



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES Y**  
**DE LA CONSERVACIÓN DE LA NATURALEZA**  
**ESCUELA DE CIENCIAS FORESTALES**  
**DEPARTAMENTO DE SILVICULTURA**

---

**EFICACIA DE EXTRACTOS INSECTICIDAS DE FRUTOS DE *Melia azedarach* L. EN VAQUITA DEL OLMO [*Xanthogaleruca* (= *Pyrrhalta) luteola* MÜLL (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE)]**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Ingeniero Forestal

**FERNANDO ANTONIO AZÚA CANALES**

Profesores Guías: Dra. Amanda Huerta Fuentes. Ingeniero Forestal  
Dr. Ítalo Chiffelle Gómez. Bioquímico

---

Santiago, Chile

2009

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES Y**  
**DE LA CONSERVACIÓN DE LA NATURALEZA**  
**ESCUELA DE CIENCIAS FORESTALES**  
**DEPARTAMENTO DE SILVICULTURA**

**EFICACIA DE EXTRACTOS INSECTICIDAS DE FRUTOS DE *Melia***  
***azedarach* L. EN VAQUITA DEL OLMO [*Xanthogaleruca* (= *Pyrrhalta*)**  
***luteola* MÜLL (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE)]**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Ingeniero Forestal

**FERNANDO ANTONIO AZÚA CANALES**

Calificaciones:	Nota	Firma
Prof. Guía Dra. Amanda Huerta F.	7,0	.....
Prof. Guía Dr. Ítalo Chiffelle G.	7,0	.....
Prof. Consejero Sra. María Teresa Serra V.	7,0	.....
Prof. Consejero Sr. Tomás Karsulovic C.	7,0	.....

*A mis padres por su incondicional apoyo y cariño  
A Karla por llenar mi vida de amor y anhelos  
A mis amigos por estar ahí siempre*

## AGRADECIMIENTOS

Sin duda son muchas las personas a las que debo agradecer, no sólo por su apoyo en la elaboración de este estudio, sino también por su influencia en mí a lo largo de los años que permanecí como estudiante:

- Mi familia, gracias por el amor y la paciencia que han sabido entregarme en todos estos años, especialmente en esta importante etapa de mi vida.
- Mi profesora guía Amanda Huerta, a quién tuve el gusto y el honor de asistir como ayudante en sus ramos, y de quien no sólo recibí conocimientos académicos, sino que también un trato siempre respetuoso pero no por eso distante. Gracias por su preocupación, por su celeridad en contestar mis dudas y sobretodo por su cariño.
- Mi profesor Italo Chiffelle, quién fue el encargado de enseñarme los conocimientos básicos de la química hace muchos años y que, afortunadamente, vuelve a ser una pieza clave en instancias finales de mi paso por la Universidad. Le agradezco su apoyo y sus consejos. Aprovecho la instancia para agradecer las facilidades brindadas por Tania y el resto del personal del laboratorio de química.
- Mis profesores consejeros por sus correcciones oportunas y su buena disposición.
- A mis queridos amigos Rodrigo, Francisco, Nelson, Evelyn y Laura. Su amistad es sin duda uno de los mejores regalos que obtuve de mi paso por Antumapu. Gracias por su apoyo y cariño en todo momento.
- A Gladys y Juan Carlos, por la inmensa confianza que han depositado en mí y por hacerme sentir parte de su familia. Gracias por todo el apoyo que nos han entregado.
- Finalmente quiero agradecer a la persona más importante en mi vida, Karla. Me has entregado tu amor incondicional y siempre has creído en mí. Has sido mi soporte y mi calma, y no tengo dudas que juntos lograremos todas las metas y anhelos que nos hemos planteado.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	6
2.1 Materiales .....	6
2.1.1 Material vegetal.....	6
2.1.2 Insectos.....	6
2.2 Métodos.....	6
2.2.1 Colecta y crianza de insectos .....	6
2.2.2 Obtención de los frutos .....	6
2.2.3 Elaboración de los extractos.....	7
2.2.4 Ensayo de actividad antialimentaria.....	8
2.2.5 Evaluación de la eficacia insecticida de los extractos.....	8
2.2.6 Determinación fenotípica de sexo y razón sexual en adultos de <i>X. luteola</i> .....	9
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	10
3.1 Efecto antialimentario de extractos de frutos de <i>M. azedarach</i> sobre adultos de <i>X. luteola</i> .....	10
3.2 Evaluación de la eficacia insecticida de los extractos de frutos de <i>M. azedarach</i> sobre adultos de <i>X. luteola</i> .....	11
3.3 Determinación fenotípica de sexo y razón sexual de individuos adultos de <i>X. luteola</i> .....	17
4. CONCLUSIONES .....	19
5. BIBLIOGRAFÍA .....	20
APÉNDICE 1. Análisis Estadístico 1 .....	26
APÉNDICE 2. Análisis Estadístico 2 .....	28

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos según concentraciones (%) y tipo de solvente.	8
Cuadro 2. Porcentaje de deterrencia de adultos de <i>X. luteola</i> según distintas concentraciones de extractos acuosos de frutos de <i>M. azedarach</i> .	10
Cuadro 3. Mortalidades promedio ( $\pm$ error estándar) de <i>X. luteola</i> por efecto de extractos etanólicos de frutos de <i>M. azedarach</i> para distintas concentraciones.	11
Cuadro 4. Mortalidades promedio ( $\pm$ error estándar) de <i>X. luteola</i> por efecto de extractos acuosos de frutos de <i>M. azedarach</i> para distintas concentraciones.	12
Cuadro 5. Mortalidades promedio ( $\pm$ error estándar) de <i>X. luteola</i> por efecto de extractos acuosos y etanólicos de frutos de <i>M. azedarach</i> para cuatro concentraciones.	12
Cuadro 6. Valores de concentración letal según solvente y día de evaluación.	15
Cuadro 7. Concentraciones letales del 50% y ajuste lineal de los extractos etanólicos y acuosos de frutos de <i>M. azedarach</i> .	15

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Adulto de <i>X. luteola</i> (A); Daño foliar (B); Olmo atacado (C)	2
Figura 2. Etapas del proceso de elaboración de extractos de <i>M. azedarach</i> . A) Frutos inmaduros; B) Harina de frutos secos; C) Extractos base según solvente.	7
Figura 3. Porcentaje de mortalidad corregida promedio acumulada de adultos de <i>X. luteola</i> alimentados en hojas tratadas con extractos etanólicos de frutos de <i>M. azedarach</i> a distintas concentraciones.	14
Figura 4. Porcentaje de mortalidad corregida promedio acumulada de adultos de <i>X. luteola</i> alimentados en hojas tratadas con extractos acuosos de frutos de <i>M. azedarach</i> a distintas concentraciones.	14
Figura 5. Línea dosis Probit de extractos etanólicos y acuosos de frutos inmaduros de <i>M. azedarach</i> sobre <i>X. luteola</i> en bioensayos de laboratorio.	16
Figura 6. Vista ventral del abdomen del adulto de <i>X. luteola</i> . A. Macho; B. Hembra.	17
Figura 7. Estructuras reproductivas de adultos de <i>X. luteola</i> . A. Macho (Detalle del Aedeagus); B. Hembra (Espermateca).	18

**Eficacia de extractos insecticidas de frutos de *Melia azedarach* L. en vaquita del olmo  
[*Xanthogaleruca* (= *Pyrrhalta*) *luteola* Müll (Coleoptera: Chrysomelidae)]**

**RESUMEN**

*Xanthogaleruca luteola* Müller (Coleoptera: Chrysomelidae) es un insecto desfoliador de especies del género *Ulmus* sp., que actualmente se encuentra en diversas regiones de Chile, especialmente en la zona centro. Daña fuertemente árboles presentes principalmente en el arbolado urbano de parques, calles y jardines.

Para determinar la eficacia insecticida de extractos acuosos y etanólicos del fruto inmaduro de *Melia azedarach* L. (Meliaceae) sobre adultos de este insecto, se llevaron a cabo bioensayos en laboratorio. Se probaron distintas concentraciones de los extractos con diversos solventes y se determinó su efectividad y concentración letal para matar al 50% de los insectos (CL<sub>50</sub>). Adicionalmente, se evaluó la actividad antialimentaria de los extractos, se establecieron diferencias fenotípicas de sexos y finalmente se determinó la razón sexual de la muestra.

Los resultados indicaron que los extractos de frutos de *M. azedarach* fueron efectivos como agentes insecticidas contra adultos de *X. luteola*, registrándose mayor mortalidad a concentraciones más elevadas, y un mejor desempeño de los extractos etanólicos respecto a los acuosos, obteniéndose CL<sub>50</sub> de 0,94 y 6,55% p/v, respectivamente. Se corroboró la acción antialimentaria de los extractos del fruto inmaduro de *M. azedarach*. Además se ratificaron las diferencias sexuales fenotípicas propuestas mediante el análisis de la genitalia. Por último se determinó una razón sexual de 1:1.

Se recomienda continuar con el estudio de las propiedades insecticidas tanto de *M. azedarach* como de otras especies botánicas con el fin de elaborar extractos más inocuos para el medio ambiente. Asimismo sería conveniente seguir estudiando el comportamiento de *X. luteola* en el arbolado urbano del país a fin de determinar medidas eficaces de control para esta plaga.

**PALABRAS CLAVES:** *Melia azedarach*, *Xanthogaleruca luteola*, insecticida botánico, actividad antialimentaria, manejo integrado de plagas.

**Effectiveness of insecticides extracts from fruits of *Melia azedarach* L. in elm leaf beetle [*Xanthogaleruca* (= *Pyrrhalta*) *luteola* Müll (Coleoptera: Chrysomelidae)]**

**ABSTRACT**

*Xanthogaleruca luteola* Müller (Coleoptera: Chrysomelidae) is a *Ulmus* species defoliator insect, that currently is present in several regions of Chile, especially in the central area. This insect causes strong damage in trees present mainly in the woodland of parks, tree-line of streets and gardens.

In order to determine the insecticide effectiveness of aqueous and ethanolics extracts from immature fruit of *Melia azedarach* L. (Meliaceae) on adults of this type of insect, bioassays in laboratory were carried out. Different concentrations of the extracts with a diverse range of solvents were trialed and its effectiveness and lethal concentration to kill 50% of the insects (CL<sub>50</sub>) were determined. Additionally, the antifeedant activity of the extracts was evaluated, the phenotypes differences of sexes were established and finally the sexual ratio of the sample was determined.

The results indicated that the extracts from fruits of *M. azedarach* were effective as insecticide agents against adults of *X. luteola*, reporting a greater mortality to higher concentrations, and a better performance of the ethanolics extracts with respect to the aqueous ones, obtaining CL<sub>50</sub> of 0.94 and 6.55%, respectively. The antifeedant action of the extracts of the immature fruit of *M. azedarach* was corroborated. In addition, the sexual phenotypical differences suggested were ratified by genital analysis and a sexual ratio of 1:1 was determined.

It is recommended to continue with the study of the insecticide properties of *M. azedarach* as well as the other botanical species with the purpose of making environmentally less injurious extracts. Also it would be convenient to continue studying the behavior of *X. luteola* in the urban woodland of the country in order to determine effective control measures against this pest.

**KEY WORDS:** *Melia azedarach*, *Xanthogaleruca luteola*, botanical insecticide, antifeedant activity, integrated pest management.

## 1. INTRODUCCIÓN

El manejo del arbolado de parques y jardines plantea dificultades al momento de decidir qué método de control fitosanitario aplicar debido al mayor resguardo a la salud humana y animal en lugares masivamente concurridos.

Los olmos (*Ulmus* sp.), originarios de Europa, Asia y América, son cultivados en el país, principalmente como árboles ornamentales en parques y avenidas en la zona centro y centro sur (Fu *et al.*, 2003; Loewe y González, 2005).

El arbolado urbano compuesto por olmos de diversas comunas de la Región Metropolitana y otras regiones, está siendo invadido por un insecto desfoliador, conocido como la vaquita del olmo, *Xanthogaleruca* (= *Pyrrhalta*) *luteola* Müll (Coleoptera: Chrysomelidae) (Figura 1.A) (Jackson y Jackson, 2008).

Este insecto de origen europeo es eminentemente monófago, vive sobre toda clase de olmos, cualquiera sea su edad, pero demostrando preferencia por las especies europeas (Romanyk y Cadahia, 2002).

*X. luteola* es considerado el más grande desfoliador de plantaciones y de ejemplares ornamentales de olmos en Europa; además de transformarse en la plaga forestal urbana más importante en diversos países, tales como: Estados Unidos, Argentina, Canadá y Australia (Wu *et al.*, 1991; Valladares *et al.*, 1997; Lefoe, 2002; Lawson y Dahlsten, 2003).

Con respecto a la distribución de *X. luteola* en Chile, Askevold (1991) indicó que el primer registro data de abril de 1982 de un ejemplar proveniente de Ritoque (Región de Valparaíso). Por su parte, Parra (2009) indicó que el insecto fue observado hace 6 años en la plaza de la ciudad de Los Andes, desde donde avanzó a Til-Til, Lampa, Buin y Chillán. SAG (2005) la reportó en las regiones Metropolitana, O'Higgins y del Bío-Bío.

El daño de este insecto se inicia con las primeras fases de los estadios larvales, las que consumen las hojas a partir de la epidermis inferior por el envés, dejando intacta la epidermis superior, provocando la esqueletonización de la superficie foliar, lesión que se agrava al considerar que *X. luteola* contempla tres estadios larvarios en su ciclo de desarrollo. Posteriormente, al emerger los insectos adultos desde las pupas, comienza un segundo período de destrucción foliar al alimentarse del tejido meristemático, atravesando ambas epidermis (superior e inferior) ocasionando así la perforación circular de la hoja. Es frecuente encontrar ambos tipos de ataque simultáneamente, lo que indica un posible traslape entre las generaciones (Figura 1.B) (Romanyk y Cadahia, 2002; Jackson y Jackson, 2008). Dependiendo del nivel del ataque el resultado puede variar desde la defoliación parcial o total del dosel (Figura 1.C), con lo cual se reduce el valor estético del árbol y ocasiona la caída anual de las hojas, hasta el debilitamiento general de éste, volviéndose más susceptible al ataque de otras plagas como los escolítidos, transmisores de la enfermedad holandesa del olmo (De Liñán, 1998).

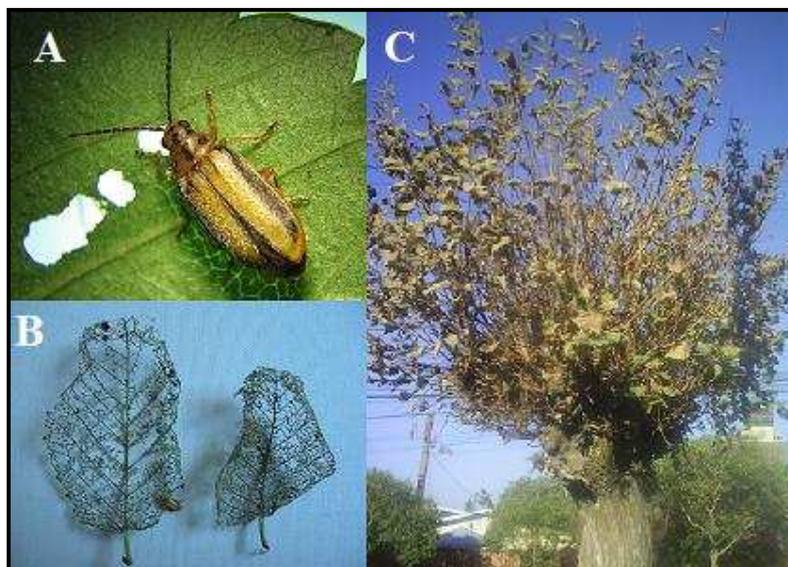


Figura 1. Adulto de *X. luteola* (A); Daño foliar (B); Olmo atacado (C)

El nivel de daño se encuentra estrictamente relacionado con el número de generaciones que este escarabajo puede llegar a tener por año. En regiones donde las condiciones climáticas son favorables, el insecto puede completar hasta tres generaciones en un año, tal como ocurre en España (Romanyk y Cadahia, 2002) y en el centro-sur de California (Dreistadt *et al.*, 2004). En el país aún no existen antecedentes sobre el número de generaciones que este insecto puede tener.

Con respecto a los métodos de control de *X. luteola*, generalmente se realiza en el contexto del manejo integrado de plagas, empleando diferentes técnicas (1) uso de bandas de corteza impregnadas de insecticida, destinadas a eliminar a la larva cuando se encuentra en el tercer estadio y se desplaza por el tronco hacia el suelo para pupar; y (2) empleo de controladores biológicos como el díptero *Erynniopsis antennata* Rondani (Tachinidae), el cual emerge de las larvas maduras, o de pequeñas avispas *Oomyzus brevistigma* Gahan (Eulophidae), parasitoide de larvas maduras y pupas y *Oomyzus gallerucae* Fonscolombe (Eulophidae), parasitoide de huevos. También se ha probado la utilización de *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* como parte del control biológico (Weber y Holman, 1976; Clair *et al.*, 1987; Costello *et al.*, 1990; Dreistadt y Dahlsten, 1990; Dahlsten *et al.*, 1994; Dmytrasz, 1998; Thurston, 1998; Dahlsten y Lystrup, 1999; Puttler y Bailey, 2003).

Además, se emplean diversos insecticidas sistémicos de aplicación foliar, generalmente de amplio espectro, que no son recomendables por los efectos negativos sobre los enemigos naturales y por los impactos medioambientales en los paisajes urbanos (Maistrello *et al.*, 2005).

Actualmente existe una línea de investigación sobre el estudio de especies botánicas con propiedades insecticidas como una alternativa de solución a los diversos problemas que se derivan principalmente del uso de insecticidas de origen sintético. En este contexto,

*Azadirachta indica* L. (Meliaceae), conocida como “neem”, es una de las especies vegetales más estudiadas y a partir de la cual se han derivado la mayor cantidad de extractos con propiedades insecticidas probados en más de 400 especies de insectos (Charleston, 2004).

No obstante, existe otra especie de interés perteneciente a la misma familia Meliaceae, *Melia azedarach* L., que ha sido objeto de diversos estudios para probar un sinnúmero de propiedades provenientes de distintas partes de este árbol, entre las que destacan la actividad insecticida, antiviral, fungicida, antioxidativa, bactericida y antiparasítica (Alché *et al.*, 2003; Carpinella *et al.*, 2003a,b ; Padrón *et al.*, 2003; Szewczuk *et al.*, 2003; Ahmed *et al.*, 2008; Gende *et al.*, 2008 y Huerta *et al.*, 2008).

*M. azedarach* es nativa de Persia, India y China; este árbol caducifolio es natural en diversos continentes incluyendo África, Australia y América. Puede alcanzar 10 a 15 m de altura, de hoja caduca y crecimiento muy rápido. Presenta un tronco recto, cilíndrico, aunque a veces torcido. La corteza es gris oscura y en ramas nuevas es lisa y lustrosa (Valdés, 2000).

Sus flores son pequeñas, fragantes, con cinco pétalos color lila. Se disponen en panículas ligeramente penduladas con los estambres reunidos en un tubo central de color púrpura oscuro (Langeland y Burks, 1998; Valdés, 2000)

Sus frutos corresponden a drupas esféricas verdes en su estado inmaduro, las que se tornan amarillas a ocreas al madurar. Poseen un tamaño aproximado de 12 a 18 mm de diámetro, son lisas, cuelgan en racimos durante todo el invierno y encierran tres a cinco semillas leñosas y duras. Estas últimas son muy tolerantes al desecamiento, y llegan a sobrevivir hasta con 3,5% de su volumen de humedad normal, pudiendo permanecer viables por períodos prolongados, hasta al menos 26 meses (Hong y Ellis, 1998; Valdés, 2000).

*M. azedarach* florece y fructifica cuando alcanza el tamaño de un arbusto. Posee una alta producción de frutos y semillas, que persisten a la última caída de las hojas (Burks, 1997).

También *M. azedarach* se reproduce vegetativamente por formación de brotes desde la raíz, capacidad que a menudo permite producir bosquecillos monotípicos densos (Langeland y Burks, 1998).

En el país esta especie es frecuente en el arbolado de calles y avenidas por lo que se presenta con altas posibilidades de utilización principalmente de los desechos del manejo de esta especie.

En relación con la actividad insecticida de *M. azedarach*, ésta se encuentra en hojas, tallos, frutos y semillas, y se debe a un grupo de triterpenoides, biológicamente activos que poseen efecto antialimentario. El mecanismo de acción de la mayoría de las sustancias provenientes de *M. azedarach* consistiría en inhibir la acción de las oxidasas en el intestino medio, por lo que el insecto inmaduro muere o se convierte en pupa o adulto anormal por deficiencia de nutrientes o interferencia en los procesos fisiológicos. Esto se traduce en inhibición de la alimentación, disminución del crecimiento y desarrollo, descenso de la tasa metabólica relativa, emergencia de adultos deformes, inhibición de la oviposición o mortalidad (Rodríguez, 1999; Gusberty *et al.*, 2000).

El efecto antialimentario de extractos de diferentes partes de *M. azedarach* ha sido analizado por diversos autores encontrando que, de modo general, los extractos de frutos inmaduros y de hojas han sido los más eficaces principalmente para insectos coleópteros y lepidópteros (Breuer y Devkota, 1990; Del Tío *et al.*, 1996; Riba *et al.*, 1996; De Nardo *et al.*, 1997; Valladares *et al.*, 1997; Carpinella *et al.*, 2003a; Valladares *et al.*, 2003; Charleston, 2004; Nathan y Kim., 2005; Defagó *et al.*, 2006; Akhtar *et al.*, 2008; Rossetti *et al.*, 2008).

Sin embargo, *M. azedarach* ha experimentado un bajo desarrollo comercial como insecticida comercial en comparación con *A. indica*, debido principalmente a que los frutos de la primera contienen meliatoxina, un compuesto triterpenoide tóxico para mamíferos (Schmutterer, 2002).

No obstante, Carpinella *et al.* (2003a, 2005) plantean que la composición química de *M. azedarach* varía notablemente desde su estado silvestre al cultivado, y que, en el caso de los individuos cultivados en Argentina, los frutos no contienen meliatoxinas pero sí otros triterpenoides, especialmente meliartenin, el cual es un fuerte antialimentario de insectos.

La acción insecticida de extractos etanólicos de *M. azedarach* y *A. indica* fue evaluada por Wandscheer *et al.* (2004) en contra del estado larvario del mosquito transmisor de la fiebre dengue, *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). En dicho estudio se determinó que los extractos endocárpicos de ambas especies tenían acción larvicida, alcanzando mejores resultados con menores concentraciones en *A. indica* que con *M. azedarach*.

La eficacia de extractos metanólicos de tallos, hojas y frutos de *M. azedarach* fue probada por Abou-Fakhr *et al.* (2001) contra insectos adultos de la mosca de la papa *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) encontrando una alta repelencia del insecto adulto al extracto en comparación con las plantas control (tratadas con agua destilada), pero sin existir diferencias significativas entre los porcentajes de repelencia para los diferentes tipos de extractos.

La actividad insecticida y antialimentaria de extractos provenientes de diferentes partes de plantas de *M. azedarach*, aplicados sobre adultos de *X. luteola* fue investigada por Defagó *et al.* (2006). Los principales resultados del estudio revelan que en los extractos de las distintas partes arbóreas evaluadas se encontró un efecto antialimentario significativo, además de evidenciar un fuerte aumento en las tasas de mortalidad.

Huerta *et al.* (2008) evaluaron la eficacia insecticida de frutos de *M. azedarach* en *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae). En dicho estudio se concluyó que la eficacia insecticida era mayor en los frutos en estado inmaduro por contener una mayor concentración de las sustancias insecticidas que los maduros. Además, se determinó que las concentraciones más efectivas para la mortalidad del insecto se lograron con 7.500 y 10.000 ppm de extracto de *M. azedarach*, bordeando el 75% de efectividad.

Considerando los resultados de diversos estudios sobre la efectividad insecticida de distintas partes de *M. azedarach* y tomando en cuenta que en el país dicha especie arbórea se encuentra en el arbolado urbano, es posible utilizar recursos tales como desechos de poda en la elaboración de extractos naturales, los cuales son factibles de ser utilizados

contra diversas plagas como es el caso de *X. luteola*, que con los crecientes niveles de presencia en el país, se perfila como un excelente candidato a ser evaluado.

Esta investigación es un estudio sobre la elaboración de extractos crudos del fruto inmaduro de *M. azedarach* y la evaluación de su eficacia insecticida contra *X. luteola* mediante bioensayos de laboratorio, con el propósito de contribuir al manejo integrado de esta plaga.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Materiales

#### 2.1.1 Material vegetal

El material vegetal utilizado en este estudio correspondió a 1 Kg de frutos inmaduros de *M. azedarach* colectados manualmente durante el verano de 2008 desde árboles ornamentales del Campus Antumapu de la Universidad de Chile, en Santiago, Chile (Coordenadas 33°34 S; 70°38 O).

#### 2.1.2 Insectos

Los ejemplares de *X. luteola* se colectaron en estado larvario desde individuos arbóreos de calles de la Comuna de Maipú en Santiago y se trasladaron al Laboratorio de Entomología Forestal del Departamento de Silvicultura de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile, donde se crió para efectos de obtener individuos adultos de edades conocidas.

### 2.2 Métodos

El método utilizado en este estudio consideró cinco etapas principales: (1) colecta de insectos, (2) obtención de los frutos, (3) elaboración de los extractos, (4) evaluación de la actividad antialimentaria (deterrencia) y de la eficacia de los extractos mediante bioensayos de laboratorio y (5) diferenciación fenotípica de sexo y razón sexual de adultos.

Cabe destacar que dada la escasa información existente acerca de la biología de *X. luteola* en el país se estudió la diferenciación fenotípica de sexo, razón sexual y actividad antialimentaria del insecto, actividades realizadas en forma adicional a lo contemplado en el proyecto de memoria original.

#### 2.2.1 Colecta y crianza de insectos

Se colectaron larvas de últimos estadios de *X. luteola* y se trasladaron en bolsas de tul al Laboratorio de Entomología Forestal. Los insectos se colocaron en cápsulas Petri con papel filtro Whatman N°1 en la base, humedecido con agua destilada y se les suministró hojas frescas de olmo (*Ulmus minor* Mill.) como alimento hasta que se transformaron en pupas. Posteriormente se cubrieron con hojas para simular las condiciones naturales en las que el insecto realiza la pupación y se mantuvieron con humedad constante hasta la emergencia de los adultos, usándose en los bioensayos.

#### 2.2.2 Obtención de los frutos

Los frutos de *M. azedarach* se obtuvieron mediante un muestreo aleatorio sobre 20 árboles y se colectaron desde distintas partes de la copa. El estado de madurez escogido para la elaboración de los extractos fue el inmaduro (Figura 2A) (Chiffelle *et al.*, 2009). Este estado del fruto es reconocible por un color verde brillante característico y por tener epicarpio carnoso.

### 2.2.3 Elaboración de los extractos

La elaboración de los extractos se llevó a cabo en los laboratorios de Química del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile. Los frutos de *M. azedarach* obtenidos se secaron en una estufa de aire forzado (Memmert® 854) a 45 °C por 70 h hasta adquirir un peso constante (Boeco Equilab, sensibilidad 0,1 mg, máx. 120 g). Posteriormente, se trituraron en un molino mecánico con un tamiz de graduación N° 60, obteniéndose la harina que se usó para los análisis (Figura 2 B).



Figura 2. Etapas del proceso de elaboración de extractos de *M. azedarach*. A) Frutos inmaduros; B) Harina de frutos secos; C) Extractos base según solvente.

Los extractos se elaboraron mezclando la harina con los solventes (agua destilada y etanol). Este proceso consistió en la determinación empírica de la solución más concentrada del extracto al considerar distintas relaciones entre el material sólido y el solvente.

Para el caso del agua destilada, la relación considerada fue de 1/7 (1 parte de harina (Shimadzu ELBL 3000, sensibilidad 0,1 g, máx. 3000 g) por 7 partes de agua destilada) y para el caso del etanol fue de 1/3. Esta variación se debió a las diferencias en solubilidad resultantes para cada tipo de solvente.

Las soluciones anteriores se agitaron magnéticamente (Heidolph® MR 3001K) durante 18 h, exponiéndolas la primera hora a 37°C, y posteriormente se filtraron y centrifugaron (HN-S centrifuge). Las soluciones resultantes se filtraron nuevamente (utilizando papel filtro Whatman N°1) hasta obtener los extractos base para cada solvente (Figura 2 C).

Para determinar la concentración de estos últimos, se llevó a sequedad un volumen conocido de las soluciones (5 mL) y por diferencia de pesos se determinó la cantidad de sólidos solubles (determinación de % p/v) en los extractos base. Se prepararon las concentraciones utilizadas para cada solvente por dilución.

Las máximas concentraciones posibles de los extractos, mediante el método antes descrito, fueron de 7,5 y 4,2% [p/v] para el caso de agua destilada y del etanol, respectivamente. A partir de dichos valores y por medio de dilución se obtuvieron las concentraciones finales (tratamientos) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tratamientos según extracto (% p/v) y tipo de solvente.

Tipos de Solventes	Extracto (% p/v)					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Agua destilada	2,4	3,0	3,6	4,2	6,0	7,5
Etanol	1,0	1,8	2,4	3,0	3,6	4,2

#### 2.2.4 Ensayo de actividad antialimentaria

Para evaluar la actividad antialimentaria de los extractos obtenidos con los distintos solventes se usó el método descrito por Defagó *et al.* (2006). Un adulto de *X. luteola* fue colocado en una placa petri con dos hojas de olmo de similares características (tamaño, edad y proveniente del mismo árbol). Una de las hojas fue pincelada por ambos lados con 0,5 mL de la solución probada (Cuadro 1), mientras que la otra con 0,5 mL del solvente (agua destilada o etanol). El porcentaje de área foliar consumida se midió cada 24 h, utilizando el programa *Leaf Area Measurement Versión 1.3* (University of Sheffield, 2003).

El porcentaje de deterrencia o inhibición de la alimentación se calculó mediante la fórmula  $(1-T/C)*100$  (Defagó *et al.*, 2006) donde:

T: área foliar consumida del tratamiento.

C: área foliar consumida del control.

Se realizaron seis réplicas por cada tratamiento.

#### 2.2.5 Evaluación de la eficacia insecticida de los extractos

La eficacia insecticida de los extractos se evaluó considerando como tratamientos las distintas concentraciones de extractos de *M. azedarach*, obtenidas utilizando los solventes agua y etanol (Cuadro 1), más los testigos.

Se usaron placas petri estériles en las cuales se introdujeron hojas sanas (sin evidencia de daño) de tamaño regular de olmo, previamente sumergidas en la solución correspondiente a cada tratamiento durante 1 min. Luego de unos instantes se incluyó en cada placa petri tres insectos adultos de *X. luteola*, constituyendo así una unidad experimental. Se hicieron tres repeticiones por cada tratamiento, correspondientes a las distintas concentraciones y testigos.

Se contabilizó el número de insectos muertos diariamente y se calcularon los promedios de mortalidades con sus respectivas desviaciones estándares. Los datos de mortalidad se corrigieron mediante la fórmula de Abbott (1925) con la finalidad de no sobredimensionar el efecto real de cada tratamiento, eliminando de esta forma la mortalidad natural producida en el testigo (Silva *et al.*, 2003a, b).

$$MC = [(X-Y)/(100-Y)]x 100$$

Donde:

MC: Mortalidad corregida

X: Mortalidad del tratamiento

Y: Mortalidad del testigo.

Sobre la mortalidad corregida se determinó la concentración letal 50% (CL<sub>50</sub>); es decir, la concentración a la cual el 50% de los individuos de la unidad muestral se muere, con el procedimiento Probit mediante el software Stadplus versión 5.4.0 (AnalystSoft, 2008).

El diseño experimental utilizado para el análisis de los resultados fue completamente aleatorio. Los datos porcentuales de mortalidad se normalizaron con la fórmula  $\text{Arc}\sqrt{(x/100)}$ , siendo x la mortalidad corregida, para realizar posteriormente un análisis de varianza (ANDEVA). Cuando éste arrojaba diferencias significativas se aplicó la prueba Tukey de comparación de medias de los tratamientos con un nivel de confianza del 95% ( $P \leq 0,05$ ).

Se realizó un análisis bifactorial (4x2) con tres repeticiones, siendo los factores las concentraciones (4) y los solventes (2). Se contrastaron las concentraciones siguientes: 2,4, 3,0, 3,6 y 4,2% p/v. Este análisis permitió determinar las diferencias entre los tratamientos y concentraciones. Para estos análisis se usó el programa estadístico InfoStat versión 2009 (Grupo InfoStat, 2009).

#### **2.2.6 Determinación fenotípica de sexo y razón sexual en individuos adultos de *X. luteola***

Esta etapa consistió en la observación exhaustiva de los insectos (n= 250) en estado adulto, mediante una lupa estereoscópica. Una vez separados empíricamente los insectos por sexos, se sometió a una muestra de ellos (n= 25) a la determinación de su genitalia, mediante el método de KOH caliente al 10% v/v (Carrera y Osuna, 1996) con el fin de corroborar que las observaciones detectadas mediante lupa, coincidiesen con la observación de la genitalia y obtener de este modo un método visual, no destructivo de diferenciación fenotípica.

Terminado el proceso anterior y corroborada la efectividad de las observaciones, se procedió a un muestro aleatorio de otros 250 individuos adultos los cuales mediante observación se separaron por sexo para determinar la razón sexual.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Efecto antialimentario de extractos de frutos de *M. azedarach* sobre adultos de *X. luteola*

La evaluación del efecto antialimentario de los extractos de frutos de *M. azedarach* aplicados sobre adultos de *X. luteola* mostró diferencias al considerar el tipo de solvente utilizado en la elaboración del extracto. Para el caso de etanol, no pudo ser evaluado el efecto antialimentario puesto que los insectos perecieron en su mayoría, y aquéllos que sobrevivieron no se alimentaron ni de las hojas control ni de las hojas tratadas. Por su parte, los extractos acuosos mostraron una fuerte actividad antialimentaria para todas las concentraciones evaluadas, especialmente sobre 3,6% p/v, donde el porcentaje de inhibición de la alimentación o deterrencia alcanzó un 100 % (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentaje de deterrencia de adultos de *X. luteola* según distintas concentraciones de extractos acuosos de frutos de *M. azedarach*.

Concentración de los extractos acuosos (% p/v)	Área foliar consumida por <i>X. luteola</i> (%)		Deterrencia (%)
	Control	Tratamiento	
2,4	1,09	0,14	87,08
3,0	3,13	0,07	97,68
3,6	3,33	0,00	100,0
4,2	2,85	0,00	100,0
6,0	2,48	0,00	100,0
7,5	2,19	0,00	100,0

En el Cuadro 2 se evidencia el efecto antialimentario de extractos acuosos de frutos de *M. azedarach* frente a individuos adultos de *X. luteola*, situación muy diferente a lo ocurrido con los extractos etanólicos, donde puede decirse que el efecto presentado fue de toxicidad.

Los valores de deterrencia registrados en este estudio concuerdan con los obtenidos por diversos autores sobre el poder antialimentario de extractos de *M. azedarach*. Al respecto Breuer y Devkota (1990) realizaron un estudio de control de la procesionaria del pino, *Thaumetopoea pityocampa* (Den. et Schiff) (Lepidoptera: Thaumetopoeidae), mediante el uso de extractos metanólicos de frutos de *M. azedarach*, donde se evidenció un aumento en el efecto antialimentario de los extractos en respuesta al incremento en las concentraciones utilizadas 1, 5 y 10%, mientras que Rossetti *et al.* (2008) encontraron valores de deterrencia cercanos al 100% al evaluar extractos etanólicos de fruto maduro de *M. azedarach* a similares concentraciones, 2, 5 y 10% sobre *Spodoptera eridania* Cramer (Lepidoptera: Noctuidae). Si bien no fue posible registrar valores de deterrencia para los extractos etanólicos, los extractos acuosos de frutos de *M. azedarach* probados en este estudio presentaron resultados similares en la actividad antialimentaria comparados con los otros insectos; además de coincidir en las concentraciones utilizadas (2 y 10%).

Valladares *et al.* (2003) encontraron que los extractos etanólicos de hojas senescentes al 10% presentaron una deterrencia total (100%) al ser aplicados sobre tres insectos coleópteros: *Diabrotica speciosa* (Germar) (Chrysomelidae), *Epilachna paenulata* Germar (Coccinellidae) y *Sitophilus oryzae* (L.) (Curculionidae). Por su parte, Nathan y Kim (2005) encontraron que los extractos de semillas de *M. azedarach* mostraron una alta actividad inhibitoria de la alimentación sobre la larva *Hyblaea puera* Cramer (Lepidoptera: Hyblaeidae), alcanzando un valor de deterrencia de 94% al aplicar el extracto a un 4% de concentración.

Dichos valores concuerdan con los obtenidos en este estudio, donde al aumentar las concentraciones del extracto del fruto se obtienen mayores valores de deterrencia.

Defagó *et al.* (2006) determinaron que los extractos etanólicos de frutos inmaduros de *M. azedarach* sobre *Xanthogaleruca luteola*, registraron deterrencias de 98 y 100% para concentraciones de 0,25 y de 1, 2 y 5%, respectivamente. Los valores anteriores son los más comparables a los obtenidos para extractos acuosos en este estudio, dado que se aplicaron sobre adultos del mismo insecto, en el mismo estado de madurez y consideraron concentraciones similares de los extractos, aunque en el presente estudio se usaron extractos crudos.

Shekari *et al.* (2008) investigaron los efectos de extractos metanólicos de *Artemisia annua* L. (Asteraceae) sobre larvas de tercer estadio y adultos de *X. luteola*. En dicho estudio se determinó que el porcentaje de deterrencia a las 24 h de evaluación para las larvas fue de 90% al aplicar extractos al 2,5 y de 100% al aplicar extractos al 5 o 10%. Mientras que para el insecto adulto registraron valores de 78, 86 y 100% al aplicar concentraciones de 2,5, 5 y 10%, respectivamente.

### 3.2. Evaluación de la eficacia insecticida de los extractos de frutos de *M. azedarach* sobre adultos de *X. luteola*

Los resultados de mortalidad de insectos adultos de *X. luteola* para cada solvente se presentan en los Cuadros 3 y 4.

Cuadro 3. Mortalidades promedio ( $\pm$  error estándar) de *X. luteola* por efecto de extractos etanólicos de frutos de *M. azedarach* para distintas concentraciones.

Testigo	Mortalidad (%)*					
	Extracto (% p/v)					
	1,0	1,8	2,4	3,0	3,6	4,2
$0 \pm 0 a$	$52,78 \pm 4,7 b$	$67,36 \pm 3,85 c$	$86,11 \pm 5,46 d$	$98,61 \pm 1,39 e$	$100,0 \pm 0 e$	$100,0 \pm 0 e$

\*Las letras distintas en forma horizontal indican diferencias significativas entre las concentraciones según la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Cuadro 4. Mortalidades promedio ( $\pm$  error estándar) de *X. luteola* por efecto de extractos acuosos de frutos de *M. azedarach* para distintas concentraciones.

Testigo	Mortalidad (%)*					
	Extracto (% p/v)					
	2,4	3,0	3,6	4,2	6,0	7,5
0 $\pm$ 0 a	13,89 $\pm$ 2,78 b	19,44 $\pm$ 6,12 b	25,69 $\pm$ 5,84 b	29,17 $\pm$ 7,77 b	35,42 $\pm$ 6,47 b	43,06 $\pm$ 6,78 b

\*Las letras distintas en forma horizontal indican diferencias significativas entre las concentraciones según la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

En los extractos etanólicos los más altos porcentajes de mortalidad evidenciados sobre adultos de *X. luteola* correspondieron a un 100% y se obtuvieron al aplicar las mayores concentraciones (3,6 y 4,2% p/v) (Cuadro 3). Se puede apreciar que todas las concentraciones fueron estadísticamente diferentes al testigo, existiendo una clara tendencia al aumento en la mortalidad en respuesta a una mayor concentración del extracto (Apéndice 1).

Con respecto a la eficacia de los extractos acuosos, el valor de mortalidad máximo correspondió a un 43%, obtenido al aplicar la máxima concentración (7,5%) (Cuadro 4). Si bien, a nivel estadístico es clara la diferencia entre el testigo y las concentraciones evaluadas, entre estas últimas no se registran diferencias significativas (Apéndice 1).

En ambos extractos evaluados se puede apreciar que los menores valores de mortalidad se alcanzaron empleando las concentraciones más bajas de extractos de frutos inmaduros de *M. azedarach* (Cuadros 3 y 4).

El análisis bifactorial entre solventes y concentraciones (Apéndice 2) indicó que existieron diferencias significativas entre los solventes utilizados, pero no reflejó diferencias a nivel de las concentraciones (Cuadro 5). De lo anterior se desprende que para una misma concentración del extracto, resulta más efectivo aquel donde se utilizó etanol como solvente en vez de agua destilada.

Cuadro 5. Mortalidades promedio ( $\pm$  error estándar) de *X. luteola* por efecto de extractos acuosos y etanólicos de frutos de *M. azedarach* para cuatro concentraciones.

Solvente	Mortalidad (%)*			
	Extracto (% p/v)			
	2,4	3,0	3,6	4,2
Etanol	86,11 $\pm$ 5,46 a	98,61 $\pm$ 1,39 a	100 $\pm$ 0 a	100 $\pm$ 0 a
Agua	13,89 $\pm$ 2,78 b	19,44 $\pm$ 6,12 b	25,69 $\pm$ 5,84b	29,17 $\pm$ 7,77b

\*Las letras distintas en forma vertical indican diferencias significativas entre los solventes ( $p \leq 0,05$ ).

Diversos autores han probado el efecto insecticida de extractos de frutos de *M. azedarach*. Para el caso de extractos acuosos, Castiglioni *et al.* (2002) encontraron que al aplicar extractos de frutos verdes al 5% sobre *Tetranychus urticae* Koch (Prostigmata: Tetranychidae) se obtienen valores de mortalidad de 63%, mientras que Berlitz *et al.* (2005)

al aplicar dichos extractos sobre el coleóptero *Oryzophagus oryzae* Costa Lima (Coleoptera: Curculionidae) a una concentración de 10% registraron una mortalidad del 92,8%. Jazzar y Hammad (2003) probaron el efecto insecticida de estos extractos sobre *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) encontrando que, bajo una concentración al 20%, se alcanzó una mortalidad levemente superior al 15%; sin embargo, al agregar un coadyuvante (Detergente Tween-20 al 0,5%), aumentó a cerca del 72%.

Por su parte, Huerta *et al.* (2008) registraron valores de mortalidad superiores al 70 % al aplicar extractos acuosos a una concentración de 1,07% p/v sobre *D. melanogaster*. De acuerdo a los valores mencionados se puede evidenciar el efecto insecticida de extractos acuosos de frutos de *M. azedarach* al ser aplicado sobre diferentes tipos de insectos, coincidiendo en parte con los resultados obtenidos en este estudio. No obstante, no se obtuvieron tasas de mortalidad tan altas como las registradas sobre el insecto mencionado.

En relación con los extractos etanólicos de frutos verdes de *M. azedarach*, Banchio *et al.* (2002) aplicaron concentraciones al 10 y 20% sobre *Liriomyza huidobrensis* Blanchard (Diptera: Agromyzidae), encontrando mortalidades de 55 y 65%, respectivamente. Otro estudio llevado a cabo por Defagó *et al.* (2006) evaluó la actividad insecticida de extractos compuestos (agua, acetona, etanol y metanol) de frutos verdes de *M. azedarach* sobre insectos adultos de *X. luteola*, obteniendo mortalidades promedio acumuladas, para las concentraciones 2, 5 y 10%, de 91, 100 y 100%, respectivamente. Al comparar las concentraciones mencionadas con las aplicadas en este estudio, se aprecia que existe coincidencia con los valores de mortalidad alcanzados, siendo más significativo este hecho para el trabajo de Defagó *et al.* (2006) debido a que se trata de una aplicación sobre el mismo insecto, aunque existiendo diferencias en el tipo de preparación del extracto, dado que se utilizó la extracción mediante soxhlet de la porción lipídica de los extractos, mientras que en el presente estudio se usaron los extractos crudos.

En otros estudios se ha evaluado la actividad insecticida de extractos de frutos pero utilizando otros solventes como el metanol, el hexano, el éter de petróleo y la acetona entre otros (Del Tío *et al.*, 1996; Riba *et al.*, 1996; Nunes *et al.*, 2004).

La supervivencia de los insectos alimentados con extractos etanólicos de frutos de *M. azedarach* con respecto al control fue menor desde el primer día, siendo más significativas estas diferencias entre el tercer y sexto día de evaluación (Figura 3).

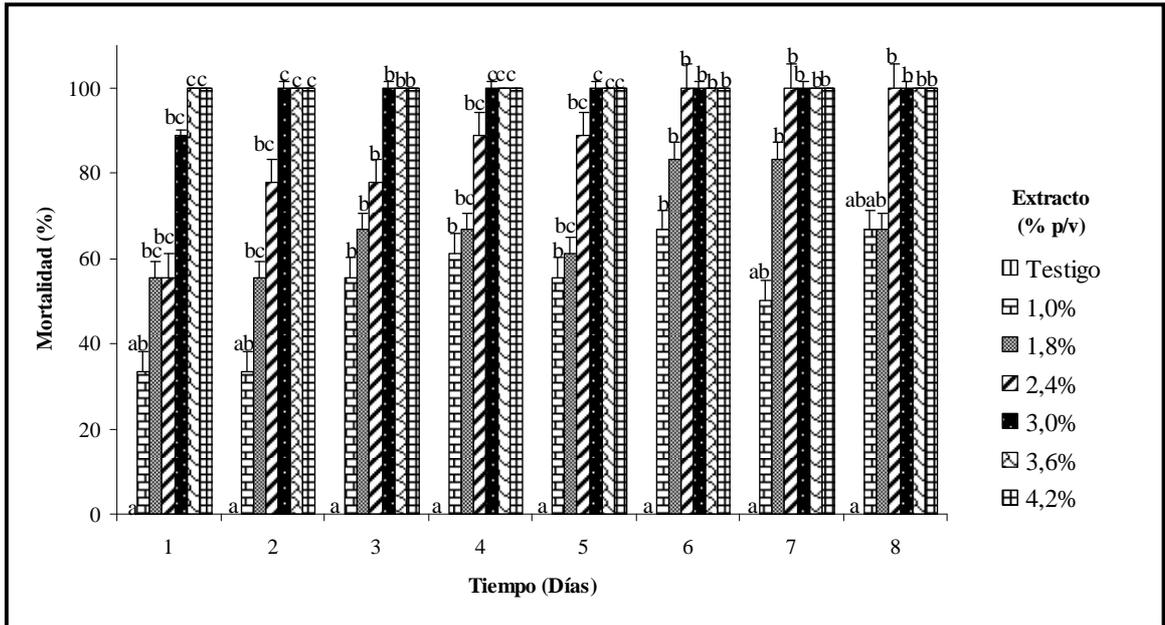


Figura 3. Porcentaje de mortalidad promedio acumulada de adultos de *X. luteola*, alimentados de hojas tratadas con extractos etanólicos de frutos de *M. azedarach* en distintas concentraciones.

Respecto a la supervivencia de los insectos alimentados con extractos acuosos de frutos de *M. azedarach*, ésta fue menor comparada con la del testigo desde el primer día, siendo estas diferencias estadísticamente significativas sólo entre el cuarto y el quinto día (Figura 4).

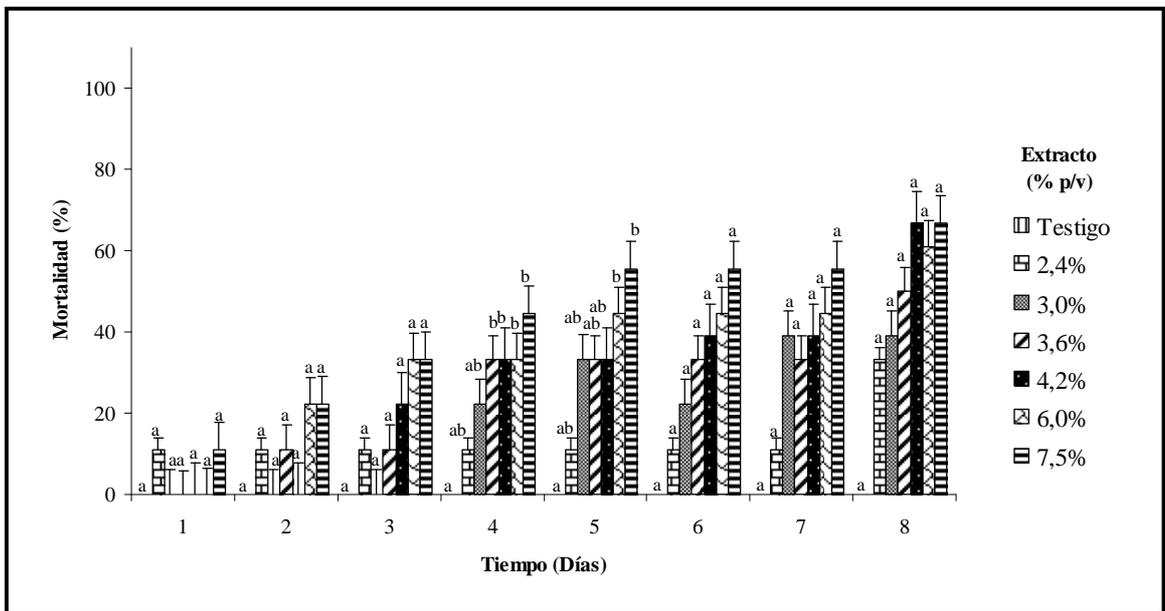


Figura 4. Porcentaje de mortalidad promedio acumulada de adultos de *X. luteola* alimentados de hojas tratadas con extractos acuosos de frutos de *M. azedarach* en distintas concentraciones.

Como se puede apreciar en las figuras 2 y 3 los extractos acuosos y etanólicos de frutos de *M. azedarach* presentan un efecto similar sobre insectos adultos de *X. luteola* donde el porcentaje de mortalidad fue mayor al aplicar las mayores concentraciones.

Para el caso del solvente etanol las mayores diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad entre las concentraciones se registraron el tercer día, mientras que para el solvente agua destilada dichas diferencias ocurrieron el quinto día. Los valores del ajuste probit para el cálculo de la concentración letal para el 50% de los individuos del ensayo se presentan en el cuadro 6.

Cuadro 6. Valores de concentración letal según solvente y día de evaluación.

<b>Solvente</b>	<b>Día evaluado</b>	<b>n</b>	<b>Pendiente (media ± E.E)</b>	<b>CL<sub>10</sub> (%)</b>	<b>CL<sub>50</sub> (%)</b>	<b>CL<sub>90</sub> (%)</b>	<b>X<sup>2</sup></b>
<b>Etanol</b>	Día 3	9	34,885 ± 8,12	0,3	0,94	2,97	2,07
	Día 8	9	9,37 ± 9,37	0,0003	0,0245	1,745	0,15
<b>Agua destilada</b>	Día 5	9	33,3 ± 6,47	1,97	6,55	21,74	2,79
	Día 8	9	31,9 ± 15,8	0,87	3,12	11,13	1,38

El test de Chi-cuadrado (X<sup>2</sup>) fue utilizado para medir el ajuste de los datos al modelo Probit. Los valores son menores que X<sup>2</sup> (df= 5, P<0,05)=11,05.

La CL<sub>50</sub> fue menor en los extractos etanólicos que en los acuosos, lo que indicó que bajo similares condiciones del ensayo para lograr el 50% de mortalidad de insectos adultos de *X. luteola* sería más eficiente usar extractos etanólicos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Concentraciones letales del 50% y ajuste lineal de los extractos etanólicos y acuosos de frutos de *M. azedarach*.

<b>Tipo de extracto</b>	<b>CL<sub>50</sub> (%)</b>	<b>Ajuste lineal</b>	<b>Coefficiente determinación (r<sup>2</sup>)</b>
Etanólico	0,94	Y=34,885x-269,28	0,91
Acuoso	6,55	Y=33,349x-319,84	0,87

De acuerdo al ajuste Probit, el solvente etanol registra mayores mortalidades que el agua destilada a menores concentraciones de los extractos (Figura 5).

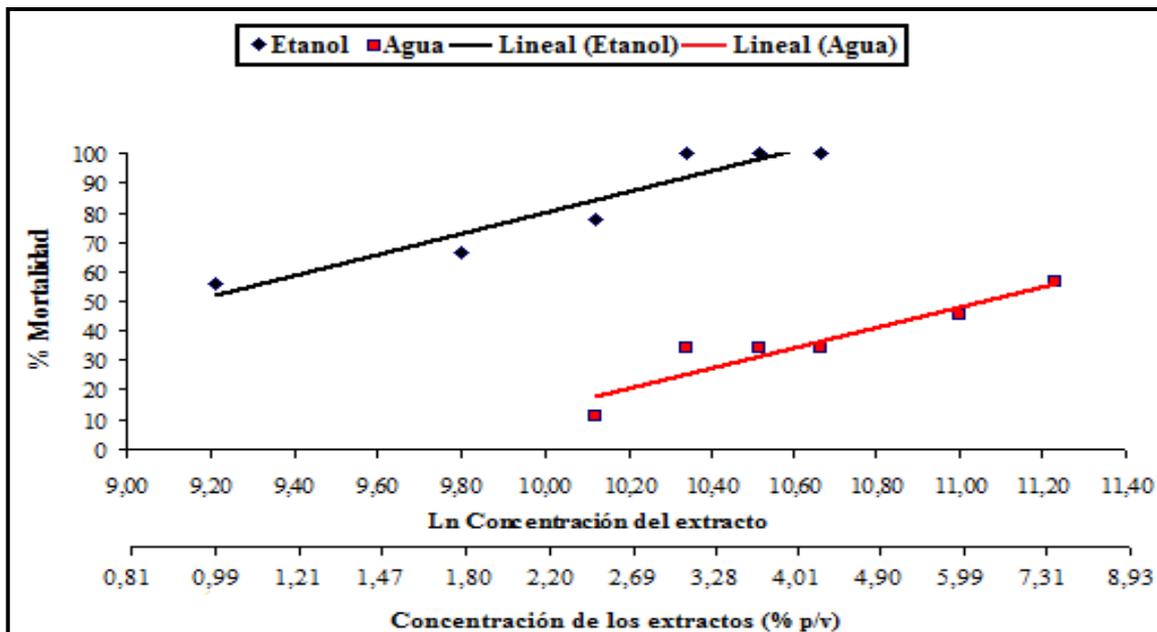


Figura 5. Línea dosis Probit de extractos etanólicos y acuosos de frutos verdes de *M. azedarach* sobre *X. luteola* en bioensayos de laboratorio.

Los resultados de  $CL_{50}$  anteriores difieren de los obtenidos por Lizana (2005) para extractos de frutos verdes de *M. azedarach* donde se calculó una concentración de 2.071 y 4.382 ppm para los solventes etanol y agua, respectivamente. No obstante, el método de aplicación llevado a cabo por dicho autor fue distinto al utilizado en este estudio, ya que el extracto fue mezclado directamente con el sustrato de cría de larvas de *D. melanogaster*. No obstante, la efectividad de los extractos etanólicos fue mayor que en los acuosos en ambos estudios.

Otros autores como Akhtar *et al.* (2008) hallaron valores similares de  $CL_{50}$  para extractos metanólicos de *M. azedarach* aplicados sobre larvas de *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) y *Pseudaletia unipuncta* Haworth (Lepidoptera: Noctuidae), dos especies de lepidópteros nocturnos. Cuando el extracto fue aplicado sobre un disco foliar (ensayo de alimentación), los valores de  $CL_{50}$  para *T. ni* y *P. unipuncta* fueron aproximadamente 6 y 3,06% p/v. Mientras que cuando el extracto se asperjó directamente sobre el cuerpo de las larvas, *T. ni* presentó un valor de 12,6% p/v al séptimo día.

Para el caso de estudios realizados sobre *X. luteola*, Shekari *et al* (2008) encontraron que a las 48 h de evaluación, los extractos metanólicos de *Artemisia annua* (L.) (Asterales: Compositae) presentan valores de  $CL_{50}$  de 43,77 y 15,43% al ser aplicados sobre larvas de tercer estadio y adultos, respectivamente. Este último valor es cercano al encontrado en los extractos etanólicos de este estudio.

### 3.3 Determinación fenotípica de sexo y razón sexual de adultos de *X. luteola*

Luego de una acuciosa observación de los individuos adultos de *X. luteola* se pudo determinar que, pese a no existir diferencias morfológicas evidentes entre ambos sexos, es decir, no existir un marcado dimorfismo sexual, es posible determinar pequeñas diferencias a nivel abdominal, precisamente en el 5<sup>to</sup> esclerito ventral (Figura 6).

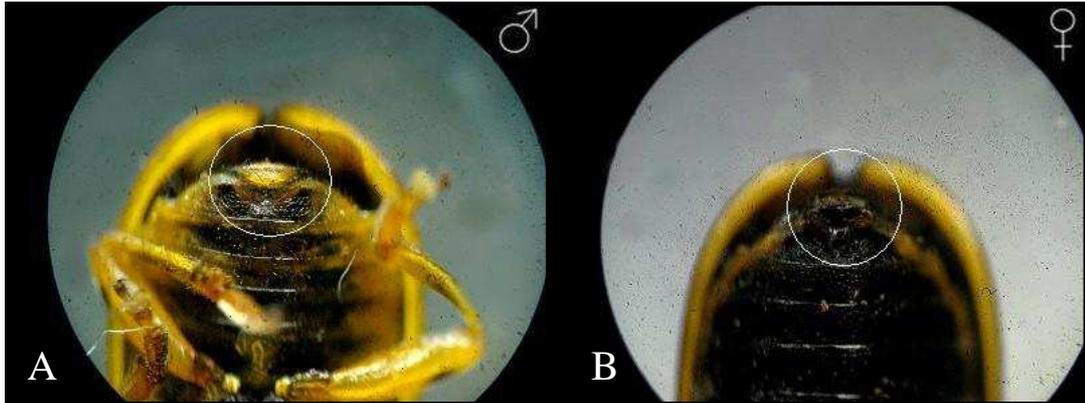


Figura 6. Vista ventral del abdomen del adulto de *X. luteola*. A. Macho; B. Hembra.

Los individuos machos (Figura 6.A) presentaron una forma característica en los bordes del 5<sup>to</sup> esternito (terminación semicircular), rasgo que se vio potenciado por la presencia de un esclerito interno de coloración amarillo (zona de color claro en la figura). En el caso de las hembras (Figura 6.B), los bordes de dicho esternito fueron más abruptos o rectos, dejando en evidencia un notable surco que se completa superiormente por un esclerito interno de coloración generalmente oscura, con lo cual fue posible diferenciarlos de los machos.

De acuerdo a autores como Jackson y Jackson (2008) un rasgo característico de la anatomía diferencial entre el macho y la hembra de *X. luteola* es la terminación subcónica de su último tergito, lo que otorga una forma más alargada con respecto al macho. Sin embargo, se pudo evidenciar que en algunas hembras este rasgo no siempre fue tan claro y por el contrario, su forma era más bien redondeada, lo que dificulta la determinación del sexo del insecto, sólo utilizando esa descripción.

Una vez separados por sexos según las características fenotípicas mencionadas, una muestra (n=25) de los insectos se sometió a la determinación de su genitalia a través de la técnica del KOH caliente al 10% para validar la clave de reconocimiento sugerida (Figura 7).

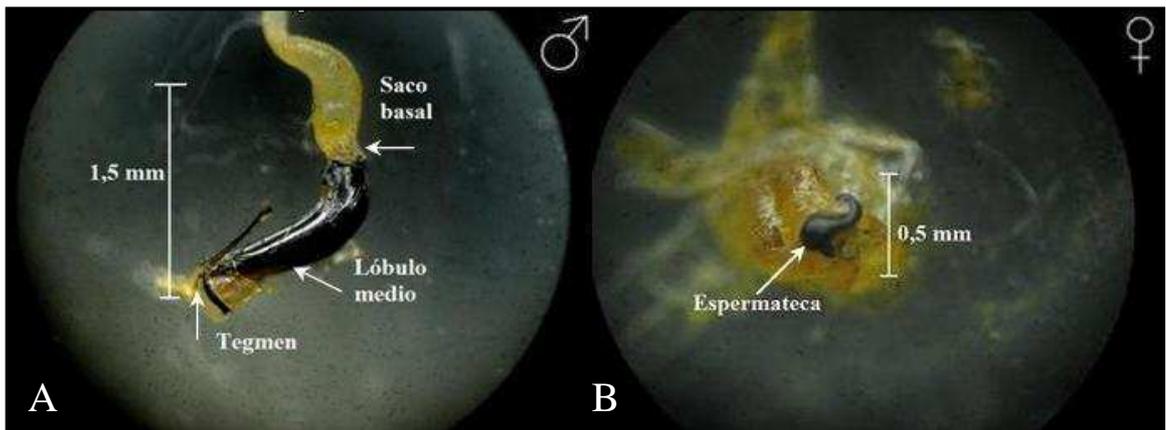


Figura 7. Estructuras reproductivas de adultos de *X. luteola*. A. Macho (Detalle del *Aedeagus*); B. Hembra (Espermateca).

Mediante la visualización con una lupa estereoscópica fue posible determinar la estructura reproductiva del macho (*Aedeagus*), pudiendo diferenciarse algunas de sus partes constituyentes. Por el contrario, no fue posible evidenciar toda la estructura reproductiva de la hembra debido a la destrucción de sus partes más blandas. Sin embargo, en la hembra fue posible identificar la espermateca. Con los resultados anteriores se corrobora entonces la efectividad de las claves fenotípicas propuestas para la determinación de sexos.

Con respecto a la razón sexual, los resultados sobre 250 insectos adultos de *X. luteola* colectados, indicaron que el 52% correspondieron a hembras (130 individuos), es decir, aproximadamente la mitad, obteniéndose una razón sexual de 1:1. La cifra anterior no coincide con lo señalado por Jackson y Jackson (2008), quienes encontraron que sobre una muestra de 119 ejemplares de *X. luteola*, se encontraron 98 machos y 21 hembras, es decir, una proporción entre ambos sexos de 5:1.

#### 4. CONCLUSIONES

- Los extractos etanólicos del fruto inmaduro de *M. azedarach* evaluados mediante bioensayos de laboratorio fueron eficaces como bioinsecticidas alcanzando un 100% de mortalidad al aplicar concentraciones de 3,6 y 4,2% mientras que en los extractos acuosos se registró una mortalidad máxima de 43% al ser aplicados a 7,5%.
- De acuerdo al análisis estadístico se puede concluir que la mortalidad de *X. luteola* por efecto de la aplicación de extractos a base de etanol fue superior a la obtenida por los extractos elaborados con agua destilada. Sin embargo, dicho análisis no arrojó diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas.
- Con respecto a la actividad antialimentaria de los frutos inmaduros de *M. azedarach*, se evidencia una alta deterrencia para los extractos acuosos en todas las concentraciones evaluadas, llegando a ser de 100% a partir de los 3,6% hasta la mayor dosis evaluada (7,5%). Sin embargo, en los extractos etanólicos no pudo comprobarse dicho efecto dado que los adultos de *X. luteola* perecieron, encontrándose por ende un efecto de toxicidad de dichos extractos.
- La menor concentración letal para matar al 50% de los individuos de *X. luteola* (CL<sub>50</sub>) se obtuvo con los extractos etanólicos (0,94%).
- Los caracteres fenotípicos propuestos para la diferenciación sexual de adultos de *X. luteola* fueron efectivos, siendo corroborados mediante análisis de genitalia.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- ABBOTT, W. A. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- ABOU-FAKHR, H.; ZOURNAJIAN, H. and TALHOUK, S. 2001. Efficacy of extracts of *Melia azedarach* L. Callus, leaves and fruits against adults of the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal Applied Entomology* 125: 483-488.
- AHMED, M.; AHMED, M.; THAYYIL, H.; ZAMEERUDDIN, K. and IBRAHIM, M. 2008. Antioxidative activity of *Melia azedarach* Linn leaf extract. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics* 7 (1): 31-34.
- AKHTAR, Y.; YEOUNG, Y. and ISMAN, M. 2008. Comparative bioactivity of selected extracts from Meliaceae and some commercial botanical insecticides against two noctuid caterpillars, *Trichoplusia ni* and *Pseudaletia unipuncta*. *Phytochem. Rev.* 7: 77-88.
- ALCHÉ, L.; ASSAD, G.; MEO, M.; COTO, C. and MAIER, M. 2003. An antiviral meliicarpin from leaves of *Melia azedarach* L. *Z. Naturforsch* 58 c: 215-219.
- ANALYSTSOFT. 2008. Programa StatPlus versión 5.4.0. URL: <http://www.analystsoft.com/en/products/statplus/download.phtml> [Visitada: 20 mayo 2009].
- ASKEVOLD, I. 1991. On some poorly known, missidentified and mislabelled Chilean Chrysomelidae (Coleoptera). *Rev. Chilena Ent.* 19: 11-15.
- BANCHIO, E.; VALLADARES, G.; DEFAGÓ, M.; PALACIOS, S. and CARPINELLA, C. 2002. Effects of *Melia azedarach* (Meliaceae) fruit extracts on the leafminer *Liriomyza huidobrensis* (Diptera, Agromyzidae): Assessment in laboratory and field experiments. *Ann. Appl. Biol* 143: 187-193.
- BERLITZ, D.; SEBBEN, A.; VARGAS, J. y FIUZA, L. 2005. Efeito de proteínas bacterianas e vegetais no controle de *Oryzophagus oryzae* (Col., Curculionidae). *En: IV Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado/ XXVI Reunião de cultura do Arroz Irrigado: 9 al 12 de Agosto de 2005. Santa María (RS), Brasil. pp. 57-59.*
- BREUER, M. and DEVKOTA, B. 1990. Control of *Thaumetopoea pityocampa* (Den. et Schiff) by extracts of *Melia azedarach* L. (Meliaceae). *Journal of Applied Entomology* 110 (2): 128-135.
- BURKS, K. 1997. *Melia azedarach*. Fact sheet prepared by the Bureau of Aquatic Plant Management, Department of Environmental Protection, State of Florida, Tallahassee, FL. 74p. URL: <http://www.imapinvasives.org/GIST/ESA/esapages/documnts/meliaze.pdf> [Visitada: 20 mayo 2009].

- CASTIGLIONI, E.; VENDRAMIN, J. y TAMAI, M. 2002. Evaluación del efecto tóxico de extractos acuosos y derivados de meliáceas sobre *Tetranychus urticae* (Koch) (Acari: Tetranychidae). *Agrociencia* 6 (2): 75-82.
- CARRERA, Z. y OSUNA, E. 1996. Morfología de la genitalia externa masculina de la Tribu Harpactorini (Reduviidae: Harpactorinae). Parte Ia. : Morfología general del falo. *Bol. Entomol. Venez. N.S.* 11(1): 1-9.
- CARPINELLA, C.; DEFAGÓ, T.; VALLADARES, G. and PALACIOS, M. 2003a. Antifeedant and insecticide properties of a limonoid from *Melia azedarach* (Meliaceae) with potencial use for pest management. *Journal Agricultural Food Chemistry* 51: 369-374 .
- CARPINELLA, C.; GIORDA, L.; FERRAYOLI, C. and PALACIOS, S. 2003b. Antifungal effects of different organic extracts from *Melia azedarach* L. on phytopathogenic fungi and their isolated active components. *J. Agric. Food Chem.* 51 (9): 2506-2511.
- CARPINELLA, C.; FERRAYOLI, C. and PALACIOS, M. 2005. Antifungal synergistic effect of scopoletin, a hydroxycoumarin isolated from *Melia azedarach* L. fruits. *Journal Agricultural Food Chemistry* 53: 2922 -2927.
- CHARLESTON, D. 2004. Integrating biological control and botanical pesticides for management of *Plutella xylostella*. Tesis doctoral. Universidad de Wageningen. Holanda. 184 p.
- CLAIR, D.; DAHLSTEN, D. and HART, E. 1987. Rearing *Tetrastichus gallerucae* (Hymenoptera: Eulophidae) for biological control of the ELM leaf beetle *Xanthogaleruca luteola*. *Biological Control* 32 (5): 457-461.
- CHIFFELLE, I.; HUERTA, A. y LIZANA, D. 2009. Physical and chemicals characterization of *Melia azedarach* L. fruit and leaf for use as botanical insecticide. *Chilean Journal of Agricultural Research* 69 (1): 38-45.
- COSTELLO, L.; SCOTT, S.; PETERSON, J. and ADAMS, C. 1990. Trunk banding to control elm leaf beetle. *Journal of Arboriculture* 16 (9): 225-230.
- DAHLSTEN, D. and LYSTRUP, J. 1999. Implementation of integrated pest management for the elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* (Chrysomelidae: Coleoptera), in a large urban area (Sacramento). Pest Management Grant Final Report. California Department of Pesticide Regulation. 14 p.
- DAHLSTEN, D.; ROWNEY, D. and TAIT, S. 1994. Development of integrated pest management programs in urban forests: the elm leaf beetle, (*Xanthogaleruca luteola* [Muller]) in California, U.S.A. *Forest Ecology and Management* 65: 31-44.

- DE LIÑÁN, C. 1998. Entomología Agroforestal. Ediciones Agrotécnicas S.L., Madrid. 1039 p.
- DE NARDO, E.; COSTA, A. and LOURENÇÃO, L. 1997. *Melia azedarach* extract as an antifeedant to *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). Florida Entomologist 80 (1): 92-94.
- DEFAGÓ, M.; VALLADARES, G.; BANCHIO, E.; CARPINELLA, C. and PALACIOS, S. 2006. Insecticide and antifeedant activity of different plants parts of *Melia azedarach* on *Xanthogaleruca luteola*. Fitoterapia 77: 500-505.
- DMYTRASZ, P. 1998. IPM for elm leaf beetle in Toronto. The IPM Practitioner 20 (10): 1-7.
- DEL TÍO, R.; CANO, E.; MARTÍN, P.; RAMÍREZ, J. y OCETE, M. 1996. Ensayos sobre la actividad antialimentaria de extractos de *Melia azedarach* L. y *Mentha suaveolens* Ehrh. frente a los noctuidos plaga *Spodoptera littoralis* (Boisd.) y *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Bol. San. Veg. Plagas 22: 133-140.
- DREISTADT, S. and DAHLSTEN, D. 1990. Insecticide bark bands and control of the elm leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) in northern California. Journal of Economic Entomology 83 (4): 1495-1498.
- DREISTADT, S.; CLARK, J. and FLINT, M. 2004. Pest of lanscape trees and shrubs: an integrated pest management guide. 2<sup>nd</sup> edn. Oakland, CA. Univ. Calif. Agric. Nat. Res.
- FU, L.; XIN, Y. and WHITTEMORE, A. (2003). Ulmacea. Flora of China 5: 1-10.
- GENDE, L.; PRINCIPAL, J.; MAGGI, M.; PALACIOS, S.; FRITZ, R. y EGUARAS, M. 2008. Extracto de *Melia azedarach* y aceites esenciales de *Cinnamomun zeylanicum*, *Mentha piperita* y *Lavandula officinalis* como control de *Paenibacillus larvae*. Zootecnia Trop. 26 (2): 151-156.
- GUSBERTI, A.; MARTÍN, O. y TELLO, M. 2000. El Paraíso: ¿Para insectos? Feria Nacional de Ciencia y Tecnología 2000. Escuela Industrial Domingo Faustino Sarmiento, San Juan, Argentina. 39 p.
- GRUPO INFOSTAT. 2009. InfoStat versión 2009. Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- HONG, T. and ELLIS, R. 1998. Contrasting seed storage behaviour among different species of Meliaceae. Seed Science and Technology 26(1): 77-95.
- HUERTA, A.; CHIFFELLE, I. y LIZANA, D. 2008. Actividad insecticida de extractos del fruto de *Melia azedarach* en distintos estados de madurez sobre *Drosophila melanogaster*. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas 34 (3): 425-432.

- JACKSON, D. y JACKSON, T. 2008. Establecimiento del escarabajo de la hoja del olmo, *Xanthogaleruca luteola* (Müller)(Coleoptera: Chrysomelidae), en Chile. Acta Entomológica Chilena 32 (1-2): 27-34.
- JAZZAR, C. and HAMMAD, E. 2003. The efficacy of enhance aqueous extracts of *Melia azedarach* leaves and fruits integrated with the *Camptotylus reuteri* releases against the sweetpotato whitefly nymphs. Bulletin of Insectology 56 (2): 269-275.
- LANGELAND, A. y BURKS, C. 1998. Identification and biology of non-native plants in Florida's natural areas. University of Florida, Gainesville, FL. 165 p.
- LAWSON, A. and DAHLSTEIN, D. 2003. Implementation of a citywide monitoring program to base treatment decisions on elm leaf beetle abundance. Journal Arboriculture 29: 34-41.
- LEFOE, G. 2002. First release of the elm leaf beetle parasitic fly. NRE Frankston. Keith tumbull Research Institute. Under Control, Pest Plant & Animal Management News.
- LIZANA, D. 2005. Elaboración y evaluación de extractos del fruto de *Melia azedarach* L. como insecticida natural. Memoria Ingeniería Forestal. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales. 57 p.
- LOEWE, V. y GONZÁLEZ, M. 2005. El Olmo: Una especie todo terreno. Revista Chile Forestal 317: 46-48.
- MAISTRELLO, L.; LÓPEZ, M.; SORIA, F. and OCETE, R. 2005. Growth inhibitory of *Daphne gnidium* L. (Thymelaeaceae) extracts on the elm leaf beetle (Col., Chrysomelidae). Journal of Applied Entomology 129 (8): 418-424.
- NATHAN, S. and KIM, S. 2005. Effects of *Melia azedarach* L. extract on the teak defoliator *Hyblaea puera* Cramer (Lepidoptera: Hyblaeidae). Crop Protection 25 (3): 287-291.
- NUNES, E.; PIRES, R. y FIUZA, L. 2004. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. Acta Biológica Leopoldensia 26 (2): 173-185.
- PADRÓN, B.; ORANDAY, A.; RIVAS, C. y VERDE, M. 2003. Identificación de compuestos de *Melia azedarach*, *Syzygium aromaticum* y *Cinnamomun zeylanicum* con efecto inhibitorio sobre bacterias y hongos. Ciencia UANL 6 (3): 333-338.
- PARRA, N. 2009. Plaga del Olmo Vaquita del Olmo (*Ulmus minor*, Mill). Boletín CONAF Región Metropolitana de Santiago. Santiago, Chile. 1 p.
- PUTTLER, B. and BAILEY, W. 2003. Establishment of *Oomyzus gallerucae* (Hymenoptera: Eulophidae), an egg parasite of the elm leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae), in Missouri and adjacent states. Biological Control 27 (1): 20-25.

- RIBA, M.; TORRA, E. y MARTÍ, J. 1996. Bioactividad de extractos de *Melia azedarach* L. sobre el taladro del maíz *Sesamia nonagrioides* Lef. Bol. San. Veg. Plagas 22: 261-276.
- ROBERTSON, J.; SMITH, K; SAVIN, N and LAVIGNE, R. 1984. Effects of dose selection and sample size on the precision of lethal dose estimates in dose-mortality regression. J. Econ. Entomol. 77 (4): 833-837.
- RODRÍGUEZ, C. 1999. El paraíso *Melia azedarach* (Meliaceae) como alternativa de manejo de plagas. Avance de investigación, Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Texcoco, México. 3 p.
- ROMANYK, M. y CADAHIA, D. 2002. Plagas de insectos en las masas forestales. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 336 p.
- ROSSETTI, M.; DEFAGÓ, M.; CARPINELLA, M.; PALACIOS, S. y VALLADARES, G. 2008. Actividad biológica de extractos de *Melia azedarach* sobre larvas de *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae). Rev. Soc. Entomol. Argent. 67 (1-2): 115-125.
- SAG (SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO). 2005. Nueva Distribución de Plagas, *Xanthogalerucella luteola* (Hill.) (Coleoptera, Chrysomelidae). Informativo Fitosanitario Forestal (Servicio Agrícola y Ganadero), N° 2.
- SHEKARI, M.; SENDI, J.; ETEBARI, K.; ZIBAEI, A. and SHAPARVAR, A. 2008. Effects of *Artemisia annua* L. (Asteracea) on nutritional physiology and enzyme activities of elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* Mull. (Coleoptera: Chrysomelidae). Pesticide Biochemistry and Physiology 91: 66-74.
- SILVA, G., LAGUNAS, A. y RODRIGUEZ, J. 2003a. Control de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: curculionidae) con polvos vegetales solos y en mezcla con carbonato de calcio en maíz almacenado. En Revista Ciencia e Investigación Agraria 30 (3): 153-160.
- SILVA, G., J. RODRÍGUEZ. y D. PIZARRO. 2003b. Evaluación de insecticidas en laboratorio. En: G. Silva y R. Hepp (Eds). Bases para el manejo racional de insecticidas. Universidad de Concepción. Facultad de Agronomía. Chillán, Chile. 157-174 p.
- SCHMUTTERER, H. 2002. The Neem Tree. Nem Found, Mumbai, 892p.
- SZEWCZUK, V.; MONGELLI, E. and POMILIO, A. 2003. Antiparasitic activity of *Melia azedarach* growing in Argentina. Molecular Medicinal Chemistry 1: 54-57.
- THURSTON, G. 1998. Biological control of elm leaf beetle. Journal of Arboriculture 24 (3): 154-159.
- UNIVERSITY OF SHEFFIELD. 2003. Programa *Leaf area measurement* versión 1.3

URL: <http://www.shef.ac.uk/~nuocpe/ucpe/leafarea.html> [Visitada: 20 octubre 2008].

- VALDÉS, R. 2000. Evaluación del establecimiento en una plantación con *Melia azedarach* en el secano costero de la VIII Región. Tesis Ing. Forestal, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Talca, Talca, Chile. 63 p.
- VALLADARES, G.; DEFAGÓ, T.; PALACIOS, S. and CARPINELLA, C. 1997. Laboratory evaluation of *Melia azedarach* (Meliaceae) extracts against the elm leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology* 90: 747-750.
- VALLADARES, G.; GARBIN, L.; DEFAGÓ, M. T.; CARPINELLA, C. y PALACIOS, S. 2003. Actividad antialimentaria e insecticida de un extracto de hojas senescentes de *Melia azedarach* (Meliaceae). *Soc. Entomol. Argent.* 62 (1-2): 53-61.
- WANDSCHEER, C.; DUQUE, J.; Da SILVA, M.; FUKUYAMA, Y.; WOHLKE, J.; ADELMANN, J. and FONTANA, J. 2004. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. *Toxicon.* 44: 829-835.
- WEBER, R. and HOLMAN, M. 1976. *Coleomegilla maculata* (DeGeer), (Coleoptera: Coccinellidae), a new coleopteran predator of the elm leaf beetle, *Pyrrhalta luteola* (Mueller), (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 49 (2): 160.
- WU, Z.; JAMIESON, S. and KILEBASO, J. 1991. Urban forest pest management. *Journal Arboriculture* 17: 150-158.

## APÉNDICE 1. Análisis Estadístico 1

Modelo de efectos fijos entre el solvente agua y su correspondiente testigo

Día	Testigo	Extractos (% p/v)					
		2,4	3,0	3,6	4,2	6,0	7,5
	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
1	0	19,471	0	0	0	0	19,471
2	0	19,471	0	19,471	0	28,126	28,126
3	0	19,471	0	19,471	28,126	35,264	35,264
4	0	19,471	28,126	35,264	35,264	35,264	41,810
5	0	19,471	35,264	35,264	35,264	41,810	48,190
6	0	19,471	28,126	35,264	38,580	41,810	48,190
7	0	19,471	38,580	35,264	38,580	41,810	48,190
8	0	35,264	38,580	45,000	54,736	51,420	54,736

FV	gl	SC	CM	RAZÓN F	Razón f tabla
Tratamiento	6	8.052,01	1.342,0	7,16	2,29
Error	49	9.183,78	187,42		
total	55	17.235,79		F0>Fc	

gl: grados de libertad

SC: suma de cuadrados

CM: cuadrados medios

Test de Tukey:

t0	A
t1	B
t2	B
t3	B
t4	B
t5	B
t6	B

Tratamientos con letras iguales no acusan diferencia significativa al nivel 0,05.

Modelo de efectos fijos entre el solvente etanol y su correspondiente testigo

Día	Testigo	Extractos (% p/v)					
		1,0	1,8	2,4	3,0	3,6	4,2
	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
1	0	35,264	48,190	48,190	70,529	90,000	90,000
2	0	35,264	48,190	61,874	90,000	90,000	90,000
3	0	48,190	54,736	61,874	90,000	90,000	90,000
4	0	51,420	54,736	70,529	90,000	90,000	90,000
5	0	48,190	51,420	70,529	90,000	90,000	90,000
6	0	54,736	65,905	90,000	90,000	90,000	90,000
7	0	45,000	65,905	90,000	90,000	90,000	90,000
8	0	54,736	54,736	90,000	90,000	90,000	90,000

FV	gl	SC	CM	RAZÓN F	Razón f tabla
Tratamiento	6	51.625,83	8.604,31	148,67	2,29
Error	49	2.835,96	57,88		
total	55	54.461,79		F0>Fc	

gl: grados de libertad

SC: suma de cuadrados

CM: cuadrados medios

Test de Tukey:

T0	A
T1	B
T2	C
T3	D
T4	E
T5	E
T6	E

Tratamientos con letras iguales no acusan diferencia significativa al nivel 0,05.

## APÉNDICE 2. Análisis Estadístico 2

Análisis estadístico bifactorial entre solventes y concentraciones

Solvente		Extractos (% p/v)			
		2,4	3,0	3,6	4,2
Etanol (a)	R1	0	27,155	22,448	42,608
	R2	11,783	24,097	35,262	37,761
	R3	37,761	27,155	32,690	11,783
Agua (b)	R1	54,736	90,000	90,000	90,000
	R2	73,221	90,000	90,000	90,000
	R3	90,000	78,222	90,000	90,000

FV	gl	SC	CM	RAZÓN F	Razón f tabla
Tratamiento	-	21.746,48			
Solvente	1	20.749,05	20.749,05	157,42	4,494
Concentración	3	982,80	327,60	2,49	3,239
Interacción	3	14,63	4,88	0,03	3,239
Error	16	2.108,96	131,80		
Total	23	23.855,44			

gl: grados de libertad

SC: suma de cuadrados

CM: cuadrados medios

Test de Tukey:

a	A
b	B

Tratamientos con letras iguales no acusan diferencia significativa al nivel 0,05.