

"Evaluación de la eficacia de extractos naturales de *Tagetes* spp. como bioinsecticidas sobre adultos de *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae)."

"Evaluation of insecticidal effect of natural extracts from *Tagetes* spp., on adults of *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae)."

Rodríguez, S.¹, A. Pelicano¹, G. Heck¹ y S. Delfino²

RESUMEN

Se evaluó la toxicidad de soluciones acuosas y etílicas de distintas partes anatómicas (raíces, tallos-hojas y flores) de *Tagetes minuta* y variedades comerciales de *T. patula* (bonaerenses y salteño), en dos concentraciones, sobre adultos de *Sitophilus oryzae* a lo largo del tiempo.

Las soluciones etílicas de hojas y tallos de *T. patula* (bonaerense y salteño) exhibieron el mayor y más rápido poder insecticida, junto con la de raíces al 20%. Ninguno de las soluciones acuosas fue efectiva, como así tampoco las soluciones etílicas foliares de *T. minuta* y las florales de *T. patula* bonaerense. Solamente se registró un aumento de la toxicidad al incrementarse las dosis en las soluciones de raíces.

ABSTRACT

The toxicity of watery and ethylic solutions of different anatomical parts (roots, stems-leaves and flowers) of *Tagetes minuta* and commercial varieties of *T. patula* (from Buenos Aires and Salta provinces) was evaluated. Two concentrations were tested and was applied on adults of *Sitophilus oryzae*.

The ethylic solutions from leaves and stems of *T. patula* from Buenos Aires and Salta and the solutions from roots at 2% had the highest and quicker insecticide power. The watery solutions, the leaves ethylic solutions of *T. minuta* and the flowers solutions of *T. patula* from Buenos Aires weren't effective. When the roots solutions doses increased, an increment of the toxicity was registered.

¹ Ings. Agrs. Cátedra de Zoología. Facultad de Agronomía-UBA. Av. San Martín 4453 (1417). Argentina.

² Licenciada. Cátedra de Estadística. Facultad de Agronomía-UBA.

INTRODUCCIÓN

El 80-90% de las pérdidas que sufren los granos almacenados se debe a la actividad de insectos (Picar *et al.*, 1987) (Pantenius, 1988). Entre ellos el gorgojo del arroz (*Sitophilus oryzae* L.) está considerado como una de las plagas más importantes y destructivas (Metcalf, Flint, 1976) (Pantenius, *op.cit.*) junto a *S. granarius* y *Tribolium* spp., hallándose presente en todo el mundo (Jalil Maluf, Lamédica, 1996).

Tanto las larvas como los adultos atacan numerosos granos, entre ellos: maíz, trigo, sorgo, arroz, avena, cebada y triticale. *Triticale* se comporta como resistente a su ataque que el trigo, y éste más que el arroz (Levchenko, Imshenetskii, 1991).

Los daños que produce son derivados del consumo y contaminación de los granos. Según Abukar *et al.*, 1986, se alimenta del endosperma, provocando pérdidas de peso de entre 24 y 31%. Su actividad incrementa la temperatura de los mismos (Metcalf, Flint, *op. cit.*), lo que sumado al frecuente incremento del contenido de humedad de los mismos puede desencadenar la germinación. Asimismo, el poder germinativo disminuye (Sinha, Sinha, 1992) al igual que la energía metabolizable (Lopes *et al.*, 1990). Además las heces, mudas de larvas, pupas, e insectos enteros o fragmentos de éstos contaminan el grano (Jalil Maluf, Lamédica, *op. cit.*).

Simultáneamente, incrementan la incidencia de *Aspergillus flavus* y el nivel de aflatoxina sintetizada por este último (Sinha, Sinha, *op. cit.*), a la vez que facilitan el ataque posterior de otros insectos de infestación secundaria, como la carcoma achatada (*Cryptolestes ferrugineus*), carcoma grande (*Tenebroides mauritanicus*), tribolios (*Tribolium castaneum* y *T. confusum*) y polillas (*Ephestia kuehniella* y *E. ellutella*), entre otros (Jalil Maluf, Lamédica, *op. cit.*).

Tagetes minuta es una maleza que crece tanto en cultivos de girasol, maíz, papa o tabaco, como en montes frutales y viñedos. En Argentina se la puede encontrar en todas las provincias al norte del río Colorado, excepto Tucumán (Marzocca, 1997). Además constituye una fuente de compuestos insecticidas:

- En sus hojas se identificaron varios terpenos, tóxicos para insectos como Zabrotas subfasciatus, siendo los más abundantes dihidrotagetona, (E) y (Z)-tagetenona y (Z)-tagetona, todos estos, hidrosolubles (Chalchat *et al.*, 1995) (Baser, Malyer, 1996) (Chalchat *et al.*, 1997). Además, se identificaron los siguientes flavonoides: quercetagetina, quercetina, quercetagetin 3-arabinogalactósido, quercetin 5-glucósido, patuletin 7-glucósido y patuletin (Abdala, Seeligmann, 1995).

- En sus flores, los terpenos que predominan son (Z)-tagetona y (Z)-b-ocimeno (Chalchat *et al.*, 1997). Se hallan presentes varios tiofenos, tóxicos para larvas de mosquitos, destacándose: 5-(but-3-ene-1-inil)-2,2'-bitiofeno; 5-(but-3-N-1-inil)-5'-metil-2,2'-bitiofeno; 2,2',5',2"-tertiofeno y 5-metil-2,2',5',2"-tertiofeno (Perich *et al.*, 1995).

- En sus raíces se encontraron bi y tertiofenos, también con acción nematocida y larvicida (Weaver *et al.*, 1997).

El contenido de tagetonas permanece constante desde que comienza el desarrollo floral (Thappa *et al.*, 1993). Los máximos niveles de tagetonas y b-ocimeno se alcanzan en plena floración, mientras que el de dihidrotagetona declina al avanzar la madurez.

Tagetes patula es una planta cultivada destinada a la decoración de jardines; además es fuente de pigmentos y sustancias aromáticas y medicinales.

Cualitativamente, la composición de terpenos no difiere demasiado entre ambas especies de *Tagetes*. En ellas se hallan presentes: metilchavicol, limoneno, cariofileno, terpinoleno y piperitona (Hethelyi *et al.*, 1992).

Los procesos de extracción, purificación y aislamiento de las sustancias activas de *Tagetes* sp. generan importantes pérdidas de los componentes volátiles (probablemente por el calor durante la destilación), lo cual disminuye la toxicidad de los preparados originados por esta técnica. Por este método controlar la población existente sólo en el corto plazo, no existiendo residualidad (Weaver *et al.*, *op. cit.*). El uso de extractos crudos podría ser el método más eficaz en programas de control, ya que evita el problema anteriormente mencionado. Sin embargo, los extractos florales de *T. minuta* no serían los ideales para controlar *Sitophilus* (Weaver *et al.*, *op. cit.*).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la eficacia de distintas concentraciones (10% y 20% P/V) de soluciones acuosas y alcohólicas naturales a través del parámetro mortalidad de individuos adultos de *S. oryzae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los adultos de *Sitophilus oryzae* fueron criados en recipientes de vidrio sobre granos de arroz integral en condiciones controladas de laboratorio: 26,5 ± 0,5°C, 70% HR y oscuridad continua.

Las soluciones acuosas se obtuvieron de ejemplares en floración de *Tagetes minuta* y de dos variedades comerciales de *T. patula*, una de la provincia de Buenos

Aires (*var. Rusty red*) y otra de Salta (*var. no identificada*), recolectadas en el mes de marzo de 1999. El material se secó en estufa a 40°C y se conservó en recipientes de vidrio hasta el momento de su utilización.

Para cada especie, se consideraron por separado las raíces, flores y tallos con hojas. El material fue fraccionado; cada fracción, pesada y envasada en un recipiente de vidrio. Las infusiones se obtuvieron agregando al material molido agua destilada en ebullición, manteniendo la proporción: 10 gr. de material en 100 ml. de agua destilada para 10% ó 20 gr. de material en 100 ml. de agua destilada para 20%. Se dejaron reposar los preparados 36 horas con el propósito de facilitar la extracción de los compuestos hidrosolubles, luego de lo cual se filtraron las soluciones obtenidas

Se evaluaron quince tratamientos: **T1**: raíces de *Tagetes minuta* al 10%; **T2**: raíces de *T. minuta* al 20%; **T3**: hojas de *T. minuta* al 10%; **T4**: hojas de *T. minuta* al 20%; **T5**: raíces de *T. patula* bonaerense al 10%; **T6**: raíces de *T. patula* bonaerense al 20%; **T7**: hojas de *T. patula* bonaerense al 10%; **T8**: hojas de *T. patula* bonaerense al 20%; **T9**: flores de *T. patula* bonaerense al 10%; **T10**: flores de *T. patula* bonaerense al 20%; **T11**: hojas de *T. patula* salteño al 10%; **T12**: hojas de *T. patula* salteño al 20%; **T13**: flores de *T. patula* salteño al 10%; **T14**: flores de *T. patula* salteño al 20%; **T15**: Testigo: agua destilada.

Para la experiencia se utilizaron cajas de Petri con papel de filtro, el que fue pulverizado con 1 ml. de solución. En cada una de ellas se colocaron 10 insectos adultos y se realizó el conteo de gorgojos muertos a los 30 minutos, 6, 24 y 48 horas post aplicación.

Se efectuó un diseño en bloques completamente aleatorizados, siendo las unidades experimentales las cajas de petri. Se utilizaron 4 bloques o repeticiones, en los que se aleatorizaron cada uno de los 15 tratamientos.

Para las soluciones alcohólicas se utilizó etanol como extractante y solvente. El mismo permite extraer sustancias de carácter polar y no polar. Debido a la escasez de material vegetal de *T. patula* var. "Rusty Red", se utilizó *T. patula* var. "Spry", proveniente de la prov. de Bs. As., recolectada también en marzo de 1999. Se empleó el mismo diseño que para el ensayo precedente.

Las soluciones se obtuvieron utilizando etanol (78,5°) en ebullición y la metodología fue similar a la anterior manteniendo la proporción: 10 gr. de material en 100 ml. de etanol para 10% P/V (densidad del etanol a 20°C: 0,789 gr/ml) ó 20 gr. de material en 100 ml. de etanol para 20% P/V.

Los tratamientos fueron: **T1**: hojas y tallos de *Tagetes minuta* al 10%; **T2**: hojas y tallos de *T. minuta* al 20%; **T3**: hojas y tallos de *T. patula* salteño al 10%; **T4**: hojas y tallos de *T. patula* salteño al 20%; **T5**: flores de *T. patula* bonaerense al 10%; **T6**: flores de *T. patula* bonaerense al 20%; **T7**: hojas y tallos de *T. patula* bonaerense al 10%; **T8**: hojas y tallos de *T. patula* bonaerense al 20%; **T9**: raíces de *T. patula* bonaerense al 10%; **T10**: raíces de *T. patula* bonaerense al 20%; **T11**: Testigo: etanol.

Se utilizó previamente un análisis exploratorio. Como los datos no seguían una tendencia normal, se procedió a transformar los datos según el método del arco seno, registrándose la normalidad por el método de Shapiro Wilks. Los análisis de variancia se realizaron siguiendo la metodología de análisis de variancia para ensayos repetidos en el tiempo. Las comparaciones posteriores de medias de tratamientos se analizaron según prueba de Tukey o Dunnet para comparaciones con el testigo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Eficacia de los extractos acuosos.

Los tratamientos correspondientes al ensayo de extractos acuosos no provocaron la muerte de gorgojos. Esto indicaría que los principios tóxicos de los *Tagetes* evaluados para gorgojos tienen carácter no polar, debido a lo cual no pudieron ser extraídos por el agua.

Eficacia de los extractos alcohólicos.

Los tratamientos 3, 4 (hojas y tallos de *T. patula* salteño al 10% y 20% resp.), 7, 8 (hojas y tallos de *T. patula* bonaerense al 10% y 20% resp.) y 10 (raíces de *T. patula* bonaerense al 20%) fueron significativamente los más eficaces. Todos ellos fueron igualmente tóxicos para gorgojos. Tanto la variedad salteña de *T. patula*, como la bonaerense mostraron la misma efectividad. Los tratamientos con *T. minuta* y flores de *T. patula* bonaerense no difirieron del testigo, que resultó inocuo para los gorgojos. (Cuadro y Gráfico 1)

A) Análisis de la toxicidad de los tratamientos en cada momento de medición.

30 minutos postaplicación.

Ninguno de los tratamientos causó la muerte de gorgojos.

6 horas postaplicación.

Los tratamientos más tóxicos fueron aquellos en base a hojas y tallos de *T. patula*: 3, 4, 7 y 8. Los restantes no difirieron significativamente del testigo. (Cuadro y Gráfico 2)

24 horas postaplicación.

Los tratamientos 3, 4, 7 y 8 continuaron siendo significativamente los más efectivos. Los restantes se mantuvieron similares al testigo. (Cuadro y Gráfico 3)

48 horas postaplicación.

Observando la evolución del efecto de los tratamientos (cuadros 3 y 1), encontramos que el tratamiento 10 (raíces de *T. patula* bonaerense al 20%) incrementó notablemente su toxicidad, logrando la máxima efectividad final junto a los tratamientos 3, 4, 7 y 8. El tratamiento 9 también incrementó su toxicidad, pero fue significativamente menos eficaz que los cinco tratamientos anteriormente mencionados.

La mayor mortalidad de gorgojos se registró a las 6 horas postaplicación, siendo significativamente mayor que a las 24 y 48 horas (cuadro 4). Estos resultados sugieren la presencia de los mayores niveles de principio biocida extraído en hojas y tallos. En las raíces se registraría un menor contenido, mientras que las flores contendrían la menor proporción de principio biocida de toda la planta. (Cuadro 4)

B) Efecto de la dosis sobre la toxicidad.

En la mayoría de los tratamientos no se observó un aumento de la toxicidad al incrementarse la dosis: con solución al 10% ya se registró la máxima mortalidad de gorgojos. Las soluciones de raíces exhibieron una relación directa entre el aumento de la dosis y la mortalidad: el tratamiento 10 fue significativamente más tóxico que el 9 (cuadro 5) lo que sugiere que en este

órgano vegetal los metabolitos activos se encuentran en menor proporción que en el resto de la planta.

CONCLUSIONES

1. Las soluciones acuosas de *Tagetes* sp. no fueron efectivos en el control de *S. oryzae*, como así tampoco las etflicas foliares de *T. minuta* y los florales de *T. patula* bonaerense.
2. Las soluciones etflicas de hojas y tallos de ambas variedades de *T. patula* mostraron un poder insecticida notablemente mayor y más rápido que las otras utilizadas, no observándose diferencias de toxicidad atribuibles a la variedad de *T. patula* empleada.
3. Sólo la solución etflica de raíces de *T. patula* bonaerense al 20 % resultó igualmente efectiva a los tratamientos anteriormente mencionados, pero exhibiendo un efecto mucho más lento.
4. Los mayores niveles del principio tóxico se localizaron en hojas y tallos. Las flores registraron la menor concentración de toda la planta, mientras que en las raíces el contenido fue intermedio.
5. No se registró un aumento de la toxicidad al incrementarse las dosis, excepto en las soluciones etflicas de raíces.

Los resultados obtenidos sugieren como promisoría la utilización de estas soluciones en los tratamientos para plagas de granos almacenados.

Treatment	6h	24h	48h
1	0	0	0
2	0	0	0
3	100	100	100
4	100	100	100
5	100	100	100
6	100	100	100
7	100	100	100
8	100	100	100
9	100	100	100
10	100	100	100
11	0	0	0
12	0	0	0

Cuadro 1**Mortalidad final de gorgojos (en porcentaje) para cada tratamiento.**

Tratamiento	% medio de gorgojos muertos	Desvío standard	Significancia
1	5,00	10,00	d
2	2,50	5,00	d
3	100	0	a
4	100	0	a
5	17,50	22,17	cd
6	20,00	24,49	cd
7	97,50	5,00	a
8	97,50	5,00	a
9	55,00	33,17	bc
10	95,00	5,77	ab
11	5,00	5,77	d

Letras distintas en el orden vertical representan diferencias significativas para test de Tukey ($p < 0,05$).**Cuadro 2****Mortalidad de gorgojos (en porcentaje) a las 6 horas postaplicación.**

Tratamiento	% medio de gorgojos muertos	Desvío standard	Significancia
1	0	0	b
2	0	0	b
3	97,50	5,00	a
4	90,00	8,16	a
5	12,50	18,93	b
6	7,50	9,57	b
7	97,50	5,00	a
8	95,00	10,00	a
9	17,50	28,72	b
10	0	0	b
11	0	0	b

Letras distintas en el orden vertical representan diferencias significativas para test de Tukey ($p < 0,05$).

Cuadro 3

Mortalidad de gorgojos (en porcentaje) a las 24 horas postaplicación.

Tratamiento	% medio de gorgojos muertos	Desvío standard	Significancia
1	2,50	5,00	b
2	2,50	5,00	b
3	100	0	a
4	100	0	a
5	12,50	18,93	b
6	20,00	24,49	b
7	97,50	5,00	a
8	97,50	5,00	a
9	30,00	38,30	b
10	17,50	17,08	b
11	0	0	b

Letras distintas en el orden vertical representan diferencias significativas para test de Tukey ($p < 0,05$).

Cuadro 4

Mortalidad media de gorgojos (en porcentaje) en cada momento de medición.

30'	6 hs.	24 hs.	48 hs.
0	37,95 ± 45,17	5,68 ± 10,43	10,45 ± 23,82
(c)	(a)	(b)	(b)

Letras distintas en el orden horizontal representan diferencias significativas para test de Tukey ($p < 0,05$).

Cuadro 5

Comparación de la toxicidad de cada infusión en sus dos dosis.

Tratamiento	Dosis	% medio de gorgojos muertos	Desvío standard	Significancia
1	10 %	5,00	10,00	a
2	20 %	2,50	5,00	a
3	10 %	100	0	a
4	20 %	100	0	a
5	10 %	17,50	22,17	a
6	20 %	20,00	24,49	a
7	10 %	97,50	5,00	a
8	20 %	97,50	5,00	a
9	10 %	55,00	33,17	a
10	20 %	95,00	5,77	b

Letras distintas en el orden vertical, dentro de cada par de tratamientos comparados, representan diferencias significativas para test de Tukey ($p < 0,05$).

Gráfico 1

Mortalidad final de gorgojos (en porcentaje) para cada tratamiento

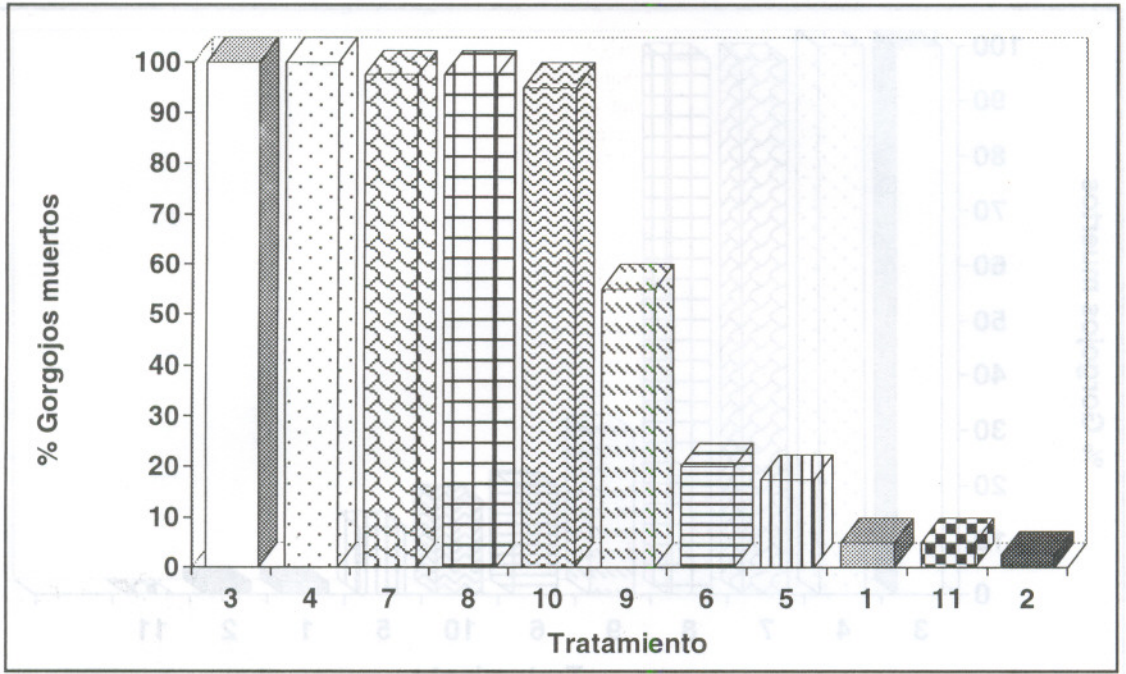


Gráfico 2

Mortalidad instantánea de gorgojos (en porcentaje) a las 6 horas postaplicación.

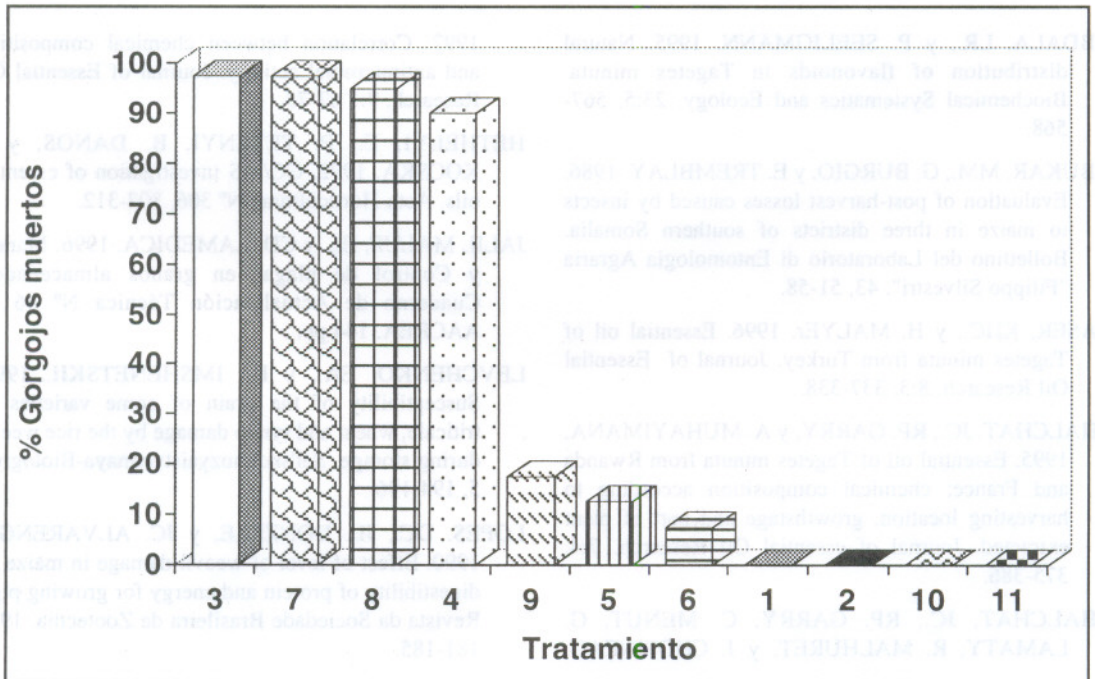
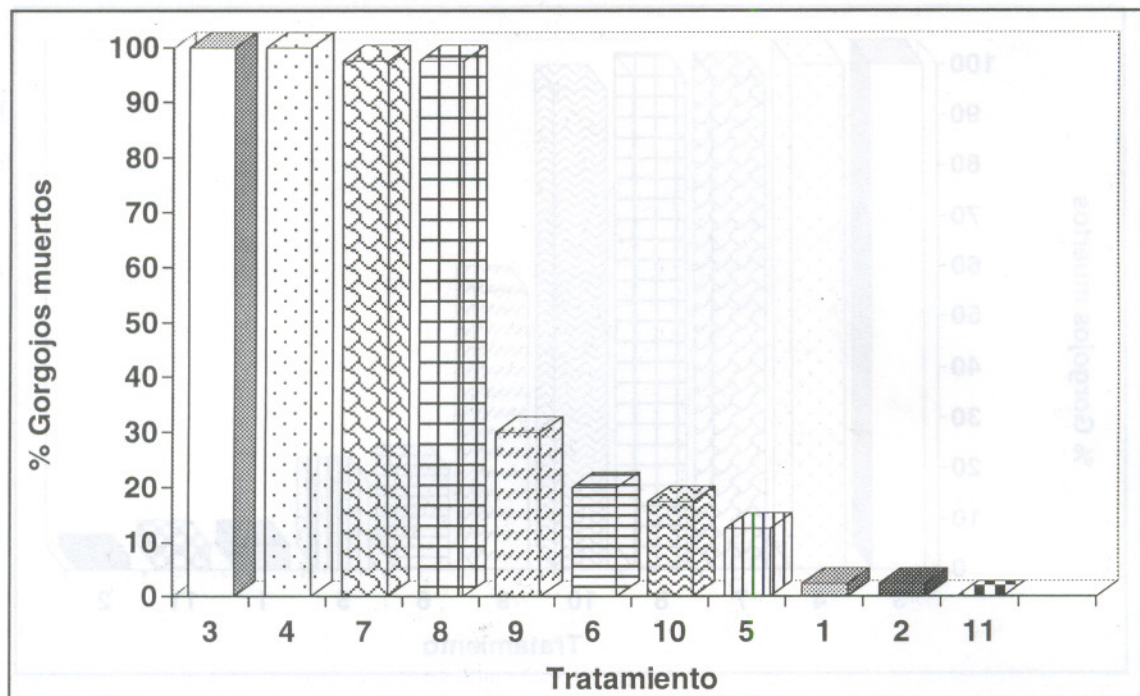


Gráfico 3

Mortalidad instantánea de gorgojos (en porcentaje) a las 24 horas postaplicación



LITERATURA CITADA

- ABDALA, LR., y P. SEELIGMANN. 1995. Natural distribution of flavonoids in *Tagetes minuta*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 23:5, 567-568.
- ABUKAR, MM., G. BURGIO, y E. TREMBLAY. 1986. Evaluation of post-harvest losses caused by insects to maize in three districts of southern Somalia. *Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria "Filippo Silvestri"*. 43, 51-58.
- BASER, KHC., y H. MALYER. 1996. Essential oil of *Tagetes minuta* from Turkey. *Journal of Essential Oil Research*. 8:3, 337-338.
- CHALCHAT, JC., RP. GARRY, y A. MUHAYIMANA. 1995. Essential oil of *Tagetes minuta* from Rwanda and France: chemical composition according to harvesting location, growthstage and part of plant extracted. *Journal of essential Oil Research*. 7:4, 375-386.
- CHALCHAT, JC., RP. GARRY, C. MENUT, G. LAMATY, R. MALHURET, y J. CHOPINEAU. 1997. Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Essential Oil Research*. 9:1 67-75.
- HETHELYI, E., P. TETENYI, B. DANOS, y I. KOCSKA. 1992. GC/MS investigation of essential oils. *Acta-Horticulturae* N° 306, 302-312.
- JALIL MALUF, EL. y CD. LAMEDICA. 1996. Manejo y Control de plagas en granos almacenados. Cuaderno de Actualización Técnica N° 56 de AACREA. 144 pp.
- LEVCHENKO, EA., y EI. IMSHENETSKII. 1991. Susceptibility of the grain of some varieties of triticale, wheat and rye to damage by the rice weevil during storage. *Sel'skokhozyaistvennaya-Biologiya*. 5, 194-196.
- LOPES, DC., JL. DONZELE, y JC. ALVARENGA. 1990. Effect of level of weevil damage in maize on digestibility of protein and energy for growing pigs. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. 19:3, 181-185.

- MARZOCCA, A. 1997 Vademecum de malezas medicinales de la Argentina. Indígenas y Exóticas. Buenos Aires. Orientación Gráfica Editora. pp. 87.
- METCALF, CL. y WP. FLINT. 1976. Insectos destructivos e insectos útiles: sus costumbres y control. México. C.E.C.S.A. pp. 1046-1047.
- PANTENIUS, CU. 1988. Storage losses in traditional maize granaries in Togo. *Insect Science and its Application*. 9: 6, 725-735.
- PERICH, MJ., C. WELLS, W. BERTSCH, y KE. TREDWAY. 1995. Isolation of the insecticidal components of *Tagetes minuta* (compositae) against mosquito larvae and adults. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 11:3, 307-310.
- PICAR, GD., E. DONAHAYE, y S. NAVARRO. 1987. Integration of new pest control techniques into the post harvest grains sector of developing countries. *Proceedings of the Fourth International Working Conference on stored product protection*, Tel Aviv, Israel, pp. 288-301.
- RODRIGUEZ HERNANDEZ, C., y J. DJAIR VENDRAMIM. 1996. Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae en Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae). *Manejo Integrado de Plagas* (Costa Rica) No. 42; 14-22.
- RODRIGUEZ-LAGUNES, DA., A. LAGUNES-TEJEDA, D. Riestra-Diaz, C. RODRIGUEZ-MACIEL, J. VELAZQUEZ-MENDOZA, E. BECERRIL-ROMAN, y E. PACHECO-VELASCO. 1998. Extractos acuosos de nim para el combate de la broga de café. *Manejo Integrado de Plagas* (Costa Rica) No. 49;73-77.
- SINHA, KK., y AK. SINHA. 1992. Impact of stored grain pests on seed deterioration and aflatoxin contamination in maize. *Journal of Stored Products Research*. 28:3, 211-219.
- THAPPA, RK., SG. AGARWAL, y NK. KALIA. 1993. Changes in chemical composition of *Tagetes minuta* oil at various stages of flowering and fruiting. *Journal of Essential Oil Research*. 5:4, 375-379.
- WEAVER, D., JL. ZETTLER, CD WELLS, JE. BAKER, W. BERTSCH, y JE. THRONE. 1997. Toxicity of Fractionated and Degraded Mexican Marigold Floral Extract to Adult *Sitophilus zeamais*. *Journal of Economic Entomology*. 90:6, 1678-1683.
- ZYGADLO, JA., CA. GUZMAN, y NR. GROSSO. 1994. Antifungal properties of the leaf oils of *Tagetes minuta* and *T. Filifolia*. *Journal of essential Oil Research*. 6:6, 617-621.