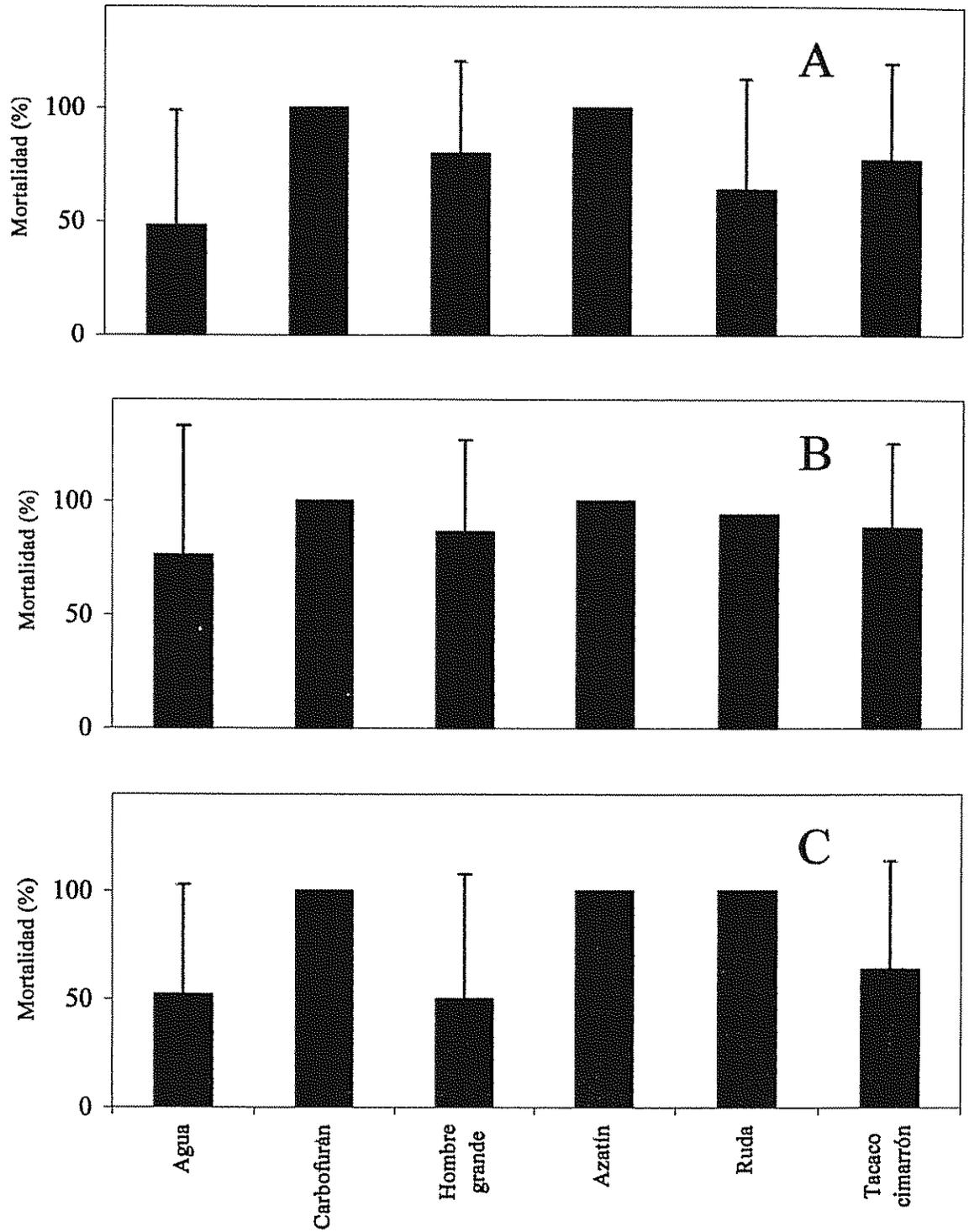


Figura 26. Porcentaje de mortalidad total de larvas de *H. grandella* expuestas a folíolos provenientes de plantas de cedro cultivadas *in vitro* en medios con diferentes extractos vegetales, y para las evaluaciones realizadas tres días (A), una semana (B) y dos semanas (C) después de la siembra.

5. DISCUSIÓN

La madera de *Q. amara* posee sustancias que pueden causar fagodisuasión en las larvas de *H. grandella* (Shannon *et al.* 1997, Mancebo *et al.* 2000c). De hecho, se ha documentado que éstas poseen receptores asociados con la fagodisuasión, en órganos sensoriales (sensillas estilocónicas) ubicados en las maxilas (Schoonhoven 1980). No obstante, dicho efecto se había determinado solamente para extractos crudos de la madera de *Q. amara*, en los cuales posiblemente predominan varios cuasinoídes, tales como cuasina y neocuasinas (Polonsky 1973). Por ejemplo, Leskinen *et al.* (1984) hallaron que un tipo de cuasinoide presente en *Q. amara* actúa como fagodisuasiva de *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae).

En la presente investigación se obtuvieron fracciones a partir de una primera mezcla (extracto crudo), la cual fue sometida a un proceso de extracción con varios disolventes. El problema principal con una extracción es la determinación de un disolvente de alta selectividad que permita obtener los principios activos deseados con alta eficiencia y a bajo costo (Feuerhake 1984). Los disolventes utilizados en el fraccionamiento del extracto crudo de *Q. amara* se diferencian en sus propiedades físicas y químicas, por lo que son capaces de disolver diferentes tipos de sustancias presentes en dicho extracto. Por ejemplo, la polaridad de las moléculas de los disolventes disminuye en la secuencia agua, metanol y éter dietílico, mientras que su tamaño y peso aumenta en ese mismo orden (Bonner y Castro 1971, Summers 1983). Es decir, aunque las sustancias presentes en cada fracción no fueran identificadas, podrían caracterizarse sus polaridades y, en términos muy generales, sus grupos funcionales, tamaños y pesos, según el disolvente por el cual tuvieron mayor avidez.

Además, la utilidad práctica de este proceso fue la posibilidad de estudiar la actividad biológica de las fracciones, y compararla con la del extracto crudo, que previamente se había estudiado en detalle con respecto a *H. grandella* (Mancebo *et al.* 2000c). En un experimento parecido, con el nim, Sharma *et al.* (1982) fraccionaron el extracto de las semillas y encontraron que las fracciones de benceno y acetato de etilo tuvieron una actividad ovidisuasiva en la hembra de *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). Otras dos fracciones (extraídas con una mezcla de acetona y éter de petróleo, a partir de la primera) no mostraron dicha actividad, pero tuvieron, respectivamente, efectos fagodisuasivos en larvas de *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) e insecticidas en *Myzus persicae* y *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). Según estos autores, el

proceso podría desarrollarse para una producción industrial a pequeña escala de estas fracciones del extracto del nim, y en tal sentido, el fraccionamiento del extracto de la madera de *Q. amara* también tendría esta utilidad.

Para caracterizar la actividad biológica del extracto crudo, así como de las fracciones metanólica y etérea, deben complementarse los hallazgos de los bioanálisis de laboratorio con los de los experimentos de invernadero. Los primeros permiten obtener resultados rápidos sobre el efecto fagodisuasivo, así como también observar efectos posteriores en la mortalidad y el ciclo de vida. En éstos, las larvas se exponen a un disco foliar, impregnado con algún tratamiento, que representa la única fuente de alimento durante 24 h. Por su parte, los experimentos de invernadero permiten observar cómo funcionarían las sustancias fagodisuasivas en condiciones más parecidas a las del campo. En ellos, la inoculación de las larvas en los brotes apicales de las plantas implica el inicio de la búsqueda de alimento y el descubrimiento de sustancias que podrían afectar su actividad alimentaria de diferentes maneras.

Tanto en el bioanálisis general de laboratorio como en el experimento de invernadero, las fracciones se evaluaron a la concentración en que ellas se encuentran dentro de una mezcla del extracto crudo al 10%, que fue la concentración más alta a la cual se había detectado algún tipo de actividad biológica (Shannon *et al.* 1997, Mancebo *et al.* 2000c).

En el bioanálisis se demostró un claro efecto fagodisuasivo de las fracciones etérea y metanólica, al igual que del extracto crudo. Estos tres tratamientos siempre provocaron los menores valores de consumo, tanto en el laboratorio como el invernadero, con leves diferencias a favor del extracto crudo de *Q. amara*; no obstante, a la concentración aplicada causó síntomas de toxicidad en el invernadero, provocando la caída de algunas hojas y quemaduras persistentes en la superficie del tallo.

La fagodisuasión causada por la fracción etérea fue muy evidente, como lo mostró el contraste entre el consumo en los discos tratados con esta fracción y aquellos tratados apenas con éter. Asimismo, en el experimento de invernadero hubo algunos orificios y brotes caídos, inicialmente, en las plantas tratadas con esta fracción, lo cual podría ser evidencia de un efecto retardado. Aunque el éter parece haber afectado en forma más severa las superficies de las plantas, evitando así un ataque similar al que sucedió con el agua, estos hechos no fueron lo suficientemente importantes como para impedir observar la diferencia de efectos entre la fracción y su disolvente. Si bien el éter puede ser

fitotóxico (en algunos casos produjo corrugamiento de los discos, deshidratación del tejido foliar y disolución de pigmentos), es muy volátil y su rápida evaporación evitaría daños severos al árbol y los discos, dejándolos impregnados con las sustancias presentes en la fracción aplicada.

Por su parte, la fagodisuasión causada por la fracción metanólica no difirió de la de su disolvente en el bioanálisis, lo cual sugiere que la fagodisuasión no se debió a las sustancias presentes en la fracción, sino a la fitotoxicidad del disolvente. En realidad, el metanol produjo un halo clorótico en el disco y posiblemente alteró las características organolépticas del tejido foliar, haciéndolo menos apetecible para las larvas. En este sentido, el efecto fitotóxico del metanol, o bien su efecto tóxico directo sobre las larvas, estaría enmascarando el posible efecto fagodisuasivo. En contraste, en el experimento de invernadero hubo notorias diferencias entre la fracción metanólica y su disolvente. El daño de las larvas fue prácticamente nulo en los árboles de cedro tratados con dicha fracción (no hubo orificios en los brotes terminales y las cantidades de montículos y brotes caídos fueron nulas o muy bajas), mientras que en aquellos tratados con metanol fue severo.

Se esperaría que en un ambiente de invernadero el disolvente se evaporara con mayor rapidez y produjera efectos tóxicos menos severos sobre los árboles, que sobre los pequeños discos utilizados en el laboratorio. Éstos, por su tamaño, son más susceptibles a la marchitez, la deshidratación y al daño físico y químico. Pero, además, aún en presencia de fitotoxicidad sobre los brotes apicales, las larvas podrían evitar las superficies tratadas, ya sea migrando hacia otras partes de la planta o alimentándose en los tejidos internos de la estructura tratada, no afectados por el disolvente. En cambio, en el laboratorio las larvas estaban encerradas en el frasco y expuestas a un solo disco como fuente de alimento. De acuerdo con esto, parece ser que el efecto fitotóxico del metanol fue menos importante en las plantas del invernadero, pues este tratamiento tuvo efectos parecidos a los del agua, y en resumen, lo ocurrido en este experimento guarda mayor similitud con lo que podría suceder en condiciones naturales, y fundamenta la clasificación de la fracción metanólica como promisoría, por sus efectos fagodisuasivos.

En realidad, para todas las evaluaciones del experimento de invernadero, el extracto crudo y las fracciones metanólica y etérea mostraron buena protección de las plantas a las que fueron aplicados, con algunas excepciones que no tuvieron importancia estadística. En la primera evaluación, realizada dos días después de la inoculación, no se encontró ningún orificio en las plantas tratadas con el extracto crudo o con la fracción metanólica, y apenas 0,12 orificios en las plantas tratadas con la fracción etérea. Al final, en la evaluación realizada cuatro semanas después de la inoculación,

no se encontró ningún túnel en las plantas tratadas con el extracto crudo o la fracción etérea, y uno solo en el estrato superior de una planta tratada con la fracción metanólica. Esto significa que las larvas, en general, no se alimentaron de los tejidos del brote terminal, el cual había sido asperjado con estos tratamientos, pero tampoco migraron a otros sitios que no estaban tratados, aunque tuvieran la oportunidad de hacerlo. De hecho, la presencia de túneles en los estratos inferiores de las plantas correspondió a los tratamientos de la fracción acuosa de *Q. amara*, el agua y el metanol, lo cual podría ser la respuesta de las larvas a la competencia en el interior de los tallos del estrato superior, y no necesariamente a repelencia o fagodisuasión hacia dichos tratamientos, aunque esto no se puede descartar.

Aunque hasta ahora se ha resaltado el efecto fagodisuasivo de las fracciones de *Q. amara*, cabe la posibilidad de que hubiera efecto tóxico directo (insecticida) en algunas de ellas. En realidad, los resultados de mortalidad obtenidos en el bioanálisis de laboratorio descartan un efecto insecticida del extracto crudo y de las fracciones etérea y metanólica, pues sus valores no difirieron de sus respectivos testigos. Asimismo, no se esperaría que las larvas murieran al ingerir los principios activos depositados en los brotes terminales de los árboles, en el invernadero, sino más bien que ellos provocarían inapetencia y muerte por inanición en las larvas de *H. grandella*.

En el laboratorio, las larvas expuestas a los discos foliares posiblemente se debilitaron mucho, pero pronto fueron transferidas a la dieta artificial, lo cual les permitió reiniciar su actividad alimenticia y superar el posible estado de debilitamiento e inapetencia provocado por los principios activos. En cambio, las larvas inoculadas en el invernadero quizás también se debilitaron mucho pero, a diferencia de aquellas, tuvieron que buscar nuevos sitios para alimentarse y perecieron al hacer ésto. Es decir, el debilitamiento provocado por estos compuestos, sumado a la dificultad de hallar sitios adecuados de alimentación, afectó adversamente a las larvas en el invernadero, en contraste con el laboratorio.

Sin embargo, algunos tratamientos que provocaron síntomas de debilitamiento e inapetencia en las larvas mientras estaban en instar III, afectaron indirectamente la duración del instar siguiente (IV). Posiblemente, un período de perturbación metabólica y estrés retrasó la muda entre los instares IV y V. La duración fue mayor para el tratamiento del extracto crudo, y aunque las fracciones metanólica y etérea no difirieron de éste, tampoco lo hicieron de sus respectivos testigos. Es decir, pareciera ser que la mezcla de los principios activos presentes en ambas fracciones podría causar un efecto sinergista en cuanto a esta variable. Warthen (1990) considera que al estudiarse los

compuestos fagodisuasivos individualmente, a la misma concentración en que ocurren en las plantas (o en los extractos), se comportan menos activos que en la planta en sí. Cuando se estudia la mezcla de todos los componentes que tienen actividad biológica, hay un efecto aditivo. Éste podría ser el caso del extracto crudo y las fracciones metanólica y etérea, si se comparan las tendencias para algunas de las variables estudiadas, como la duración del instar IV.

No obstante, no se afectó la duración del instar V ni de la pupa, el peso de la pupa, ni el intervalo para alcanzar la emergencia de los adultos. Esto sugiere que conforme las larvas se alimentaron de la dieta artificial normalizaron su metabolismo y su desarrollo. Además, sugiere que el extracto crudo de *Q. amara* no tiene un efecto tóxico residual en las larvas, pues de otra manera se hubieran afectado otras variables relacionadas con el ciclo de vida o la mortalidad. Al medir la mortalidad acumulada hasta el empupamiento, solamente hubo diferencias entre las fracciones metanólica y etérea con la acuosa, y no de las dos primeras con sus respectivos testigos, por lo que estos resultados no son suficientes para establecer dicho efecto tóxico residual.

Aunque no hubo diferencias estadísticas entre los disolventes con respecto al consumo del disco foliar, los valores con metanol y éter fueron menores que con el agua, lo que puede indicar que los daños de fitotoxicidad constituirían siempre un factor determinante en la disminución de los porcentajes de consumo de los disolventes. Bajo este supuesto, los valores de consumo de las fracciones metanólica y etérea serían también inferiores a los esperados si los disolventes no hubiesen ocasionado dichos efectos y hubiesen tenido valores más cercanos a los del agua. Este razonamiento supone que los valores de consumo de dichas fracciones se distanciarían del extracto crudo, y que el efecto de éste, correspondiendo al mismo porcentaje de consumo (0,34), consistiría en un efecto sinérgico de ambas fracciones.

Así, el extracto crudo de *Q. amara* podría representar una mezcla en la que se combinan el efecto sinérgico de las fracciones metanólica y etérea, con un efecto inocuo de la fracción acuosa. Ésta nunca difirió del testigo de agua y casi siempre lo hizo de todos los demás tratamientos, alcanzando valores extremos para la mayoría de variables evaluadas: mayor porcentaje de consumo, mayor peso de la pupa, menor intervalo para la emergencia del adulto, mayor emergencia de adultos, menor mortalidad durante la primera semana, menor mortalidad hasta que las larvas empuparan, y la segunda menor duración del instar IV. Sin embargo, aun cuando estas observaciones fueron notorias cualitativamente, carecen de significancia estadística para sugerir que la fracción acuosa pudiera contener sustancias fagoestimulantes de las larvas de *H. grandella*, y que aumentarían o

disminuirían las magnitudes de las variables estudiadas, desfavoreciendo cualquier potencial de manejo de la plaga. Por el contrario, los resultados respaldan el hecho de que el agua no fue un disolvente capaz de extraer los principios activos responsables de alguna actividad biológica sobre las larvas.

La manifestación de otros efectos, aparte del fagodisuasivo, en las fracciones de *Q. amara*, se indagó mediante bioanálisis específicos, que comprendieron un amplio ámbito de concentraciones. Mancebo *et al.* (2000c) habían determinado que, al 0,32%, el extracto crudo causó fagodisuasión en las larvas de *H. grandella*.

Para la fracción metanólica, los menores porcentajes de consumo correspondieron a las cuatro mayores concentraciones, por lo que se podría indicar que la fracción metanólica al 0,02% es la mínima concentración que causa fagodisuasión en las larvas. En efecto, la concentración de 0,32% del extracto crudo, evaluada y recomendada por Mancebo *et al.* (2000c), contiene a la fracción metanólica a una concentración del 0,02%. Sin embargo, el porcentaje de consumo para esta concentración fue de 4,17 y no difirió del porcentaje de consumo (7,25) de la concentración más baja (0,00625%). Una mejor recomendación podría darse a partir de la curva de tendencia entre el consumo y las concentraciones de la fracción (en escala relativa de la concentración del extracto crudo). La curva logarítmica tiende a ser constante (1,94%) cuando la concentración se acerca al valor de 0,0625% de la fracción metanólica, por lo que ésta sería la concentración que produjo un efecto fagodisuasivo importante.

En este bioanálisis se utilizó como disolvente una mezcla de 20% de metanol en agua, para evitar los riesgos de fitotoxicidad que el metanol puro podría provocar en los discos. En efecto, éstos fueron poco dañados por la mezcla disolvente, y los porcentajes de consumo de dicha mezcla y del agua fueron muy similares, obteniéndose tendencias bastante claras.

En cuanto a un posible efecto insecticida de la fracción metanólica, no lo hubo para ninguna de las concentraciones, pues no difirieron del disolvente respecto a la mortalidad acumulada durante la primera semana, en la cual únicamente se revelaron diferencias entre la concentración más alta y el testigo absoluto (agua) y, en algunos casos, entre las concentraciones extremas.

Desde otro punto de vista, la tendencia de la relación lineal entre el consumo del disco foliar y la mortalidad al segundo día podría revelar efectos insecticidas, fagodisuasivos o inocuos,

dependiendo de la ubicación de las coordenadas en la línea recta. Esta relación se basó en la mortalidad al segundo día, por ser un momento clave para juzgar lo sucedido a las larvas. Al ser el primer día en que ellas estuvieron en la dieta artificial, un tratamiento insecticida debería ser suficientemente tóxico para impedir la sobrevivencia de la larva al ser retirada del disco, mientras que uno fagodisuasivo permitiría a la larva recuperarse de su estado crítico al hallarse en el nuevo alimento.

A las concentraciones menores y en el testigo (concentración nula), los tratamientos se ubicaron en el extremo de la línea, donde hay un alto consumo del disco y una baja mortalidad. En este caso el efecto fue inocuo sobre las larvas, pues ellas fueron consumiendo gran área del disco foliar, al no haberse inhibido su actividad alimentaria ni haber sufrido síntomas de toxicidad. Por el contrario, a las mayores concentraciones los tratamientos se deberían ubicar en regiones de la línea recta donde el consumo es bajo y la mortalidad es muy alta. Éste no fue el caso de la concentración de 0,625% de este experimento, que sólo alcanzó valores de mortalidad del 40%. Teóricamente, los tratamientos que se ubiquen en esta región se considerarían insecticidas, pues causarían intoxicación y alta mortalidad en las larvas cuando ellas sólo han consumido bajos porcentajes del área tratada.

Cualquier tratamiento ubicado entre estos dos extremos teóricos puede ser clasificado como fagodisuasivo, pues consistiría en una concentración lo suficientemente alta como para evitar el consumo y, a la vez, lo suficientemente baja para evitar una intoxicación directa de las larvas y para permitir que se recuperen de un estado de inapetencia y debilitamiento al ser colocadas en la dieta artificial. En resumen, este efecto fagodisuasivo correspondió a las tres concentraciones más altas de la fracción metanólica, a las cuales no se puede conferir ningún efecto insecticida.

En cuanto al bioanálisis de la fracción etérea, los resultados fueron muy erráticos, pues ninguna de las concentraciones tuvo efectos diferentes a los causados por el disolvente. Aunque éste se preparó como una mezcla al 20% de éter y 80% de agua con un emulsificante, los discos sufrieron deshidratación, disolución de pigmentos y leve corrugamiento, y ésto pudo haber enmascarado cualquier posible efecto de las concentraciones de la fracción y determinar los bajos porcentajes de consumo. En forma análoga, los efectos de esta fracción sobre la mortalidad acumulada, en el período de observaciones de una semana, mostró tendencias muy erráticas.

Desde el punto de vista práctico, para el manejo de *H. grandella* en el campo, es crítico conocer si los extractos vegetales se pueden desplazar sistémicamente por los árboles de cedro o caoba. Por tanto, además del extracto crudo de la madera de *Q. amara*, en los experimentos se incluyeron otros tres compuestos de origen vegetal que habían demostrado efecto fagodisuasivo o tóxico sobre las larvas de *H. grandella* (Mancebo *et al.* 2000a, b, c). Todos los tratamientos se evaluaron a una concentración del 10%, por cuestiones prácticas, pues es lo suficientemente alta para garantizar la manifestación de efectos sistémicos.

Los cuatro extractos se desplazaron sistémicamente por las plantas de cedro, como lo reveló el bajo consumo de los folíolos. Sin embargo, ninguno lo hizo de manera tan evidente como el carbofurán, que fue el testigo comercial. Dicho producto es un eficaz insecticida contra *H. grandella*, con gran actividad sistémica en árboles de cedro cuando se aplica al suelo, incluso bajo condiciones de campo (Wilkins 1972). En los folíolos provenientes de plantas cultivadas *in vitro* con este producto, el consumo fue nulo y la mortalidad resultante fue del 100% desde el primer día de exposición de las larvas. Al ser un insecticida de contacto estomacal (Thomson 1992), necesariamente debió haber consumo en el folíolo, aunque éste haya sido mínimo e imperceptible a las evaluaciones visuales. La tendencia insecticida fue constante en las tres evaluaciones realizadas, confirmando los hallazgos de Wilkins (1972), quien encontró que en plantas de cedro de invernadero, el carbofurán alcanzaba su punto máximo al tercer día después de la aplicación al suelo, y se mantenía a una concentración constante por 23 días más.

La utilización del agua en este experimento tuvo un doble propósito. Primero, ser un testigo absoluto con el cual se pudieran establecer diferencias para caracterizar los efectos biológicos de los otros tratamientos sobre las larvas de *H. grandella*. Segundo, determinar la actividad sistémica de los extractos en plantas de cedro, al confirmarse alguna actividad biológica sobre larvas de *H. grandella*. Indagaciones sobre esta actividad ya existen para los cuatro extractos, según los hallazgos de Mancebo *et al.* (2000a, b, c, d).

De los extractos, el Azatín causó el menor consumo en los folíolos, como promedio de las tres evaluaciones, lo cual revela que sus compuestos se translocaron en las plantas. Los extractos de las semillas de *A. indica* contienen principalmente azadiractina y otros limonoides derivados de la oxidación de un triterpenoide (Jacobson 1988).

La actividad sistémica de los principios activos del nim ha sido determinada en algunos experimentos u observada en experiencias prácticas de agricultores. Por ejemplo, Soon y Bottrell (1994) mencionan que, en la India, muchos agricultores incorporan una masa de nim como enmienda al suelo en sus campos de arroz, obteniendo valor como fertilizante, pero además como insecticida sistémico contra *Nephotettix* spp. (Homoptera). Por otra parte, Griffiths *et al.* (1972) y Nisbet *et al.* (1992) (en Mordue y Blackwell 1993), determinaron que altas concentraciones de azadiractina (> 100 ppm) eran requeridas para producir efectos fagodisuasivos en los áfidos *Rhopalosiphum padi* y *Sitobion avenae* en los cereales, pero que dicho efecto fue semejante al provocado por dosis bajas (50 ppm) aplicadas tópicamente a las hojas. De forma parecida, altas concentraciones de azadiractina (500 ppm) fueron necesarias para provocar actividad fagodisuasiva en *Myzus persicae* en viveros de tabaco, pero fueron insuficientes para evitar la inoculación con los virus PLRV y PVY transmitidos por este áfido (Nisbet *et al.* 1992, en Mordue y Blackwell 1993). La baja sensibilidad de estos insectos a la actividad de la azadiractina, cuando se aplica sistémicamente a bajas concentraciones, podría deberse a la poca movilidad de los principios constituyentes del nim en el floema de las plantas tratadas (Schmutterer 1985, en Mordue y Blackwell 1993).

No obstante, las propiedades sistémicas del Azatín en plantas de cedro son interesantes, pues se comprueba que las sustancias presentes en la semilla del árbol de nim, que es una especie de la familia Meliaceae, pueden translocarse dentro de los tejidos conductores de una meliácea neotropical. Es decir, es posible que haya algún tipo de afinidad molecular, ya que por ejemplo el tallo del cedro australiano (*Toona ciliata*) contiene sustancias adversas a *H. grandella*, las cuales pueden transferirse al cedro mediante injertos, utilizando a *T. ciliata* como patrón (Grijpma 1970, en Newton *et al.* 1993, Grijpma 1973b).

Asimismo, la curva de mortalidad del Azatín se acercó mucho a la del carbofurán, tanto durante cada día del período de evaluación como en cada una de las tres evaluaciones. Se diferenció del carbofurán en que el intervalo necesario para causar el 100% de mortalidad fue de 10 días en las primeras evaluaciones y de un día en la tercera, mientras que el carbofurán lo hizo desde el primer día de exposición a los folíolos en todas las evaluaciones. Estos resultados confirman las propiedades tóxicas directas del Azatín, como lo documentaron Mancebo *et al.* (2000b). Ellos determinaron este efecto sobre larvas de instar III de *H. grandella*, al encontrar una mortalidad muy alta en los días inmediatos a la exposición de las larvas, y no un efecto como regulador de

crecimiento o fagodisuasivo (Mordue y Blackwell 1993), esperado en teoría y determinado para el Nim 80, que es una formulación menos refinada.

Al comparar los efectos de los extractos no formulados comercialmente, el tacaco cimarrón mostró el mayor consumo, aunque fue inferior al testigo absoluto y diferente a él en todas las evaluaciones, excepto en la primera. Esto podría sugerir que un efecto sistémico del tacaco cimarrón pudo haberse dado hasta la fecha de la segunda evaluación, una semana después de la siembra de las plantas. Sin embargo, en cuanto a la mortalidad, el patrón observado para el tacaco cimarrón durante la primera semana de la primera evaluación más bien indica que el extracto, aunque no causó efecto insecticida inmediato sobre las larvas, sí tuvo un efecto de toxicidad muy similar al hombre grande y la ruda, lo que confirma su actividad sistémica. Mancebo *et al.* (2000d) documentaron un efecto tóxico directo del tacaco cimarrón sobre las larvas a una concentración del 10%, pero posiblemente las sustancias presentes en dicho extracto, y que pudieron ser translocadas sistémicamente en las plantas en este experimento, no alcanzaron una concentración equivalente al 10% y no causaron dicho efecto insecticida, sino fagodisuasivo.

Por su parte, la actividad sistémica de los extractos de hombre grande y de ruda fueron demostrados, desde la primera evaluación, por un claro efecto fagodisuasivo sobre las larvas. Roark (1947) señala que al asperjar las raíces de árboles de durazno verde con una solución diluida de cuasina y compuestos relacionados provenientes de la madera *Q. amara*, no hubo presencia de áfidos, lo cual indicó que dichas sustancias fueron posiblemente absorbidas y translocadas sistémicamente en el árbol.

El efecto fagodisuasivo encontrado para dichos extractos corrobora los resultados de Mancebo *et al.* (2000c, 2000d), quienes determinaron que los extractos de hombre grande al 0,32% y de la ruda al 1% causaron fagodisuasión de las larvas de *H. grandella*. No se puede concluir, sin embargo, que los extractos se encontraron a estas concentraciones en los tejidos de los folíolos de las plantas tratadas.

Las tendencias de mortalidad de los extractos no comerciales demuestran que ésta no se debió a un efecto insecticida, pues se diferenciaron mucho del carbofurán y del Azatín. Más bien, sugieren un efecto tóxico retardado, al diferenciarse claramente, en promedio de las tres evaluaciones, de la mortalidad del agua durante la primera semana y al final de cada experimento. Sin embargo, el patrón de mortalidad de cada evaluación por separado no siempre sugiere este efecto de toxicidad

retardada, al mostrar algunas similitudes entre el agua y los extractos. Hay que descartar, sin embargo, las similitudes principalmente del hombre grande con el agua en la segunda evaluación, pues el consumo en los folíolos provenientes de plantas cultivadas en medio básico sin extractos fue menor al esperado, lo cual pudo deberse a que dichos folíolos tenían un aspecto distinto a los demás, pues fueron más delgados y de apariencia traslúcida, por razones desconocidas.

Al indagarse este efecto de toxicidad retardada para estos tres extractos, como promedio de las evaluaciones, el resultado contrastó con los obtenidos para el extracto crudo en el bioanálisis de las fracciones de *Q. amara*, pues no se sugirió dicho efecto para él. Posiblemente, las larvas de instar I utilizadas en los bioanálisis del experimento de sistemicidad fueron más afectadas por el estado de debilitamiento e inapetencia ocasionados por la actividad fagodisuasiva de estos extractos, que las larvas de instar III del bioanálisis general de las fracciones de *Q. amara*. De hecho, en el primer caso se están reflejando condiciones más parecidas a las naturales, al utilizar larvas de instares más jóvenes. Posiblemente, el extracto crudo de *Q. amara*, o alguna(s) de sus fracciones, presenten este efecto tóxico residual cuando sean aplicados en árboles del campo en condiciones naturales de los ataques.

Las medidas de porcentaje de consumo foliar y mortalidad en los experimentos de sistemicidad reflejan el efecto de una actividad biológica de las sustancias sobre las larvas de *H. grandella*, sumado a una actividad sistémica en las plantas producidas *in vitro*. Esta conjunción de efectos no hace posible saber cuál de los extractos fue mejor absorbido y translocado por las plantas *in vitro*, para ordenarlos según su actividad sistémica, pues no se puede saber si el efecto provocado en las larvas se debe a una alta toxicidad y acción inmediata del extracto, o a una actividad sistémica muy grande que permite el alcance de altas concentraciones en corto tiempo (bajos tiempos de translocación).

En realidad, con la metodología utilizada en los experimentos se garantizó que las plantas y las sustancias se encontraran en un sistema de cultivo bajo condiciones controladas, para poder determinar si había actividad sistémica de dichas sustancias. Los medios utilizados y las condiciones de asepsia evitan la presencia de cualquier obstáculo físico o biológico que pueda impedir la absorción de los extractos por las plantas. No se puede descartar, aún, la posibilidad de alguna interferencia química entre los compuestos presentes en los extractos y los del medio de cultivo. Sin embargo, las ventajas mencionadas anteriormente pueden justificar el empleo de esta metodología para determinar la actividad sistémica de otros extractos vegetales, aunque hacia el

futuro, la caracterización de la actividad sistémica de estas sustancias promisorias también debería realizarse en condiciones más cercanas a las de campo, mediante métodos de inyección al xilema, enmiendas directas al suelo u otro sustrato, o por métodos de liberación controlada.

Finalmente, los extractos vegetales evaluados por su actividad biológica sobre larvas de *H. grandella*, al igual que otros que tienen efectos biológicos promisorios sobre otros insectos, deben ser caracterizados con respecto a otras variables que permitan su óptima utilización, su adecuado manejo y su buen funcionamiento en el campo. Entre estos retos resaltan la determinación de sus características toxicológicas, su residualidad y persistencia en el ambiente y en las plantas, la formulación en que podrían ser producidos y los métodos de aplicación en que podrían ser usados, la caracterización química y física de sus mezclas, la caracterización biológica de sus efectos (insecticida, repelente o fagodisuasivo), las opciones comerciales que justifican su producción, y el espectro de plagas para el que pueden utilizarse.

En el futuro a corto o a largo plazo, dichas evaluaciones fundamentarán la utilidad práctica de estos productos y, en consecuencia, la motivación por producirlos a escala artesanal, semiindustrial o industrial, la implementación que los agricultores o silvicultores hagan de ellos, y la promoción de un manejo integrado de plagas forestales o agrícolas.

6. CONCLUSIONES

- Las fracciones metanólica y etérea del extracto de la madera de *Q. amara* causaron fagodisuasión en las larvas de *H. grandella*.
- La concentración mínima de la fracción metanólica de *Q. amara* que provocó fagodisuasión fue la de 0,0625%.
- Los extractos crudos de hombre grande (*Quassia amara*), ruda (*Ruta graveolens*) y tacaco cimarrón (*Sechium pittieri*), además de causar fagodisuasión en las larvas de *H. grandella*, mostraron actividad sistémica en las plantas de cedro.
- El Azatín causó mortalidad directa de las larvas de *H. grandella*, y mostró actividad sistémica en las plantas de cedro.

7. RECOMENDACIONES

- Optimizar el proceso de fraccionamiento del extracto de *Q. amara* y encontrar sustancias que, al ser utilizadas como solventes de los liofilizados, tengan efectos fitotóxicos nulos o mínimos en los árboles de cedro.
- Realizar un experimento de invernadero para las concentraciones crecientes de la fracción metanólica del extracto de *Q. amara*, para comparar los resultados obtenidos en el bioanálisis con situaciones más parecidas a las condiciones de campo.
- Realizar el fraccionamiento de otros extractos (ruda y tacaco cimarrón) que han demostrado actividad biológica sobre larvas de *H. grandella*.
- Utilizar los conocimientos sobre el proceso de fraccionamiento del laboratorio y la caracterización física, química y biológica de los principios de cada fracción como fundamento para la formulación y producción semiindustrial de las fracciones del extracto de *Q. amara*.
- Realizar pruebas de sistemicidad con otros extractos vegetales que muestren efectos adversos sobre larvas de *H. grandella*, utilizando la técnica de aplicación a medios de cultivos *in vitro*, y estudiar mejor los fundamentos que pueden dar más validez a esta metodología.
- Desarrollar experimentos de invernadero y de campo con los extractos vegetales a los que se determinó actividad sistémica en plantas de cedro y actividad biológica sobre *H. grandella*, realizando las aplicaciones a través de métodos convencionales como la inyección al xilema o las enmiendas al suelo.

8. LITERATURA CITADA

- AgriDyne Technologies. n.d. Features and benefits of Azatin EC. Salt Lake City. Utah. 33 p. (Mimeo).
- Allan, G.; Gara, R.; Wilkins, R. 1970. The evaluation of some systemic insecticides for the control of larvae in *Cedrela odorata* L. In Grijpma, P. ed. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller). Lep. Pylalidae. IICA Misc. Publ N° 101. v.1, p. 40-48.
- Becker, V. 1973a. Microlepidópteros asociados con *Carapa*, *Cedrela* y *Swietenia* en Costa Rica. In Whitmore J.L. ed. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller). Lep. Pylalidae. IICA Misc. Publ N° 101. v.2, p. 75-101.
- Becker, V. 1973b. Microlepidopteros asociados con *Carapa*, *Cedrela* y *Swietenia* en Costa Rica. Tesis Mag.Sc. Turrialba, Costa Rica, IICA. 108 p.
- Berrios F. 1972. Estudio de la susceptibilidad del barrenador de las meliáceas *Hypsipyla grandella* Zeller al hongo *Metarrhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin. Tesis Mag.Sc. Turrialba, Costa Rica, IICA. 76 p.
- Bonner, W.; Castro, A. 1971. Química orgánica básica. Madrid. Editorial Alhambra. 599 p.
- Broughton, H.; Jones, P.; Ley, S.; Morgan, E.; Slawin, A.; Williams, D. 1986. The chemical structure of azadirachtin. In Schmutterer, H.; Ascher, K. eds. Natural pesticides from the neem tree and other tropical plants. GTZ. Eschborn, Germany, GTZ. p. 103-110.
- Castro, V.; Ramírez, E.; Mora, G.; Iwase, Y.; Nagao, T.; Okabe, H.; Matsunaga, H.; Katano, M.; Mori, M. 1997. Structures and antiproliferative activity of saponins from *Sechium pittieri* and *S. talamancense*. Chem. Pharm. Bull 45(2): 349-358.
- Cibrián, D.; Méndez, J. T.; Campos, R.; Yates III, H. O.; Flores, J. E. 1995. Insectos forestales de México. Universidad Autónoma de Chapingo-Comisión Forestal de América del Norte (COFAN). Publ. No. 6. 453 p.

- Del Pozo, J. 1973. Efecto de la radiación ultravioleta y determinación de la patogenicidad para larvas de *Hypsipyla grandella* (Zeller) en mutantes de *Metarrhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin. Tesis Mag.Sc. Turrialba, Costa Rica, IICA. 64 p.
- Dourojeanni, R. 1963. El barrenado de los brotes (*Hypsipyla grandella*) en cedro y caoba. *Agronomía (Perú)* 30 (1): 35-43.
- FAO. 1990. Forest resources assessment. Rome, Italy. 59p.
- Faurby O.; Barahona, T. 1998. Silvicultura de especies maderables nativas del trópico seco de Nicaragua. Managua, Nicaragua. Instituto de Investigación y Desarrollo Nitlapán, Universidad Centroamericana (ed.). 134 p.
- Feuerhake, K. 1983. Effectiveness and selectivity of technical solvents for the extraction of neem seed components with insecticidal activity. In Schmutterer, H.; Ascher, K. eds. Natural pesticides from the neem tree and other tropical plants. Eschborn, Germany, GTZ. p. 103-114
- Gara, R.; Allan, G.; Wilkins, R.; Whitmore, J. 1976. Comportamiento en vuelo y selección de hospedero del barrenador de las meliáceas, *Hypsipyla grandella* (Zeller) (Lepid., Phycitidae). In Whitmore, J. ed. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller). Lep. Pyralidae. IICA Misc. Publ. N° 101. v.2, p. 116-121.
- González, G. 1973. Propiedades de la madera de algunas meliáceas de la América Tropical. In Whitmore, J.L. ed. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller). Lep. Pyralidae. IICA Misc. Publ. N° 101. v.3, p. 8-17.
- Grijpma, P. ed. 1973a. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller). Lep., Pyralidae. IICA Misc. Publ. No. 101. v.1, 91 p.
- Grijpma, P. 1973b. Immunity of *Toona ciliata* M. Roem var. *australis* (F. v. M.) C. DC. and *Khaya ivorensis* A. Chev. to attacks of *Hypsipyla grandella* (Zeller) in Turrialba, Costa Rica. In Grijpma, P. ed. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller). Lep. Pyralidae. IICA Misc. Publ. No. 101. v.1, p. 18-25.

- Grijpma, P. 1971. Observations on a rearing technique and on host selection behavior of adults in captivity. In Grijpma, P. ed. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller). Lep. Pylalidae. IICA Misc. Publ. N° 101. v.1, p. 50-60.
- Grijpma, P.; Gara, R. 1970a. Studies on the shoot borer *Hypsipyla grandella* (Zeller). I. Host selection behavior. In Grijpma, P. ed. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller). Lep. Pylalidae. IICA Misc. Publ. N° 101. v.1, p. 26-33.
- Grijpma, P.; Gara, R. 1970b. Studies on the shoot borer *Hypsipyla grandella* (Zeller), 1. Host preference of the larva. In Grijpma, P. ed. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller). Lep. Pylalidae. IICA Misc. Publ. N° 101. v.1, p. 34-39.
- Grijpma, P.; Ramalho, R. 1969. Toona spp., posibles alternativas para el problema del barrenador *Hypsipyla grandella* de las Meliaceae en América Latina. In Grijpma, P. ed. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller). Lep. Pylalidae. IICA Misc. Publ. N° 101. v.1, p. 3-17.
- Hidalgo-Salvatierra, O. 1976. Control de *Hypsipyla grandella* (Zeller) por métodos microbiológicos. In Whitmore, J.L. ed. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller). Lep. Pylalidae. IICA Misc. Publ. N° 101. v.3, p. 56.
- Hilje, L.; Víquez, M.; Araya, C. M.; Scorza, F. 1991. El manejo de enfermedades y plagas forestales en Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas 19: 34-39.
- Howard, F. L. 1991. Seasonal incidence of shoot infestation by mahogany shoot borer (Lepidoptera: Phycidae) in Florida. Florida Entomologist 74: 150-151.
- Jacobson, M. 1988. Focus on phytochemical pesticides. v.1: The Neem Tree. Maryland, US, Department of Agriculture. p. 48-63.
- Jiménez, F. 1973. Estudio comparativo de patogenicidad de diferentes variedades del *Bacillus thuringiensis* en larvas del primer instar de *Hypsipyla grandella* (Zeller). Tesis Ing. Agr. San José, Universidad de Costa Rica. 58 p.

- Jiménez, F. 1994. Resumen acumulado de datos agroclimáticos. Turrialba, Costa Rica, CATIE. s.p. (Mimeografiado).
- Leskinen, V.; Polonsky, J.; Bhatnagar, S. 1984. Antifeedant activity of quassinoids. *Journal of Chemical Ecology*. 10 (10): 1497-1507.
- López, J.; Jara, L.; Mesén, F. 1997. Variación en resistencia de *Cedrela odorata* al ataque de *Hypsipyla grandella*. *Revista Forestal Centroamericana* 19: 20-25.
- Mancebo, F.; Hilje, L.; Mora, G.A.; Salazar, R. 2000a. Efecto de extractos vegetales sobre larvas de *Hypsipyla grandella*. *Manejo Integrado de Plagas* 55: 12-23.
- Mancebo, F.; Hilje, L.; Mora, G.A.; Salazar, R. 2000b. Biological activity of two neem (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) products on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Crop Protection* (Submitted).
- Mancebo, F.; Hilje, L.; Mora, G.A.; Salazar, R. 2000c. Antifeedant activity of *Quassia amara* (Simaroubaceae) extracts on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Crop Protection* 19(5): 301-305.
- Mancebo, F.; Hilje, L.; Mora, G.A.; Castro, V.H.; Salazar, R. 2000d. Biological activity of *Ruta graveolens* (Rutaceae) and *Sechium pittieri* (Cucurbitaceae) extracts on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Revista de Biología Tropical* (Submitted).
- Martin, H.; Worthing, C. eds. 1974. Pesticide manual. 4 ed. Nottingham, England, British Crop Protection Council. 565 p.
- Mayhew, J.E.; Newton, A.C. 1998. The silviculture of mahogany. Wallingford, UK, CABI Publishing. 226 p.
- Mesén, F. 1999. Avances en el mejoramiento genético de Meliáceas con referencia especial a América Central. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 18 p.

- Mordue, A.; Blackwell, A. 1993. Azadirachtin: an update. *Journal of Insect Physiology* 39(11): 903-924.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant.* 15:53-58.
- Newton, A.; Watt, A.; López, F.; Cornelius, J.; Mesén, J.; Corea, E. 1999. Genetic variation in host susceptibility to attack by the mahogany shoot borer, *Hypsipyla grandella* (Zeller). *Agricultural and Forest Entomology* 1: 11-18.
- Newton, A.; Cornelius, J.; Mesén, F.; Corea, E.; Watt, A.D. 1995. Genetic variation in host susceptibility to attack by the mahogany shoot borer, *Hypsipyla grandella* (Zeller). In CATIE. Proyecto Mejoramiento Genético Forestal. Compendio de publicaciones 1984-1996. Turrialba, Costa Rica. v.1, p. 199-208
- Newton, A.; Baker, P.; Ramnarine, S.; Mesén, J. F.; Leakey, R.R.B. 1993. The mahogany shoot borer: Prospects for control. *Forest Ecology and Management* 57: 301-328.
- Norris, D. 1990. Repellents. In Morgan, E.; Mandava, N. eds. *CRC handbook of natural pesticides*. v.6. Insect attractants and repellents. Boca Raton, Florida, CRC Press. p. 135-149.
- Peter, K. 1992. *Silviculture and use of American Mahogany (Swietenia spp.)*. Copenhagen, The Royal Veterinary and Agricultural University. p. 36-45.
- Pickett, J. A.; Wadhams, L. J.; Woodcock, C. M. 1997. Developing sustainable pest control from chemical ecology. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 64: 149-156.
- Pillmoor, J. B.; Wright, K.; Terry, A. S. 1993. Natural products as a source of agrochemicals and leads for chemical synthesis. *Pesticide Sciences*. 39 : 131-140.
- Polonsky, J. 1973. Quassinoid bitter principles. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe* 30: 101-150.

- Pruess, K.P. 1983. Day-degree methods for pest management. *Environmental Entomology* 12(3): 613-619.
- Ramírez, J. 1964. Investigación preliminar sobre biología, ecología y control de *Hypsipyla grandella* Zeller. *Boletín del Instituto Forestal Latino Americano de Investigación y Capacitación* 16: 54-77.
- Renwick, J. 1990. Oviposition stimulants and deterrents. In Morgan, E.; Mandava, N. eds. *CRC handbook of natural pesticides. Insect attractants and repellents*. Boca Raton, Florida, CRC Press. p. 151-160.
- Roark, R. 1947. Some promising insecticidal plants. *Economic Botany* 1: 437-445.
- Samaniego, A.; Sterringa, J. 1976. Un nuevo método para obtener oviposición en cautividad. In Whitmore, J. L. ed. *Studies on the shootborer Hypsipyla grandella (Zeller). Lep., Pyralidae*. IICA Misc. Publ. no. 101. v.2, p. 47-49.
- SAS Institute. 1985. *SAS user guide: Statistics, Version 5 ed.* SAS Institute Inc., Cary, North Carolina. 956 p.
- Schmutterer, H.; Ascher, K. R. S. eds. 1987. *Natural pesticides from the neem tree and other tropical plants*. Eschborn, Germany, GTZ. 703 p.
- Schmutterer, H.; Ascher, K. R. S. eds. 1984. *Natural pesticides from the neem tree and other tropical plants*. Eschborn, Germany, GTZ. 587 p.
- Schmutterer, H.; Ascher, K. R. S.; Rembold, H. eds. 1980. *Natural pesticides from the neem tree (Azadirachta indica A. Juss)*. Eschborn, Germany, GTZ. 297 p.
- Schoonhoven, L.M. 1982. Biological aspects of antifeedants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 31:57-69.

- Schoonhoven, L.M. 1980. Perception of azadirachtin by some lepidopterous larvae. In Schmutterer, H.; Ascher, K.; Rembold, H. ed. Natural pesticides from the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss). Eschborn, Germany, GTZ. p. 105-108.
- Shannon, P.J.; Vargas, C.; Cubillo, D.; Hilje, L.; Wa Masabo, M. A.; Sanabria, G. 1997. Actividad biológica de hombre grande (*Quassia amara*) sobre *Hypsipyla grandella* (Lep.: Pyralidae). (Inédito).
- Sharma, R.; Nagasampagi, B; Bhosale, A; Kulkarni, M.; Tungikar, V. 1984. "Neemrich": the concept of enriched fractions from neem for behavioral and physiological control of insects. In Schmutterer, H.; Ascher, K. eds. Natural pesticides from the neem tree and other tropical plants. Eschborn, Germany, GTZ. p. 115-128.
- Sliwa, D.; Becker, V. 1973. Observations on emergence and mating of adults in captivity. In Whitmore, J. L. ed. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller). Lep., Pyralidae. IICA Misc. Publ. no. 101. v.2, p. 42-46.
- Snook, L. 1996. Catastrophic disturbance, logging and the ecology of mahogany (*Swietenia macrophylla* King): grounds for listing a major tropical timber species in CITES. Botanical Journal of the Linnean Society. 122: 35-46.
- Soon, L.; Bottrell, D. 1994. Neem pesticides in rice: potential and limitations. Manila, Philippines, IRRI. 69 p.
- Speight, M.R. 1996. Forest pests in the tropics: Current status and future threats. In Watt, A. D.; Stork, N.E.; Hunter, M.D. eds. Forest and insects. London, Chapman & Hall. p. 207-227.
- Summers, D. 1983. Manual de química. 2 ed. México, D.F., Grupo Editorial Iberoamérica. 112 p.
- Taveras, R. 1999. Aspectos bioecológicos y caracterización del daño de *Hypsipyla grandella* (Zeller) en caoba, en Turrialba, Costa Rica. Tesis Mag.Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 83p.

- Tomerlin, J.R.; Howell, T. 1988. Distrain: A computer program for training people to estimate disease severity on cereal leaves. *Plant Disease* 72: 455-459.
- Thompson, W.T. 1992. Agricultural chemicals. Book 1. Insecticides. Fresno, California, Thompson Publications. 301 p.
- Warthen, D. 1990. Insect feeding deterrents (1976-1980). Part A. In Morgan, E.; Mandava, N. eds. CRC handbook of natural pesticides. v.6. Insect attractants and repellents. Boca Raton, Florida, CRC Press. p. 23-82.
- Weaver, P.; Bauer, G. 1986. Growth, survival and shoot borer damage in mahogany plantings in the Luquillo Forest in Puerto Rico. *Turrialba*. 36(4): 509-522.
- Whitmore, J. L. ed. 1976a. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller). Lep., Pyralidae. IICA Misc. Publ. no. 101. v.2, 139 p.
- Whitmore, J. L. ed. 1976b. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller). Lep., Pyralidae. IICA Misc. Publ. no. 101. v.2. 116 p.
- Wilkins, R. 1972. Suppression of the shootborer, *Hypsipyla grandella* ZELLER (Lepidoptera: Phycitidae), with controlled release insecticides. Ph.D. Thesis. Washington, 103 p.
- Wilkins, R.; Allan, G.; Gara, R. 1976. Protection of spanish cedar with controlled release insecticides. In Whitmore, J. ed. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller) Lep. Pyralidae. IICA Misc. Publ. no. 101. v.3, p. 63-70.
- Yamazaki, S.; Taketani, A.; Fujita, K.; Vásques, C.; Ikeda T. 1990. Ecology of *Hypsipyla grandella* and its seasonal changes in population density in Peruvian Amazon forest. *Japan Agricultural Research Quarterly* 24: 149-155.
- Yared, J.A.; Carpanezzi, A. 1981. Conversao de capoeira alta da Amazonia em povoamento de producao madeireira: o metoda 'recru' e especies promissoras. Embrapa, Cpatu, Brazil. *Boletim de Pesquisa* no. 25.

9. ANEXOS

Anexo 1. Ingredientes y preparación de la dieta artificial para las larvas de *Hypsipyla grandella*.

1) Para obtener 1 l de dieta se pesan los ingredientes en las siguientes proporciones:

Producto	Cantidad (g)
Germen de trigo	120
Azúcares	30
Caseína	20
Agar	20
Levadura "Brewers"	15
Acido Metil ester P-Hydroxy-benzoico	1
Colesterol	0.2
Sales de Wesson	10
Acido Sórbico	2
Semilla molida de cedro	2
Clorotetraciclina	0.3
Mezcla de vitaminas	15

2) Todos los ingredientes (excepto la clorotetraciclina y las vitaminas) se mezclan bien en un beaker de 1 l y se les agrega 850 ml de agua destilada.

3) La mezcla se coloca en un frasco de 1 l hermético y se esteriliza en autoclave a 121°C y 12 bares e presión, por 20 minutos.

4) La mezcla se enfría en un baño de agua, y cuando su temperatura desciende de los 65°C, y antes que llegue a 50°C, se agregan los dos ingredientes faltantes.

Anexo 2. Cálculo de las concentraciones de las fracciones (RxC) del extracto de *Q. amara* preparadas para los bioanálisis de laboratorio.

R = Rendimiento de la fracción	C = Concentración del extracto crudo (% p/v)	R x C = Concentración de la fracción (% p/v)
$\frac{\text{g fracción}}{\text{g extracto crudo}}$	$\frac{\text{g extracto crudo} \times 100}{\text{ml mezcla}}$	$\frac{\text{g fracción} \times 100}{\text{ml mezcla}}$
Fracción acuosa $9.2 \text{ g} / 40 \text{ g} = 0.23$	10	2.3
	3.2	0.74
	1	0.23
	0.32	0.074
	0.1	0.023
Fracción metanólica $2.5 \text{ g} / 40 \text{ g} = 0.0625$	10	0.625
	3.2	0.2
	1	0.0625
	0.32	0.02
	0.1	0.00625
Fracción etérea $0.56 \text{ g} / 40 \text{ g} = 0.014$	10	0.14
	3.2	0.0448
	1	0.014
	0.32	0.00448
	0.1	0.0014

Anexo 3. Porcentaje promedio de consumo en discos foliares de cedro impregnados con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, al exponer larvas de instar III de *H. grandella*, durante 24 h.

Tratamiento	N	X	D.E.	C.V.
Extracto crudo	32	0.34 d	0.70	205.88
Fracción acuosa	32	19.59 a	10.64	54.31
Fracción metanólica	32	1.16 cd	1.46	125.86
Fracción etérea	32	0.94 d	1.19	126.60
Agua	32	15.53 ab	11.66	75.08
Metanol	32	7.53 bcd	11.84	157.24
Éter	32	9.09 bc	8.22	90.43

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.

Anexo 4. Duración promedio (en días) de los instares IV y V y de la pupa, para larvas de *H. grandella* expuestas a las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, durante el instar III.

Tratamiento	N*	X	D.E.	C.V.
Instar IV				
Extracto crudo	19	4.47 a	0.77	17.23
Fracción acuosa	27	3.41 c	0.69	20.23
Fracción metanólica	18	4.38 ab	0.61	13.93
Fracción etérea	19	3.84 abc	0.69	17.97
Agua	24	3.21 c	0.51	15.89
Metanol	22	3.76 bc	0.94	25.00
Éter	27	3.33 c	0.62	18.62
Instar V				
Extracto crudo	19	4.53 a	1.26	27.81
Fracción acuosa	27	4.30 a	1.61	37.44
Fracción metanólica	17	3.88 a	1.41	36.34
Fracción etérea	18	4.44 a	1.65	37.16
Agua	24	3.67 a	1.27	34.60
Metanol	22	4.50 a	2.09	46.44
Éter	25	3.56 a	0.58	16.29
Pupa				
Extracto crudo	6	10.83 a	0.75	6.93
Fracción acuosa	13	11.38 a	1.56	13.71
Fracción metanólica	6	11.83 a	0.41	3.47
Fracción etérea	6	11.00 a	1.10	10.00
Agua	9	11.22 a	1.09	9.71
Metanol	7	10.00 a	1.53	15.3
Éter	10	11.80 a	0.79	6.69

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.

* Las diferencias en el tamaño de la muestra se deben a la mortalidad que hubo en los tratamientos.

Anexo 5. Peso promedio de las pupas provenientes de larvas de *H. grandella* expuestas a las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, durante el instar III.

Tratamiento	N*	X	D.E.	C.V.
Extracto crudo	14	0.10 a	0.03	30.00
Fracción acuosa	25	0.11 a	0.04	36.36
Fracción metanólica	12	0.09 a	0.02	22.22
Fracción etérea	11	0.08 a	0.03	37.50
Agua	22	0.09 a	0.02	22.22
Metanol	17	0.09 a	0.02	22.22
Éter	21	0.10 a	0.04	40.00

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.

* Las diferencias en el tamaño de la muestra se deben a la mortalidad que hubo en los tratamientos.

Anexo 6. Número de días transcurridos desde el inicio del experimento hasta la emergencia de los adultos provenientes de larvas de *H. grandella* expuestas a las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, durante el instar III.

Tratamiento	N*	X	D.E.	C.V.
Extracto crudo	7	39.57 a	5.77	14.58
Fracción acuosa	14	35.79 a	3.19	8.91
Fracción metanólica	6	43.17 a	6.97	16.15
Fracción etérea	6	45.17 a	7.03	15.56
Agua	9	36.67 a	4.69	12.79
Metanol	8	40.12 a	6.56	16.35
Éter	11	43.36 a	8.98	20.71

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.

* Las diferencias en el tamaño de la muestra se deben a la mortalidad que hubo en los tratamientos.

Anexo 7. Porcentaje de mortalidad acumulada de larvas de *H. grandella*, durante los primeros siete días del experimento, luego de su exposición a discos foliares de cedro tratados con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, durante 24 h y en el instar III.

Tratamientos	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.
Extracto crudo	15.62 ± 6.25 a	25.00 ± 14.43 a	40.62 ± 15.73 a	40.62 ± 15.73 ab	40.62 ± 15.73 ab	40.62 ± 15.73 ab	40.62 ± 15.73 ab
Fracción acuosa	6.25 ± 12.50 a	6.25 ± 12.50 a	6.25 ± 12.50 b	12.50 ± 10.21 b	12.50 ± 10.21 b	12.50 ± 10.21 c	12.50 ± 10.21 b
Fracción metanol	12.50 ± 10.21 a	25.00 ± 17.68 a	43.75 ± 21.65 a	43.75 ± 21.65 a	43.75 ± 21.65 a	43.75 ± 21.65 a	43.75 ± 21.65 a
Fracción etérea	15.62 ± 6.25 a	18.75 ± 7.22 a	34.38 ± 11.97 ab	40.62 ± 11.97 ab	40.62 ± 11.97 ab	40.62 ± 11.97 ab	40.62 ± 11.97 ab
Agua	15.62 ± 6.25 a	18.75 ± 12.50 a	21.88 ± 18.75 ab	21.88 ± 18.75 ab	21.88 ± 18.75 ab	25.00 ± 17.68 abc	25.00 ± 17.68 ab
Metanol	12.50 ± 17.68 a	15.62 ± 18.75 a	25.00 ± 14.43 ab	28.12 ± 11.97 ab	28.12 ± 11.97 ab	28.12 ± 11.97 abc	28.12 ± 11.97 ab
Éter	6.25 ± 7.22 a	15.62 ± 11.97 a	15.62 ± 11.97 ab	15.62 ± 11.97 ab	15.62 ± 11.97 ab	15.62 ± 11.97 bc	18.75 ± 12.50 ab

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.

Anexo 8. Porcentaje de mortalidad total en larvas de *H. grandella* expuestas a discos foliares de cedro tratados con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, durante 24 h y en el instar III.

Tratamiento	N	X	D.E.	C.V.
Extracto crudo	4	53.13 ab	11.96	22.51
Fracción acuosa	4	21.88 b	18.75	85.69
Fracción metanólica	4	62.50 a	10.21	16.34
Fracción etérea	4	65.63 a	21.35	32.53
Agua	4	31.25 ab	16.14	51.65
Metanol	4	46.88 ab	18.75	40.00
Éter	4	34.38 ab	11.97	34.82

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0.05$), según la prueba de Tukey.

Anexo 9. Porcentaje promedio de adultos de *H. grandella* emergidos, provenientes de larvas expuestas a discos foliares de cedro tratados con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, durante 24 h y en el instar III.

Tratamiento	N	X	D.E.	C.V.
Extracto crudo	4	21.88 a	11.97	54.71
Fracción acuosa	4	43.75 a	33.07	75.59
Fracción metanólica	4	18.75 a	12.50	66.66
Fracción etérea	4	18.75 a	7.21	38.45
Agua	4	28.12 a	11.97	42.57
Metanol	4	25.00 a	14.43	57.72
Éter	4	34.38 a	25.77	74.96

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.

Anexo 10. Número promedio de orificios encontrados en plantas de cedro tratadas, con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, dos días después de la inoculación con larvas de instar I de *H. grandella*.

Tratamiento	N	X	D.E.	C.V.
Extracto crudo	8	0.00 c	0.00	0.00
Fracción acuosa	8	2.00 ab	0.93	46.29
Fracción metanólica	8	0.00 c	0.00	0.00
Fracción etérea	8	0.12 c	0.35	282.84
Agua	8	2.25 a	0.46	20.57
Metanol	8	2.25 ab	1.04	46.00
Éter	8	1.25 b	1.28	102.54

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.

Anexo 11. Número promedio de montículos (resultado de tres evaluaciones), encontrados en plantas de cedro tratadas con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara* e inoculadas con larvas de instar I de *H. grandella*.

Tratamiento	N	X	D.E.	C.V.
Extracto crudo	24	0.00 c	0.00	0.00
Fracción acuosa	24	2.62 a	1.61	61.45
Fracción metanólica	24	0.21 c	0.51	242.86
Fracción etérea	24	0.04 c	0.20	500.00
Agua	24	3.29 a	1.33	40.43
Metanol	24	3.46 a	1.91	55.20
Éter	24	1.46 b	1.74	119.18

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.

Anexo 12. Número promedio de montículos, para cada una de las evaluaciones, encontrados en plantas de cedro tratadas con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara* e inoculadas con larvas de instar I de *H. grandella*.

Tratamiento	N	X	D.E.	C.V.
Dos días después				
Extracto crudo	8	0.00 c	0.00	0.00
Fracción acuosa	8	2.00 ab	0.93	46.50
Fracción metanólica	8	0.00 c	0.00	0.00
Fracción etérea	8	0.12 c	0.35	291.67
Agua	8	2.25 a	0.46	20.44
Metanol	8	2.00 ab	1.20	60.00
Éter	8	1.25 b	1.28	102.40
Una semana después				
Extracto crudo	8	0.00 c	0.00	0.00
Fracción acuosa	8	3.50 a	1.77	50.57
Fracción metanólica	8	0.25 c	0.46	184.00
Fracción etérea	8	0.00 c	0.00	0.00
Agua	8	4.00 a	1.41	35.25
Metanol	8	3.88 a	1.88	48.45
Éter	8	1.38 b	1.85	134.06
Dos semanas después				
Extracto crudo	8	0.00 c	0.00	0.00
Fracción acuosa	8	2.38 b	1.77	74.37
Fracción metanólica	8	0.38 c	0.74	194.74
Fracción etérea	8	0.00 c	0.00	0.00
Agua	8	3.62 a	1.30	35.91
Metanol	8	4.50 a	1.77	39.33
Éter	8	1.75 b	2.19	125.14

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.

Anexo 13. Número promedio de brotes caídos (resultado de tres evaluaciones), encontrados en plantas de cedro tratadas con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara* e inoculadas con larvas de instar I de *H. grandella*.

Tratamiento	N	X	D.E.	C.V.
Extracto crudo	24	0.00 c	0.00	0.00
Fracción acuosa	24	1.92 a	1.06	55.21
Fracción metanólica	24	0.04 c	0.20	500.00
Fracción etérea	24	0.00 c	0.00	0.00
Agua	24	1.88 a	1.23	65.43
Metanol	24	2.08 a	1.56	75.00
Éter	24	0.75 b	0.85	113.33

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.

Anexo 14. Número promedio de brotes caídos, para cada una de las evaluaciones, encontrados en plantas de cedro tratadas con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara* e inoculadas con larvas de instar I de *H. grandella*.

Tratamiento	N	X	D.E.	C.V.
Dos días después				
Extracto crudo	8	0.00 d	0.00	0.00
Fracción acuosa	8	1.50 a	0.53	35.33
Fracción metanólica	8	0.00 d	0.00	0.00
Fracción etérea	8	0.00 d	0.00	0.00
Agua	8	1.12 ab	0.83	74.11
Metanol	8	0.62 bc	0.52	83.87
Éter	8	0.38 cd	0.52	136.84
Una semana después				
Extracto crudo	8	0.00 c	0.00	0.00
Fracción acuosa	8	2.12 a	1.25	58.96
Fracción metanólica	8	0.00 c	0.00	0.00
Fracción etérea	8	0.00 c	0.00	0.00
Agua	8	2.12 a	1.25	58.96
Metanol	8	2.62 a	1.60	61.07
Éter	8	1.00 b	0.93	93.00
Dos semanas después				
Extracto crudo	8	0.00 d	0.00	0.00
Fracción acuosa	8	2.12 b	1.25	58.96
Fracción metanólica	8	0.12 d	0.35	291.67
Fracción etérea	8	0.00 d	0.00	0.00
Agua	8	2.38 b	1.30	54.62
Metanol	8	3.00 a	1.20	40.00
Éter	8	0.88 c	0.99	112.50

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.

Anexo 15. Número promedio de túneles (por planta) encontrados en los estratos superior e inferior de plantas de cedro tratadas con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, cuatro semanas después de la inoculación con larvas de instar I de *H. grandella*.

Tratamiento	N	X	D.E.	C.V.
En estrato superior				
Extracto crudo	8	0.00 d	0.00	0.00
Fracción acuosa	8	0.75 ab	0.46	61.33
Fracción metanólica	8	0.12 cd	0.35	291.67
Fracción etérea	8	0.00 d	0.00	0.00
Agua	8	1.00 a	0.00	0.00
Metanol	8	1.00 a	0.00	0.00
Éter	8	0.50 bc	0.53	106.00
En estrato inferior				
Extracto crudo	8	0.00 a	0.00	0.00
Fracción acuosa	8	0.38 a	0.52	136.84
Fracción metanólica	8	0.00 a	0.00	0.00
Fracción etérea	8	0.00 a	0.00	0.00
Agua	8	0.38 a	0.52	136.84
Metanol	8	0.25 a	0.46	184.00
Éter	8	0.00 a	0.00	0.00

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.

Anexo 16. Número promedio de larvas o pupas de *H. grandella* (por planta) encontradas en los estratos superior e inferior de plantas de cedro tratadas con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, cuatro semanas después de la inoculación con larvas de instar I.

Tratamiento	N	X	D.E.	C.V.
En estrato superior				
Extracto crudo	8	0.00 b	0.00	0.00
Fracción acuosa	8	0.50 ab	0.53	106.00
Fracción metanólica	8	0.12 ab	0.35	291.67
Fracción etérea	8	0.00 b	0.00	0.00
Agua	8	0.88 a	0.35	39.77
Metanol	8	0.88 a	0.83	94.32
Éter	8	0.62 ab	0.74	119.35
En estrato inferior				
Extracto crudo	8	0.00 a	0.00	0.00
Fracción acuosa	8	0.25 a	0.46	184.00
Fracción metanólica	8	0.00 a	0.00	0.00
Fracción etérea	8	0.00 a	0.00	0.00
Agua	8	0.38 a	0.52	136.84
Metanol	8	0.25 a	0.46	184.00
Éter	8	0.00 a	0.00	0.00

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.

Anexo 17. Longitud promedio de los túneles encontrados en los estratos superior e inferior de plantas de cedro tratadas con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, cuatro semanas después de la inoculación con larvas de instar I de *H. grandella*.

Tratamiento	N° túneles	Longitud		
		X	D.E.	C.V.
En estrato superior				
Extracto crudo	0	-	-	-
Fracción acuosa	6	20.8 a	8.23	39.51
Fracción metanólica	1	12.3 a	-	-
Fracción etérea	0	-	-	-
Agua	8	19.0 a	10.10	53.10
Metanol	8	17.2 a	7.88	45.71
Éter	3	19.8 a	8.43	42.58
En estrato inferior				
Extracto crudo	0	-	-	-
Fracción acuosa	3	6.0 a	2.59	42.95
Fracción metanólica	0	-	-	-
Fracción etérea	0	-	-	-
Agua	3	6.1 a	3.55	58.20
Metanol	2	5.4 a	2.19	40.18
Éter	0	-	-	-

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.

Anexo 18. Porcentaje promedio de consumo en discos foliares de cedro impregnados con concentraciones crecientes de la fracción metanólica del extracto de *Q. amara*, al exponer larvas de instar III de *H. grandella*, durante 24 h.

Tratamiento*	N	X	D.E.	C.V.
Agua	32	9.56 a	2.72	28.45
Mezcla disolvente	32	8.77 a	3.13	35.69
0,00625 (0,10)	32	7.25 ab	1.52	20.97
0,02 (0,32)	32	4.17 bc	1.77	42.45
0,0625 (1,0)	32	1.94 c	0.64	32.99
0,2 (3,2)	32	1.17 c	0.83	70.94
0,625 (10)	32	0.88 c	0.56	63.64

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.

* Los valores entre paréntesis son las concentraciones del extracto crudo correspondientes a las concentraciones del liofilizado de la fracción metanólica.

Anexo 19. Porcentaje de mortalidad acumulada de larvas de *H. grandella*, durante los primeros siete días del experimento, luego de su exposición a discos foliares de cedro tratados con concentraciones crecientes de la fracción metanólica del extracto de *Q. amara*, durante 24 h y en el instar III.

Tratamientos	D/a 1	D/a 2	D/a 3	D/a 4	D/a 5	D/a 6	D/a 7					
	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.					
Agua	6.25 ± 7.21	b	6.25 ± 7.22	b	9.38 ± 6.25	b	9.38 ± 6.25	c	9.38 ± 6.25	c	12.50 ± 10.21	a
Solvente	12.50 ± 17.68	ab	15.62 ± 23.66	ab	15.62 ± 23.66	ab	18.75 ± 21.65	ab	18.75 ± 21.65	abc	18.75 ± 21.65	abc
0.00625 %	9.38 ± 11.97	ab	9.38 ± 11.97	ab	12.50 ± 14.43	ab	12.50 ± 14.43	b	12.50 ± 14.43	bc	15.62 ± 11.97	bc
0.02 %	21.88 ± 15.73	ab	25.00 ± 17.68	ab	25.00 ± 17.68	ab	25.00 ± 17.68	ab	25.00 ± 17.68	abc	28.12 ± 21.35	abc
0.0625 %	31.25 ± 16.14	ab	40.62 ± 6.25	ab	40.62 ± 6.25	ab	40.62 ± 6.25	ab	43.75 ± 12.50	abc	46.88 ± 11.97	ab
0.2 %	43.75 ± 23.94	a	43.75 ± 23.94	a	43.75 ± 23.94	a	43.75 ± 23.94	ab	46.88 ± 23.66	ab	46.88 ± 23.66	ab
0.625 %	37.50 ± 17.68	ab	43.75 ± 16.14	a	46.87 ± 11.97	a	50.00 ± 17.68	a	53.12 ± 23.66	a	53.12 ± 23.66	a

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.

Anexo 20. Porcentaje promedio de consumo en discos foliares de cedro impregnados con concentraciones crecientes de la fracción etérea del extracto de *Q. amara*, al exponer larvas de instar III de *H. grandella*, durante 24 h.

Tratamiento*	N	X	D.E.	C.V.
Agua	32	8.47 a	1.61	19.01
Mezcla disolvente	32	1.40 b	0.70	50.00
0.0014 (0,10)	32	0.78 b	0.56	71.79
0.00448 (0,32)	32	1.18 b	0.55	46.61
0.014 (1,0)	32	1.38 b	0.46	33.33
0.0448 (3,2)	32	0.34 b	0.12	35.29
0.14 (10)	32	0.77 b	0.11	14.29

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.

* Los valores entre paréntesis son las concentraciones del extracto crudo correspondientes a las concentraciones del liofilizado de la fracción etérea.

Anexo 21. Porcentajes de mortalidad acumulada de larvas de *H. grandella*, durante los primeros siete días del experimento, luego de su exposición a discos foliares de cedro tratados con concentraciones crecientes de la fracción etérea del extracto de *Q. amara*, durante 24 h y en el instar III.

Tratamientos	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.
Agua	3.12 ± 6.25 a	6.25 ± 7.22 c	6.25 ± 7.22 b	9.38 ± 11.97 b	9.38 ± 11.97 b	9.38 ± 11.97 b	12.50 ± 14.43 b
Solvente	12.50 ± 17.68 a	28.12 ± 21.35 abc	28.12 ± 21.35 ab				
0.0014 %	25.00 ± 17.68 a	46.88 ± 11.97 ab	50.00 ± 10.21 a	50.00 ± 10.21 a	53.12 ± 11.97 a	53.12 ± 11.97 a	53.12 ± 11.97 a
0.00448 %	18.75 ± 16.14 a	34.38 ± 6.25 abc	34.38 ± 6.25 ab				
0.014 %	12.50 ± 0.00 a	15.62 ± 6.25 bc	15.62 ± 6.25 ab				
0.0448 %	31.25 ± 16.14 a	50.00 ± 22.82 a	50.00 ± 22.82 a	50.00 ± 22.82 a	50.00 ± 22.82 a	50.00 ± 22.82 a	50.00 ± 22.82 ab
0.14 %	28.12 ± 18.75 a	31.25 ± 16.14 abc	34.37 ± 18.75 ab	34.37 ± 18.75 ab	37.50 ± 22.82 ab	37.50 ± 22.82 ab	37.50 ± 22.82 ab

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.

Anexo 22. Porcentaje promedio de consumo (resultado de tres evaluaciones) en folíolos provenientes de plantas cultivadas *in vitro* en medios con diferentes extractos vegetales, al exponer larvas de instar I de *H. grandella*, durante 24 h.

Tratamiento	N	X	D.E.	C.V.
Agua	75	17.83 a	12.91	72.41
Carbofurán	75	0.00 d	0.00	0.00
hombre grande	60	4.74 c	5.31	1.12
Azatín	51	2.51 cd	4.93	1.96
ruda	55	6.46 bc	7.68	1.19
tacaco cimarrón	50	10.40 b	11.98	115.19

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.

Anexo 23. Porcentaje promedio de consumo en folíolos provenientes de plantas de cedro cultivadas *in vitro* en medios con diferentes extractos vegetales, al exponer larvas de instar I de *H. granella*, durante 24 h, y para las evaluaciones realizadas tres días, una semana y dos semanas después de la siembra de las plantas en los medios.

Tratamiento	N	X	D.E.	C.V.
Tres días				
Agua	25	20.12 a	14.02	69.68
Carbofurán	25	0.00 c	0.00	0.00
hombre grande	25	3.66 c	4.88	133.33
Azatín	25	2.16 c	5.43	251.39
ruda	25	10.04 b	8.65	86.16
tacaco cimarrón	22	16.36 a	14.68	89.73
Una semana				
Agua	25	12.48 a	13.56	108.65
Carbofurán	25	0.00 c	0.00	0.00
hombre grande	22	5.86 b	5.00	85.32
Azatín	16	3.00 bc	4.99	166.33
ruda	17	4.71 bc	5.81	123.35
tacaco cimarrón	17	4.24 bc	6.27	147.88
Dos semanas				
Agua	25	20.88 a	13.56	64.94
Carbofurán	25	0.00 c	0.00	0.00
hombre grande	13	4.92 bc	6.51	132.32
Azatín	10	2.60 bc	3.75	144.23
ruda	13	1.85 bc	4.02	217.30
tacaco cimarrón	11	8.00 b	6.21	77.62

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.

Anexo 24. Porcentaje promedio de mortalidad acumulada (resultado de tres evaluaciones) de larvas de *H. grandella*, durante los primeros siete días de cada experimento, luego de su exposición a folíolos provenientes de plantas de cedro cultivadas *in vitro* en medios con diferentes extractos vegetales.

Tratamientos	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
	X ± D.E.						
Agua	12.00 ± 32.71 c	16.00 ± 36.91 c	16.00 ± 36.91 c	17.33 ± 38.11 c			
Carbofurán	100.00 ± 0.00 a						
Hombre grande	45.00 ± 50.17 b	51.67 ± 50.39 b	55.00 ± 50.17 b	55.00 ± 50.17 b	56.67 ± 49.97 b	56.67 ± 49.97 b	56.67 ± 49.97 b
Azafrán	78.43 ± 41.54 a	82.35 ± 38.50 a	84.31 ± 36.73 a	92.16 ± 27.15 a	92.16 ± 27.15 a	92.16 ± 27.15 a	94.12 ± 23.76 a
Ruda	47.27 ± 50.39 b	58.18 ± 49.78 b					
Tacaco cimarrón	46.00 ± 50.35 b	46.00 ± 50.35 b	46.00 ± 50.35 b	50.00 ± 50.51 b	54.00 ± 50.35 b	54.00 ± 50.35 b	56.00 ± 50.14 b

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0.05$), según la prueba de Tukey.

Anexo 25. Porcentaje de mortalidad promedio acumulada de larvas de *H. grandella*, durante los primeros siete días del experimento, luego de su exposición a folíolos provenientes de plantas de cedro cultivadas *in vitro* en medios con diferentes extractos vegetales, y tomados tres días después de realizada la siembra.

Tratamientos	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.
Agua	4.00 ± 20.00 c	4.00 ± 20.00 c	4.00 ± 20.00 c	4.00 ± 20.00 c	4.00 ± 20.00 c	4.00 ± 20.00 c	4.00 ± 20.00 c
Carbofúrán	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a
Hombre grande	44.00 ± 50.66 b	52.00 ± 50.99 b	52.00 ± 50.99 b	52.00 ± 50.99 b	56.00 ± 50.66 b	56.00 ± 50.66 b	56.00 ± 50.66 b
Azafín	80.00 ± 40.82 a	84.00 ± 37.41 a	84.00 ± 37.41 a	88.00 ± 33.17 a	88.00 ± 33.17 a	88.00 ± 33.17 a	92.00 ± 33.17 a
Ruda	24.00 ± 43.59 bc	40.00 ± 50.00 b					
Tacaco cimarrón	31.82 ± 47.67 b	31.82 ± 47.67 b	31.82 ± 47.67 b	36.36 ± 49.24 b	45.45 ± 50.96 b	45.45 ± 50.96 b	50.00 ± 51.18 b

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.

Anexo 26. Porcentaje de mortalidad promedio acumulada de larvas de *H. grandella*, durante los primeros siete días del experimento, luego de su exposición a folíolos provenientes de plantas de cedro cultivadas *in vitro* en medios con diferentes extractos vegetales, y tomados una semana después de realizada la siembra.

Tratamientos	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.
Agua	24.00 ± 43.59 d	36.00 ± 48.99 c	36.00 ± 48.99 c	36.00 ± 48.99 b	36.00 ± 48.99 c	36.00 ± 48.99 c	36.00 ± 48.99 d
Carbofurán	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a
Hombre grande	31.82 ± 47.67 cd	40.91 ± 50.32 bc	50.00 ± 51.18 bc	50.00 ± 51.18 b	50.00 ± 51.18 bc	50.00 ± 51.18 bc	50.00 ± 51.18 cd
Azafín	68.75 ± 47.87 b	68.75 ± 47.87 ab	75.00 ± 44.72 ab	93.75 ± 25.00 a	93.75 ± 25.00 a	93.75 ± 25.00 a	93.75 ± 25.00 ab
Ruda	52.94 ± 51.45 bc	58.82 ± 50.73 bc	58.82 ± 50.73 bc	58.82 ± 50.73 b	58.82 ± 50.73 bc	58.82 ± 50.73 bc	58.82 ± 50.73 cd
Tacaco cimarrón	64.71 ± 49.26 bc	64.71 ± 49.26 bc	64.71 ± 49.26 bc	64.71 ± 49.26 b	64.71 ± 49.26 b	64.71 ± 49.26 b	64.71 ± 49.26 bc

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.



Anexo 27. Porcentaje de mortalidad promedio acumulada de larvas de *H. grandella*, durante los primeros siete días del experimento, luego de su exposición a folíolos provenientes de plantas de cedro cultivadas *in vitro* en medios con diferentes extractos vegetales, y tomados dos semanas después de realizada la siembra.

Tratamientos	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.
Agua	8.00 ± 27.69 c	8.00 ± 27.69 c	8.00 ± 27.69 c	12.00 ± 33.17 d			
Carbofurán	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a			
Hombre grande	69.23 ± 48.04 b	69.23 ± 48.04 b	69.23 ± 48.04 b	69.23 ± 48.04 bc			
Azafín	90.00 ± 31.62 ab	100.00 ± 0.00 ab	100.00 ± 0.00 ab	100.00 ± 0.00 ab	100.00 ± 0.00 ab	100.00 ± 0.00 ab	100.00 ± 0.00 ab
Ruda	84.62 ± 37.55 ab	92.31 ± 27.74 ab	92.31 ± 27.74 ab	92.31 ± 27.74 abc			
Tacaco cimarrón	45.45 ± 52.22 c	45.45 ± 52.22 c	45.45 ± 52.22 c	54.54 ± 52.22 c	54.54 ± 52.22 c	54.54 ± 52.22 c	54.54 ± 52.22 c

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.

Anexo 28. Porcentaje promedio de mortalidad total (resultado de tres evaluaciones) de larvas de *H. grandella* expuestas a folíolos provenientes de plantas cultivadas *in vitro* en medios con diferentes extractos vegetales, durante 24 h y en el instar I.

Tratamiento	N	X	D.E.	C.V.
Agua	75	58.67 c	49.57	84.49
Carbofurán	75	100.00 a	0.00	0.00
hombre grande	51	80.39 b	40.10	49.88
Azatín	51	100.00 a	0.00	0.00
ruda	55	81.82 b	38.92	47.57
tacaco cimarrón	50	78.00 b	41.85	53.65

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey.

Anexo 29. Porcentaje de mortalidad total de larvas de *H. grandella*, expuestas a folíolos provenientes de plantas de cedro cultivadas *in vitro* en medios con diferentes extractos vegetales, y para las evaluaciones realizadas tres días, una semana y dos semanas después de la siembra de las plantas en los medios.

Tratamiento	N	X	D.E.	C.V.
Tres días				
Agua	25	48.00 c	50.99	106.23
Carbofurán	25	100.00 a	0.00	0.00
hombre grande	25	80.00 b	40.82	51.02
Azatín	25	100.00 a	0.00	0.00
ruda	25	64.00 bc	48.99	76.55
tacaco cimarrón	22	77.27 b	42.89	55.51
Una semana				
Agua	25	76.00 b	43.59	57.36
Carbofurán	25	100.00 a	0.00	0.00
hombre grande	22	86.36 ab	35.13	40.68
Azatín	16	100.00 ab	0.00	0.00
ruda	17	94.12 ab	24.25	25.76
tacaco cimarrón	17	88.24 ab	33.21	37.64
Dos semanas				
Agua	25	52.00 b	50.99	98.06
Carbofurán	25	100.00 a	0.00	0.00
hombre grande	13	50.00 b	57.74	115.48
Azatín	10	100.00 a	0.00	0.00
ruda	13	100.00 a	0.00	0.00
tacaco cimarrón	11	63.63 b	50.45	79.29

Las medidas con la misma letra no difieren ($p \leq 0.05$), según la prueba de Tukey.