

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



EVALUACIÓN DEL EFECTO FAGOESTIMULANTE O ANTIALIMENTARIO
DE ÁCIDOS GRASOS SOBRE *Hylastinus obscurus* (Marsham)

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera, como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo

SANDRA MARCELA PARRA ESTRADA

TEMUCO-CHILE

2013

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**EVALUACIÓN DEL EFECTO FAGOESTIMULANTE O ANTIALIMENTARIO
DE ÁCIDOS GRASOS SOBRE *Hylastinus obscurus* (Marsham)**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera, como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo

SANDRA MARCELA PARRA ESTRADA

PROFESOR GUÍA: Dr. ANDRÉS QUIROZ CORTEZ

TEMUCO-CHILE

2013

**EVALUACIÓN DEL EFECTO FAGOESTIMULANTE O ANTIALIMENTARIO DE
ÁCIDOS GRASOS SOBRE *Hylastinus obscurus* (Marsham).**

PROFESOR GUÍA

: _____

Dr. Andrés Eduardo Quiroz Cortez
Doctor en Ciencias Químicas
Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales
Universidad de La Frontera

PROFESOR CONSEJERO

: _____

Dr. Leonardo Javier Parra Bardehle
Doctor en Ciencias de Recursos Naturales
Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales
Universidad de La Frontera

CALIFICACIÓN PROMEDIO TESIS :

CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hipótesis.	3
1.2 Objetivo general.....	3
1.3 Objetivos específicos.	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Trébol rosado (<i>Trifolium pratense</i> L.)	4
2.1.1 Antecedentes generales.	4
2.1.2 Manejo y uso.	5
2.1.3 Principales factores que afectan la persistencia del trébol rosado.	5
2.1.3.1 Factores bióticos y abióticos.....	5
2.1.3.2 Enfermedades fungosas.	6
2.1.3.3 Plagas insectiles.....	6
2.2 Antecedentes generales sobre el barrenador de la raíz del trébol rosado, <i>Hylastinus obscurus</i> (Marsham).	6
2.2.1 Posición sistemática.	6
2.2.2 Distribución.....	7
2.2.3 Ciclo vital y estacional.	8
2.2.4 Daño e intensidad de ataque de <i>H. obscurus</i>	9
2.2.5 Métodos de control sobre <i>H. obscurus</i>	10

2.2.5.1 Control cultural.....	10
2.2.5.2 Control biológico.....	11
2.2.5.3 Control químico.....	11
2.3 Antecedentes sobre la interacción química entre <i>H. obscurus</i> y trébol rosado	11
2.4 Uso de dietas para el control de plagas.....	13
2.4.1 Dietas artificiales.....	14
2.4.2 Fagoestimulantes.....	15
2.4.3 Antialimentario.....	15
2.4.3.1 Azadiractina.....	16
2.5 Mecanismos directos de defensa de las plantas frente a insectos herbívoros.	17
2.6 Planteamiento del problema.....	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1 Lugar de obtención de material biológico.	20
3.1.1 Obtención de plantas de trébol rosado.	20
3.1.2 Obtención y mantención de <i>H. obscurus</i>	21
3.2 Elección y preparación de dietas artificiales.....	21
3.3 Bioensayos de alimentación en dietas artificiales.....	23
3.3.1 Controles realizados en los bioensayos de alimentación	25
3.3.2 Compuestos a evaluar.....	25
3.4 Conservación y determinación del sexo de <i>H. obscurus</i>	26

3.5 Diseño experimental y análisis estadístico.	26
4. RESULTADOS	28
4.1 Control sin dieta.	28
4.2 Elección de la dieta a utilizar.	29
4.2.1 Efecto de la dieta agar sobre <i>H. obscurus</i>	29
4.2.2 Efecto de la dieta compuesta sobre <i>H. obscurus</i>	29
4.3 Conducta alimentaria de <i>H. obscurus</i> en dietas suplementadas con ácidos grasos y sacarosa.	31
4.3.1 Conducta alimentaria de <i>H. obscurus</i> en dietas suplementada con ácidos grasos y sacarosa en solución a 100 ppm.	31
4.3.2 Conducta alimentaria de <i>H. obscurus</i> en dietas suplementadas con ácidos grasos y sacarosa en solución a 500 ppm.	32
4.3.3 Conducta alimentaria de <i>H. obscurus</i> en dietas suplementadas con ácidos grasos y sacarosa en solución a 1.000 ppm.	33
4.3.4 Conducta alimentaria de <i>H. obscurus</i> en dietas suplementadas con ácidos grasos y sacarosa en solución a 5.000 ppm.	34
4.3.5 Conducta alimentaria de <i>H. obscurus</i> en dietas suplementadas con ácidos grasos y sacarosa en solución a 10.000 ppm.	35
4.4 Conducta alimentaria de <i>H. obscurus</i> en dieta suplementada con azadiractina a una concentración de 10 ppm.	36
5. DISCUSIÓN.....	37
6. CONCLUSIONES.....	42
7. RESUMEN.....	44

8. SUMMARY46

9. LITERATURA CITADA.....48

10. AGRADECIMIENTOS.....57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A) Inflorescencia del trébol rosado; B) Follaje del trébol rosado.	5
Figura 2. <i>Hylastinus obscurus</i> (Marsham) adulto.	7
Figura 3. Ciclo estacional de <i>Hylastinus obscurus</i> . Modificado de Carrillo y Mundaca (1974). ...	9
Figura 4. Extracción de plantas de trébol rosado desde parcelas experimentales.	20
Figura 5. A) Disco de Petri con papel humedecido, raíces de trébol rosado e insectos; B) Disco de Petri con papel humedecido e insectos.	21
Figura 6. A) Frasco Schott de 40 ml; B) Autoclave All American modelo 25x Electric Pressure Steam Sterilizer; C) Balanza analítica Rodwag modelo AS 220/C/2; D) Campana de flujo laminar vertical Zhicheng modelo ZHJH-C1112C Clean Bench.	22
Figura 7. Microbalanza Sartorius CP2P.	23
Figura 8. Bioensayo de alimentación montado.	24
Figura 9. A) Capilar que contiene la dieta artificial con el insecto; B) Capilar sin dieta.	24
Figura 10. A) <i>H. obscurus</i> bajo la lupa; B) <i>H. obscurus</i> disectado; C) Edeago; D) Órgano reproductor femenino.	27
Figura 11. Efecto del control sin dieta sobre <i>H. obscurus</i>	28
Figura 12. Efecto de la dieta agar sobre <i>H. obscurus</i>	29
Figura 13. Efecto de la dieta compuesta sobre <i>H. obscurus</i>	30
Figura 14. Conducta alimentaria de <i>H. obscurus</i> en dietas suplementadas con ácidos grasos y sacarosa en solución a 100 ppm.	31

Figura 15. Conducta alimentaria de <i>H. obscurus</i> en dietas suplementadas con ácidos grasos y sacarosa en solución a 500 ppm	32
Figura 16. Conducta alimentaria de <i>H. obscurus</i> en dietas suplementadas con ácidos grasos y sacarosa en solución a 1000 ppm	33
Figura 17. Conducta alimentaria de <i>H. obscurus</i> en dietas suplementadas con ácidos grasos y sacarosa en solución a 5.000 ppm	34
Figura 18. Conducta alimentaria de <i>H. obscurus</i> en dietas suplementadas con ácidos grasos y sacarosa en solución a 10.000 ppm	35
Figura 19. Conducta alimentaria de <i>H. obscurus</i> en dieta suplementada con azadiractina a una concentración de 10 ppm.....	36

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sustancias antialimentarias según su naturaleza química (Alonso, 1998).	16
---	----

1. INTRODUCCIÓN

El trébol rosado (*Trifolium pratense* L.) es una leguminosa forrajera perenne de vida corta, cuyos principales usos son en praderas de rotación corta, pastoreo y corte (heno, ensilaje y soiling). Si bien es cierto, es una especie perenne, a nivel mundial presenta como limitante su baja persistencia, determinada por la alta mortalidad de plantas; lo cual se debe tanto a enfermedades radicales como plagas que la afectan durante su vida productiva (Ortega, 1996). Considerando que existe una lista de insectos asociados al cultivo, solo dos especies se comportan como plaga, siendo éstas las cuncunillas negras (Lepidoptera: Hepialidae) y el barrenador de la raíz del trébol (*Hylastinus obscurus* (Marsham)) (Coleoptera: Curculionidae). A diferencia de las cuncunillas, *H. obscurus* es altamente específico y es uno de los factores que limitarían fuertemente la persistencia del trébol rosado. La distribución de este insecto se extiende desde la Región del Bio-Bío hasta la Región de Los Lagos, siendo la Región de La Araucanía la zona con más alto índice de ataque (Aguilera *et al.*, 1996). Este insecto se alimenta de tejidos radicales, corteza y a veces del cilindro vascular lo que facilita la entrada de agentes patógenos al interior de la raíz. Esta acción provoca alteraciones en el normal almacenamiento de carbohidratos y en el sistema de transporte de nutrientes y agua desde el suelo. El largo periodo de vuelo del insecto, así como su ubicación al interior de las raíces, han dificultado su control químico, biológico y cultural. Debido a estos antecedentes, el control etológico, el cual se basa en el estudio del comportamiento de los animales en relación al medio ambiente resulta ser una buena opción. Este tipo de control utiliza las estrategias desarrolladas por los insectos, las que se centran en las respuestas de éstos frente a la presencia u ocurrencia de estímulos que son predominantemente de naturaleza química, además de estímulos físicos y mecánicos. Así, una sustancia química presente en una planta puede provocar que el insecto se acerque (atrayerente) o se aleje (repelente) de ella. Además existen sustancias que estimulan la alimentación y otras que la inhiben (Cisneros, 1995).

En los últimos años, el Laboratorio de Química Ecológica de la Universidad de La Frontera ha investigado la interacción insecto-planta, específicamente la conducta de *H.*

obscurus en relación a su hospedero *T. pratense*. Al respecto, Tapia *et al.* (2007) estudiaron los extractos de volátiles de raíces de plantas adultas de trébol de 1,5 y 2,5 años de edad, mostrando que el insecto fue atraído por volátiles del extracto de 1,5 años pero no por los volátiles de plantas de 2,5 años de edad. Manosalva *et al.* (2011) lograron identificar y cuantificar ácidos grasos en extractos de raíces de siete líneas experimentales y dos cultivares (Redqueli INIA y Quiñequeli INIA) de plantas jóvenes de trébol rosado (3-13 meses de edad). Entre los compuestos identificados se encontraron los ácidos láurico, palmítico y oleico, los cuales en bioensayos olfatométricos resultaron ser significativamente atrayentes para hembras de *H. obscurus* a pesar de la baja volatilidad de estos compuestos.

Las plantas son fundamentales para insectos fitófagos ya que son su fuente de alimentación y como tal deben nutrir al insecto, favoreciendo el crecimiento y desarrollo para que éste pueda completar de forma exitosa su ciclo biológico (Schoonhoven *et al.*, 1998). La subfamilia Scolytinae a la cual pertenece *H. obscurus* se caracteriza por seleccionar individualmente su planta hospedera; esto lo hace guiándose por señales atrayentes de largo alcance (volátiles) emitidas desde el hospedero (Wood, 1982; Schlyter *et al.*, 1989). Según Agelopoulos *et al.* (1999) cuando los insectos xilófagos descartan una especie como hospedero se debe principalmente al escaso aporte nutricional de éste o a la detección de metabolitos secundarios potencialmente tóxicos.

Existen sustancias consideradas antialimentarias o también llamados fagoINHIBIDORES según la estructura química que estos presenten, tales como azadiractina (terpenoide). Este compuesto es un poderoso insecticida que ha sido probado en más de 600 especies siendo capaz de inhibir el crecimiento y alimentación de los insectos, reduce la fertilidad en las hembras, afecta la sobrevivencia, causa repelencia y anomalías anatómicas en distintas especies insectiles (Murillo y Salazar, 2011)

A pesar de los antecedentes anteriormente expuestos, no existen estudios sobre una metodología que permita estudiar los factores que influyen en la alimentación de *H. obscurus*. Al respecto, Faccoli *et al.* (2005), estudiaron la alimentación de *Ips typographus* L. (Coleoptera: Scolytidae), determinando que factores químicos estarían involucrados en la aceptación del

hospedero por parte de insecto a través de la utilización de dietas artificiales. El estudio demostró que la dieta artificial fue un excelente sustrato para evaluar la alimentación de *I. typographus* adicionando compuestos provenientes de su hospedero y otros de plantas no hospederas, debido a que los machos resultaron ser más sensibles a las dietas en altas concentraciones comparado con las hembras, lo cual permitió determinar compuestos con actividad “antialimentaria”. Debido a estos antecedentes, el presente estudio pretende evaluar distintas dietas para *H. obscurus* suplementadas por ácidos grasos presentes en raíces de trébol rosado con el objetivo de determinar su efecto fagoestimulante o antialimentario, lo cual sería un indicador de susceptibilidad o resistencia del hospedero ante la infestación por parte de este insecto.

1.1 Hipótesis. La alimentación de *H. obscurus* es modificada por ácidos grasos presentes en raíces de trébol rosado que al ser incorporados en una dieta artificial, provocan respuestas fagoestimulantes o antialimentarias por parte del insecto.

1.2 Objetivo general. Estudiar la conducta de alimentación de *H. obscurus* a través de una dieta artificial.

1.3 Objetivos específicos.

- I. Seleccionar una dieta artificial idónea para la alimentación de *H. obscurus*.
- II. Determinar el efecto fagoestimulante de ácidos grasos sobre la alimentación de *H. obscurus*.
- III. Determinar el efecto antialimentario de ácidos grasos sobre la alimentación de *H. obscurus*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Trébol rosado (*Trifolium pratense* L.)

2.1.1 Antecedentes generales. Esta especie tiene como centros de origen el sudeste de Europa o Asia menor, utilizándose desde el siglo III d.C. en Europa. En la península Ibérica fue cultivada en el siglo XVI d.C., lugar desde el cual se expandió a Holanda y Alemania. Posteriormente, fue introducida en Inglaterra y Estados Unidos (Ortega *et al.*, 1991).

En Chile esta especie fue introducida en 1869 a la Región del Maule (Aguila, 1990). Su distribución actual abarca desde la Región de Atacama hasta la Región de Magallanes y la Antártica Chilena, concentrándose entre las Regiones del Libertado Bernardo O'Higgins y de Los Ríos superando las 100.000 hectáreas, lo cual representa aproximadamente un 20% del total de las praderas sembradas del país. El rendimiento promedio anual de esta forrajera es de 7 ton/ha aproximadamente (Torres y Sierra, 1991; Venuto *et al.*, 1995). Sus cualidades nutritivas, altos rendimientos y alta producción de semilla, han hecho del trébol rosado el recurso forrajero de mayor utilización en nuestro país.

El trébol rosado (Fig. 1) es considerada una planta perenne, sin embargo, esta especie en las pasturas declina a niveles insatisfactorios desde el segundo año después de la siembra (Cuevas y Balocchi, 1983), siendo la infestación de las raíces por el insecto *Hylastinus obscurus* uno de los factores bióticos que afectan mayormente la sobrevivencia de esta leguminosa (Ortega *et al.*, 1993).



Figura 1. A) Inflorescencia del trébol rosado; B) Follaje del trébol rosado.

2.1.2 Manejo y uso. En los sistemas de producción agrícola, el trébol rosado es frecuentemente usado como rotación corta. Esta especie se adapta a variadas formas de uso ya sea en pastoreo o corte (heno, soiling y ensilaje) (Catrileo y Rojas, 1987). Carambula (1977) señaló que su uso principal es para pastoreo, mientras que Aguila (1990) reportó que se adapta muy bien al corte. Según Spedding y Diekmahns (1972), los rendimientos en *T. pratense* están ligados a la estacionalidad de la producción. Holmes y Wilson (1989) señalan que el mayor crecimiento de la planta ocurre durante otoño y primavera pudiendo mantener buen crecimiento y calidad alimenticia durante el verano.

2.1.3 Principales factores que afectan la persistencia del trébol rosado.

2.1.3.1 Factores bióticos y abióticos. El rendimiento de forraje y su persistencia en una pradera de trébol rosado depende de la interacción de múltiples factores bióticos y abióticos. Ortega (1996) señala que entre los factores bióticos relacionados a la genética de los cultivares y líneas experimentales está su población de plantas (determinada por la sobrevivencia de plantas), tamaño y capacidad de rendimiento de cada planta. El rendimiento del trébol rosado comienza a decaer a comienzo del segundo año (baja persistencia) y su sobrevivencia es de tres años como

máximo (Venuto *et al.*, 1995). Skipp y Christensen (1990) plantean que las plantas de trébol rosado, generalmente mueren como resultado del deterioro de su eje primario, raíz y corona.

2.1.3.2 Enfermedades fungosas. Los hongos que afectan al trébol rosado ejercen un importante papel, no solo reduciendo la calidad y cantidad de forraje obtenido, sino que además provocando una menor persistencia en la plantas, cambios en la composición botánica de la pradera y trastornos fisiológicos y/o reproductivos en los animales que se alimentan del forraje enfermo (Galdames y Aguilera, 1993).

Se ha informado que la asociación entre *T. pratense* y hongos del género *Fusarium* sinergizan el ataque de *H. obscurus*, aumentando el daño sobre esta especie forrajera (Kamm y Buttery, 1984). *Fusarium oxysporum* Schlecht., *F. solani* (mart.) Sacc., y *F. roseum* Link. son los patógenos más prevalecientes asociados a la pudrición de la raíz (Chi y Hanson, 1961). Galdames (1991) asocia la presencia de estos patógenos a factores ambientales, mal drenaje, fertilización deficiente, actividad de otros patógenos y/o a la asociación de nematodos.

2.1.3.3 Plagas insectiles. En la zona sur de Chile el trébol rosado es un hospedero de una docena de insectos fitófagos, los cuales no necesariamente se les denomina plaga, ya que muchos de ellos son ocasionalmente dañinos y rara vez alcanzan densidades de importancia económica para el cultivo (Cisternas y Norambuena, 1991).

Las especies más importantes asociadas a esta leguminosa son conocidas vulgarmente como cuncunillas negras (*Dalaca* spp.) y el barrenador de la raíz del trébol rosado (*Hylastinus obscurus* Marsham), la primera es nativa y poco específica, en cambio la segunda es de origen foráneo (Europa) y altamente específico. Este último, en conjunto con patógenos del suelo limita fuertemente la persistencia del trébol rosado.

2.2 Antecedentes generales sobre el barrenador de la raíz del trébol rosado, *Hylastinus obscurus* (Marsham).

2.2.1 Posición sistemática. Según Rockwood (1926), *Hylastinus obscurus* fue inicialmente descrita por Marsham como *Ips obscurus* De Geer en 1802. Durante 1818 aparece descrita en las

notas de Swaine, bajo el nombre de *Hylastinus obscurus* (Marsham) (Fig. 2). Bright y Stark (1973), determinaron que *H. obscurus* pertenecía al orden Coleoptera, familia Scolytidae. Si bien es cierto, durante muchos años Scolytidae fue considerada una familia independiente, estudios taxonómicos la consideran actualmente como una subfamilia de Curculionidae (Scolytinae) (Lawrence y Newton, 1995). Pese a esta nueva clasificación, cabe destacar que los adultos pertenecientes a esta subfamilia no presentan un *rostrum* tan desarrollado como ocurre con otros curculiónidos (Guillot, 2005; Triplehorn y Johnson, 2005).



Figura 2. *Hylastinus obscurus* (Marsham) adulto.

2.2.2 Distribución. *H. obscurus* es un coleóptero originario de Europa, el cual fue introducido a América del Norte aproximadamente en 1978. También ha sido citado en África del Norte (Matamala, 1976; Aguilera, 1989).

Su presencia en Chile fue detectada en 1971, en la zona de Pailahueque, Región de La Araucanía (Matamala, 1976). Actualmente se distribuye desde la Región del Bio-Bío hasta la Región de Los Ríos, siendo la Región de La Araucanía la zona con más alto índice de ataque (Aguilera *et al.*, 1996), en las comunas de Victoria, Angol y Temuco (Castillo y Vender, 1973).

2.2.3 Ciclo vital y estacional. *H. obscurus* comienza su ciclo vital en primavera cuando ocurre la oviposición, cuya duración varía entre tres y cuatro meses. Inverna principalmente en estado adulto y el vuelo de dispersión ocurre luego que se ha realizado el apareamiento, a temperaturas ambientales de 20°C (Koehler *et al.*, 1961). En Chile, este periodo se extiende desde la primera semana de octubre hasta la tercera semana de diciembre, con una duración de 60 días aproximadamente (Matamala, 1976; Aguilera, 1989).

González (1989), señala que la postura de huevos se efectúa en la base del cuello de la corona, en los meses de verano después de los vuelos de dispersión que en la Región de La Araucanía se inician en noviembre. La hembra pone los huevos individualmente en el interior de las raíces, en nichos excavados en las paredes de las galerías de oviposición de forma cilíndrica (Koehler *et al.*, 1961). Ambos autores mencionan que la temperatura es un factor determinante para completar el periodo de incubación del estado de huevo. Matamala (1976) indica que el desarrollo del huevo a 20°C tiene una duración aproximada de tres meses. Por su parte, Aguilera (1989) establece que entre 8 a 15 días, dependiendo de la condición ambiental, los huevos alcanzan el estado de larva, la que completa su desarrollo en 65 días, luego de lo cual llega al estado de pupa, de la cual a los 15 días emerge el adulto.

Estudios sobre la biología de *H. obscurus* indican que se comporta como un insecto monovoltino (presenta una generación al año) en Europa, Estados Unidos y Chile (Koehler *et al.*, 1961; Carrillo *et al.*, 1978).

Prado (1991) indica que este insecto inverna en estado adulto, pudiendo hacerlo también en los estados de larva y pupa, sin embargo, Carrillo y Mundaca (1974) en experimentos realizados en la provincia de Malleco y Cautín (Región de La Araucanía), determinaron que *H. obscurus* inverna en la raíz del trébol rosado mayoritariamente en estado adulto y en menor grado como pupa y larva. Los mismos autores señalan que el estado de huevo se encuentra en los meses de primavera y el adulto, larva y pupa durante todo el año (Fig.3).

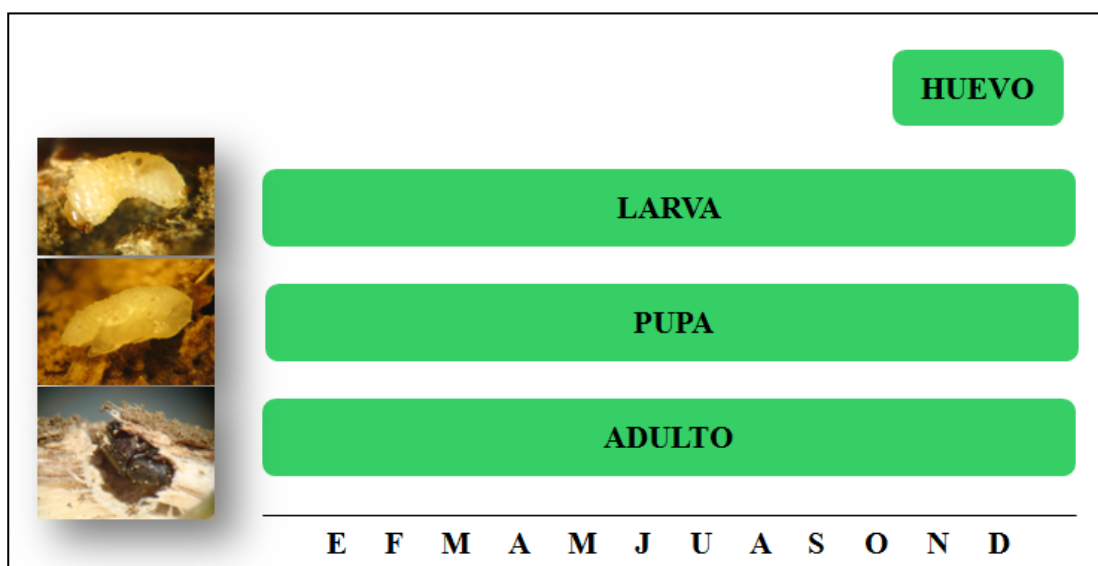


Figura 3. Ciclo estacional de *Hylastinus obscurus*. Modificado de Carrillo y Mundaca (1974).

2.2.4 Daño e intensidad de ataque de *H. obscurus*. Carrillo y Mundaca (1974) señalan a *T. pratense* L. y *Medicago sativa* L. como hospedero de *H. obscurus*, sin ser considerada plaga en la segunda especie. Reportes bibliográficos han señalado que existe una estrecha relación entre plantas muertas y la presencia de *H. obscurus*, indicando a este insecto como la principal causa en la disminución de persistencia del cultivo en praderas (Ortega, 1996; Steiner y Alderman, 2003). En cuanto al ataque de este insecto a las praderas, Ruíz (1988) señala que el ataque ocurre al año siguiente de establecido el trébol, generando un gran número de galerías en las raíces. Por otra parte, González (1989) señala que el insecto ataca exclusivamente aquellas praderas de más de dos años de edad. Aguilera *et al.* (1996) señalan que el insecto ataca las praderas al año siguiente de establecida la pastura, produciendo un gran número de galerías en las raíces, por otra parte Alarcón *et al.* (2010) advierten que la colonización de *H. obscurus* comienza cuando las plantas tienen seis meses de edad.

El daño ocasionado a la planta se debe a la formación de galerías en las raíces, el cual es producido por los estados de larva y adulto (Koehler *et al.*, 1961). Estos estados se alimentan de tejidos radicales, corteza y también del *cámbium* lo que facilita la entrada de agentes patógenos al interior de la raíz. Lo anterior provoca alteraciones en el normal almacenamiento de carbohidratos y en el sistema de transporte de nutrientes y agua desde el suelo (Cisternas y Norambuena, 1991). Las galerías excavadas por insectos xilófagos no solos los provee de alimento, sino que además les otorgan protección ante cualquier ataque de predadores de mayor tamaño (Toro *et al.*, 2004). Las plantas dañadas son altamente susceptibles al descalce por heladas o desarraigamiento por pastoreo (Carrillo y Mundaca, 1974; Matamala, 1976). Matamala (1976) afirma que el daño no es tan severo en plantas que desarrollan más de una raíz, lo que es más común en suelos francos, y menos frecuente en suelos arcillosos.

La densidad de insectos por raíz puede variar entre 1 a 40, siendo más frecuente entre 1 y 5, lo cual está correlacionado significativamente con el diámetro de la corona, es decir, a mayor diámetro de la corona, mayor será el número de insectos por raíz (Koehler *et al.*, 1961; Carrillo y Mundaca, 1974; Matamala, 1976).

2.2.5 Métodos de control sobre *H. obscurus*.

2.2.5.1 Control cultural. El control de *H. obscurus* estaría asociado al cambio de algunas prácticas agrícolas, entre las cuales se encuentra la rotación de cultivos (Koehler *et al.*, 1961). Torres y Sierra (1991) señalan que entre las medidas que podrían disminuir la infestación, aumentando la persistencia del trébol rosado estarían:

- Desarrollar el cultivo en suelos francos, donde la planta podrá desarrollar un mayor número de raíces.
- Rotura de praderas que tengan una alta infestación de insectos, provocando la muerte de estos mismos en su estado inmaduro por desecación.
- No realizar siembras de trébol rosado adyacentes o cercanas a otras de mayor edad ya que estos posibilitarían una más rápida infestación.

- Establecer mezclas forrajeras y rotaciones más cortas (Carrillo, 1986).

2.2.5.2 Control biológico. Prado (1991), indica que no existen controladores biológicos de *H. obscurus* en Chile. El control natural ejercido por algunos insectos, aves y hongos no juega un rol significativo (Darlane y Morrison, 1957).

2.2.5.3 Control químico. Matamala (1976) y Carrillo (1986) señalan que no existe eficiencia en la aplicación de control químico sobre esta especie. Por otra parte Torres y Sierra (1991) señalan que el control químico no es recomendable, debido al largo periodo de vuelo del insecto y su ubicación en el interior de las raíces representa una seria limitante para un control eficiente.

2.3 Antecedentes sobre la interacción química entre *H. obscurus* y trébol rosado

Kamm y Buttery (1984), informaron la preferencia de *H. obscurus* por 10 de 15 compuestos químicos provenientes de raíces sanas del trébol rosado y por 1 de 23 compuestos provenientes de las hojas. Entre las sustancias presentes en las raíces que resultaron ser atrayentes se detectó eugenol, estragol y acetol, mientras que la sustancia atrayente proveniente de las hojas fue salicilato de metilo. Sin embargo, en este estudio, los insectos adultos no mostraron preferencia por compuestos individuales o sus mezclas en ensayos preliminares de campo, por lo que estos autores señalan que la respuesta del insecto en esa condición, puede ser una respuesta global hacia los volátiles asociados al trébol, y no a una respuesta específica por compuestos individuales. Cabe hacer notar que en este estudio los autores utilizaron plantas con daño severo para aislar e identificar compuestos. Según Price *et al.* (1980) cuando las plantas son dañadas por herbívoros se activan múltiples mecanismos de defensa que pueden clasificarse como defensa directa e indirecta. La defensa directa es aquellas que previene el ataque de herbívoros a través de características físicas, como espinas, tricomas y sustancias químicas, como ceras y compuestos volátiles los cuales son sintetizados por el metabolismo secundario de la planta, o a través de proteínas de defensa especializadas, tales como inhibidores de proteasas (Arimura *et al.*, 2005). La defensa indirecta involucra la emisión de volátiles que atraen a enemigos naturales, que se alimentan del herbívoro en sus diferentes estados de desarrollo,

disminuyendo el número de individuos plaga (Dicke, 1999; Kessler y Baldwin, 2001; Neveau *et al.*, 2002; Köllner *et al.* 2004; Arimura *et al.*, 2005). Tanto la estrategia directa como indirecta pueden ser inducidas (Arimura *et al.*, 2005).

Paré y Tumlinson (1999) señalan que los compuestos volátiles emitidos por la planta, se mantienen en un nivel básico siendo liberados o mantenidos como reserva química. Son mezclas complejas, a menudo con más de 100 compuestos diferentes, los cuales también son producidos pero en menor cantidad (Dicke, 1999). Se ha determinado que compuestos volátiles de plantas de dos años de edad participan en la elección del hospedero por parte de *H. obscurus* (Pinilla, 2003; Quiroz *et al.*, 2005). Por otra parte, el aceite esencial de la parte foliar del trébol rosado de dos años produce un efecto atrayente hacia *H. obscurus* (Quiroz *et al.*, 2005). Tapia *et al.* (2007) informaron que este curculiónido fue atraído por volátiles provenientes de extractos etanólicos de raíces de trébol rosado de 1,5 años de edad. Recientemente, Manosalva *et al.* (2011) identificaron y cuantificaron ácidos grasos extraídos desde raíces de trébol rosado, los que resultaron ser significativamente atrayentes para hembras de *H. obscurus*.

Manosalva *et al.* (2011) llevaron a cabo un análisis químico cualitativo de extractos radicales de plantas jóvenes de trébol rosado, las cuales fueron colectadas entre los 3 y 13 meses de edad. Éstos extractos se obtuvieron mediante la extracción con diclorometano (CH_2Cl_2) lo cual permitió obtener compuestos volátiles y ácidos grasos. Entre los volátiles identificados se encontraron 2-pentanona, 3-octanol, 1-octeno, carveol, eucaliptol, limoneno, maltol, 1-tridecanol, 2-metoxi-4-vinifenol, 1-hexadecanol, longipineno epóxido, pentadecanal y los ácidos grasos, láurico, mirístico, Z-11-hexadecanoico, palmítico, oleico y esteárico. Por otra parte, se ha reportado que hembras de *H. obscurus* reconocen ácidos grasos presentes en las raíces de trébol rosado mediante receptores olfativos y de contacto, mientras que los individuos de sexo masculino solo fueron capaces de percibir estos compuestos a través de los receptores de contacto. Estos resultados, permitieron a los autores inferir que los ácidos grasos presentes en las raíces del trébol rosado pueden actuar como señales olfativas y táctiles de corto alcance las cuales participarían en el reconocimiento de hospedero y/o los procesos de aceptación por parte de este insecto (Manosalva *et al.*, 2011).

Schoonhoven *et al.* (1998) clasificaron los compuestos químicos provenientes de la planta en cuatro grupos, según la respuesta que causaban estos en el insecto: atrayentes, repelentes, fagoestimulantes (estimulantes de la alimentación) y fagoinhibidores (disuasivo de la alimentación). Los atrayentes son aquellos compuestos volátiles que provocan que el insecto dirija sus movimientos hacia la fuente de emisión. Serna y Correa (2003) señalan que los repelentes son aquellas sustancias que provocan una respuesta motriz orientada en sentido opuesto al origen del estímulo. Un fagoestimulante es aquel metabolito de origen natural que, al contacto con los palpos labiales y maxilares de los insectos incentiva el consumo. Por el contrario, un fagoinhibidor produce un rechazo de consumo del alimento (Dethier *et al.*, 1960).

2.4 Uso de dietas para el control de plagas.

Cohen (2001) explica que, si bien por mucho tiempo en la crianza de insectos se han confundido las disciplinas de nutrición y dietética, en general la primera ha sido una ciencia destinada a comprender los requisitos y funciones de los componentes de los alimentos, mientras que la dietética es una aplicación más práctica en la cual se busca desarrollar dietas. Lo anterior considerando que el término “dieta” se refiere al plan de alimentación diaria del insecto en un acto voluntario en el cual toman alimentos del ambiente.

Singh (1977) observó que el término dieta era utilizado a menudo de forma muy ambigua e imprecisa. Aquellas dietas que contienen almidón, caseína ó germen de trigo, se describen como “dietas químicamente definidas”. Para otros autores aquella dieta que consistía en una mezcla de sustancias nutritivas y a las cuales se les añadía una preparación vegetal con levadura, vitaminas ó azúcar era una “dieta sintética”. Para otros una dieta sintética consiste en una mezcla solo de productos químicos. Sin embargo, Dougherty (1959) proporciona una definición lógica y concisa la cual ha sido utilizada por muchos autores para poder dar un significado coherente a la terminología de formulación de dietas. Este autor describe las dietas en: 1) “dietas holídicas” como aquella cuyos componentes son completamente conocidos, 2) “dietas oligídicas” como aquellas cuyo componentes no son totalmente conocidos o que incluso no están bien caracterizados y que además incluye ingredientes crudos y, 3) “dietas merídicas” que son

aquellas que contienen componentes definidos y otros componentes no definidos por lo que esta dieta se puede considerar como una dieta intermedia entre las dietas holídica y oligídica.

2.4.1 Dietas artificiales. Según Vanderzant (1966), el término “dieta artificial”, cuando se aplica a insectos, es definido como cualquier dieta que no es el alimento natural del insecto, por lo que, este nombre engloba diversos términos, tales como sintética, químicamente definido, holídica, merídica y oligídica.

A principios de la década del 50', las dietas artificiales fueron desarrolladas para muchas especies, lo cual resultó ser más difícil de lo que se pensó inicialmente. Esto se debió a dos características de la planta que son difíciles de imitar en una dieta artificial; primero, las plantas proporcionan un sustrato seco a sus herbívoros a pesar de su alto contenido de agua que puede llegar hasta un 90% del peso total, debido a que el alimento vegetal es esencialmente un líquido envasado en microcápsulas (células) dándole un exterior seco. Segundo, físicamente la estructura química de las microcápsulas evita que los microorganismos invadan los contenidos celulares, los cuales son altamente nutritivos. Es por esto que para imitar la superficie firme de la planta se le otorga rigidez a las dietas artificiales mediante la incorporación de agar, celulosa u otras sustancias que son nutricionalmente inertes pero que añaden textura a los alimentos líquidos. Además proporcionan fibra, la cual ayuda al paso del alimento a través del intestino (Schoonhoven *et al.*, 1998).

Las distintas especies insectiles suelen tener ligeras diferencias en sus requerimientos nutricionales. Pequeños cambios en la composición de la dieta puede tener efectos drásticos en el rendimiento del insecto, lo cual incluye reproducción y crecimiento. Lo anterior, también se puede ver seriamente afectado en función de la calidad de la dieta, el origen y almacenamiento de los ingredientes que la componen, así como variaciones en la preparación (Schoonhoven *et al.*, 1998). Esto mismos autores afirman que las dietas artificiales de composición química conocida han demostrado ser una herramienta indispensable para estudiar la relación entre el insecto y su hospedero ya que el material vegetal es difícil de estandarizar debido a que las

plantas y sus órganos pueden variar en gran medida, con la estación y etapa de desarrollo, por lo que la dieta artificial permite tener un control preciso de los factores nutricionales.

2.4.2 Fagoestimulantes. Los principales fagoestimulantes son nutrientes, especialmente azúcares, los cuales son capaces de estimular la alimentación de distintas especies, siendo sacarosa y fructosa las más efectivas. Los insectos también pueden probar algunos aminoácidos, los cuales también tienen un efecto fagoestimulante pero menor en comparación con los azúcares. A pesar de la importancia de las proteínas nutritivas, aún no se ha evidenciado que puedan degustarlas (Bernays *et al.*, 1994). Algunos autores señalan que en dietas artificiales es conveniente añadir algún extracto o parte de la planta hospedera, lo cual cumpliría la función de un fagoestimulante (Hsiao *et al.*, 1974; Necibi *et al.*, 1997).

2.4.3 Antialimentario. Las plantas están dotadas de mecanismos físicos y químicos para defenderse de sus enemigos. Respecto a los mecanismos químicos, Coll (1988) planteó que las sustancias antialimentarias se clasifican sobre la base de estructura química que éstas tengan, como: terpenos, sesquiterpenos, clerodia, diterpenos, compuestos heterocíclicos, compuestos aromáticos y esteroides (Tabla 1). Todas estas sustancias tienen como función evitar o interrumpir el proceso de alimentación del insecto después de un consumo inicial y de esa forma conducen a la muerte por inanición (Alonso, 1998).

Tabla 1. Sustancias antialimentarias según su naturaleza química (Alonso, 1998).

Sustancias antialimentarias según su naturaleza química	Ejemplo
Terpenos	Azadiractina, sintetizada principalmente por frutos de <i>Azadirachta indica</i> .
Sesquiterpenos	Compuestos sintetizados por <i>Wasburgia ugandensis</i> y <i>W. stuhlmanii</i> (Canellaceae).
Clerodia y Diterpenos	Ambos sintetizados por <i>Clerodendrum</i> sp. de la familia Verbenaceae.
Compuestos Heterocíclicos	Cucumarinas, flavonoides, lignanos y taninos.
Compuestos Aromáticos	Fenoles, quinonas, ácidos fenólicos y alcaloides.
Esteroides	Formononetina

2.4.3.1 Azadiractina. Es el principal compuesto de la especie arbórea denominada comúnmente “Neem”, (*Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae)). Es un árbol nativo de India y que se ha difundido en países de Asia, África, América del Sur y Australia (Srivastava *et al.*, 1997). Schmutterer (1990) señala que esta especie se destaca por ser una de las plantas con mayor potencial para la producción de bioinsecticidas, siendo capaz de ejercer su acción insecticida en más de 400 especies de plagas en el mundo (Nathan *et al.*, 2005; Isman, 2006).

Los productos derivados del Neem son muy efectivos como plaguicidas debido a los efectos que provoca en los diferentes estados del crecimiento de los insectos, actuando como antialimentario y repelente en los órdenes Coleoptera, Homoptera, Orthoptera, Hemiptera, Lepidoptera, entre otros (Capataz *et al.*, 2002). Las propiedades del Neem podrían estar basadas en el parecido de sus componentes con las hormonas de los insectos y éstos al absorber los metabolitos del Neem bloquean su sistema endocrino (Trujillo *et al.*, 2008).

La azadiractina es sintetizada principalmente en los frutos de *A. indica*, y es responsable de la acción insecticida de la planta (Nathan *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2003). Este compuesto inhibe el crecimiento de insectos, reduce la fertilidad en hembras, afecta la sobrevivencia, causa repelencia e inhibe la alimentación y causa anomalías anatómicas en distintas especies insectílicas (Isman, 2006; Martínez y Van Emden, 1999). Además provoca efectos histopatológicos dañinos en tejidos celulares de insectos, como glándulas productoras de neurohormonas (Sayah, 2002), tejidos reproductivos (Sayah *et al.*, 1996; Lucatoni *et al.*, 2006) y células epiteliales del intestino (Ndione *et al.*, 2007). También se ha comprobado que afecta el metabolismo de las proteínas en los insectos (Huang *et al.*, 2007; Yasmin *et al.*, 2008).

La azadiractina ha sido probada en más de 600 especies de insectos, encontrándose activa sobre unas 500 especies que han resultado sensibles en un rango de aplicación de entre 1 y 10 ppm (Murillo y Salazar, 2011) lo cual brinda pleno respaldo a la utilización de este compuesto como control positivo en la función de antilalimentario.

2.5 Mecanismos directos de defensa de las plantas frente a insectos herbívoros.

Comprende características de las plantas que afectan negativamente el rendimiento de los insectos (tasa de crecimiento, éxito reproductivo y desarrollo) y la preferencia de éstos (selección de la planta hospedera, oviposición y conducta alimentaria), teniendo como resultado una mayor adecuación de las plantas a un ambiente hostil (Gregg y Schaller, 2008). Estos rasgos incluyen características morfológicas para la defensa física tales como espinas, tricomas, ceras epicuticulares, cristales de cera, durezas de tejidos, así como las estructuras secretoras y conductos de resinas o látex. También incluye compuestos para la defensa química, tales como metabolitos secundarios, proteínas que reducen la digestibilidad y enzimas antinutritivas (Gregg y Schaller, 2008). Estos rasgos pueden ser la resistencia expresada por factores preformados o son inducidas ya que son desplegadas sólo después del ataque de insectos herbívoros (Stahl, 1998). Schoonhoven *et al.* (2005) afirman que el éxito de las plantas se basa en la capacidad de seguir evolucionando en ambientes variables y desfavorables gracias a la combinación y eficacia de los sistemas de defensa físicos, químicos y de desarrollo.

Una consecuencia directa medida por el daño producido por herbívoros es la acumulación de inhibidores de quimotripsina y tripsina tal como proteasas de serina, lo cual ha sido reportado por Green y Ryan (1972) en tejidos aéreos de plantas de tomate y papa. Como consecuencia, estos mismos autores sugieren que la expresión de inhibidores de la proteinasa puede estar regulada en las hojas para hacer a la planta menos apetecible y quizás letal para insectos invasores ya que afecta de forma directa la calidad nutricional del follaje el cual es un determinante importante del crecimiento y desarrollo del herbívoro (Painter, 1936; Berenbaum, 1995).

Otro componente de la superficie de la planta que sirve como defensa incluyen: 1) espinas, las cuales están dirigidas contra los herbívoros mamíferos, 2) tricomas, que son eficaces contra insectos (Myers y Bazely, 1991; Schoonhoven *et al.*, 2005). Howlett *et al.* (2001) señalan que la dureza de la hoja se correlaciona con la resistencia a insectos y es un buen predictor de herbivoría. En relación a lo anterior, Schoonhoven *et al.* (2005) sostienen que este rasgo es un ejemplo para distinguir claramente entre factores físicos y químicos de resistencia ya que el refuerzo de la pared celular de las hojas se debe a la deposición de productos químicos, incluyendo macromoléculas tales como lignina, celulosa, suberina, moléculas orgánicas pequeñas y moléculas inorgánicas tales como fenoles y partículas de sílice, respectivamente

Berryman (1972) destaca otra forma bien establecida y muy apreciada de protección anatómica que es la base de la defensa en coníferas, refiriéndose a la resina. La resina es una mezcla de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y ácidos de resina, la cual se acumula en conductos y estructuras secretoras. Los escarabajos de la corteza y otros insectos que se encuentran en el ducto de la resina son expulsados y tras la exposición al aire, se evapora una fracción del monoterpeno que es altamente volátil lo que deja a los insectos atrapados en los ácidos de la resina solidificada (Phillips y Croteau, 1999; Trapp *et al.*, 2001).

2.6 Planteamiento del problema.

En base a los antecedentes discutidos anteriormente, el principal problema que presenta *T. pratense* es su baja persistencia, a pesar de su condición de ser considerada una planta forrajera perenne de vida corta. Esto se debe principalmente a la infestación por parte de *H. obscurus* el cual provoca daños severos a la parte radicular de la planta lo cual se traduce en una alta mortalidad de estas. A su vez, el trébol rosado genera compuestos entre los cuales se encuentran ácidos grasos como el ácido oleico, palmítico y láurico los cuales han resultado ser atractivos para hembras de *H. obscurus*. Pese a lo anteriormente señalado, no existen reportes que acrediten que los compuestos mencionados cumplan un rol fagoestimulante o antialimentario sobre *H. obscurus*, por lo cual se evaluó el comportamiento que tuvo este insecto frente a dietas artificiales suplementadas con esos ácidos grasos, lo cual en la práctica podría ser un referente para estimar niveles de susceptibilidad del trébol rosado a la infestación por parte de este insecto.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de obtención de material biológico.

El material vegetal, ya sea plantas e insectos, fueron obtenidos desde parcelas experimentales ubicadas en el Centro Regional de Investigación Carillanca, perteneciente al Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, ubicado en el kilómetro 10 del camino Cajón-Vilcún, Región de La Araucanía ($38^{\circ} 41' \text{ L.S.} / 75^{\circ} 25' \text{ L.O.} / 200 \text{ msnm}$).

3.1.1 Obtención de plantas de trébol rosado. Una vez por semana se efectuaron salidas a terreno para la recolección de plantas de trébol que presentaran infestación por *H. obscurus*. Estas plantas fueron extraídas de forma manual con una pala metálica (32 x 18 cm) de tal forma de extraer su raíz completa y sin daño (Fig. 4). Luego, estas plantas fueron depositadas en bolsas de polietileno (60 x 42 cm) para luego ser trasladadas al Laboratorio de Química Ecológica de la Universidad de La Frontera, para su posterior revisión.



Figura 4. Extracción de plantas de trébol rosado desde parcelas experimentales.

3.1.2 Obtención y mantenimiento de *H. obscurus*. De las plantas obtenidas anteriormente, se eliminó la parte aérea dejando solo las raíces las cuales con un bisturí se disectaron para facilitar la detección de *H. obscurus*. Éstos fueron extraídos desde la raíz con ayuda de una pinza metálica punta roma, para posteriormente ser depositados en un disco de Petri de 5,5 cm de diámetro por 1,5 cm de alto. Una vez que se contó con la cantidad de insectos necesarios, fueron depositados en otro disco de Petri que en su interior contenía un papel humedecido y trozos de raíces sanas (4°C). Estas raíces fueron retiradas 24 horas antes de realizar los bioensayos de alimentación (Fig. 5).

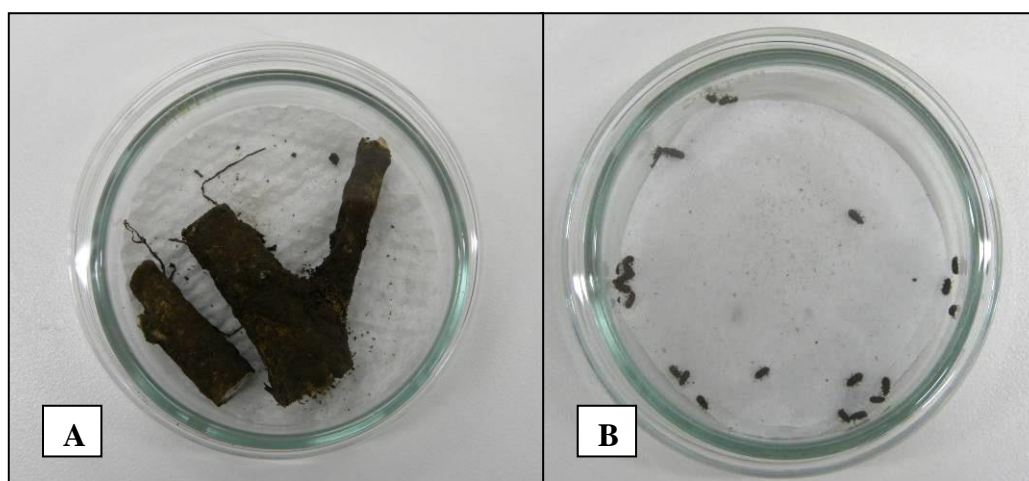


Figura 5. A) Disco de Petri con papel humedecido, raíces de trébol rosado e insectos; B) Disco de Petri con papel humedecido e insectos.

3.2 Elección y preparación de dietas artificiales.

Debido a los distintos reportes en la literatura, se establecieron dos posibles dietas a utilizar, las cuales ya han sido probadas en otros escolítidos. Faccoli *et al.* (2005) propusieron una dieta compuesta por agua (87,6%), celulosa (2%), glucosa (2,6%), almidón (4,3%) y agar (3,5%), mientras que Sallé y Raffa (2007) sugieren una dieta basada solo en agar. La preparación consistió en pesar en una balanza analítica Rodwag modelo AS 220/C/2 los componentes de las dietas para luego ser vertidos en frascos Schott de 40 ml en donde se mezclaron con 35 ml de agua destilada. Luego, estos frascos fueron esterilizados en el autoclave All American modelo 25x Electric Pressure Steam Sterilizer durante 15 minutos a 121°C con 1,5 atm de presión.

Mientras se esterilizaba parte del material en el autoclave, se depositó bajo la campana de flujo laminar vertical Zhicheng modelo ZHJH-C1112C Clean Bench el resto del material a esterilizar utilizando luz UV (Fig. 6). Una vez esterilizado todo el material se procedió a verter 400 μ L de dieta líquida de agar puro (n=30) o dieta compuesta (n=30) en capilares de vidrio (2,5 cm de largo x 6 mm de diámetro interno) (Fig. 9), los cuales se fijaron en un soporte de plumavit. Posteriormente se registró el peso inicial de un insecto el cual fue pesado en la microbalanza Sartorius CP2P (d = 0,005 mg) (Fig. 7). El peso del insecto fue evaluado cada 24 h durante 9 días. Cada 24 h se renovó la dieta.



Figura 6. A) Frasco Schott de 40 mL; B) Autoclave All American modelo 25x Electric Pressure Steam Sterilizer; C) Balanza analítica Rodwag modelo AS 220/C/2; D) Campana de flujo laminar vertical Zhicheng modelo ZHJH-C1112C Clean bench.



Figura 7. Microbalanza Sartorius CP2P.

3.3 Bioensayos de alimentación en dietas artificiales.

Este bioensayo se realizó vertiendo 400 μL de dieta fresca líquida dentro del capilar procurando no dejar burbujas. Inmediatamente se adicionó 10 μL de cada compuesto y concentración, homogenizando la mezcla con ayuda de una pipeta Pasteur. Una vez solidificada la dieta (15 por concentración y 5 por control), los insectos a utilizar por tratamiento fueron pesados (Peso Inicial = P_i) en la microbalanza, para posteriormente fijar los capilares en un soporte de plumavit (Fig. 8) e introducir con ayuda de una pinza metálica un insecto a cada capilar, los cuales fueron sellados con parafilm y teflón AQUATEC $\frac{3}{4}$ "x 50 m dejando un pequeño orificio para permitir la entrada de oxígeno (Fig. 9). Todos los tratamientos fueron mantenidos a temperatura ambiente y en oscuridad.



Figura 8. Bioensayo de alimentación montado.

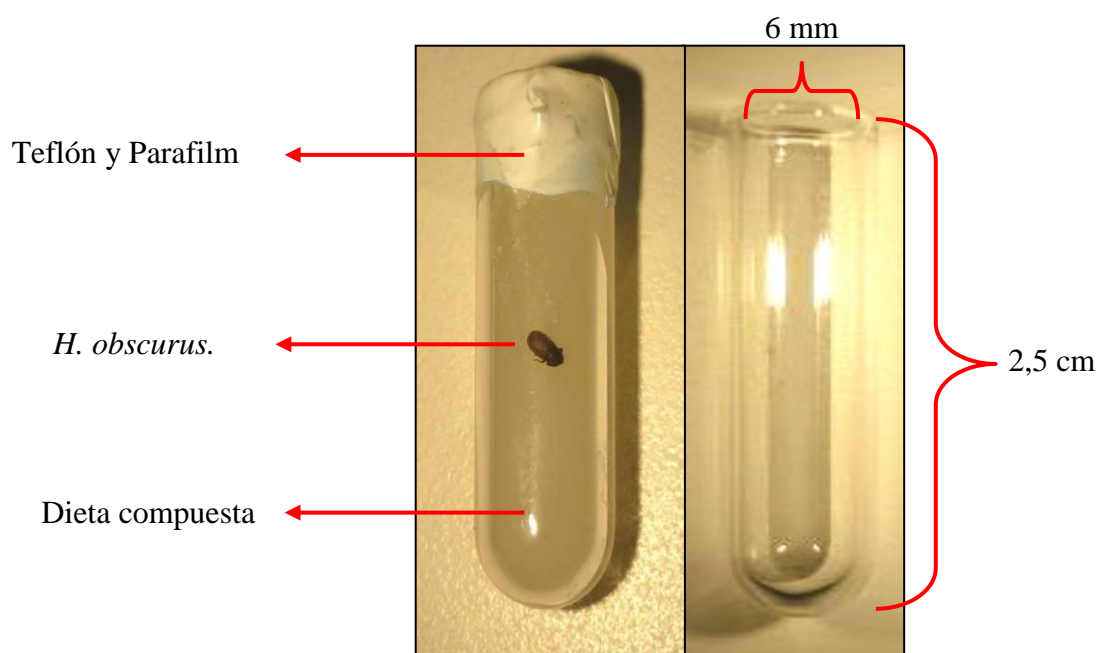


Figura 9. A) Capilar que contiene la dieta artificial con el insecto; B) Capilar sin dieta.

La evaluación del consumo se realizó pasado cinco días. Para ello, los insectos fueron retirados de cada capilar y pesados nuevamente (Peso Final = P_f).

3.3.1 Controles realizados en los bioensayos de alimentación. El primer control consistió en utilizar el capilar sin dieta (Fig. 9B). Para ello, se introdujo un insecto previamente pesado dentro de un capilar, éstos fueron sellados con parafilm y teflón para posteriormente dejarlos a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad durante cinco días ($n = 10$). Pasado este periodo, se registraron los pesos finales de los insectos (P_f).

El segundo control consistió en utilizar sólo dieta ($n = 5$) y para el tercer control la dieta fue suplementada con 10 μ l de etanol el cual fue el solvente utilizado para realizar las distintas soluciones de las concentraciones evaluadas. El único bioensayo que no tuvo un control con etanol fue aquel en el cual se evaluó sacarosa, debido a que este compuesto a diferencia de los demás fue disuelto en agua.

El consumo de *H. obscurus* fue evaluado como porcentaje de incremento de peso del insecto, el cual es definido, según Claros *et al.* (2001) como:

$$\text{Crecimiento del insecto (\%)} = \left(\frac{P_f - P_i}{P_f} \right) \times 100$$

3.3.2 Compuestos a evaluar. Los compuestos utilizados en los bioensayos de alimentación fueron los ácidos grasos oleico, láurico y palmítico (Cayman Chemical Company, ~98% de pureza), además de sacarosa (Arquimed, ~99% de pureza) y azadiractina (Sigma, ~95% de pureza). Estos dos últimos se utilizaron como controles positivos, siendo la sacarosa utilizada como fagoestimulantes y la azadiractina como antialimentario.

En el caso de la sacarosa y los ácidos grasos se utilizaron soluciones en concentración de 100, 500, 1.000, 5.000 y 10.000 ppm según lo reportado por Manosalva *et al.* (2011). Cada concentración fue probada en 15 unidades muestrales. Por otra parte, azadiractina fue utilizada a una concentración de 10 ppm según lo reportado por Lynn *et al.* (2010), la cual fue probada en 20 unidades muestrales.

3.4 Conservación y determinación del sexo de *H. obscurus*.

Una vez finalizados los bioensayos de alimentación, los insectos utilizados en éstos fueron depositados en tubos Eppendorf de 0,5 mL en el cual se añadió solución Kahle para conservar los insectos. Luego, los insectos fueron colocados sobre una placa de cera la cual se ubicó bajo una lupa binocular donde se realizó un corte transversal en la zona abdominal de *H. obscurus*. Posteriormente, se removió el exoesqueleto para el reconocimiento de los órganos reproductivos (Fig. 10) según la metodología descrita por Carrillo *et al.* (1978) y modificada por Luchsinger (2007).

3.5 Diseño experimental y análisis estadístico.

El diseño experimental de los bioensayos de alimentación fue completamente al azar ya que los insectos utilizados en este estudio no tuvieron una selección previa.

Se utilizó análisis de Regresión Lineal Simple para la determinación de la dieta adecuada para ser utilizada en los bioensayos de alimentación. Para la evaluación de los distintos compuestos incorporados en la dieta se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Conover-Inman ($P < 0,05$). Para determinar si hubo diferencias en el crecimiento del insecto en ambos sexos, se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney. Finalmente para el bioensayo con azadiractina, se utilizó la prueba de Wilcoxon.

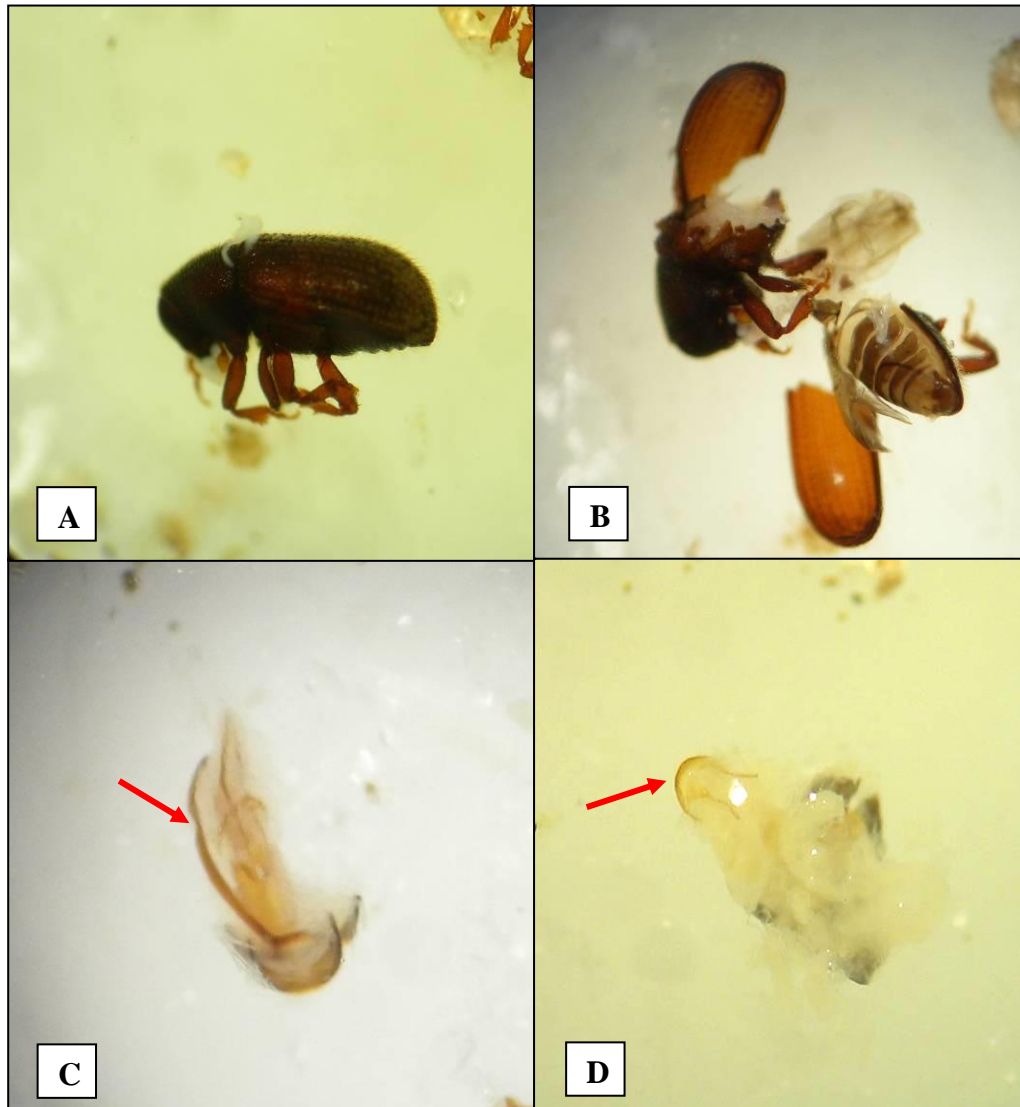


Figura 10. A) *H. obscurus* bajo la lupa; B) *H. obscurus* disectado; C) Edeago; D) Órgano reproductor femenino.

4. RESULTADOS

4.1 Control sin dieta.

Este tratamiento consistió en mantener al insecto durante nueve días al interior de un capilar, en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente y sin alimento. La Fig. 11 muestra la disminución de peso de los insectos a través de los días de evaluación.

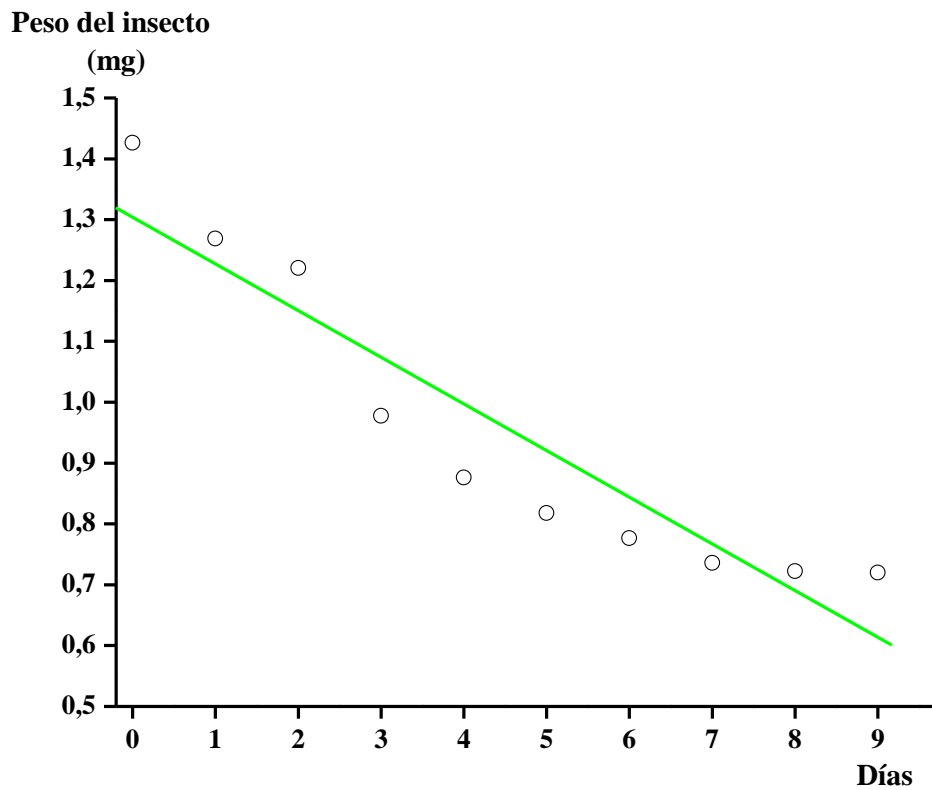


Figura 11. Efecto del control sin dieta sobre *H. obscurus*. Gráfico de dispersión obtenido por análisis de Regresión Lineal Simple. $R = -0,938332$ ($n = 10$).

4.2 Elección de la dieta a utilizar.

4.2.1 Efecto de la dieta agar sobre *H. obscurus*. La Fig. 12 muestra la respuesta del insecto frente a la dieta de agar usando como referencia la variación de su peso a través de los días de evaluación.

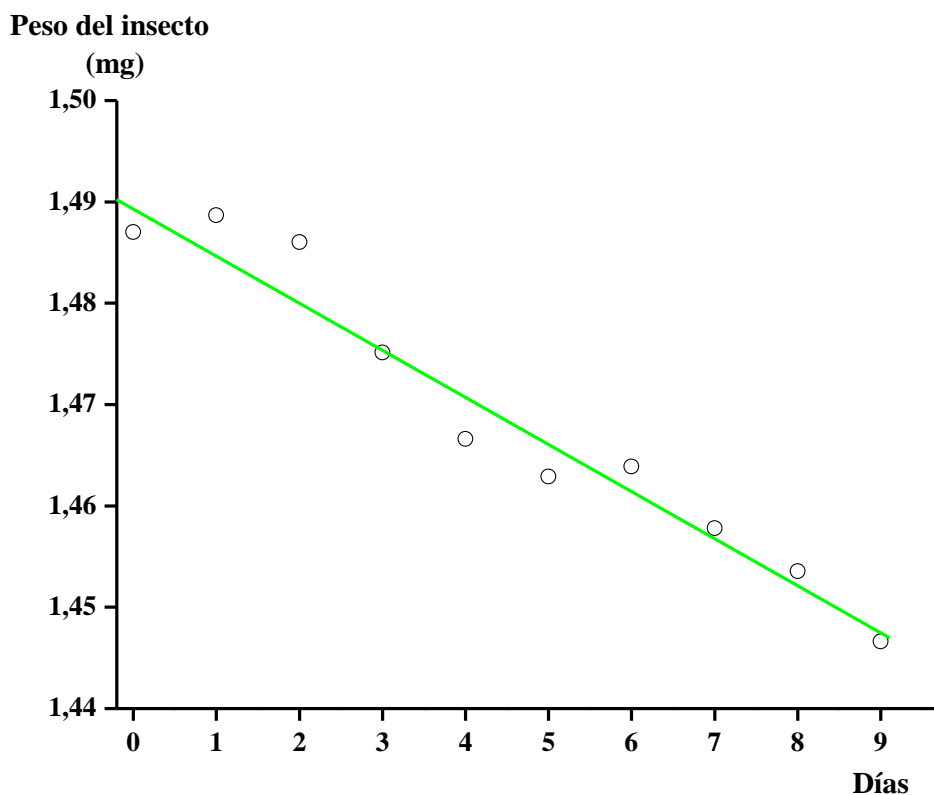


Figura 12. Efecto de la dieta agar sobre *H. obscurus*. Gráfico de dispersión obtenido por análisis de Regresión Lineal Simple. $R = -0,976341$ ($n = 30$).

4.2.2 Efecto de la dieta compuesta sobre *H. obscurus*. La Fig. 13 muestra la respuesta del insecto frente a la dieta compuesta usando como referencia la variación de su peso a través de los días de evaluación.

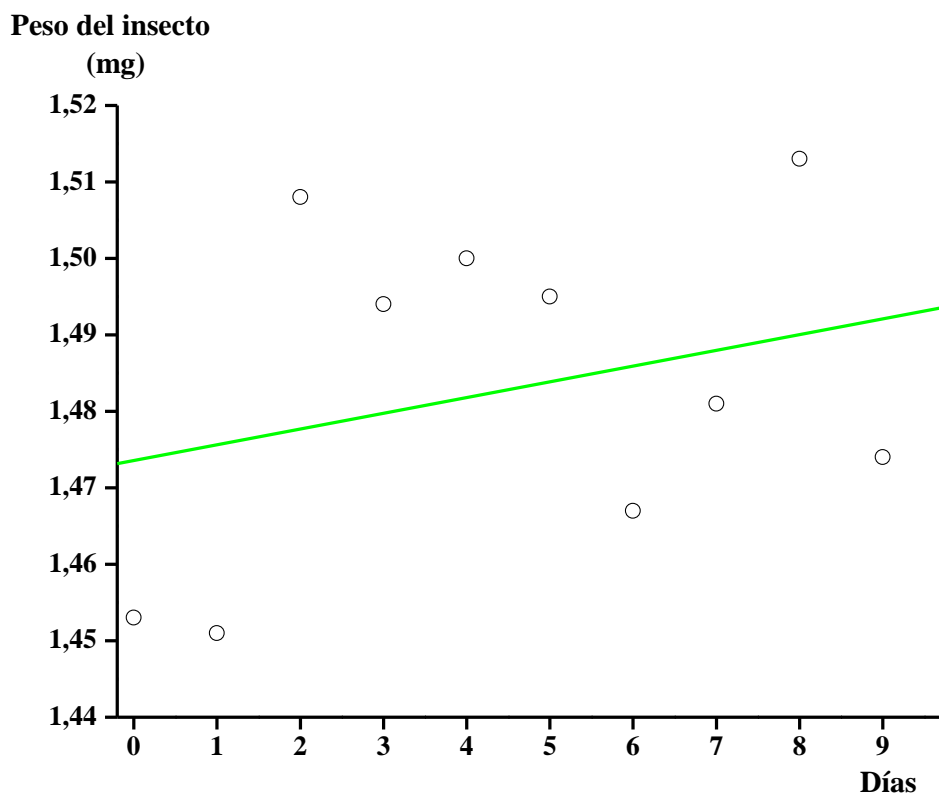


Figura 13. Efecto de la dieta compuesta sobre *H. obscurus*. Gráfico de dispersión obtenido por análisis de Regresión Lineal Simple. $R = 0,335896$ ($n = 30$).

Al evaluar los resultados, se aprecia que fue la dieta compuesta la que permitió que los insectos consumieran y aumentarán su peso una vez finalizado el periodo de evaluación (Fig. 13). Lo contrario ocurrió con la dieta de agar en la cual los insectos disminuyeron su peso durante el periodo de evaluación (Fig. 12). Lo anterior se debe a que el valor “R” obtenido en el análisis de Regresión Lineal Simple, fue negativo (-0,976341) lo cual da cuenta de que una de las variables ($y =$ peso del insecto), decrece a medida que aumenta otra variable ($x =$ días de evaluación), por lo tanto, existe una correlación negativa entre las variables mencionadas.

4.3 Conducta alimentaria de *H. obscurus* en dietas suplementadas con ácidos grasos y sacarosa.

4.3.1 Conducta alimentaria de *H. obscurus* en dietas suplementada con ácidos grasos y sacarosa en solución a 100 ppm. La Fig. 14 muestra la respuesta del insecto frente a las dietas complementadas con ácidos grasos y sacarosa a 100 ppm evaluando la variación de su peso después de 5 días de tratamiento. Como resultado de lo anterior se observa que no hubo diferencias significativas entre sacarosa, ácido oleico y láurico con respecto al aumento de peso del insecto. Sin embargo, se observan diferencias significativas entre esos tres compuestos y el ácido palmítico ($P < 0,05$). Este último ácido indujo una disminución de peso del insecto.

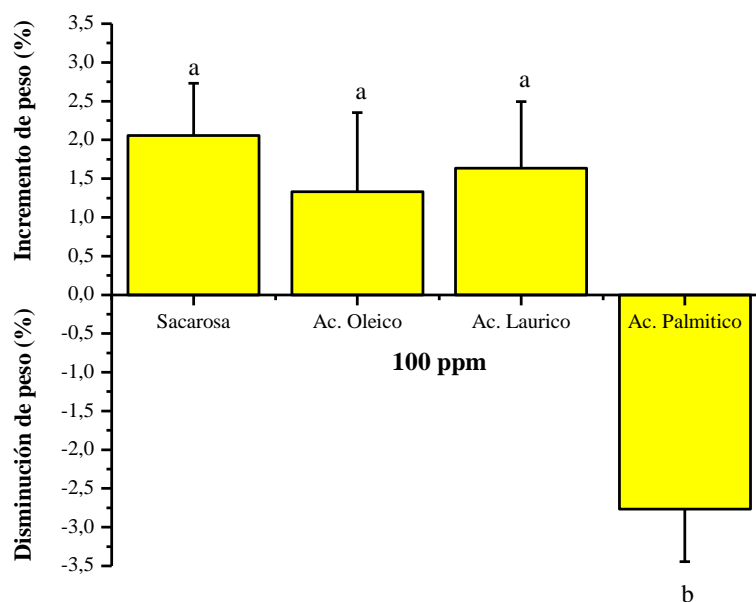


Figura 14. Conducta alimentaria de *H. obscurus* en dietas suplementadas con ácidos grasos y sacarosa en solución a 100 ppm ($n = 15$). Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Kruskal-Wallis seguido por la prueba de Conover-Inman ($P < 0,05$). Las barras representan el error estándar.

4.3.2 Conducta alimentaria de *H. obscurus* en dietas suplementadas con ácidos grasos y sacarosa en solución a 500 ppm. La Fig. 15 muestra la respuesta del insecto frente a las dietas complementadas con ácidos grasos y sacarosa a 500 ppm evaluando la variación de su peso después de 5 días. Como resultado de lo anterior se observa que existen diferencias significativas entre sacarosa y los ácidos grasos ($P < 0,05$). Los ácidos grasos oleico y láurico no presentaron diferencias significativas a pesar de observarse tendencias diferentes. El ácido palmítico en concentración de 500 ppm provocó la misma conducta de no alimentación que en la concentración de 100 ppm (Fig. 14), siendo en este caso significativamente diferente al ácido láurico ($P = 0,0013$), a pesar que este también produjo una disminución del peso en *H. obscurus*.

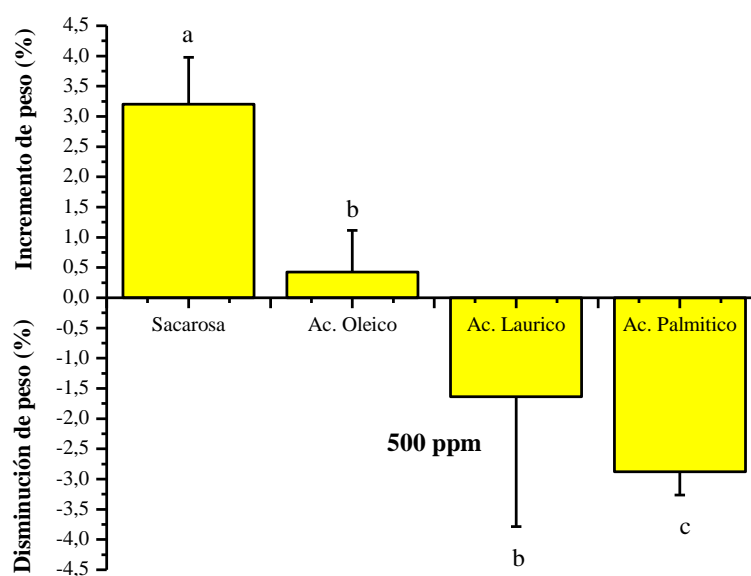


Figura 15. Conducta alimentaria de *H. obscurus* en dietas suplementadas con ácidos grasos y sacarosa en solución a 500 ppm ($n = 15$). Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Kruskal-Wallis seguido por la prueba de Conover-Inman ($P < 0,05$). Las barras representan el error estándar.

4.3.3 Conducta alimentaria de *H. obscurus* en dietas suplementadas con ácidos grasos y sacarosa en solución a 1.000 ppm. La Fig. 16 muestra la respuesta del insecto frente a las dietas complementadas con ácidos grasos y sacarosa a 1.000 ppm evaluando la variación de su peso después de 5 días. Como resultado de lo anterior se observa que no existen diferencias significativas entre sacarosa y los ácidos oleico y láurico con respecto al crecimiento del insecto, sin embargo, existen diferencias significativas ($P < 0,05$) entre esos tres compuestos y el ácido palmítico, observándose la misma conducta que con las dosis anteriores (Figs. 14 y 15), lo cual indicaría que este ácido cumpliría la función de un antialimentario.

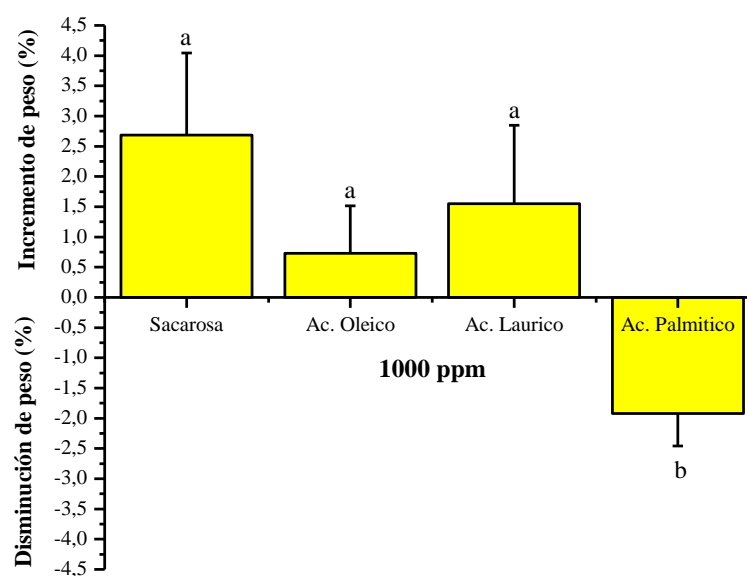


Figura 16. Conducta alimentaria de *H. obscurus* en dietas suplementadas con ácidos grasos y sacarosa en solución a 1000 ppm ($n = 15$). Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Conover-Inman ($P < 0,05$). Las barras representan el error estándar.

4.3.4 Conducta alimentaria de *H. obscurus* en dietas suplementadas con ácidos grasos y sacarosa en solución a 5.000 ppm. La Fig. 17 muestra la respuesta del insecto frente a las dietas complementadas con ácidos grasos y sacarosa a 5.000 ppm evaluando la variación de su peso después de 5 días. En la figura se observa que no hubo diferencias significativas entre los compuestos con respecto al crecimiento de los insectos ($P > 0,05$). Pese a ello, se observa que existe una tendencia antialimentaria del ácido palmítico, ya que es el único compuesto que disminuyó el peso de *H. obscurus*.

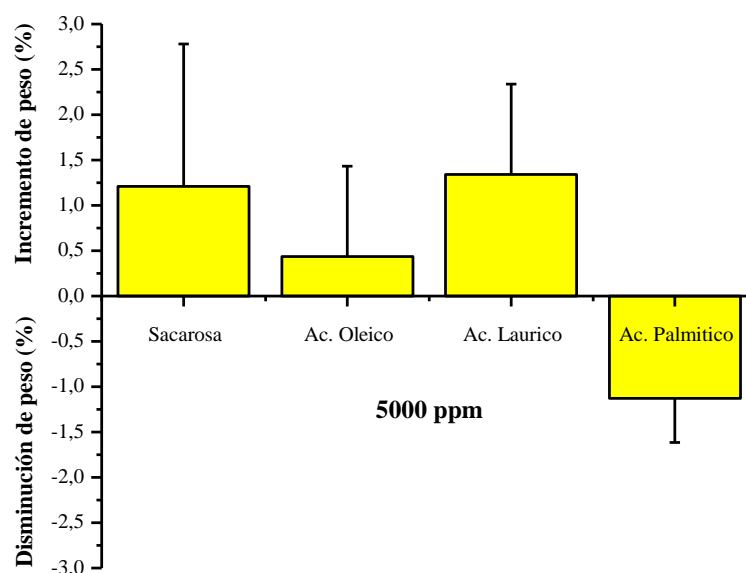


Figura 17. Conducta alimentaria de *H. obscurus* en dietas suplementadas con ácidos grasos y sacarosa en solución a 5.000 ppm (n = 15). Ausencia de letras indican diferencias no significativas según la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Las barras representan el error estándar.

4.3.5 Conducta alimentaria de *H. obscurus* en dietas suplementadas con ácidos grasos y sacarosa en solución a 10.000 ppm. La Fig. 18 muestra la respuesta del insecto frente a las dietas complementadas con ácidos grasos y sacarosa a 10.000 ppm evaluando la variación de su peso después de 5 días. Como resultado de lo anterior se observa que no hubo diferencias significativas entre sacarosa y el ácido láurico los cuales provocaron un incremento de peso en *H. obscurus*. Por el contrario, los ácidos oleico y palmítico provocaron una disminución de peso en el insecto no encontrándose diferencias significativas entre ellos ($P > 0,05$).

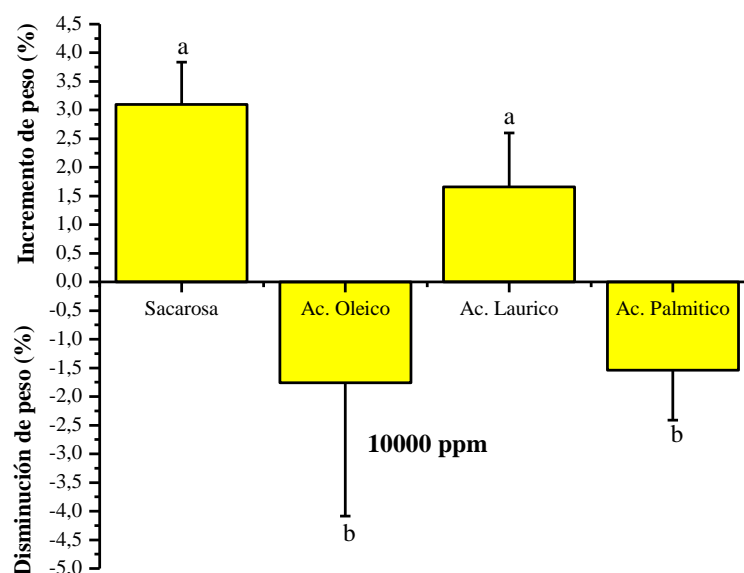


Figura 18. Conducta alimentaria de *H. obscurus* en dietas suplementadas con ácidos grasos y sacarosa en solución a 10.000 ppm ($n = 15$). Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Kruskal-Wallis seguido por la prueba de Conover-Inman ($P < 0,05$). Las barras representan el error estándar.

Como resultado de lo anterior se observó que no hay diferencias significativas en un mismo compuesto a distintas concentraciones con respecto al crecimiento del insecto. Lo mismo ocurrió al evaluar la preferencia de machos y hembras a las distintas concentraciones de ácidos

grasos en donde solo hubo diferencias significativas por parte de los machos al ácido oleico a 500 ppm (datos no mostrados). Sin embargo, en los otros compuestos a distintas concentraciones no hubo diferencias significativas en la preferencia de machos y hembras.

4.4 Conducta alimentaria de *H. obscurus* en dieta suplementada con azadiractina a una concentración de 10 ppm.

La figura 19 muestra la respuesta del insecto frente a una solución de 10 ppm de azadiractina. Como resultado de lo anterior se observó que hubo diferencias significativas entre la azadiractina y su control (dieta compuesta + etanol) ($P < 0,05$) ya que el primer compuesto evitó el crecimiento de *H. obscurus* a diferencia del control. No se encontraron diferencias significativas en la preferencia de machos y hembras frente a la azadiractina.

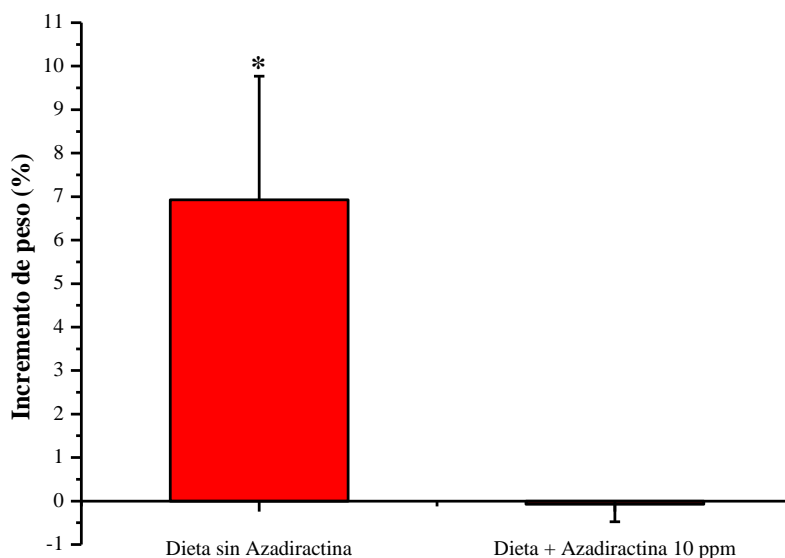


Figura 19. Conducta alimentaria de *H. obscurus* en dieta suplementada con azadiractina a una concentración de 10 ppm (n=20). Asterisco indica diferencia significativa según la prueba de Wilcoxon ($P < 0,05$). Las barras representan el error estándar.

5. DISCUSIÓN

Una de las consideraciones más importante para la crianza de insectos es el tipo de dieta que se suministra a larvas y adultos. Criarlos en su ambiente natural es poco factible por razones como la estacionalidad y la variación en la calidad de la dieta, además de los excesivos costos que esto conlleva (Alfazairy *et al.*, 2012). Es por esto que para la crianza de insectos se provee de dietas artificiales que si bien se parecen muy poco al hospedero natural o fuente de alimento, estas permiten que los insectos crezcan y se desarrollen satisfactoriamente. Sin embargo, estas dietas presentan algunos problemas, como es el caso de insectos masticadores ya que se debe preparar una dieta que no sólo debe ser sólida, sino que además debe presentar un alto contenido de agua (Vanderzant, 1974).

La elección de *H. obscurus* por la dieta compuesta se debe a que ésta contiene entre sus ingredientes glucosa la cual además de cumplir una función nutritiva en el insecto juega un papel fundamental en la composición de glicoproteínas. Estas últimas cumplen una función compleja ya que participan como sitios de reconocimiento de proteínas que a su vez sirven como canales y receptores de los movimientos de sustancias fuera de la célula (Cohen, 2001). En cambio la dieta de agar no proporciona nutriente alguno, lo que concuerda con lo reportado por Schoonhoven (1998) quien indica que el agar es una sustancia nutricionalmente inerte que tiene la función de imitar las partes firmes de la planta otorgando rigidez necesaria a la dieta. Sin embargo, Vanderzant (1969) indica que el agar se ha usado ventajosamente en dietas sólidas, pero que en la práctica no siempre logra dar la textura adecuada y es por esto que se han utilizado materiales más eficaces tales como celulosa, almidones, alginatos y otros hidrocoloides vegetales. Lo anterior concuerda con la elección de la dieta para *H. obscurus* (Fig. 12) puesto que la dieta compuesta presenta entre sus componentes celulosa, con lo cual el insecto podría haber encontrado una textura más atractiva en esta dieta.

Bernays *et al.* (1994) afirman que todas las plantas contienen un conjunto de carbohidratos, aminoácidos y otros compuestos que actúan tanto como nutrientes y fagoestimulantes para los insectos. Uno de los principales fagoestimulantes son azúcares tal como la sacarosa, la cual destaca por ser uno de los fagoestimulantes más efectivos ya que estimula las células receptoras de azúcares en los quimiorreceptores del gusto en las patas y el aparato bucal, los cuales incitan al insecto a alimentarse (Mordue, 1997). Al respecto, los resultados obtenidos en este estudio con la dieta suplementada con sacarosa concuerdan con lo reportado por Bernays *et al.* (1994) debido a que en todos los tratamientos *H. obscurus* aumentó su peso. Similares resultados presentaron aquellas dietas complementadas con los ácidos grasos oleico y láurico, los cuales en la mayoría de las concentraciones probadas permitieron que el insecto tuviese un incremento en su peso. Contrariamente, el ácido graso palmítico en todas sus concentraciones provocó disminuyera su peso. Similar situación se evidenció con la dieta suplementada con azadiractina la cual según Lynn *et al.* (2010), presenta una fuerte actividad antialimentaria en diversos insectos. Además es capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo de los insectos cuando lo ingieren en su estado larval ya que provoca un bloqueo hormonal. Lo anterior coincide con lo descrito por Mordue *et al.* (1998) quienes afirman que la azadiractina en altas concentraciones puede actuar como un antialimentario en varias especies de insectos y que en concentraciones bajas suele interferir con el sistema endocrino de los insectos, siendo señalado además como un quimioesterilizante para algunos dípteros. Por otra parte Blaney *et al.* (1990), indican que azadiractina no solo estimula las células disuasorias específicas en los quimiorreceptores, sino que además es capaz de bloquear el envío de azúcar a las células receptoras encargadas de estimular la alimentación. Mordue *et al.* (2000), señalan que los principales efectos de la dosis-respuesta de azadiractina en insectos pueden ser evidenciados por la reducción del crecimiento, aumento de mortalidad, mudas anormales y retardadas, lo cual está relacionado con la interrupción del sistema endocrino del control de crecimiento y la muda. Lo anterior respalda los resultados obtenidos con la dieta suplementada con azadiractina ya que se evidenció una disminución de peso en el insecto.

Reportes en la literatura con respecto al rol que cumplen los ácidos grasos en los insectos, señalan que la grasa es fundamental como fuente de energía de reserva y que los insectos

acumulan ésta en altas concentraciones, especialmente en etapas fisiológicas de su desarrollo las cuales preceden a los periodos en donde los insectos no se alimentan, tales como el estado de pupa y el periodo de diapausa o en la maduración de las hembras para la oviposición. Además de la importante función energética que estos cumplen, forman parte de fosfolípidos de los que depende la integridad estructural y el funcionamiento externo e interno de todas las membranas celulares (Dadd, 1973).

Se han reportado especies insectiles que requieren ciertos ácidos grasos en su dieta para su normal desarrollo y reproducción (Fast, 1964). Entre estos insectos se encuentran los lepidópteros los cuales utilizan los ácidos linoleico o linolénico para su desarrollo pero no necesitan a los ácidos palmítico y oleico (Dadd, 1973). Pese a ello, existen otras especies como larvas de la mosca parásita *Agria affinis* (Fall) (Diptera: Sarcophagidae) que se desarrollan más rápidamente en aquellas dietas que contienen ácidos palmítico y oleico comparadas con aquellas que contienen otros tipos de ácidos grasos (House y Barlow, 1960). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos para el ácido graso oleico en las concentraciones de 100, 500 y 1.000 ppm donde se observó un aumento en el peso del insecto. La concentración de 10.000 ppm disminuyó el peso de *H. obscurus* lo cual se podría deber a que ácidos grasos en altas concentraciones son responsables de respuestas antialimentarias en algunos insectos (Brid *et al.*, 1986). Los mismos autores señalan que los ácidos grasos y sus ésteres pueden influir en la alimentación de los insectos y que se ha encontrado que el ácido graso palmítico es estimulante para *Tribolium confusum* (J. du V.) (Coleoptera: Tenebrionidae) lo cual contrasta con los resultados obtenidos en este estudio ya que en todas las concentraciones evaluadas este ácido disminuyó el peso de *H. obscurus*. Por otra parte, Lambremont *et al.* (1964), indican que las grasas tienen una pequeña influencia en las dietas y que podrían estar correlacionadas con la fisiología de la reproducción en especies como el gorgojo del algodón *Anthonomus grandis* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae). Además añaden, que en este insecto se encontraron los ácidos grasos palmítico y oleico, siendo este último escasamente encontrado en aquellos adultos que se reproducen de forma activa en comparación con aquellos adultos invernantes los cuales se encuentran en un estado no reproductivo (diapausa). Por otra parte, Vanderzant y Richardson (1964) informan que algunos insectos pueden desarrollarse hasta el estado adulto y con un

tamaño normal en dietas exentas de grasas, sin embargo, esto podría traer como consecuencia una producción de huevos inferior a lo normal o menor en comparación a aquellos adultos que se han alimentado en dietas que contienen grasas. Con respecto al ácido láurico, McFarlane y Henneberry (1965), estudiaron la inhibición del crecimiento de *Grylodes sigillatus* (Walk) (Orthoptera: Gryllidae) debido a los ácidos grasos, concluyendo que el ácido láurico en altas concentraciones fue el responsable de la inhibición en el crecimiento de este grillido. En este estudio el ácido láurico hizo que *H. obscurus* incrementara su peso, exceptuando la concentración de 500 ppm en el cual el insecto tuvo una disminución de peso. Por otra parte Manosalva *et al.* (2011), realizaron bioensayos de contacto en adultos de *H. obscurus* en donde se impregnaron trozos de madera con extractos de raíces de trébol rosado y ácidos grasos (láurico, palmítico, oleico y esteárico), resultando en un significativo efecto atrayente de los machos hacia los ácidos palmítico y oleico. En este sentido, al analizar la conducta alimenticia entre machos y hembras de *H. obscurus*, no se observaron diferencias significativas en los ácidos estudiados a excepción del ácido oleico en concentración de 500 ppm el cual fue preferido por machos ($P = 0,002$).

Coll (1988) establece que las sustancias antialimentarias provienen de los mecanismos químicos de defensa (metabolitos secundarios) por parte de las plantas, clasificándose según su naturaleza química. Por otra parte, Alonso (1998) describe el concepto de antialimentario estableciendo que su función es evitar o interrumpir el proceso de alimentación del insecto después de un consumo inicial y de esa forma conducir a la muerte del insecto por inanición. Respecto a lo anterior, si bien los ácidos grasos no forman parte de los metabolitos secundarios, en particular el ácido palmítico si cumple con el concepto de antialimentario según lo observado en los bioensayos complementados con este ácido graso, ya que si bien los adultos de *H. obscurus* no llegaron a la muerte, si disminuyeron considerablemente su crecimiento durante el periodo de evaluación, lo cual si se proyecta en el tiempo podría resultar en la muerte de los insectos.

El hecho de que no hubo diferencias significativas en un mismo compuesto a diferentes concentraciones en cuanto al peso de *H. obscurus*, indicaría que solo la presencia de los ácidos

grasos incidiría en la alimentación del curculiónido. Lo anterior se podría deber a que los ácidos grasos de cadena larga tienen una baja volatilidad y debido a esto han sido reportados como semioquímicos capaces de modificar conductas en insectos involucradas en procesos de corto alcance tales como reconocimiento y aceptación del hospedero (Xu *et al.*, 2006). Si se considera que los componentes químicos producidos en las plantas pueden variar en función del genotipo y cultivar (Krips *et al.*, 2001) los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que en aquellos cultivares o líneas experimentales de trébol rosado con alto contenido de ácido palmítico, podría tener un efecto antialimentario sobre *H. obscurus*.

6. CONCLUSIONES

En la presente tesis se estudió el efecto fagoestimulante o antialimentario de los ácidos grasos oleico, láurico y palmítico sobre *H. obscurus* a través de una dieta artificial. Los resultados obtenidos permiten señalar las siguientes conclusiones:

La dieta artificial que tuvo mejor aceptación por parte de *H. obscurus* correspondió a la dieta compuesta debido a que permitió que los insectos consumieran y aumentaran su peso durante el periodo de evaluación. Por el contrario, la dieta agar no produjo un aumento en de peso en los insectos. Lo anterior sugiere que la dieta compuesta es una buena opción para evaluar distintos aspectos de la alimentación en *H. obscurus*.

Los resultados obtenidos con los ácidos grasos oleico y láurico coinciden con los obtenidos para sacarosa cuya función en insectos es actuar como fagoestimulante. En ambos casos *H. obscurus* incremento su peso significativamente producto de la acción de estos ácidos grasos, lo cual sugeriría que estos ácidos cumplen una función fagoestimulante en el barrenador de la raíz del trébol.

El ácido palmítico provocó un efecto contrario al de los ácidos láurico y oleico, debido a que *H. obscurus* disminuyó su peso al ser sometido a la dieta compuesta suplementada con este ácido. Este efecto fue similar al obtenido con azadiractina la cual es un antialimentario reportado para una gran variedad de insectos. Si bien, reportes en la literatura describen al ácido palmítico como un estimulante para el desarrollo de varias especies insectiles, este estudio sugiere que este ácido tiene un efecto antialimentario sobre *H. obscurus* lo cual sería un nuevo antecedente sobre su conducta alimenticia.

No hubo diferencias significativas al evaluar el efecto de estos ácidos grasos sobre el sexo de *H. obscurus*, a excepción del ácido oleico en la concentración de 500 ppm. Lo anterior

indicaría que más que la concentración, es la presencia de estos ácidos los que estimularían o disuadirían la alimentación del barrenador.

Los resultados obtenidos en la presente investigación permitirían utilizar como parámetro de susceptibilidad a la infestación por *H. obscurus*, la composición de ácidos grasos que presentan los distintos cultivares y líneas experimentales de trébol rosado. Así, aquellos cultivares o líneas experimentales que presenten una mayor proporción de ácido palmítico podrían ser resistentes a la infestación de este curculiónido, lo que podría ser utilizado como una herramienta para implementar un control cultural para esta plaga, y las que presenten altas concentraciones de ácido oleico o láurico serían susceptibles al ataque de *H. obscurus*.

Finalmente, según los resultados obtenidos, se acepta la hipótesis planteada, la cual postulaba que: “La alimentación de *H. obscurus* es modificada por ácidos grasos presentes en raíces de trébol rosado que incorporados a una dieta artificial, provocan respuestas fagoestimulantes o antialimentarias por parte del insecto”.

7. RESUMEN

El trébol rosado (*Trifolium pratense* L.) es una leguminosa forrajera perenne de vida corta que tiene gran importancia económica en la zona centro-sur de Chile. Una de sus limitantes es la baja persistencia de las plantas debido a la presencia de *Hylastinus obscurus* lo cual produce una alta mortalidad de estas. *H. obscurus* vive al interior de las raíces del trébol rosado donde forma galerías que no solo le otorgan alimento, sino que además les brinda protección. Debido a la ubicación de este insecto al interior de la planta no se ha podido establecer un método de control para este curculiónido.

El Laboratorio de Química Ecológica de la Universidad de La Frontera ha realizado diversos estudios sobre la interacción entre *H. obscurus* y *T. pratense* logrando identificar diferentes ácidos grasos que inciden en esta interacción. Entre estos ácidos se encuentran los ácidos láurico, palmítico y oleico, resultando ser significativamente atrayentes para hembras de *H. obscurus* a pesar de la baja volatilidad de estos compuestos. Debido a lo anterior se plantea que la alimentación de *H. obscurus* es modificada por ácidos grasos presentes en raíces de trébol rosado que al ser incorporados en una dieta artificial, provocan respuestas fagoestimulantes o antialimentarias por parte del insecto. Para evaluar la conducta alimentaria de *H. obscurus* se utilizó una dieta artificial compuesta la cual resultó ser la más idónea para este insecto. Esta dieta fue suplementada con dos controles positivos: sacarosa (fagoestimulante) y azadiractina (antialimentario); y ácidos grasos oleico, láurico y palmítico en diferentes concentraciones. Además, se utilizaron otros controles los cuales correspondieron a: dieta + insecto y dieta + insecto + solvente (etanol).

Los resultados de este estudio indican que las dietas suplementadas con los ácidos oleico y láurico tuvieron un efecto fagoestimulante sobre *H. obscurus* ya que en todas las concentraciones utilizadas el insecto aumentó de peso. Por el contrario, el ácido palmítico evitó que el insectos incrementara su peso. Además, se determinó que la presencia de estos ácidos

grasos estimularían o disuadirían la alimentación de este curculiónido, no así la concentración de cada uno de ellos.

Lo anterior resulta relevante ya que en la práctica aquellos cultivares o líneas experimentales que presenten una mayor proporción del ácido palmítico podrían ser más resistente a la infestación por parte de *H. obscurus*, lo que en la práctica permitiría implementar un control cultural para esta plaga basado en este metabolito primario.

8. SUMMARY

The red clover (*Trifolium pratense* L.) is a forage legume short-lived perennial has great economic importance in the central-southern zone of Chile. One of the main limitations is the low persistence of the plants due to the presence of *Hylastinus obscurus* which produces high mortality of these. *H. obscurus* lives inside red clover roots where form galleries that not only provide food, but also gives protection them. Due to the location of this insect into the plant has not been possible establish a method for controlling this weevil.

The Laboratorio of Química Ecológica of the Universidad de La Frontera has conducted several studies on interactions between *H. obscurus* and *T. pratense*, in which various fatty acids have been identified that affect this interaction. Among the acids are lauric, palmitic and oleic acids, proving to be significantly attractive to female *H. obscurus* despite the low volatility of these compounds. Because of this, it is suggested that feeding *H. obscurus* is modified by fatty acids from red clover roots which when incorporated in an artificial diet, feeding stimulants or elicit antifeedant responses from the insect. To evaluate the feeding behavior of *H. obscurus* was used a composed artificial diet which turned out to be the most suitable for this insect. This diet was supplemented with two positive controls, sucrose (phagostimulant) and azadirachtin (antifeedant) and the fatty acids oleic, lauric and palmitic in different concentrations. Furthermore, other controls were used which corresponded to insect + diet and diet + insect + solvent (ethanol).

The results of this study suggest that diets supplemented with both oleic and lauric acids had a phagostimulant effect on *H. obscurus* because in all concentrations used the insect gained weight. In contrast, palmitic acid avoided the increase insect weight. Furthermore, it was determined that the presences of these fatty acids stimulate or would deter feeding of curculionid, but not the concentration of each of them.

The above is relevant in practice because those experimental lines or cultivars have a greater proportion of palmitic acid may be more resistant to infestation by *H. obscurus*, which in practice allow implement a cultural control of this pest based on this primary metabolite.

9. LITERATURA CITADA

Agelopoulos, N., M. Birkett, A. Hick, A. Hooper, J. Pickett, E. Pow, L. Smart, D. Smiley, L. Wadhams y C. Woodcock. 1999. Exploiting Semiochemicals in Insect Control. *Pestic. Sci.* 55: 225 - 235.

Aguila, H. 1990. Pastos y Empastadas. Editorial Universitaria. Santiago, Chile. 286 p.

Aguilera, A. 1989. Ficha entomológica de La IX Región de La Araucanía. *Hylastinus obscurus* (Marsham) (Coleoptera: Scolytidae). Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). IPA – Carillanca. Chile. IPA-Carillanca 8 (1). 2 pp.

Aguilera, A., E. Cisternas, M. Gerding y H. Norambuena. 1996. Plagas de las praderas. En: Praderas para Chile. En: Ruíz, I. (ed). Praderas para Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Ministerio de Agricultura. Santiago, Chile. pp.: 309-339.

Alarcón, D., F. Ortega, F. Perich, F. Pardo, L. Parra y A. Quiroz. 2010. Relationship between radical infestation of *Hylastinus obscurus* (Marsham) and the yield of cultivars and experimental lines of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 10(2): 115- 125.

Alfazairy, A., H. Sadek, G. Guirguis y H. Karamal. 2012. An Agar-Free Artificial Diet: A New Approach for the Low Cost Mass Rearing of the Egyptian cotton Leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Agricultural Science Research Journals* 2(12): 639-647.

Alonso, O. 1998. Los Insecticidas Botánicos: Una Opción Ecológica para el Control de Plagas. Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”. Matanzas, Cuba. pp.: 1–12.

Arimura, G., C. Kost, y B. Wilhelm. 2005. Herbivore-Induced Plant Defenses. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1734: 91-111.

Berenbaum, M. 1995. Turnabout is fair play: secondary roles for primary compounds. *J. Chem. Ecol.* 21: 925–940

Bernays, E. y R. Chapman. 1994. Host-plant selection by phytophagous insects. Chapman and Hall, New York. 312 p.

Berryman, A. 1972. Resistance of conifers to invasion by bark beetle fungus associations. *BioScience* 22: 598-600.

- Blaney, W., M. Sommonds, W. Ley, J. Anderson y P. Toogoog. 1990.** Antifeedant effects of azadirachtin and structurally related compounds on lepidopterous larvae. *Entomol. Exp. Appl.* 55: 149–160.
- Brid, T., P. Hedin y M. Burks. 1986.** Feeding deterrent compounds to the boll weevil, *Anthonomus grandis* bohemian in rose-of-sharon, *Hibiscus syriacus* L. *J. Chem. Ecol.* 13(5): 1087-1097.
- Bright, E. y W. Stark. 1973.** The Bark and Ambrosia Beetles of California (Coleoptera: Scolytidae and Platypodidae). *Bulletin of the California Insect Survey* N° 16. 169 pp.
- Capataz, J., F. Orozco, R. Hoyos y R. Vergara. 2002.** Efecto de elicitores abióticos sobre la producción de metabolitos secundarios en suspensiones celulares de *Azadirachta indica* y su efecto sobre *Spodoptera sp.* Proyecto de investigación, convocatoria DIME 2002. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. pp: 1 – 9.
- Carambula, M. 1977.** Las leguminosas en producción y manejo de pasturas sembradas. Editorial Hemisferios Sur. Montevideo, Uruguay. 463 p.
- Carrillo, R. 1986.** Plagas en Praderas. En: Producción de Forrajes. Facultad de Ciencias Agrarias. Instituto de Producción Animal. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. pp 76-94.
- Carrillo, R. y N. Mundaca. 1974.** Biología de *Hylastinus obscurus* (Marsham) (Coleoptera: Scolytidae). *Agricultura Técnica.* 34 (1): 29-35.
- Carrillo, R., J. Matamala y N. Mundaca. 1978.** Descripción de los órganos reproductores y determinación del número de generaciones anuales de *Hylastinus obscurus* (Marsham). *Agro Sur* 6(2): 79-89.
- Castillo, D. y E. Vender. 1973.** Nueva plaga de praderas y semilleros: Insecto barrenador de la raíz del trébol rosado. *Investigación y Progreso Agrícola* 5(2): 90-91.
- Catrileo, A. y C. Rojas. 1987.** Ganado y cultivos: posibilidades para enfrentar mejor las variaciones del mercado. *IPA Carillanca* 6 (1): 9-11.
- Chi, C. y E. Hanson. 1961.** Nutrition in relation to the development wilts and root rots incited by *Fusarium* in red clover. *Phytopathology* 51: 704-711.
- Cisneros, F. 1995.** Control Etológico. Disponible en la World Wide Web: http://http://www.avocadosource.com/books/cisnerosfausto1995/cpa_toc.htm. Conectado el 4 de febrero del 2013.
- Cisternas, A. y M. Norambuena. 1991.** Plagas insectiles. En: A.torres y J.C. Dumont (eds). Producción y Utilización de trébol rosado (*Trifolium pratense* L.). Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Estación Experimental Remehue. Serie Remehue. Osorno, Chile. 13: 35-44.

- Claros, S. y I. Serey. 2001.** Tasa de consume foliar de insectos masticadores (Geometridae) y minadores (Heliozelidae) en *Nothofagus alpina* y *N. obliqua*. *Bosque* 22(2): 89-91.
- Cohen, A. 2001.** Artificial diets from arthropods. Patent Application Docket No. 0121.99, allowed May 22, 2001.
- Coll, J. 1988.** Inhibidores de la alimentación de los insectos. En: *Insecticidas bioracionales*. (Ed. Belles, X.). Colección Nuevas Tendencias No. 9. Madrid. C.S.I.C. p. 355.
- Cuevas, E. y O. Balocchi. 1993.** Producción de Forraje. Instituto de Producción Animal. Universidad Austral de Chile. Serie B7. Valdivia. Chile. 210 p.
- Dadd, R. 1973.** Insect Nutrition: Current Developments and Metabolic Implications. *Annu. Rev. Entomol.* 1973. 18: 381-420.
- Dariane, B. y F. Morrison. 1957.** The distribution and importance of the clover root borer (*Hylastinus obscurus*) (Marsham) (Coleoptera: Scolytidae) in Quebec. *Canadian Journal of Plant Science* 37 (1): 26-33.
- Dethier, V., B. Brown y C. Smith. 1960.** The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insect. *J. Econ. Entomol.* 53:134-136.
- Dicke, M. 1999.** Are herbivore-induced plant volatiles reliable indicators of herbivore indent to foraging carnivorous arthropods?. *Entomol. Exp. Appl.* 91: 131-142.
- Dougherty, E. 1959.** Introduction to axenic culture of invertebrate metazoan: a goal. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 77: 27-24.
- Faccoli, M., M. Blazenec y F. Schlyter. 2005.** Feeding response to host and nonhost compounds by males and females of the spruce bark beetle *Ips typographus* in a tunneling microassay. *J. Chem. Ecol.* 31: 745-759.
- Fast, P. 1964.** Insect lipids: a review. *Mem. Ent. Soc. Can. No. 37*, pp.: 1-50.
- Galdames, R. 1991.** Producción y utilización de trébol rosado (*Trifolium pratense* L.). Enfermedades fungosas. Ed: Torres A. B. y J.C.L. Bumant INIA Remehue. Serie Remehue N°13 Osorno, Chile. 98p.
- Galdames, R. y A. Aguilera. 1993.** Fitomejoramiento de Trébol Rosado (*Trifolium pratense* L.) Evaluación Clonal de un bloque de policruzamiento. *Agricultura Técnica* 53 (4): 88-90.
- González, R. 1989.** Insectos y Ácaros de Importancia Agrícola y Cuarentenaria en Chile. Editora Ograma S.A. 310 p.
- Green, T. y C. Ryan. 1972.** Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science* 175: 776-777.

- Gregg, A. y A. Schaller. 2008.** Induced Plant Resistance to Herbivory. University of Hohenheim, Institute of plant Physiology and Biotechnology. D-70599 Stuttgart. Germany.
- Guillot, C. 2005.** Entomology (Tercera Edición). Springer, Netherlands. 831p.
- Harborne, J.B. 1993.** Introduction to Ecological Biochemistry. Academic Press. London.
- Holmes, W. y F. Wilson. 1989.** Producción de leche en pradera. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 446 p.
- House, H. y J. Barlow. 1960.** Effects of oleic and other fatty acids on the growth rate of *Agria affinis* (Fall.) (Diptera: Sarcophagidae). J. Nutr. 72: 409-414.
- Howlett, B., A. Clarke y J. Madden. 2001.** The influence of leaf age on the oviposition preference of *Chrysophtharta bimaculata* (Olivier) and the establishment of neonates. Agric. For. Entomol. 3: 121–127.
- Hsiao, T. y C. Hsiao. 1974.** Feeding requirements and artificial diets for the alfalfa weevil. Entomol. Exp. Appl. 17: 83-91.
- Huang, Z., P. Shi, C. Chen y J. Du. 2007.** Effects of Azadirachtin on hemolymph protein expression in *Ostina furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). Annals of the Entomological Society of America 100: 245-250.
- Isman, M. 2006.** Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents in Modern Agriculture and an Increasingly Regulated World. Annual Review of Entomology 51: 45-66.
- Kamm, J. y R. Buttery. 1984.** Root volatile components of red clover (*Trifolium pratense* L.) Identification and bioassay with the clover root borer (*Hylastinus obscurus*) (Coleoptera: Scolytidae). Environmental Entomology 13: 1427-1430.
- Kessler, A. y I. Baldwin. 2001.** Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. Science 291: 2141-2144.
- Koehler, C., G. Gyrisco, L. Newsom y H. Shwart. 1961.** Control of the red clover root borer, *Hylastinus obscurus* (Marsham). Memoir Cinnell. Agriculture Experiment Station N°376. 36 p.
- Köllner, T., C. Schnee, J. Gershenson y J. Degenhardt. 2004.** The sesquiterpenes hydrocarbons of maize (*Zea mays*) from live group with distinct developmental and organ-specific distributions. Phytochemistry 65: 1895-1902.
- Krips, O., P. Willems, R. Gols, M. Posthumus, M. Gort y M. Dicke. 2001.** Comparison of cultivars of ornamental crop *Gerbera jamesonii* on production of spider mite-induced volatiles, and their attractiveness to the predator *Phytoseiulus persimilis*. J. Chem. Ecol. 27: 1355–1372.
- Lambremont E., M. Blum y R. Schrader. 1964.** Storage and fatty acid composition of triglycerides during adult diapause of the boll weevil. Ann. Ent. Soc. Amer. 57: 526-532.

- Lawrence, J. y A. Newton. 1995.** Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes and references, and data on family-group names). pp: 779-1006. En : Pakaluk, J., y S.A. Slipinski (eds). *Biology, Phylogeny, and Classification of Coleoptera: Papers celebrating the 80th birthday of Roy A. Crowson*. Warsaw: Muzeum i Instytut Zoologii PAN.
- Lucatoni, L., F. Giusti, M. Cristofaro, L. Pasqualini, F. Esposito, P. Lupetti y A. Habluetzel. 2006.** Effects of a neem extract on blood feeding, oviposition and oocyte ultrastructure in *Anopheles stephensis* Liston (Diptera: Culicidae). *Tissue and Cell* 38: 361-371.
- Luchsinger, J. 2007.** Evaluación de la presencia de *H. obscurus* (Marsham) en diferentes cultivares y líneas experimentales de trébol rosado. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de La Frontera. Región de La Araucanía, Temuco. Chile. 54 p.
- Lynn, O., W. Song, J. Shim, J. Kim y K. Lee. 2010.** Effects of azadirachtin and neem-based formulations for the control of sweet potato whitefly and root-knot nematode. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 53(5): 598–604.
- Manosalva, L., F. Pardo, F. Perich, A. Mutis, L. Parra, F. Ortega, R. Isaacs y A. Quiroz. 2011.** Behavioral responses of clover root borer to long-chain fatty acids from young red clover (*Trifolium pratense*) roots. *Environ. Entomol.* 40: 399-404.
- Martinez, S. y H. Van Emden. 1999.** Sublethal concentrations of azadirachtin affect food intake, conversion efficiency and feeding behaviour of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). *Bulletin of Entomological Research* 89: 65-71.
- Matamala, J. 1976.** Biología, niveles de infestación, daño y combate químico de *Hylastinus obscurus* (Marsham) (Coleoptera: Scolytidae). Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 38 p.
- McFarlane, J. y G. Henneberry. 1965.** Inhibition of the growth of an insect by fatty acids. *F. Insect Phyriol.* 11: 1247-1252.
- Mordue, A. y A. Nisbet. 2000.** Azadirachtin from the Neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *An. Soc. Entomol. Brasil.* 29(4): 615–632.
- Mordue, A., M. Simmonds, S. Ley, W. Blaney, W. Mordue, M. Nasiruddin y A. Nisbet. 1998.** Actions of azadirachtin, a plant allelochemical, against insects. *Pesticide Science.* 54: 277-284.
- Mordue, J. 1997.** Azadirachtin a review of this mode of action in insects. En: Kleeberg, H. Practice oriented results of use and production of Neem ingredients and pheromones. *Neem ingredients: toxicological results and possible medical uses.* Wetzae. Alemania. pp.: 1 – 4.
- Murillo, W. y D. Salazar. 2011.** Tendencias verdes en la agricultura para el manejo y control de plagas. *Revista Tumbaga.* Colombia. 6: 93 – 92.

- Myers, J. y D. Bazely. 1991.** Thorns, spines, prickles, and hairs: are they stimulated by herbivory and do they deter herbivores? En: Tallamy DW Raupp MJ (eds) Phytochemical induction by herbivores. John Wiley y Sons, New York, pp. 325–344.
- Nathan, S., M. Choi, H. Seo, C. Paik, K. Kalaivani y J. Kim. 2008.** Effects of azadirachtin on acetylcholinesterase (AChE) activity and histology of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stal. Ecotoxicological and environmental Safety 70: 244-250.
- Nathan, S., K. Kalaivani, K. Murugan y P. Chung. 2005.** The toxicity and physiological effect of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) the rice leaffolder. Pesticide Biochemistry and Physiology 81: 113-122.
- Ndione, R., O. Faye, M. Ndiaye, A. Dieye y J. Afoutou, 2007.** Toxic effects of neem products (*Azadirachta indica* A. Juss) on *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 larvae. African Journal of Biotechnology 6: 2846-2854.
- Necibi, S y M. Lint. 1997.** A new artificial diet for rearing *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae). J. Kansas Entomol. Soc. 70: 145-146.
- Neveau, N., J. Grandgirard, J. Nenon y A. Cortesero. 2002.** Systemic release of herbibore-induced plant volatiles by turnips infested by concealed root-feeding larvae *Delia radicum* L. J. Chem Ecol. 22: 1717-1732.
- Ortega, F. 1996.** Variation in mortality, yield and persistence of red clover (*Trifolium pratense* L.). Ph.D. Thesis. University of Wales, Aberystwyth. 255 p.
- Ortega, F., R. Galdames y A. Aguilera. 1993.** Fitomejoramiento de Trébol rosado (*Trifolium pratense* L.). I. Evaluación clonal de un bloque de policruzamiento. Agric. Téc. 53: 291-297.
- Ortega, F., O. Romero y R. Galdámes. 1991.** Evaluación de cultivares de trébol rosado (*Trifolium pratense* L.) en la IX Región. Agricultura Técnica 51: 38-144.
- Painter, R. 1936.** The food of insects and its relation to resistance of plants to insect attack. Am Nat 70: 547–566.
- Paré, P. y J. Tumlinson. 1999.** Plant volatiles as a defense again insect herbivores. Plant Physiol. 121: 325-331.
- Phillips, M. y R. Croteau. 1999.** Resin-based defenses in conifers. Trends Plant Sci 4: 184–190.
- Pinilla, K. 2003.** Conducta de selección de hospedero del barrenador de la raíz del trébol rosado, *Hylastinus obscurus* (Marsham) mediado por compuestos volátiles emitidos desde praderas de trébol rosado (*Trifolium pratense* L.). Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de La Frontera. Región de La Araucanía, Temuco, Chile. 63 p.

- Prado, E. 1991.** Artrópodos y sus enemigos naturales asociados a plantas cultivadas en Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Estación Experimental La Platina. Santiago, Chile. Boletín Técnico 169. 203 p.
- Price, P., C. Bouton, P. Gross, B. McPherson, J. Thompson y A. Weis. 1980.** Interactions among trophic levels influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 11: 41-65.
- Quiroz, A., F. Ortega, C. Ramírez, L. Wadhams y K. Pinilla. 2005.** Response of the beetle *Hylastinus obscurus* Marsham (Coleoptera: Scolytidae) to red clover (*Trifolium pratense* L.) volatiles in a laboratory olfactometer. *Environmental Entomology.* 34(3): 690-695.
- Rockwood, L. 1926.** The clover root borer. USDA. Department Bulletin 1426: 1-48.
- Ruíz, N. 1988.** Praderas para Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Ministerio de Agricultura, Santiago, Chile. pp 309-339.
- Sallé, A. y K. Raffa. 2007.** Interactions among intraspecific competition, emergence patterns, and host selection behavior in *Ips pini* (Coleoptera: Scolytinae). Institut des Sciences de l'Évolution, Université Montpellier 2, France. *Ecological Entomology* 32: 162–171.
- Sayah, F. 2002.** Ultrastructural changes in the corpus allatum after azadirachtin and 20-hydroxyecdysone treatment in adults females of *Labidura riparia* (Dermaptera). *Tissue and Cell* 34: 53-62.
- Sayah, F., C. Fayet, M. Idaomar y A. Karlinsky. 1996.** Effects of azadirachtin on vitellogenesis of *Labidura riparia* (Dermaptera). *Tissue and Cell* 28: 741-749.
- Schlyter, F., G. Birgersson y N. Leufve'. 1989.** Inhibition of Attraction to Aggregation Pheromone by Verbenone and Ipsenol. Density regulation mechanisms in bark beetle *Ips typographus*. *J. Chem. Ecol.* 15: 2263-2277.
- Schmutterer, H. 1990.** Properties and potencial of journal pesticides from the neem tree, *Azadirachtina indica*. *Annual Review Entomology.* 35.: 271- 297.
- Schoonhoven, L., T. Jeremy y J. Van Loon. 1998.** Insect-Plant Biology. From Physiology to evolution. Chapman and Hall (Eds.). London. 409 p.
- Schoonhoven, L., J. Van Loon y M. Dicke. 2005.** Insect-plant biology, Oxford University Press, Oxford.
- Serna, F. y C. Correa. 2003.** Extractos de hojas de tomate *Lycopersicon esculentum* como fagoinhibidores de *Atta cephalotes*. *Agronomía Colombiana.* 21(3):142-153.
- Sharma, V., S. Walia, J. Kumar, M. Nair y B. Pamar. 2003.** An Efficient Method for the Purification and Characterization of Nematicidal Azadirachtins A,B and H, Using MPCL and ESIMS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3966-3972.

- Singh, P. 1977.** Artificial Diets for Insects, Mites, and Spiders. Plenum Press, New York.
- Sirvastava, M., A. Paul, S. Rengasamy, J. Kumar y B. Pamar. 1997.** Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds kernel extracts on the larval parasitoid *Bracon brevicornis* Wesm. (Hymenoptera: Braconidae). Journal of Applied Entomology 121: 51-57.
- Skipp, R. y M. Christensen. 1990.** Selection for persistence in red clover: influence of root disease and stem nematode. New Zealand J. Agric. Res. 33: 319-333.
- Spedding, C. y E. Diekmahns. 1972.** Grasses and legumes in British Agriculture. Commonwealth bureau of pastures and field crops. Farnham Royal. Bucks, England: Commonwealth Agriculture Bureaux. 511 p.
- Stahl, E. 1888.** Pflanzen und Schnecken: Biologische Studie über die Schutzmittel der Pflanzen gegen Schneckenfrass. Jena Z Naturwiss 22: 557–684.
- Steiner, J. y S. Alderman. 2003.** Red clover seed production: VI. Effect and economics of soil pH adjusted by lime application. Crop Sci. 43: 624-630.
- Tapia, S., F. Perich, F. Prado, G. Palma y A. Quiroz. 2007.** Identification of volátiles from differently aged red clover (*Trifolium pratense* L.) root extracts and behavioral responses of clover root borer (*Hylastinus obscurus*) (Marsham) (Coleoptera: Scolytidae) to them. Biochemical Systematics and Ecology. 35: 61-67.
- Toro, H., E. Chappa y C. Tobar. 2004.** Biología de insectos. Eds. Universitarias de Valparaíso. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso 2º edición. 248 p.
- Torres, A. y C. Sierra. 1991.** Descripción, Adaptación y Establecimiento. En: A. Torres y J. C. Dumont (eds.). Producción y Utilización de Trébol rosado. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Estación Experimental Remehue. Serie Remehue. Osorno, Chile. 13: 13-25.
- Trapp, S. y R. Croteau. 2001.** Defensive resin biosynthesis in conifers. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52: 689–724.
- Triplehorn, C., y N. Johnson. 2005.** Introduction to the Study of Insects. Seventh edition. Thomson. Brooks/Cole. The Ohio State University. U.S.A. 864p.
- Trujillo, P., L. Zapata, R. Hoyos, F. Yepes, J. Capataz, y F. Orozco. 2008.** Determinación de la DL₅₀ y TL₅₀ de extractos etanólicos de suspensiones celulares de *azadirachta indica* sobre *spodoptera frugiperda*. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín 61 (2): 1 – 14.
- Vanderzant E. y C. Richardson. 1964.** Nutrition of the adult boll weevil: lipid requirements. J. Ins. Physiol. 10: 267-272.
- Vanderzant, E. 1966.** Defined diets for phytophagous insects. En: Insect colonization and mass production. Smith, C. (ed.) Academic Press Inc. London. pp.: 273-303

- Vanderzant, E. 1969.** Physical aspects artificial diets. *Entomol. Exp. Appl.* 12: 642-650.
- Vanderzant, E. 1974.** Development, significance and application of artificial diets for insects. *Ann. Rev. Entomol.* 19:139 – 160.
- Venuto, B., R. Smith y C. Grau. 1995.** Virulence, Legume host specificity and genetic relatedness of isolates of *Fusarium oxysporum* from red clover. *Plant Disease* 79: 406-410.
- Wood, L. 1982.** The role of pheromones, kairomones, and allomones in the host selection and colonization behavior of bark beetles. *Annu. Rev. Entomol.* 27: 411 y 446.
- Xu, H., G. Li, M. Liu y G. Xing. 2006.** Oviposition deterrents in larval frass of the cotton boll worm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae); Chemical Identification and electroantennography analysis. *J. Insect Physiol.* 52: 320–326.
- Yasmin, N., F. Khan y Z. Channa. 2008.** Effects of a neem sample on protein patterns of *Bractrocera cucurbitae*. *Turkish Journal of Zoology* 32: 1-5.

10. AGRADECIMIENTOS

La autora de esta tesis agradece el apoyo otorgado por parte del Laboratorio de Química Ecológica – UFRO y el financiamiento al Proyecto FONDECYT N° 1100812.

Al profesor guía de tesis Dr. Andrés Quiroz, primero por brindarme la oportunidad de formar parte del equipo de trabajo, por su constante apoyo, consejos y preocupación durante el desarrollo de esta investigación, no todos tienen la suerte de tener un profesor guía presente y sin duda fui afortunada.

Al profesor consejero Dr. Leonardo Parra Bardehle, por su buena disposición, sus consejos que fueron un gran aporte a esta tesis, por el apoyo brindado en aquellos momentos en que no tenía claridad, en que el cansancio me intentó vencer, siempre tuvo una palabra de motivación, haciendo que de alguna u otra forma diera lo mejor de mí.

Finalmente, pero no por eso menos importante, agradezco a Betania, Dayand, Loreto, Yurima, Karen y Carola porque de alguna forma hicieron que mi paso por el laboratorio fuese aún más ameno, porque ante una duda nunca me negaron una respuesta o idea, porque muchas veces alegraron mis días con sus bromas, risas y buena onda, por sus consejos y muchos detalles más.

De alguna u otra forma todos ustedes han contribuido al desarrollo de esta tesis, a mi formación profesional y crecimiento personal.

Muchas gracias.