



EVALUACIÓN DE EXTRACTOS DE TALLO Y HOJA DE
Ryania speciosa (Triana y Planch) Monach. Var. *chocoensis*,
PARA EL CONTROL DE *Toxoptera citricida* Kirkaldy, EN
CONDICIONES DE LABORATORIO

CARLOS HUMBERTO CASTILLO BARBOSA

UNIVERSIDAD DEL PACÍFICO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA DE AGRONOMÍA
BUENAVENTURA

2010



EVALUACIÓN DE EXTRACTOS DE TALLO Y HOJA DE
Ryania speciosa (Triana y Planch) Monach. Var. *chocoensis*,
PARA EL CONTROL DE *Toxoptera citricida* Kirkaldy, EN
CONDICIONES DE LABORATORIO

CARLOS HUMBERTO CASTILLO BARBOSA

Trabajo de Tesis Presentado como Requisito Parcial para Optar
por el Título de Agrónomo

Director

ROBERT TULIO GONZALEZ, *M, Sc.*

Director Programa Agronomía

UNIVERSIDAD DEL PACÍFICO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA DE AGRONOMÍA
BUENAVENTURA

2010



RESUMEN

El uso indiscriminado de insecticidas químicos para el control de plagas trajo consigo contaminación de suelo y agua y su persistencia indujo resistencia muchas plagas y otros aspectos negativos. Con el fin de brindar una alternativa de manejo del áfido pardo económica y ecológicamente viable, se evaluó el potencial insecticida de extractos de tallo y hoja *Ryania speciosa* var *chocoensis* en el áfido pardo, *Toxoptera citricida*. Se colectó individuos alados de *T. citricida*, se les identificó y se infestó plántulas de limón de 6 meses de edad en invernadero, para obtener individuos para su uso en la investigación. Se evaluó la efectividad de extractos de tallo con etanol al 96%, 80%, 70% y de hoja al 96%, 70%, 55%, bajo dosis única de $1.10\text{g}\cdot 100\text{ml}^{-1}$ y $1.50\text{g}\cdot 100\text{ml}^{-1}$, respectivamente, a las 30h para establecer protocolo de producción de extractos. Se determinó la CL_{50} al exponer individuos a concentraciones de 0.20; 0.70; 1.20; 1.70 y $2.00\text{g}\cdot 100\text{ml}^{-1}$; y de 0.50; 1.20; 1.80; 2.40 y $2.95\text{g}\cdot 100\text{ml}^{-1}$, en extractos de tallo con etanol al 70% y de hoja al 75%, bajo observación por 36 horas, utilizando para ambos, 10 individuos en caja petri como unidad experimental. El parámetro de mortalidad fue la ausencia de movilidad al ser pinchados en dos ocasiones, por 15 segundos. El tratamiento control fue etanol al 1%. No hubo discriminación de sexos.

No se detectó acción microbiana en extractos etanólicos de tallo; en extractos etanólicos de hoja al 55% y 70% se presentó alta acción microbiana al evaporarse el etanol; principalmente en el primero. Los extractos etanólicos de tallo y hoja al 96% no se disolvieron en su totalidad, los demás se solubilizaron; el mayor peso se obtuvo con etanol al 96% en tallo (0.40g), y en hoja con etanol al 70% (1.41g); por lo anterior se estableció la aplicación de protocolo de extractos etanólicos propuesto por McLaughlin y otros (1998), en Bobadilla y otros (2005), para los extractos de tallo y hoja, el uso de etanol al 70% y 75%, con maceración doble por 24 y 8 horas, respectivamente. Se determinó la CL_{50} en $236\text{mg}\cdot \text{L}^{-1}$ y $68\text{mg}\cdot \text{L}^{-1}$ a las 36 horas, para tallo y hoja quedando en evidencia un mayor grado de toxicidad y velocidad de acción para extracto de hoja, cuatro veces más tóxico que el extracto de tallo. Los síntomas producidos en los áfidos fue movimiento descoordinado al cabo de dos horas, posición lateral o boca arriba con poco movimiento a las seis horas, aborto de ninfas a las 18 horas y movimiento ligado a estímulo externo (inmovilidad) que para el caso fue pinchazo en el abdomen, entre las 24 y 36 horas.

Palabras Claves: extractos botánicos, plantas tóxicas, insecticidas, *R. speciosa*, *T. citricida*, Concentración Letal Media (CL_{50}).



ABSTRAC

The indiscriminate use of chemical insecticides for pest control resulted in soil and water contamination and it is persistence produced many pest resistance and other negative aspects. To provide a management alternative brown aphid economically and environmentally viable, we evaluated the insecticide potential of stem and leaf extracts *Ryania speciosa* var *chocoensis* in brown aphid, *Toxoptera citricida*. Winged individuals were collected of *T. citricida*, was identified and lemon seedlings infested 6 months of age in the greenhouse, to obtain individuals for use in research. Evaluated the effectiveness of stem extracts with 96% ethanol, 80%, 70% and 96% leaf, 70%, 55%, with dose unique of $1.10\text{g}\cdot 100\text{ml}^{-1}$ and $1.50\text{g}\cdot 100\text{ml}^{-1}$, respectively, by 30h for establishing a protocol for production of extracts. CL_{50} was determined by exposing individuals to concentrations of 0.20, 0.70; 1.20, 1.70 and $2.00\text{g}\cdot 100\text{ml}^{-1}$; and 0.50, 1.20, 1.80, 2.40 and $2.95\text{g}\cdot 100\text{ml}^{-1}$ in stem extracts with ethanol 70% and leaf 75%, under observation for 36 hours, using as the experimental unit, 10 individuals in petri dish. The mortality parameter was determined by the lack of mobility to be tapped twice for 15 seconds. The control treatment was 1% ethanol. There was no gender discrimination.

There was no microbial action in ethanolic extracts of stem, leaf ethanolic extracts 55% and 70% contained high microbial action to evaporate ethanol, mainly in the first. The ethanol extracts of leaf and stalk 96% did not dissolve entirely, others are solubilized; the greatest weight was obtained with 96% ethanol in stem (0.40g), and leaf, with 70% ethanol (1.41 g); above was established the application of protocol proposed by McLaughlin and others (1998), Bobadilla and others (2005), with ethanol 70% and 75%, with ethanol extracts, with double soaking for 24 and 8 hours, for stem and leaf. We determined the CL_{50} $236\text{mg}\cdot \text{L}^{-1}$ and $68\text{mg}\cdot \text{L}^{-1}$ at 36 hours, to stem and leaf, left in evidence a greater degree of toxicity and speed of action for leaf extract, four times more toxic than the extract of stem. The symptoms produced on aphids was uncoordinated movement after two hours, side or face upward position with little movement at six hours, nymphs abortion at 18 hours and linked to external stimulus movement (immobility) than for the case was prick in the abdomen, between 24 and 36 hours.

Keywords: botanical extracts, toxic plants, insecticides, *R. speciosa*, *T. citricida*, Concentración Letal Media (CL_{50}).



DEDICATORIA

En primera instancia a mi madre; Rosa Lilia Barbosa Háchito, que en paz descanse, que con su paciencia, dedicación y cariño, me crió e hizo de mí lo que soy hasta ahora, aunque no pueda gozar de este acontecimiento que tanto esperó; verme graduado como profesional.

También dedico este pequeño triunfo a mi padre Humberto Castillo Salazar quien siempre me apoyó en las buenas y en las malas, económica, moral y sentimentalmente durante todo este tiempo y aún lo hace; y también a su hermano, el doctor José Pablo Castillo Salazar.

A mi madre Mirian Oliva Mosquera Manyoma, con quien no logramos compartir en mi niñez por fuerzas ajenas a ella, pero que quiero mucho y me ha apoyado de todo corazón en todo este tiempo, y de la misma manera a mi hermano, Edwin Alexis Castillo Mosquera, quien más que ser mi hermano, es mi gran amigo y compañero; te quiero.

A mi hermana Aura María Barbosa Acebedo; quien es, ha sido y sigue siendo mi hermana, tía, amiga y madre; quien me brindó y me sigue brindando todo su apoyo y cariño; y de la misma forma, a su hermana, mi tía Alba María Barbosa Háchito, quien es como mi madre.

De la misma manera le dedico este logro a mi tía Marina Arboleda de Caicedo, elemento esencial en mi desarrollo integral, y a su esposo Ranulfo Caicedo Gamboa.

A mi tío Modesto Barbosa Háchito, de quien tuve un apoyo incondicional durante mi vida, principalmente en este proceso.

A quien por su entereza, amistad y apoyo incondicional durante toda su vida, le quiero, estimo y aprecio mucho, Francisco Caicedo, al igual a su esposa, Felicidad Marines.

A mis tías Gavy Nallive Montaña Caicedo y Betulia Montaña de Castillo, quienes más que tías, han sido como mi madre al apoyarme y darme consejos sabios.

A mis hermanas Soley Castillo Valencia y Guillermina Castillo, quienes siempre han estado a mi lado apoyándome y dándome buenos consejos; les quiero.

Por último quiero dedicar este éxito a mi señora Elizabeth Estupiñan Murillo, quien ha estado con migo en las buenas y en las malas; mi apoyo, mi amor; a sus hermanos y a nuestro hijo Carlos David Castillo Estupiñan.



AGRADECIMIENTOS

Al seños nuestro Dios por brindarme la vida y la capacidad para alcanzar este logro; y porque en la vida nadie es autosuficiente y porque siempre hay personas a quien Dios les ha proporcionado los valores de la humildad y servicialidad, les doy mis más sinceros agradecimientos a:

Mi director de tesis Robert Tulio Gonzalez, *M.Sc.* y actual director del programa de Agronomía del Trópico Húmedo, quien me guió en este proceso.

A los profesores Juan Carlos Córdoba, Carlos Patiño, William Castillo, Sonia Segura Sánchez y Nelly Perez, de quienes recibí asesoría en el proceso de producción de extractos, análisis estadístico y orientación y sugerencias para la realización del trabajo escrito.

A la fundación Sociedad Portuaria de Buenaventura, SPIRBUN, por su apoyo económico.

Al profesor Felix Suarez Reyes y su esposa Sandra López, quienes me brindaron su apoyo al darme la oportunidad de adquirir experiencia como docente en la Institución educativa REY DAVID.

Del mismo modo a todos los profesores, demás funcionarios del programa de Agronomía y otros programas, pues directa o indirectamente permitieron la realización de este sueño; y asimismo a la Universidad del Pacífico.

Asimismo, me permito expresar mis más sinceros agradecimientos al actual concejal Alvaro Ortiz Rentería y su esposa, y su hermano Herásmo Rentería, a todos ellos por su apoyo incondicional en este proceso.

A todos mis compañeros de estudio, en especial a Jennifer Suarez, Flavio Enrique González, Alexander Anchico, y mi compañero de trabajo Brailer Riascos, por el gran apoyo que me brindaron en este proceso educativo.

A mi tía Martha Obando e hijos, en especial a Luis Antonio Mesa.

Al resto de mi familia.

Y a todos mis primos y amigos del barrio la Independencia, con quienes crecí, por haberme brindado su sincera amistad y apoyo, principalmente en los momentos difíciles.



CONTENIDO

	pág.
RESUMEN	3
ABSTRAC	4
DEDICATORIA	5
AGRADECIMIENTOS	6
CONTENIDO	7
ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE GRÁFICOS	12
INTRODUCCIÓN	13
1. OBJETIVOS	15
1.1 OBJETIVO GENERAL	15
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2. REVISIÓN DE LITERATURA	16
2.1 LOS CÍTRICOS	16
2.2 <i>Toxoptera citricida</i> Kirkaldi (Sin. <i>Toxoptera citricidus</i>).	16
2.2.1 Control de <i>T. citricida</i>	16
2.3 Productos y Extractos Botánicos	17
2.4 <i>Ryania speciosa</i>	19
2.4.1 Taxonomía	19
2.4.2 Variedades y Distribución Geográfica	19
2.4.3 Compuestos químicos y Mecanismo de Acción	21



2.4.4	Uso de <i>Ryania a</i> como Insecticida	22
2.5	Concentración Letal Media (CL ₅₀)	23
2.5.1	Procedimiento para Determinación de la CL ₅₀	23
	- Método Probit	24
3.	METODOLOGÍA	25
3.1	Cría de <i>T. citricida</i>	25
3.2	Colección de Material Vegetal	26
3.3	Preparación de Extractos	27
3.4	Determinación de la CL ₅₀	28
3.5	Análisis Estadístico	29
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1	Cría de Áfidos en Invernadero	31
4.2	Protocolo de Preparación de Extractos de Tallo y Hoja	34
4.2.1	Extracto Optimizado	37
4.3	Ensayos de Toxicidad <i>in vitro</i> para la Determinación de la Concentración Letal Media (CL ₅₀) de Extractos de Tallo y Hoja	37
4.4	Síntomas Observados en <i>T. citricida</i>	41
5.	CONCLUSIONES	43
6.	RECOMENDACIONES	44
	BIBLIOGRAFÍA	45
	REFERENCIAS ELECTRÓNICAS	47
	ANEXOS	49



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de especies identificadas en la colecta de áfidos.

Tabla 2. Peso de sólidos disueltos de los extractos obtenidos a partir de 10g de material vegetal, estabilidad a los microorganismos y mortalidad de áfidos expuestos a extractos de tallo y hojas producidos a diferentes concentraciones.

Tabla 3. Mortalidad de áfidos en tiempos de exposición bajo diferentes concentraciones de extractos de tallo y hoja.

Tabla 4. Concentración Letal Media (CL₅₀) de extractos de tallo y hoja a las 24 y 48 horas.



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de algunas variedades de *R. speciosa*: a) *R. speciosa* var. *bicolor*; b) *R. speciosa* var. *chocoensis*; c) *R. speciosa* var. *panamensis*; d) *R. speciosa* var. *stipularis*; e) *R. speciosa* var. *subuliflora*; f) *R. speciosa* var. *tomentella*; g) *R. speciosa* var. *tomentos*.

Figura 2. Algunos compuestos químicos de extracto de *R. speciosa*.

Figura 3. Estructura molecular de Rianodina.

Figura 4. Mezcla de suelo utilizado para siembra de plántulas de limón e invernadero: a) Mezcla suelo: a1 gravilla; a2: suelo de rizosfera de banano; b) Plántulas en invernadero.

Figura 5. Arbusto de *R. speciosa* (a), flores (a₁) y lindero de la Universidad del Pacífico con el terreno lateral derecho (b).

Figura 6. Manipulación de material vegetal: a) Material fresco; b) Material limpio; c) Material seco; d) Material triturado.

Figura 7. Proceso de producción de extractos: a) Maceración; b) Filtrado; c) Evaporación de solvente con baño de arena; d) Extractos secos

Figura 8. Preparación de concentraciones decrecientes para la determinación de la CL₅₀ de tallo y hojas de *R. speciosa*. a) Extractos secos; b) Pesado de extractos; c) Disolución de extractos; d) Realización de concentraciones; e) Concentraciones obtenidas: e₁ Concentraciones de extracto de tallo; e₂ Concentraciones de extracto de hoja

Figura 9. Evaluación de extractos; a) Evaluación de extracto etanólico de tallo al 70% a diferentes concentraciones; b) Evaluación de extracto etanólico de hojas al 75% a diferentes concentraciones.

Figura 10. Descriptores morfológicos de de ala anterior y antena de *T. citricida*, *T. aurantii* y *Aphis sp.*

Figura 11. Nominación de las venas del ala posterior y anterior de un áfido.

Figura 12. Filtrado de extracto etanólico de hoja: a) filtrado reciente no fermentado (a₁: 55% y a₂: 70%); b) filtrado fermentado (b₁: 55% y b₂: 70%).

Figura 13. Evaluación de extractos etanólicos de tallo y hoja bajo diferentes concentraciones: a) Extractos etanólicos de tallo al 96,80 y 70%; b) Extractos Etanólicos de hoja al 96, 70 y 55%.

Figura 14. Protocolo de producción de extractos de tallo y hoja de *R. speciosa*.



Figura 15. Rutas del metabolismo primario y secundario (Fuente: Fundamentos de Fisiología Vegetal)

Figura 16. Individuos alumbrados en la evaluación de los tratamientos: a) ninfas vivas, tratamiento testigo; b) abortos producidos por extractos de tallo y hoja.



ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Relación dosis-respuesta para cálculo de CL_{50} .

Grafico 2. Porcentaje de especies de áfidos identificados.

Grafico 3. Mortalidad de áfidos en diferentes tiempos de exposición.

Grafico 4. Análisis de regresión lineal para la CL_{50} a las 24h y 36h de extracto de tallo ($g.100ml^{-1}$).

Grafico 5. Análisis de regresión lineal para la CL_{50} a las 24h y 36h de extracto de hojas ($g.100ml^{-1}$).



INTRODUCCIÓN

La citricultura es un subsector agrícola que en Colombia, hasta el 2004, participaba con el 34.5% de la producción total de frutas en el país y una producción de 989539 toneladas en un área de 57856 hectáreas para el 2004, generando 57000 empleos en el 2000: 30000 directos y 27000 indirectos. Cundinamarca, Valle y Quindío, presentan las mayores producciones representando en su conjunto el 41.2% del total producido en Colombia entre el 2000 y 2004, con el Valle del Cauca como segundo departamento de más alta producción: 102908 toneladas en 3934 hectáreas en el 2004, 13.1% en la producción nacional. No obstante la alta demanda interna, problemas de gestión y desarrollo tecnológico, dificultad de acceder a mercados internacionales por no contar con variedades adecuadas, problemas de presentación y empaque, y principalmente barreras fitosanitarias han causado un incremento en las importaciones, mientras que las exportaciones decrecen manteniendo un déficit comercial en el país (Tomado del portal <http://www.agrocadenas.gov.co>, 15 de noviembre de 2007). El limón (*Citrus limon*) es una de las especies más importantes dentro de la citricultura por su gran uso en la canasta familiar, sin embargo es altamente susceptible al ataque de los Áfidos, principalmente al Áfido negro o pardo (*T. citricida*), quien genera daños a la planta debido a la succión de sabia en zonas apicales de ésta; no obstante la importancia económica de esta plaga radica en su alta efectividad para transmitir el Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV), enfermedad viral más importante a nivel mundial, pues su incidencia y severidad, pueden hacer colapsar cualquier plantación de esta especie; en Brasil y Argentina, entre los años 1930 y 1940 se eliminó 16 millones de arbustos (Tomado del portal <http://www.fiagro.org.sv>, 20 de enero de 2008).

Aunque son varias las especies de áfidos reportados en Colombia, en el Valle del Cauca *T. citricida* se reporta como la especie con más incidencia, con el 77% (Corpoica, 2002). Buenaventura no presenta reporte oficial del área cultivada con cítricos sin embargo suelen conseguirse en la mayoría de los huertos habitacionales en la zona rural, lo cual demuestra la importancia de este producto para el desarrollo sostenible de las comunidades tradicionalmente asentadas en esta región, y aún más si se tiene en cuenta que de los cultivos tradicionales que se encuentran en la zona, éstos son la única fuente de ácido cítrico (5%) y vitamina C (ácido ascórbico) lo cual evita el escorbuto (Cabanzo et al., 2005), pero la incidencia de esta plaga es altamente perjudicial no solo por su eficiencia en la transmisión del CTV, sino porque las condiciones ambientales de alta humedad, complementado con la melaza que excreta esta plaga generan condiciones favorables para la colonización de un complejo de hongos conocidos como Negrilla o Tizne (Del Cañizo et al., 1990), que obstruye el área foliar reduciendo la capacidad fotosintética de la planta, lo cual incide negativamente en la producción.

Dentro de los métodos de control de esta plaga se encuentran, como alternativa principal, el uso de insecticidas sintéticos, evolucionando desde el uso de productos inorgánicos como caldo bordez mezclado con azufre, al uso de plaguicidas orgánicos, algunos específicos y otros que controlan etapas de desarrollo del áfido; sin embargo es frecuente



escuchar sobre nuevos productos, dosis e incluso la cancelación de productos ineficientes (Davies y Gene, 1999), no obstante desde el punto de vista ecológico, éstos han ocasionado problemas como contaminación por acumulación de su efecto residual, tanto en el medio como en los productos que genera la planta, resistencia biológica en los insectos, supresión de enemigos naturales de plagas y contravenciones en la salud de muchas especies de sangre caliente, incluido el hombre y, aunque son de gran accesibilidad desde el punto de vista de oferta y “bajo costo”, para pequeños productores que obtienen baja rentabilidad en sus cultivos, situación predominante en la zona rural de esta ciudad y poco poder adquisitivos, no es tan viable su uso.

No obstante, por presentar una desventaja biológica de supervivencia contra sus enemigos por su inmovilidad, las plantas desarrollaron sustancias conocidas como metabolitos secundarios que pueden presentar actividad insecticida, nematocida, viricida, fungicida, bactericida y nematocida; en el caso de los insecticidas, sustancias como alcaloides, quinonas, aceites esenciales, glicósidos, flavonoides y rafidios (cristales de oxalato de calcio en forma de aguja), tienen la capacidad de inhibir la metamorfosis, la alimentación hasta producir muerte por inanición, inducir a adultos inviábiles y hasta producir la muerte (Alonso, 1999; Raven, Ray y Eichhorn, 1992). Especies como el Ajo, *Allium sativum* Lin., y Flor de muerto: *Tagetes patula*, son usadas desde la antigüedad para el control de plagas por sus fuertes olores; Especies de la familia de las Coníferas, Umbelíferas, Libateas Meliaceas y Leguminosas producen Flavonoides, Antihormonas Juveniles, Fitoesdicteroides y Antiecdisonas. Los Fitojuvenoides inhiben la metamorfosis; algunas especies de la familia Canellaceae y Verbenaceae producen Terpenos y Sexquiterpenos que interrumpen el proceso alimentario induciendo a la muerte por inanición; y del mismo modo especies de la familia Asteraceae y Rutaceae producen Fototoxinas de actividad viricida (Alonso, 1999).

Un material promisorio dentro de estas especies es *R. speciosa*, arbusto perteneciente a la familia Flacourtiaceae, originario de las zonas tropicales de América y adaptada a la zona húmeda del Chocó Biogeográfico (*Ryania speciosa* var. *chocoensis*); también es conocida en Táchira-Venezuela como Fruta aguacero y en Chocó, como Matacucaracha, por su efectividad contra esta plaga. Su uso se reporta desde mediados del siglo anterior, en los Estados Unidos, principalmente *R. speciosa* var. *panamensis*, la cual redujo su población en Centramérica por su sobreexplotación. Posee varios componentes insecticidas dentro de los cuales se le atribuye el mayor poder a un alcaloide llamado Rianodina. Alonso (1999) reporta su uso a través de extracto acuoso de raíz y polvo a base de tallo y hojas, contra el barrenador del melón (*Diaphania hyalinata*) y trips (*Trips tabaci*); es efectivo en Lepidopteros, principalmente en el barrenador del maíz europeo, *Sesamia nonagrioides* y la mariposa nocturna de la manzana, *Cydia pomonella* (Tomado del portal <http://www.ecoaldea.com>, 20 de enero, 2008).

Por ello se propuso la evaluación de extractos botánicos de tallo y hojas de *R. speciosa* var. *chocoensis* como estudio preliminar que permita implementarla como una alternativa ecológica y económicamente viable en el manejo integrado de ésta y otras plagas, por parte de los agricultores de esta zona.



1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial biocida de extractos de tallo y hoja de *R. speciosa var chocoensis*, como alternativa de manejo sustentable para el control de *T. citricida*, en condiciones de laboratorio, en el municipio de Buenaventura, Valle del Cauca.

1.2 OBJETIVO GENERAL

- 1.2.1 Establecer cría de áfidos en invernadero.
- 1.2.2 Establecer protocolo de producción de extractos de tallo y hoja.
- 1.2.3 Evaluar el potencial insecticida de extractos a través de la CL_{50} de los extractos, bajo análisis Probit y Regresión Lineal.



2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 LOS CÍTRICOS

Se cree que el área de origen de los cítricos es el sur este de Asia, incluyendo desde Arabia Oriental hacia el este hasta Filipinas, y desde el Himalaya hacia el sur hasta Indonesia o Australia (Fredrick y Gene, 1994), y en Colombia están totalmente dispersos, cultivándose entre 0 y 2000 msnm, con condiciones de clima, suelo, infraestructura y características socioeconómicas diversas, encontrándose variedades como: la Naranja; Wachinton, Lerma, Selerma y otras; Mandarina: Onecco, Chiva Comén, Arrayán y otras; Lima Ácida: Limón Tahití, Persa, L. pajarito e Ica Tajitit N; Toronja: Ruby Red, Ruby Blusa, Spark Ruby y otras; Tanguelos: Mineola, Orlando, Trotón y Seminole (Tomado del portal <http://www.agrocadenas.gov.co>, 15 de noviembre de 2007); representadas, en área cultivada, en 1997 con un 75% para la naranja, lima ácida con 10% y el 15% restante repartido entre mandarinas, tanguelos y otros (Corpoica, 1998).

2.2 *Toxoptera citricida* Kirkaldi (Sin. *Toxoptera citricidus*).

Conocido como el áfido pardo o negro, es el insecto de mayor importancia económica en los cítricos; presenta un aparato bucal chupador que les permite alimentarse del floema. Genera daños a la planta pero su importancia se basa en ser el vector más eficiente del Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV). Es una especie colonizadora que alcanza altas densidades poblacionales en poco tiempo, desplazando otras especies que le siguen en importancia por su eficiencia diseminadora del virus, como el caso de *Aphis gossipii* (Glover), especie con amplia gama de huéspedes y visitante esporádico (Hermoso de Mendoza, 1994, en Corpoica, 2002).

2.2.1 Control de *T. citricida*. No existe método de control eficaz. En el Valle del Cauca y otros lugares de Colombia se usa material vegetativo o plantas certificadas que consisten en injertos de diferentes variedades que al ganar vigor pueden tolerar razas del virus. Existen enemigos naturales: parasitoides del orden Hymenoptera, familia Aphididae, generos *Lysiphlebus*, *Aphidius*, y otros; depredadores Coccinelidos, Dípteros, de la familia Syrphidae y entomopatógenos como *Verticillium licanii*, sin embargo su uso no ha sido tan exitoso por la poca adaptación, principalmente en épocas críticas (clima) y dificultad en métodos de crianza de éstos. Paralelamente, el método más utilizado es el químico, sin



embargo la aparición de resistencia a muchos grupos de compuestos químicos, gran toxicidad en enemigos naturales y polinizadores, poca especificidad y la alta capacidad de reproducción de los áfidos, han hecho que en la actualidad se busquen métodos alternativos o combinación de ellos (Tomado del portal <http://www.plagas-agricolas.info.ve>, 20 de enero de 2008).

2.3 PRODUCTOS Y EXTRACTOS BOTÁNICOS

El uso de productos botánicos es tan antiguo como la vida humana misma, su uso se había dejado en el olvido por cierto tiempo a causa de la revolución verde que promovía el uso de insecticidas y fertilizantes sintéticos debido al gran uso de material vegetal mejorado altamente productivo que demanda gran cantidad de insumos agrícolas, lo cual produjo contaminación ambiental. Debido a sus propiedades químicas, principios activos y fácil degradación en el ambiente, se está promoviendo nuevamente su uso, teniendo aplicaciones en la medicina, farmacéutica, cosmetología, biotecnología y en la agricultura ecológica a través del uso de extractos botánicos (Osorio, 2006).

Olave y Mendez (2003) definen los extractos botánicos como preparados farmacéuticos en los cuales se adiciona agua destilada u otro disolvente en plantas medicinales para la extracción de principios activos de muchos usos, principalmente terapéuticos. Consideran tres tipos: **Extractos fluidos**: el volumen del solvente es igual al de la planta seca; **Extractos blandos**: en éstos se hace un retiro parcial del solvente hasta tener una consistencia de ungüento y **Extractos secos**, a los cuales se les quita totalmente el solvente.

En cuanto a su forma de extracción se plantea una gran variedad de protocolos. Se menciona el uso de solventes a base de mezcla de diclorometano y metanol (Soberon et al., 2006), disolventes no polares como n-hexano, n-heptano y benceno (Repetto, 1997), pero se menciona frecuentemente el uso de etanol, sin embargo difieren en la concentración y cantidad utilizada y el tiempo en que se deja con el material vegetal; por ejemplo, Soberon (2006), menciona el uso de etanol al 96%, bajo tres maceraciones, por 48 horas; Magallanes, Córdoba y Orozco (2003) reportan una variante del protocolo propuesto por Vlachos et al. (1996), con 20ml de etanol al 80% en 10g del material vegetal, con una maceración, durante 4 horas; Osorio, (2006) cita su uso a una concentración al 70%, sin una relación específica entre éste y el material vegetal, bajo tres maceraciones por 8 días; y McLaughlin (1998) en Bobadilla y otros (2005), menciona el uso de etanol al 95% con un volumen fijo de 3L, con dos maceraciones, durante 7 días. No obstante todos coinciden en el resto del proceso: filtración, que puede ser en frío o caliente (McLaughlin, 1998; en Bobadilla et al., 2005), evaporación del solvente y redisolución o en su defecto, enrazado a cierto volumen (Magallanes, Córdoba y Orozco, 2003).



Existe un sinnúmero de trabajos que confirman la efectividad de los extractos botánicos incluso con niveles iguales o superiores de efectividad que los insecticidas sintéticos. A continuación se mencionan algunos:

En un estudio realizado con el objetivo de evaluar la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de 12 macroalgas marinas de la costa central del Perú, realizado por Magallanes, Córdoba y Orozco (2003), solamente 5 (*Grateloupia doryphora*, *Ahnfeltiopsis durvillaei*, *Prionitis decipiensis*, *Petalonia fascia* y *Bryopsis plumosa*) presentaron efecto en 3 cepas bacterianas: 2 especies de *Staphylococcus aureus*: una clínica y no clínica y en la cepa clínica *Enterococcus faecalis*; el extracto de *B. plumosa* mostró el mayor efecto antibacteriano contra las dos cepas de *S. aureus* y *P. fascia* mostró el mayor espectro al inhibir las tres cepas mencionadas.

En estudio de acción biocida de extractos de plantas *in vitro* y colectadas, de hojas, tallo y espigas maduras (con fruto y semillas) de *Piper tuberculatum* Jacq., sobre larvas de III estadio de *Diatrea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae), solamente los extractos de diclorometano-etanol (2:1) y etanol de espigas maduras (100% mortalidad con 0.092mg.ml⁻¹ y 0.185mg.ml⁻¹; y 95% a 0.185mg/ml respectivamente) y espigas de diclorometano-etanol de plantas *in vitro*, (90% de mortalidad a 0.185mg.ml⁻¹) mostraron niveles significativos de mortalidad, determinándose CL₅₀ para espigas maduras de 0.11mg.ml⁻¹ con etanol y 0.16mg.ml⁻¹ con dicloro-etanol; y 0.39mg.ml⁻¹ con diclorometano-etanol, para plantas *in vitro* (Soberón et al., 2006).

Estrada y otros (1994), en Alonso (1999), plantearon que en pastizales y plantaciones de Caña de Fomento, los ataques del Falso medidor (*Mocis latepies*) fueron controladas con tres aplicaciones de extractos acuosos a base de semillas de Paraíso (*Melia azedarach*) durante el periodo de mayor crecimiento vegetativo con dosis de 100 a 150g de polvo de semilla por litro de agua con una efectividad de 70 y 80%; asimismo reportan un control del 80% para *Diabrotica balteada* en frijol, con la misma dosis, y que estos resultados deben ser semejantes para crisomélidos polífagos que atacan leguminosas rastreras utilizadas en ganadería.



2.4 *Ryania speciosa*

2.4.1 Taxonomía

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Violales

Familia: Flacourtiaceae

Género: *Ryania*

Especie: *speciosa*

2.4.2 Variedades y Distribución Geográfica. Está integrada por 10 variedades que tienen distribuciones discontinuas con algunas zonas de contacto.

- *R. speciosa* var. *bicolor* (DC.) Monach. Lloydia 12: 19 1949: Se distribuye al noreste de Suramérica, principalmente entre las fronteras de Venezuela y Brasil.

- *R. speciosa* var. *chocoensis* (Triana & Planch.) Monach. Lloydia 12: 18 1949: Se distribuye principalmente en el flanco occidental de la cordillera Occidental, aunque puede adentrarse hasta el magdalena medio. Las poblaciones del Pacífico colombiano tal vez sean las mejor conservadas de la especie.

- *R. speciosa* var. *chocoensis* (Triana & Planch.) Monach. Lloydia 12: 18 1949: Se distribuye principalmente en el flanco occidental de la cordillera Occidental, aunque puede adentrarse hasta el magdalena medio. Las poblaciones del Pacífico colombiano tal vez sean las mejor conservadas de la especie.

- *R. speciosa* var. *minor*: se distribuye por el Amazonas colombiano ecuatoriano, peruano venezolano y brasilero.

- *R. speciosa* var. *mutisii* Monach. Lloydia 12(1): 19 1949: se distribuye entre Tolima y Cundinamarca; posiblemente esté extinta.



- *R. speciosa* var. *panamensis* Monach. Lloydia 12(1): 18 1949: se distribuye entre Panamá, Costa Rica y Nicaragua.

- *R. speciosa* var. *stipularis* (Linden & Planch.) Monach. Lloydia 12: 17 1949: se distribuye entre Colombia y Venezuela.

- *R. speciosa* var. *subuliflora* (Sandwith) Monach. Lloydia 12: 14 1949: se encuentra ampliamente distribuida por Ecuador, Perú, y la frontera entre Colombia y Venezuela en la Orinoquía.

- *R. speciosa* var. *tomentella* Sleumer Fl. Neotrop. 22: 267-268 1980: se distribuye en el norte de Perú y la frontera entre Ecuador y Colombia.

- *R. speciosa* var. *tomentosa* (Miq.) Monach. Lloydia 12: 16 1949: se distribuye en las fronteras entre Colombia, Ecuador y Perú y la frontera noreste entre Venezuela y Brasil.

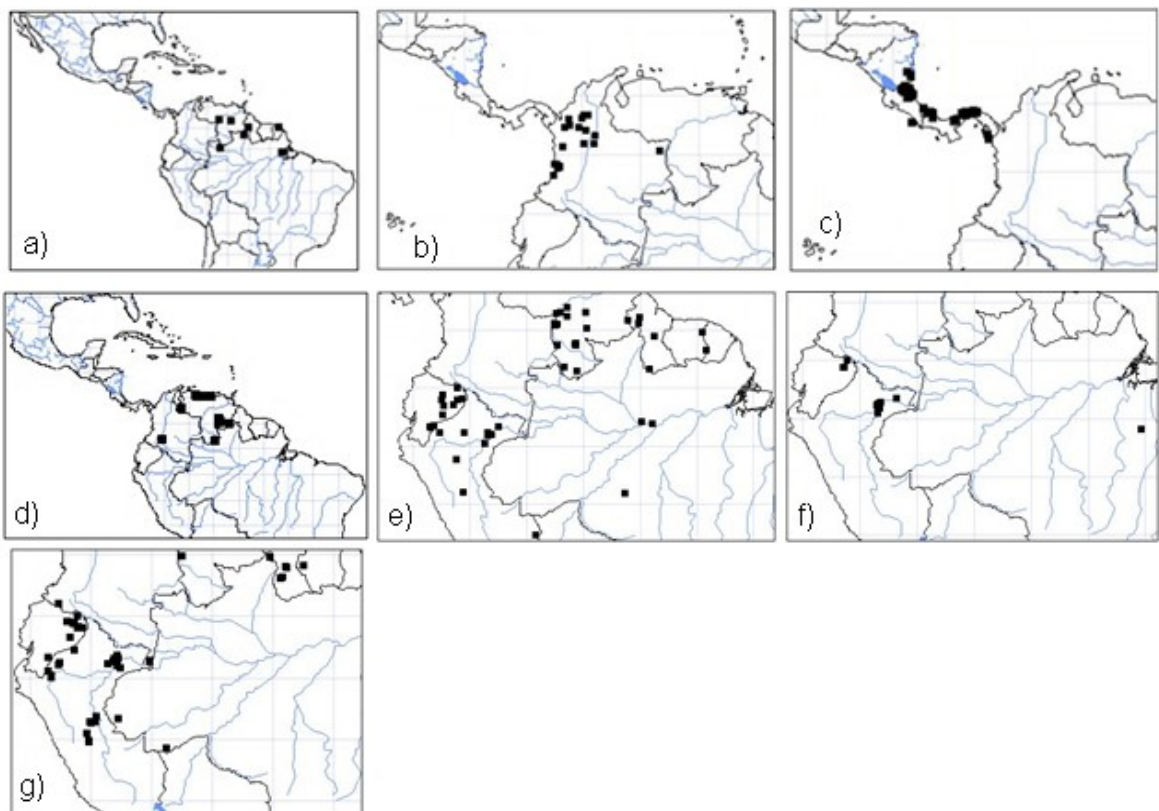


Figura 1. Distribución geográfica de algunas variedades de *R. speciosa*: a) *R. speciosa* var. *bicolor*; b) *R. speciosa* var. *chocoensis*; c) *R. speciosa* var. *panamensis*; d) *R. speciosa* var. *stipularis*; e) *R. speciosa* var. *subuliflora*; f) *R. speciosa* var. *tomentella*; g) *R. speciosa* var. *tomentosa*. (Fuente: Base de datos Tropicos de Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org>)



2.4.3 Compuestos Químicos y Mecanismos de Acción. La mayor parte de estudios sobre la planta hacen referencia al uso del alcaloide rianodina y sus glicósidos para entender la fisiología de la contracción de las fibras musculares, y permitieron el descubrimiento de receptores de membrana específicos en los músculos humanos, lo cual contribuyó al desarrollo de la medicina fisiológica humana. Se considera que aproximadamente del 0.16 a 0.2% del peso seco del tallo está constituido por esta sustancia. La toxicidad de *Ryania* en los insectos puede ser por contacto o por vía interna, afectando directamente a los músculos impidiendo su contracción y ocasionando parálisis. Esta sustancia se acopla a una molécula de la membrana de las fibras musculares, a la que se le dio el nombre de receptores de rianodina, los cuales regulan la concentración de calcio en el interior de la fibra, e interfieren en el proceso de canalización de calcio provocando una liberación masiva de éste y en consecuencia, fuertes contracciones musculares y prontamente se produce la muerte (Dayan, Cantrell y Duke, 2009).

Se reconoce que estos receptores están presentes en el tejido nervioso, y que la rianodina, inhibe drásticamente la síntesis de proteínas en las neuronas, por lo que no se descarta que el efecto sobre los insectos se deba también a deterioros del sistema nervioso (Alcazar et al., 1997). La ingestión humana de grandes dosis de *Ryania* causa debilidad, respiración lenta y profunda, vomito, diarrea y temblores. La rigidez de los músculos y la depresión del sistema nervioso central conducen al coma y la muerte por paro respiratorio en altas dosis.

Rogers y colaboradores (1948), en un estudio para la búsqueda de nuevos insecticidas a partir de plantas, encontraron que los extractos de los tallos y raíces de *Ryania* spp mostraron actividad insecticida. Lograron aislar y purificar a partir de raíces y tallos de *R. speciosa*, el primer alcaloide reportado para la familia Flacourtiaceae, al cual denominaron rianodina y le asignaron tentativamente la fórmula molecular $C_{25}H_{35}NO_9$ o $C_{26}H_{31}NO_9$.

Waterhouse, Holden y Casida (1984), aislaron rianodina (**1**) y 9,21-didehidrorianodina (**2**) a partir de extractos acuosos purificados por cromatografía líquida de alta resolución, de muestras frescas de tallos pulverizados de *R. speciosa*. Los bioensayos revelaron que los efectos tóxicos de **1** y **2** son casi iguales, estos resultados con la relación 3:1 establecida para **2** y **1** en la muestra, les permitió a estos autores concluir que **2** en lugar de **1** era el principal componente tóxico.

Ruest, Taylor y Deslongchamps (1985), aislaron seis nuevos metabolitos estructuralmente relacionados con rianodina (**1**), a partir de los extractos crudos de tallos pulverizados de *R. speciosa*. Los compuestos aislados son ésteres diterpenos del ácido α -pirrol carboxílico: dehidrorianodina (**2**), y los ésteres **3-7**. Los metabolitos aislados son de gran importancia ya que tienen el potencial de producir desarrollos de formulaciones que incluyan extractos de esta planta, solos o en mezclas con las especies antes mencionadas para aumentar su actividad y eficiencia y para disminuir la pérdida gradual de efectividad como consecuencia de resistencia adquirida por las plagas expuestas a concentraciones subletales.

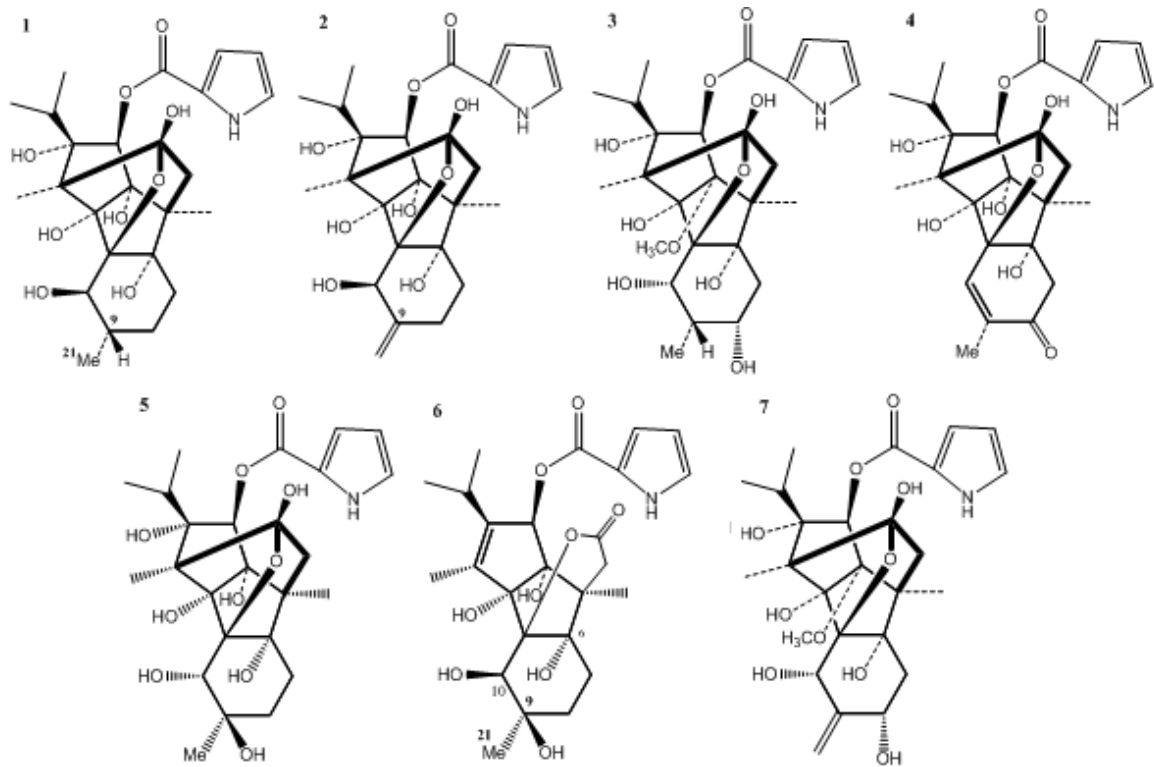


Figura 2. Algunos compuestos químicos de extracto de *R. speciosa*. (Fuente: Investigation of the constituents of *Ryania speciosa*)

2.4.4 Uso de Riania como Insecticida. Ryania es un insecticida de uso general y está clasificado por la EPA como de toxicidad clase III, es decir ligeramente tóxico. Ryania es usada muy a menudo para el control de las orugas plagas de frutos y follaje (*Cydia pomonella* L.) en manzanas y peras, el thrip de los cítricos, *Scirtothrips citri* (Moulton) en *Citrus* spp. y el barrenador europeo del maíz, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) en maíz y Las marcas comerciales son Natur Gro R-50, Natur Gro Triple Plus, Ryanicide y Ryan 50.

Se usa hace casi más de medio siglo Las formulaciones de Ryania son vendidas en combinación con rotenona y piretrinas. Debido a su alto costo es usada ocasionalmente en los jardines de las casas y por productores orgánicos. Al igual que rotenona, Riania persiste más tiempo en el campo después de la aplicación que otros insecticidas derivados de plantas, presentando cierto grado de control residual por encima de los tres a cinco días después la aplicación en la superficie de la planta.

Los arbustos eran talados en Centroamérica y vueltos aserrín; luego se acopiaban y se despachaban hacia Estados Unidos. Los agricultores remojaran el material en agua corriente, en la víspera, en canecas metálicas de 55 galones. El extracto acuoso se filtraba y aplicaba directamente sobre los cultivos, con bombas fumigadoras de espalda. Actualmente la rianodina, es por sí misma un producto de comercialización para estudios fisiológicos con alto valor agregado.



Riania ha sido usada en los Estados Unidos desde 1940, la mayoría de preparaciones comerciales son polvos crudos (50% polvo de riania), aunque los constituyentes alcaloidales pueden ser extraídos con agua, alcohol, acetona, éter o cloroformo para producir formulaciones líquidas o polvos mojables comerciales.

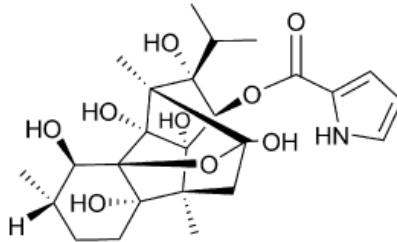


Figura 3. Estructura molecular de Rianodina. (Fuente: Investigation of the constituents of *Ryania speciosa*)

2.5 CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL₅₀).

En 1493 Paracelso afirmó que todas o ninguna sustancia es tóxica; todo depende de la dosis, pues ésta es la que realmente hace a las sustancias tóxicas. Por lo anterior las sustancias son estudiadas en su potencial tóxico a través de la CL₅₀, la cual expresa la respuesta estudiada o deseada, bajo cierta concentración, que produce una sustancia al 50% de una población de seres vivos en particular, que por lo general es la muerte (Vallejo y Baena, 2007); y aunque este método es un buen parámetro de estudio, no siempre indica la capacidad tóxica de una sustancia ya que algunas sustancias muestran un efecto subclínico o no evidente (Repetto, 1997).

2.5.1 Procedimiento para Determinación de la CL₅₀. Para ello se realiza una representación gráfica que relaciona la dosis-respuesta a través del un tiempo determinado que generalmente forma una hipérbola que al aumentar la dosis, incrementa el efecto hasta llegar a una dosis máxima (Dm) que alcanza un efecto máximo (Em); sin embargo en ocasiones esta correlación fluctúa y gráficamente forma una sigmoidea. Cuando se representa el efecto frente al logaritmo de las dosis, se obtiene una línea recta. La CL₅₀ será en antilogaritmo de las dosis en el eje "X", obtenido al cortar la línea formada con una línea recta que se traza a partir del 50% de la población estudiada (Repetto, 1997).

La CL₅₀ se expresa en mg.L⁻¹ cuando la sustancia está presente en aire o agua; y en mg/Kg cuando está presente en alimentos y entre más baja sea, mas tóxica será la sustancia (Vallejo y Baena, 2007).

Para la estimación de la DL₅₀ se recomiendan cuatro métodos: método Probit (paramétrico), método de Litchfield-Wilcoson (grafico), método de Sperman-Kamber (no



paramétrico) y el método gráfico, de los cuales el más recomendado y conocido en el Probit.

- Método Probit. Es un análisis que transforma el porcentaje de efecto (porcentaje de muertes) a unidades Probit formando un sistema de tipo lineal, que se procesan a través

de un análisis de Regresión, formando una ecuación de la forma $Y = a + bx$. Para ello debe haber como mínimo dos dosis que reflejen efecto deseado intermedio (muerte entre 1 y 100%) y las dosis deben estar en proporción geométrica para que sus logaritmos aumenten frecuentemente. Las concentraciones son expresadas en el eje "x" de forma logarítmica y los porcentajes de mortalidad son convertidos a valores en Probit. Se procede a graficar y sobre esta se realiza una recta a partir del probit 5.0 hasta cortar la línea formada por la grafica; el antilogaritmo del valor correspondiente en el eje "x" será la CL_{50} (Díaz, Bulus y Pica, 2008).

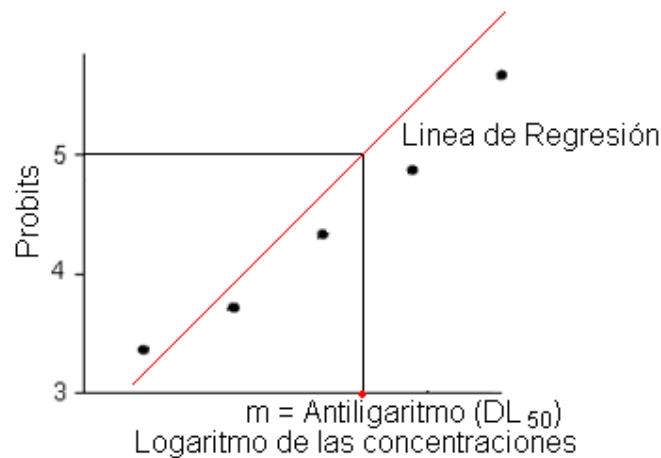


Gráfico 1. Relación dosis-respuesta para cálculo de CL_{50} . (Fuente: Métodos Estadísticos para el Análisis de Resultados de Toxicidad)



3. METODOLOGÍA

La investigación tuvo su desarrollo en salón acondicionado para obtener condiciones homogéneas, en zona residencial de la comuna 9 de Buenaventura, barrio $Y = a + bx$. Independencia (anexo B y C), en el departamento del Valle del Cauca, temperatura de $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de $94\% \pm 4\%$ y fotoperiodo de 12h día y 12h oscuridad, periodo de Junio de 2008 y abril de 2009. El criterio de selección de este sitio se basó en que los experimentos exigían un permanente seguimiento por 36 horas para evaluar mortalidad y caracterizar síntomas de toxicidad en áfidos.

3.1 CRÍA DE *T. citricida*

Se construyó invernadero de $70 * 80 * 90$ cm (ancho, fondo y alto), con malla de 1mm^2 , donde se introdujeron seis plántulas de limón (*Citrus limon*) con seis meses de edad, sembradas en masetas con sustrato formado por mezcla de suelo de rizosfera de plantas de banano (*Mussa sp.*) con alto contenido de materia orgánica, y gravilla (1200g) en relación 2:1, expuestas a condiciones ambientales naturales. Éstas fueron infestadas por tres ocasiones con áfidos adultos alados, colectados de tres arbustos ubicados en diferentes sitios de la zona descrita anteriormente (anexo D y E); cada uno fue utilizado como fuente para la crianza de áfidos por cada semana, colectando dos ramas infestadas. Éstos se identificaron previamente en el laboratorio de biología de la Universidad del Pacífico, con ayuda de estereoscopio y claves morfológicas reportadas en el texto Áfidos Asociados al Cultivo de Cítricos en el Salvador (2003).

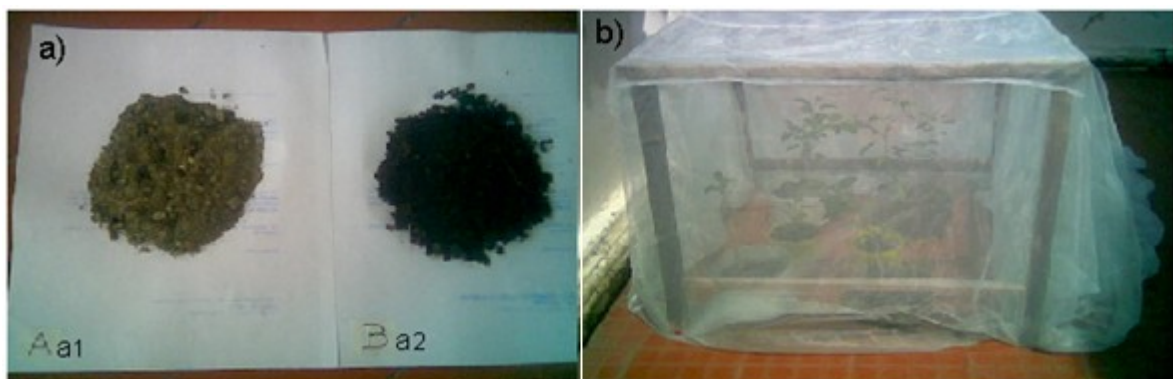


Figura 4. Mezcla de suelo utilizado para siembra de plántulas de limón e invernadero: a) Mezcla suelo: a1 gravilla; a2: suelo de rizosfera de banano; b) Plántulas en invernadero.



3.2 COLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL

Las muestras de *R. speciosa* se colectaron en los linderos de la sede académica de la Universidad del Pacífico (Km 6, vía Cabal Pombo). Se seleccionó hojas y tallo en buen estado fitosanitario, se limpió y se dejó secar por 15 días a temperatura ambiente. Las hojas se trituraron con molino casero; el tallo se cortó con sierra para obtener aserrín, material para los extractos de este último órgano.



Figura 5. Arbusto de *R. speciosa* (a), flores (a₁) y lindero de la Universidad del Pacífico con el terreno lateral derecho (b). (Fuente: Base de datos Tropicos de Missouri Botanical Garden (figura a₁). <http://www.tropicos.org>)



Figura 6. Manipulación de material vegetal: a) Material fresco; b) Material limpio; c) Material seco; d) Material triturado.

3.3 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

Para estandarizar la elaboración de extractos secos de tallo y hoja, se evaluó una variante del protocolo propuesto por McLaughlin et al. (1998), en Bobadilla y otros (2005); la concentración del etanol. Para ello se tuvo en cuenta los siguientes parámetros: Estabilidad de la solución filtrada, a microorganismos (valorada por formación de nata), efectividad de extractos en la mortalidad de áfidos, el peso obtenido y la solubilidad.

Se preparó extractos etanólicos de tallo al 96%, 80% y 70%, con dos maceraciones; una cada 24 horas, en relación 2:1 (solvente/material vegetal); se filtró y el solvente se evaporó en baño de arena. El extracto obtenido se pesó y se disolvió hasta obtener concentración del 4%, con etanol al 57%. Se preparó extractos etanólicos de hoja al 96%, 70% y 55% con dos maceraciones por 8 horas en relación 1:1. La evaporación del solvente y disolución del extracto se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento para el tallo. Las soluciones de extracto de tallo y hoja al 4% se usaron como solución madre para realizar las concentraciones evaluadas, en relación peso-volumen. En esta fase se utilizó un total de 240 individuos.

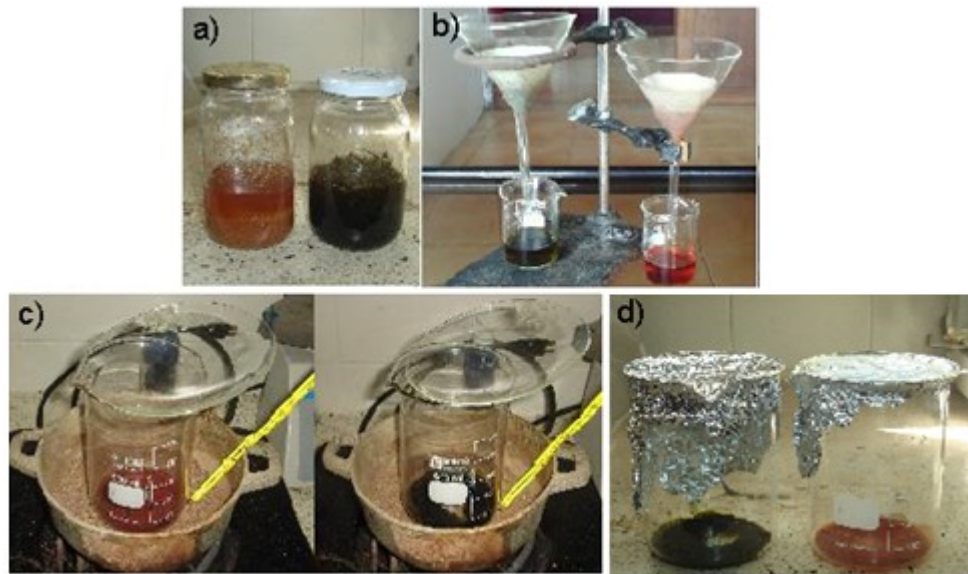


Figura 7. Proceso de producción de extractos: a) Maceración; b) Filtrado; c) Evaporación de solvente con baño de arena; d) Extractos secos

Establecido el protocolo de extracción, para precisar el rango de concentración a utilizar en los experimentos para la hallar la CL_{50} , se realizó bioensayos incrementando las concentraciones de los extractos en proporción aritmética creciente (Diechman y Mergara, 1948, en Mejía, Rodríguez y Güemez, 2001).

3.4 DETERMINACIÓN DE LA CL_{50}

Se utilizó un total de 360 individuos expuestos bajo las siguientes concentraciones: para extracto de tallo, 0.20; 0.70; 1.20; 1.70 y 2.00g.100ml⁻¹; y de 0.50; 1.20; 1.80; 2.40 y 2.95g. 100ml⁻¹, en extracto de hoja. A las 36 horas se dio por culminado el experimento, llevando un seguimiento cada hora por las primeras 6 horas y cada seis horas hasta las 36 horas.

Tanto para el protocolo de producción de extracto como para esta fase, se aplicó 0.8ml de cada concentración y se homogenizó en la superficie de cajas petri, se introdujo 10 áfidos y se tapó.



Figura 8. Preparación de concentraciones decrecientes para la determinación de la CL₅₀ de tallo y hojas de *R. speciosa*. a) Extractos secos; b) Pesado de extractos; c) Disolución de extractos; d) Realización de concentraciones; e) Concentraciones obtenidas: e₁ Concentraciones de extracto de tallo; e₂ Concentraciones de extracto de hoja

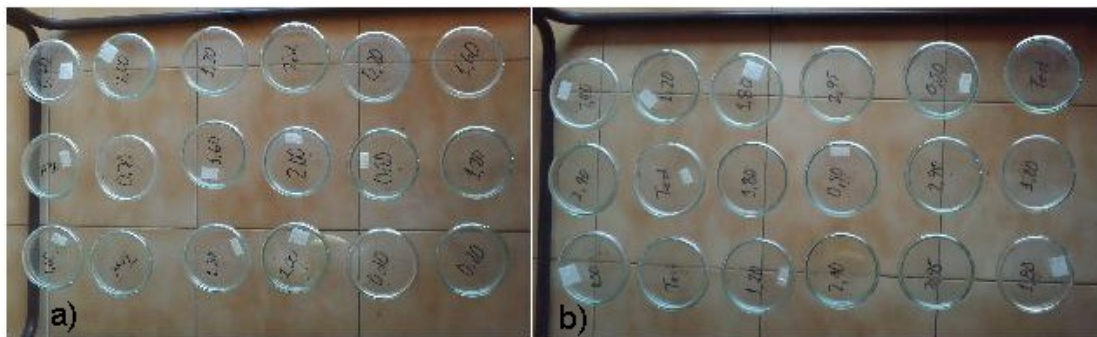


Figura 9. Evaluación de extractos; a) Evaluación de extracto etanólico de tallo al 70% a diferentes concentraciones; b) Evaluación de extracto etanólico de hojas al 75% a diferentes concentraciones.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la evaluación de los extractos etanólicos se realizó un diseño completamente al azar con tres tratamientos y cuatro repeticiones (3*4), utilizando hoja electrónica Excel; para determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) con nivel de confianza de 95% y técnicas de estadística descriptiva.



La Concentración Letal Media (CL₅₀) para las 24h y 36h se determinó mediante un análisis Probit y Regresión Lineal Simple (Zar, 1974; en Mejía, Rodríguez y Güemez, 200; Díaz, Bulus y Pica, 2008), bajo un diseño en bloques completamente al azar con seis tratamientos y tres repeticiones, utilizando hoja electrónica Excel

El parámetro para determinar la muerte de los individuos fue la no respuesta de éstos al recibir dos pinchazos en el abdomen, por un tiempo de 15 segundos. El tratamiento control fue etanol al 1%. No hubo discriminación de sexos en los bioensayos.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CRÍA DE ÁFIDOS EN INVERNADERO

De 26 individuos alados, se clasificaron 25, representados en tres especies (figura 10 y tabla 1): *T. citricida*, *T. aurantii* y *Aphis gossypii*, siendo la primera especie la de mayor frecuencia, 69.2%, (grafico 2), corroborando los resultados obtenidos en investigación realizada por Corpoica (2002), que reporta a esta especie como la de mayor frecuencia en cítricos, de 520 muestras colectadas en varios municipios del departamento del Valle del Cauca; el 77% correspondió a esta especie; además se determinó como la especie de mayor importancia económica por su gran eficiencia en la propagación del Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV).

Un individuo no fue identificada por presentar características de las dos primeras especies: el ala derecha con doble ramificación en vena media y el tercer segmento antenal oscuro, característica ligada a *T. citricida* (figura 8); sin embargo su ala izquierda revelaba una sola rama en su vena media. Este fenómeno es conocido como variación en la vena típica; sin embargo no es frecuente que se presente. Éste incide en la reducción de las ramas M1 y a veces M2 (figura 11), de la vena media (Áfidos Asociados al Cultivo de Cítricos en el Salvador, 2003).

Las plántulas fueron infestadas con 10 individuos de *T. citricida* de la siguiente forma: con cinco en la primera semana, tres en la segunda y dos en la tercera, pues gran parte de los individuos murieron en el proceso de manipulación, en la identificación y el traslado a este sitio. La cría no tuvo éxito: a los 4 días se formó una colonia que declinó rápidamente su población hasta morir. No se halló signos de parasitismo. Diferentes estudios demuestran la sensibilidad de esta especie a factores medioambientales, principalmente la temperatura; Tsai y Wang (1999), reportan que los periodos de desarrollo de estadíos inmaduros varían de 63.1 días a 8°C a 5.5 días a 32°C; el porcentaje de supervivencia aumenta de 81 a 97% entre 8 y 30°C, sin embargo la supervivencia se reduce a 29% al alcanzar los 32°C, temperatura que no solo se pudo haber alcanzado en el invernadero sino sobrepasado, pues la alta densidad de plantas (6 plantas en 0.56m²) y las altas temperaturas de la ciudad pudieron haber inducido en el aumento de la temperatura del microclima del invernadero, produciendo la muerte de éstos.

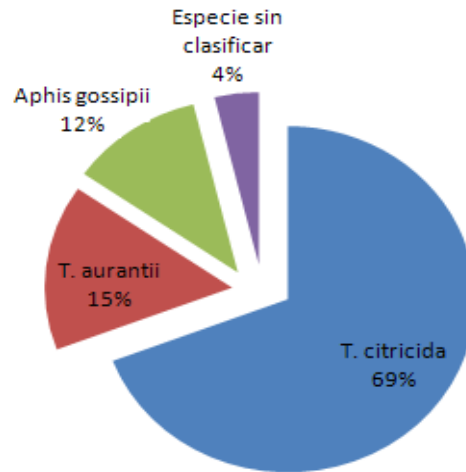


Grafico 2. Porcentaje de especies de áfidos identificados

Tabla 1. Frecuencia de especies identificadas en la colecta de áfidos.

Semanas	Total Clasificados	Especies Clasificadas y el Número de Individuos			
		<i>Toxoptera citricida</i>	<i>Toxoptera aurantii</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Especies no Clasificadas
1	9	9	0	0	0
2	10	6	3	0	1
3	7	3	1	3	0
Total	26	18	4	3	1
Porcentaje	100	69.2	15.4	11.5	3.9

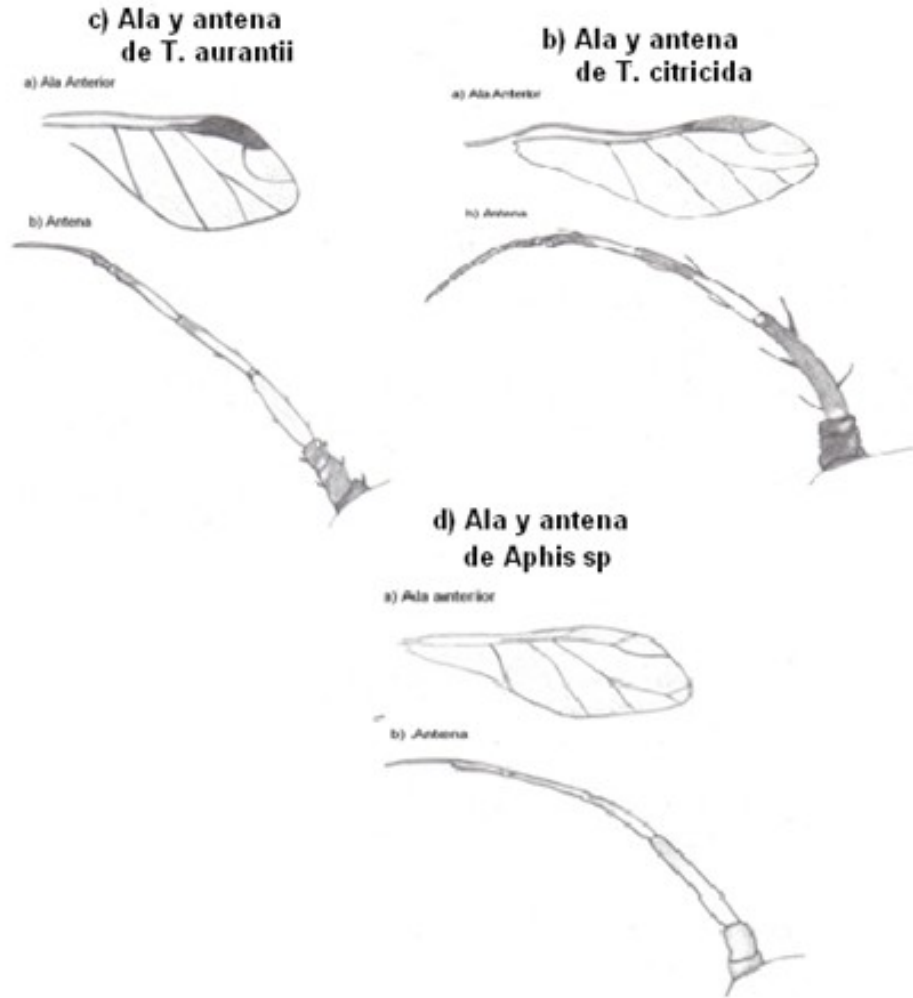


Figura 10. Descriptores morfológicos de de ala anterior y antena de *T. citricida*, *T. aurantii* y *Aphis sp.*

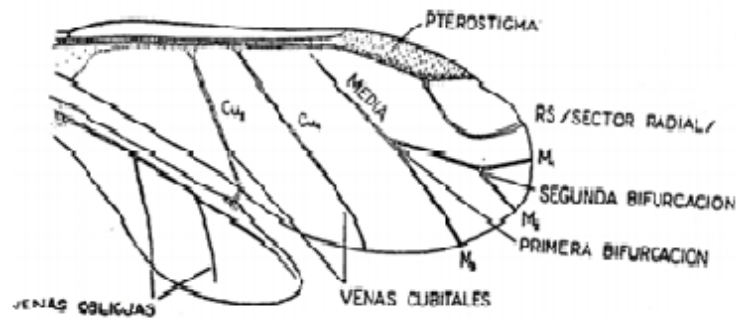


Figura 11. Nominación de las venas del ala posterior y anterior de un áfido (Fuente: Áfidos Asociados al Cultivo de Cítricos en el Salvador)



4.2 PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE EXTRACTOS DE TALLO Y HOJA

Siguiendo el protocolo ya mencionado y resumido en la figura 14, se produjeron extractos con diferentes concentraciones de etanol, con 10g de material vegetal. Los pesos obtenidos se muestran en la tabla 2. Para los extractos de tallo el mayor peso se obtuvo con etanol al 96% (0.4g), mostrando una diferencia significativamente mayor que los extractos etanólicos al 80 y 70% (de 0.1g); en los extractos etanólicos de hoja el mayor peso se presentó con el etanólico al 70%, 1.4g, aproximadamente 0.4g más que los otros.

Los extractos etanólicos de tallo presentaron una solubilidad baja, dentro de los cuales la mayor se presentó en el extracto etanólico al 70%; y la estabilidad a la presencia de microorganismos en el proceso de evaporación fue alta para los tres; no se mostró signos macroscópicos que confirmaran la presencia de microorganismos. Los extractos etanólicos de hoja al 70% y 55% presentaron alta solubilidad, principalmente el último; no obstante se presentó signos que indicaban alta acción microbiana, principalmente en el extracto de hoja al 55% (figura 12), presentándose cuando se evaporó el etanol y quedar agua, lo cual induce a la suposición de que la solución resultante no es tóxicas para microorganismos y además contiene material que sirve de alimento a éstos. Los extractos etanólicos al 96% de ambos materiales vegetales mostraron gran estabilidad a la acción microbiana, resultado que se debió seguramente a la alta concentración de etanol, sustancia tóxica para microorganismos.

Los extractos fueron disueltos y evaluados de manera independiente, por cada material, bajo dosis única de $1.10g.100ml^{-1}$ y $1.50g.100ml^{-1}$, para tallo y hoja, respectivamente, por 30 horas. No hubo diferencia significativa entre extractos de la misma clase obtenidos bajo diferentes concentraciones de etanol (figura 13). En extractos de tallo la mayor mortalidad se produjo con extractos etanólicos al 96% y 70%; 28 individuos. En los extractos de hoja hubo una relación directa entre la concentración y la mortalidad; el extracto etanólico al 96% produjo la mayor mortalidad; 29 individuos (tabla 2).



Tabla 2. Peso de sólidos disueltos de los extractos obtenidos a partir de 10g de material vegetal, estabilidad a los microorganismos y mortalidad de áfidos expuestos a extractos de tallo y hojas producidos a diferentes concentraciones.

Extractos	Peso Extractos (g)	Estabilidad a los Microorganismos	Solubilidad	Mortalidad
Tallo				
96%	0.4021	Alta	Parcial	28 de 30
80%	0.2918	Alta	Total	24 de 30
70%	0.3055	Alta	Total	28 de 30
Hoja				
96%	0.9477	Alta	Parcial	29 de 30
70%	1.4082	Regular	Total	27 de 30
55%	1.0505	Baja	Total	25 de 30

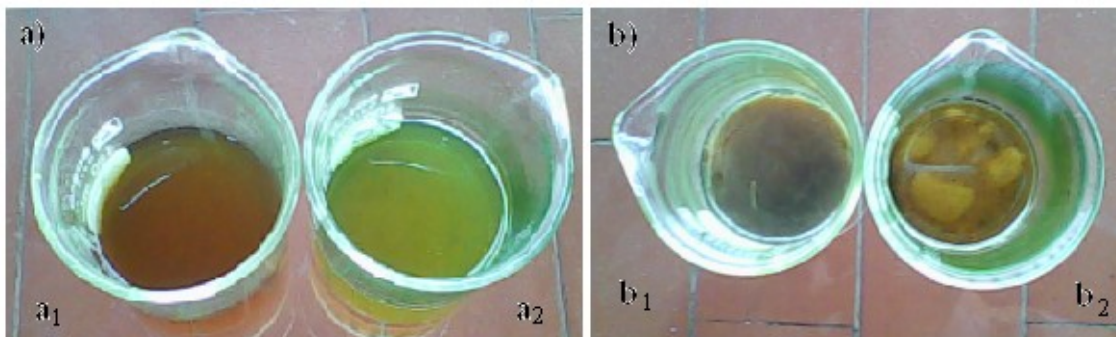


Figura 12. Filtrado de extracto etanólico de hoja: a) filtrado reciente no fermentado (a₁: 55% y a₂: 70%); b) filtrado fermentado (b₁: 55% y b₂: 70%).

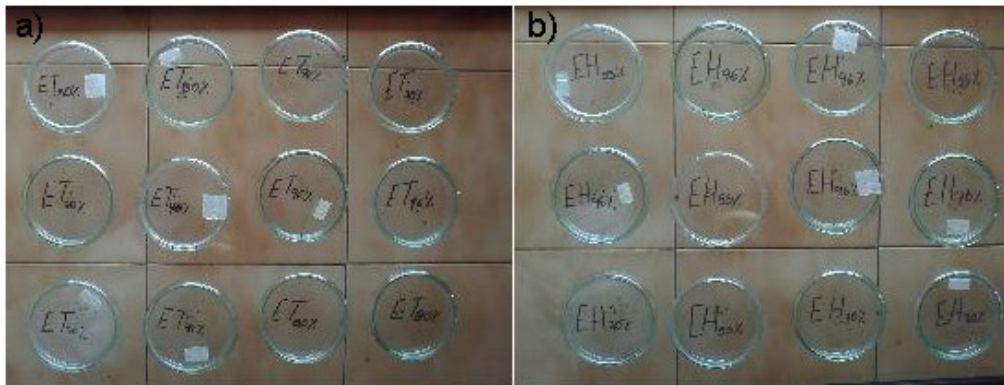


Figura 13. Evaluación de extractos etanólicos de tallo y hoja bajo diferentes concentraciones: a) Extractos etanólicos de tallo al 96,80 y 70%; b) Extractos Etanólicos de hoja al 96, 70 y 55%.

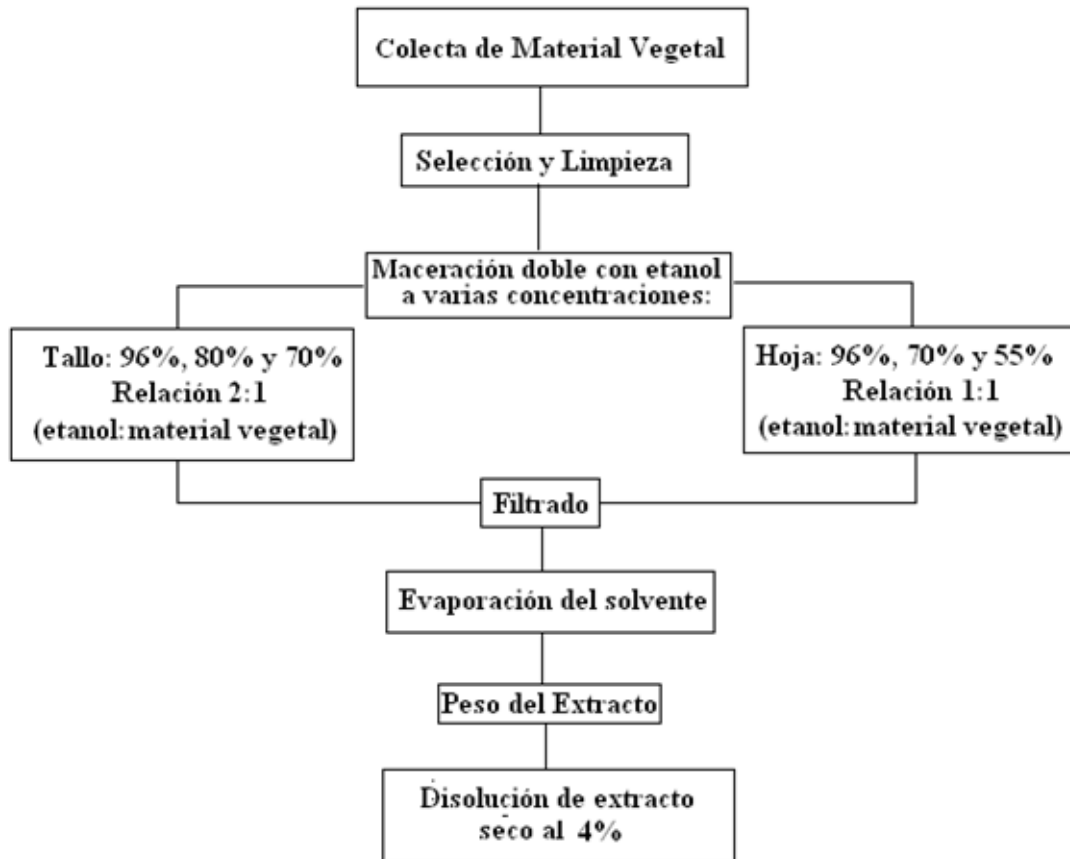


Figura 14. Protocolo de producción de extractos de tallo y hoja de *R. speciosa*.



4.2.1 Extracto Optimizado. Con base en los resultados obtenidos se estableció el siguiente protocolo: realizar extractos etanólicos al 75% y 70%, en relación 1:1 y 2:1 (solvente: material vegetal), con maceración doble por 8h y 24h, para hoja y tallo, respectivamente y filtrar con papel filtro. Evaporar solvente con baño de arena; pesar y disolver extracto seco a concentración de 4% con solución etanólica al 57% realizada con etanol al 96% y agua destilada 60°C.

4.3 ENSAYOS DE TOXICIDAD *IN VITRO* PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL_{50}) DE EXTRACTOS DE TALLO Y HOJA.

La mortalidad de áfidos expuestos bajo diferentes concentraciones y tiempos de exposición se expresan en la tabla 3; Tanto para extracto de tallo como de hojas se reporta mortalidad a la segunda hora en todas las concentraciones excepto el testigo y a $0.50g.100ml^{-1}$ en extracto de hoja, y $0.20g.100ml^{-1}$, $1.20g.100ml^{-1}$ y el testigo en extracto de tallo. Durante el transcurso del experimento no se reportó mortalidad bajo ninguna concentración del total de individuos expuestos (30 individuos).

Los mayores reportes de mortalidad se observaron a las 36 horas para los extractos a excepción de las concentraciones de $1.60g.100ml^{-1}$ y $2.00g.100ml^{-1}$ a las 24 y 30 horas respectivamente, en extracto de tallo, y $0.5g.100ml^{-1}$ a las 30 horas en extracto de hoja.

De acuerdo al grafico 3, se observa una acción letal, en áfidos, más rápida, por parte del extracto de hoja, principalmente en las primeras 6 horas, sin embargo esta situación tiende a ser igualada a partir de las 18 horas. A pesar de ello esto se presenta solamente en las concentraciones más altas del extracto de tallo (1.2 ; 1.6 y $2.0g.100ml^{-1}$).



Tabla 3. Mortalidad de áfidos en tiempos de exposición bajo diferentes concentraciones de extractos de tallo y hoja.

		Concentraciones (g/100ml)										
		1	2	3	4	5	6	12	18	24	30	36
Hoja	0.50	0	0	0	0	5	9	13	15	16	20	20
	1.20	0	5	6	6	8	11	14	17	17	17	20
	1.80	0	5	10	13	15	15	18	19	20	21	24
	2.40	0	3	6	10	13	17	21	22	23	24	25
	2.95	0	3	9	11	14	16	21	21	23	24	25
	Testigo	0	0	0	0	1	2	3	5	9	12	15
Tallo	0.20	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	6
	0.70	0	1	1	1	1	1	2	3	4	10	15
	1.20	0	0	0	0	4	4	8	13	17	20	22
	1.60	0	7	7	7	7	12	20	23	24	24	24
	2.00	0	1	1	3	3	5	14	17	23	26	26
	Testigo	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	7

Las concentraciones letales a las 24h y 36h se muestran en la tabla 4; al final del experimento se determinó una CL_{50} de 236mg.L^{-1} y 68mg.L^{-1} en extractos de tallo y hoja respectivamente, mostrando así, el extracto de hoja, un mayor grado de toxicidad, aproximadamente cuatro veces más tóxico que el de tallo. Del mismo modo se expone la determinación de estas concentraciones en las graficas 4 y 5, donde se muestran los logaritmos de las concentraciones interceptadas en el Probit 5.0, en g.100ml^{-1} , las cuales fueron calculadas a través de un análisis de regresión lineal (ver anexo A).

Tabla 4. Concentración Letal Media (CL_{50}) de extractos de tallo y hoja a las 24 y 48 horas.

Extractos	Tiempo Exposición (Horas)	CL_{50} (mg.L^{-1})
Tallo	24	432
	36	236
Hoja	24	204

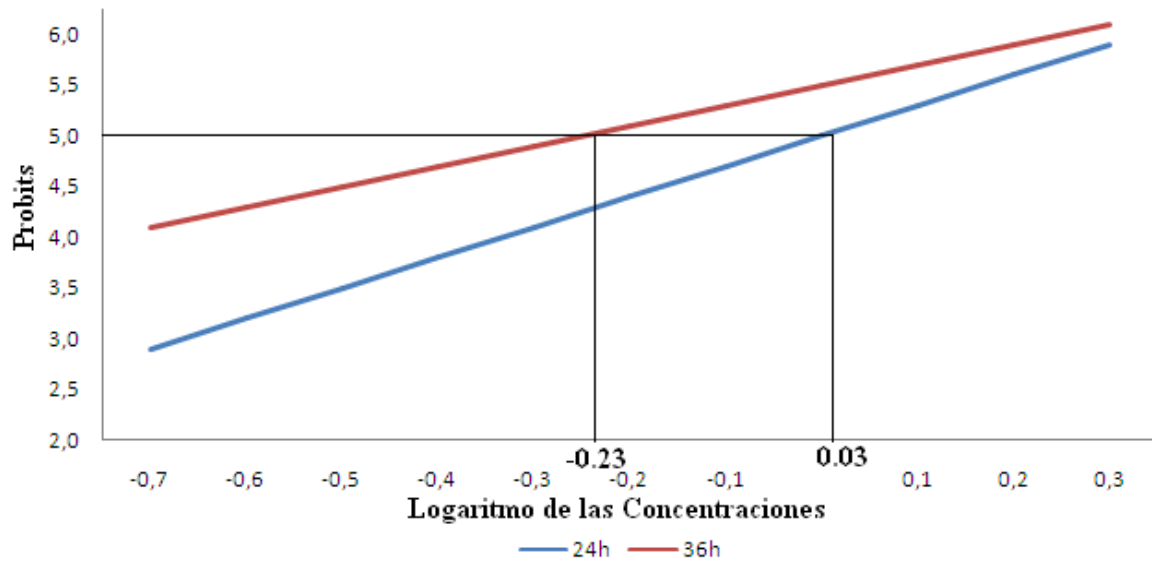


Gráfico 4. Análisis de regresión lineal para la CL₅₀ a las 24h y 36h de extracto de tallo (g.100ml⁻¹).

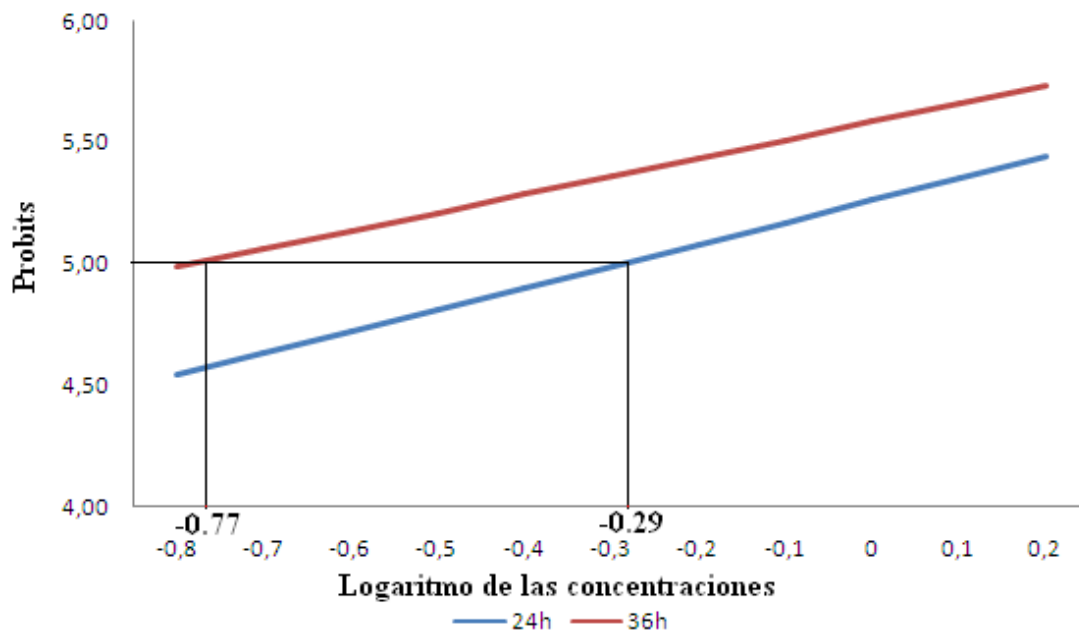


Gráfico 5. Análisis de regresión lineal para la CL₅₀ a las 24h y 36h de extracto de hojas (g.100ml⁻¹).



Aunque generalmente se reporta raíz y tallo como los órganos de reserva de diferentes sustancias químicas, el mayor grado de toxicidad de extractos de hoja puede explicarse por el hecho de que la hoja es el órgano especializado en el proceso de transformación de energía luminosa en química (fotosíntesis), generando como producto final azúcares $[CH_2O]$, los cuales sirven como sustancia primordial para la iniciación de procesos bioquímicos que producen aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y otros polímeros, de los cuales se desarrollan nuevas rutas de reacciones bioquímicas que inducen a la formación de compuestos peculiares, conocidos como metabolitos secundarios (figura 15), que pueden mostrar acción insecticida, haciendo así que sus extractos de este órgano puedan ofrecer mayor cantidad de componentes activos que los de cualquier otro órgano, con un amplio rango de acción (Anaya et al., 2001; Azcon-Bieto y Talón, 2000).

Por otra parte, la toxicidad del extracto de hoja fue baja; no obstante su explicación se puede basar en estudios realizados sobre fisiología muscular humana, que han demostrado que la Rianodina, alcaloide derivado de *Ryania*, en concentraciones nanomolares abre los canales de Ca^{+2} , pero los cierra en concentraciones micromolares, produciendo la muerte (Taleisnik, 2006).

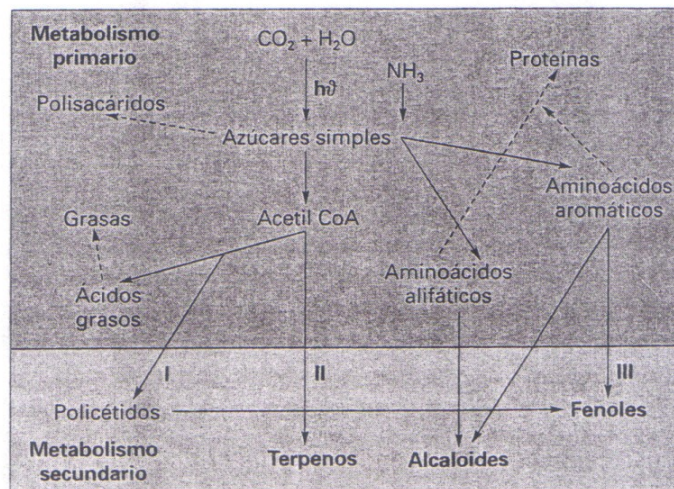


Figura 15. Rutas del metabolismo primario y secundario (Fuente: Fundamentos de Fisiología Vegetal)

Hasta el momento no se reporta el uso de esta variedad como insecticida de plagas agrícolas con excepción de sus uso etnobotánico como matacucaracha (sanidad humana), ni un estudio sobre las sustancias que contiene su extracto, sin embargo estos resultados son prometedores porque comprueban el gran potencial insecticida de esta especie y abre la posibilidad de su explotación con miras económicas a través de un mejor uso racional de esta especie, con efectos ecológicos más positivos ya que esto implicaría una menor tala de éstos, que incide en la protección del suelo y reducción en la contaminación.



4.4 SÍNTOMAS OBSERVADOS EN *T. citricida*.

La toxicosis de los áfidos fue similar al ser expuestos a ambos extractos. Se resume de la siguiente manera:

- a) En la primera hora de exposición, los individuos del tratamiento testigo se mostraban activos y se posaban sobre la caja petri; los expuestos a ambos extractos bajo todas las concentraciones redujeron su actividad en comparación con el testigo pero se posaban sobre su cuerpo y se desplazaban normalmente.
- b) Entre la segunda y tercera hora, los individuos testigo no mostraron novedad; los áfidos expuestos a los extractos mostraban movimientos descoordinados, principalmente los expuestos a concentraciones por encima de $1\text{g}\cdot 100\text{ml}^{-1}$.
- c) Entre las cuatro y seis horas, la mayor parte de los individuos expuestos al agente tóxico adoptan una posición lateral o boca arriba, su movimiento se redujo notoriamente; algunos reaccionaban solo al percibir el estímulo de la aguja.
- d) A las doce horas los movimientos de los individuos en el tratamiento testigo, se redujeron. Los expuestos a los extractos mostraron la expresión descrita anteriormente.
- e) En las dieciocho horas se produce aborto de ninfas de áfidos bajo todos los niveles evaluados en ambos extractos: se observa individuos sin extremidades, distinguiéndose solo el cuerpo y los ojos (figura 15). En el tratamiento testigo se observó ninfas vivas; los individuos evaluados bajo este tratamiento redujeron en gran medida su movimiento.
- f) Entre las 24 y 36 horas, la mayor parte de los áfidos, incluidos los del tratamiento testigo, reaccionaban solo bajo el estímulo del pinchazo en el abdomen.

Con lo anterior, este arbusto se perfila como un material promisorio en el control de áfidos de esta especie ya que el hecho de inducir aborto implica en sí un control, pues reduciría, en esta especie, la capacidad de producir poblaciones, pues una hembra tiene el potencial de producir una población de más de 4.400 individuos en tres semanas (Komasaki, 1988, en Madrigal, 2003), además los organismos que lograsen sobrevivir podrían formar adultos inviables por la precocidad del proceso de gestación (Alonso, 1999).

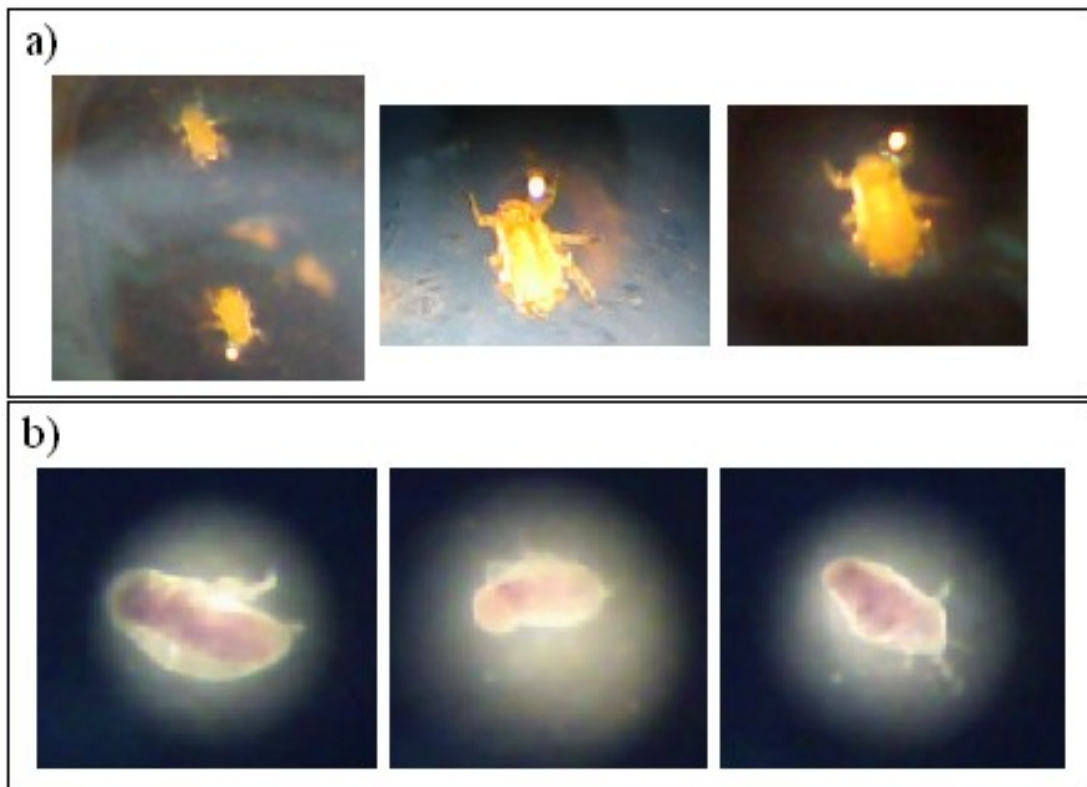


Figura 16. Individuos alumbrados en la evaluación de los tratamientos: a) ninfas vivas, tratamiento testigo; b) abortos producidos por extractos de tallo y hoja.



5. CONCLUSIONES

- 5.1 La concentración letal media (CL₅₀) para extracto de tallo y hojas fue de 236mg.L⁻¹ y 68mg.L⁻¹, al final del experimento, colocándose en evidencia una mayor efectividad y rapidez de la acción insecticida de extractos de hoja que el de tallo.
- 5.2 La mayor efectividad del extracto de hoja, con respecto al tallo implica un resultado positivo desde el punto de vista ecológico y económico pues cambiaría el modo de explotación de esta especie a uno más racional ya que induciría a declinación de su tala y una domesticación agrícola con fines económicos más sostenibles en el tiempo.
- 5.3 Dentro de los síntomas observados en *T. citricida* al ser expuestos en ambos extractos, sobresalen el movimiento descoordinado al cabo de las 4 horas, la particular posición lateral o boca arriba que toman los individuos y la reducción del movimiento, al cabo de las 12 horas. El aborto de ninfas a las 18 horas bajo todas las concentraciones de ambos extractos y la reducción total del movimiento de los áfidos entre las 24 y 36 horas.
- 5.4 Los resultados fueron satisfactorios, perfilando a *Ryania speciosa* (Triana y Planch) Monach. Var. *chocoensis* como un material promisorio para el control de *T. citricida*, por su efectividad y por inducir al aborto de ninfas inmaduras.



6. RECOMENDACIONES

- 6.1 Utilizar otras metodologías para la evaluación de los extractos y sensibilidad de acuerdo al sexo.
- 6.2 Hacer estudio detallado del potencial abortivo que tienen estos extractos.
- 6.3 Evaluar la efectividad de los extractos en plagas de importancia económica en el municipio.



BIBLIOGRAFÍA

1. ALCAZAR, A. et al. 1997. Calcium mobilization by ryanodine promotes the phosphorylation of initiation factor 2 α subunit and inhibits protein synthesis in cultured neurons. *Journal of neurochemistry*. vol. 69, no4, pp. 1703-1708.
2. ALONSO, O. 1999. Insecticidas Botánicos: Una opción Ecológica para el Control de Plagas. Editorial Universitaria. Vol 1, N° 1. Cuba. 3-13p.
3. ANAYA, A. et al. 2001. Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación. Plaza Valdez Editores. Mexico. 138p.
4. AZCON-BIETO, J. y M. TALÓN. 2000. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Mc Graw Hill. España. Pp 133-263.
5. CABANZO et al. 2005. Manual Curativo con Frutas y Plantas Medicinales. Editorial Grupo latino. Colombia. 102p.
6. CORPORACIÓN COLOMBIANA DE INVESTIGACIÓN AGRÍCOLA, Corpoica. 1999. Frutos de la Investigación Corpoica Cinco Años. Bogotá. 52p.
7. ----- . 2002. Revista Regional Novedades Técnicas. N° 2. TROCHEZ, A. y otros. Reconocimiento de Áfidos Asociados a los Cítricos e Incidencia del Virus de la Tristeza de los Cítricos en Algunas Regiones de Colombia; CAICEDO, A. Virus de la Tristeza de los Cítricos: "Una Amenaza Constante", 20 Preguntas para Conocer mejor la Enfermedad 2ª parte. Palmira. pp 8-13.
8. DAVIES, F, y GENE, A. 1999. Cítricos. Editorial Acriba. España. Pp. 3-11.
9. DAYAN F.; C. CANTRELL y DUKE, S. 2009. Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17 (2009) 4022–4034.
10. DEL CAÑIZO et al. 1990. Guía Práctica de Plagas. Editorial Mundi-Prensa. Segunda Edición. España. pp. 350-351.
11. FREDRICK, D. y GENE, L.1994. Cítricos. Editorial Acriba. Zaragoza-España. Pp 3-11; 205-206.
12. MADRIGAL, A. 2003. Insectos Forestales en Colombia: Biología, Hábitos, Ecología y Manejo. Editorial Marin Vieco Ltada. Colombia. 667p.



13. OLAVE, J. y MENDEZ, J. 2003. Guía de Plantas y Productos Medicinales. Convenio Andres Bello. Colombia. 11p.
14. RAVEN, RAY y EICHHORN. 1992. Biología de las Plantas. Editorial Reverte. Segunda Edición. España. 618p.
15. REPETTO, M. 1997. Toxicología Fundamental. Editorial Díaz de Santos. Tercera edición. Madrid-España. pp. 29-31.
16. RODRIGEZ, R. 1997. Las Toxinas Ambientales y sus Efectos Genéticos. Editorial Ciencia/124. Segunda Edición. Mexico. 14p.
17. ROGERS, E. et al. 1948. J. Am. Chem. Soc. PP. 3086-3087.
18. RUEST, L.; D., TAYLOR y DESLONGCHAMPS, P. 1985. Investigation of the constituents of *Ryania speciosa*. Can. J. Chem., 63, 2840-2843.
19. TALEISNIK, S. 2006. Receptores Celulares y la Transducción de las Señales. Grupo Editores. Argentina. 49p.
20. VALLEJO, M. y BAENA, C. 2007. Toxicología Ambiental. Editorial Grupo empresarial Willis. Segunda Edición. Colombia. pp. 167-171.
21. WATERHOUSE, A.; A., HOLDEN y CASIDA, J. 1984. 9,21-Didehydroriodine: a new principal toxic constituent of the botanical insecticide *Ryania*. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1265-1266.



REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

1. Áfidos Asociados al Cultivo de Cítricos en el Salvador. 2003. San Salvador-Salvador. 2p. [Documento en línea] Disponible en formato PDF en: <www.fiagro.org.sv/systemFiles/531.pdf>. [Acceso en enero de 2008].
2. Áfidos de Importancia Agrícola en Venezuela. Venezuela. 12-13p. [Documento en línea] Disponible en formato PDF en: <www.plagas-agricolas.info.ve/documental/afidos-venezuela.pdf>. [Acceso en enero de 2008].
3. BOBADILLA, M. y OTROS. 2005. Evaluación Larvícida de las Suspensiones Acuósas de Guanábana, *Annona muricata* Linnaeus sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae). [Documento en línea] Disponible en formato PDF en: <sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologia/v12_n1/pdf/v12n1a14.pdf>. [Acceso en septiembre de 2008].
4. Descubrimiento de un Nuevo Mecanismo de Acción Insecticida: Un Capítulo Aparte. [Documento en línea] Disponible en formato PDF en: <www.research.bayer.es/edicion-19/19_Fitosanidad.pdf>. [Acceso en septiembre de 2008].
5. DÍAZ, M., BULUS, G. y PICA, Y. Métodos Estadísticos para el Análisis de Resultados de Toxicidad. . [Documento en línea] Disponible en formato HTML en: <www.idrc.ca/es/ev-66572-201-1-DO_TOPIC.html>. [Acceso en septiembre de 2008].
6. Jardín Botánico de Missouri. [Documento en línea] Disponible en formato HTML en: <humangarden.ru/bd/missouri.php?rastname=Ryania>. [Acceso en septiembre de 2009].
7. LANNACONE, J. y LAMAS, G. 2003. Efectos Tóxicos de Molle (*Schinus molle*) y Lantana (*Lantana camara*) sobre *Chysoperla externa* (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE), *Trichogramma pinto* (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE) y *Copidosoma koehleri* (HYMENOPTERA:ENCYRTIDAE). Perú. Vol. 3. pp 347-360. [Documento en línea] Disponible en formato HTML en: <www.bioline.org.br/request?at03039>. [Acceso en enero de 2008].
8. MAGALLANES, C. CÓRDOBA, C. Y OROZCO R. 2003. Actividad de Extractos Etanólicos de Macroalgas Marinas de la Costa Central del Perú. Perú. pp. 4-7. [Documento en línea]. Disponible en formato PDF en: <sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologia/v10_n2/PDF/antibacteriana.pdf>. [Acceso en enero de 2007].



9. Medicina Natural al Alcance de sus Manos: Tratamientos Naturales de Plagas. [Documento en línea] Disponible en formato HTML en: <www.ecoaldea.com/horticultura/fitosanitarios.htm>. [Acceso en enero de 2008].
10. MEJIA, M., RODRIGUEZ, M. y GÜEMEZ, J. 2001. Determinación de la Concentración Letal Media (CL₅₀) y Efecto Hispatológico del Permanganato de Potasio, en Renacuajos de Rana Toro *Rana catesbeiana* (Anura:Ranidae). [Documento en línea] Disponible en formato PDF en: <www.ujat.mx/publicaciones/uciencia/diciembre2001/ranasima_dic2001.pd>[Acceso en septiembre de 2008].
11. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. 2005. La Cadena de Cítricos en Colombia: Una mirada Global de su Estructura y Dinámica 1991-2005. [Documento en línea] Disponible en formato PDF en: <www.agrocadenas.gov.co/citricos/documentos/caracterizacion_citricos.pd> [Acceso en noviembre de 2007].
12. OSORIO, G. 2006. Evaluación de Hongos Endofíticos y Extractos Botánicos para el Control de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Moreler) en Banano. [Documento en línea] Disponible en formato PDF en: <orton.catie.ac.cr/repdoc/A0988e/A0988e.pdf>. [Acceso en septiembre de 2008].
13. SOBERÓN y OTROS. 2006. Acción Biocida de Plantas de *Piper tuberculatum* Jacq. Sobre *Diatrea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae). Perú. pp. 3-5. [Documento en línea] Disponible en formato PDF en: <sisbib.unmsm.edu.pe/BvRevistas/biologia/v13n1/pdf/v13n01a07.pdf>. [Acceso en enero de 2007].
14. TSAI, J. y OTROS.1996. Biología y Control del Áfido Negro de los Cítricos (*Toxoptera citricida* Kirkaldy) y la Tristeza de los Cítricos. Universidad de Minesota. [Documento en línea] Disponible en formato HTML en: <ipmworld.umn.edu/cancelado/Spchapters/TrisezaSp.htm>. [Acceso en septiembre de 2009].



ANEXOS

Anexo A. Calculo de la CL₅₀ de tallo y hojas de *R. speciosa*.

Los porcentajes de mortalidad se convirtieron a valores probiticos (Díaz, Bulus y Pica, 2008) y las concentraciones a escala logarítmica; Se hizo análisis de regresión lineal a estos valores con la ayuda de hoja de cálculo Excel para ajustarlos con más precisión a una función lineal (ficha Datos, Análisis de datos, Funciones para análisis de datos, Regresión). El valor llamado "intercepto" es "a" y el llamado "variable x 1" es el "b" en la

ecuación lineal $Y = a + bx$; se calculó "x" tomando como valor de "y" 5.0 y el antilogaritmo del valor hallado en "x" se determinó como la CL₅₀ en g.100ml⁻¹. El valor obtenido se extrapolo a mg.L⁻¹; el 4% de este valor fue la CL₅₀ fijada en mg.L⁻¹.

Las ecuaciones y coeficientes de correlación, calculadas para tallo y hoja a 24 y 36 horas fueron las siguientes:

- CL₅₀ Tallo 24 horas: $y = 4.92 + 2.88x$ Coeficiente de correlación: 0.97

- CL₅₀ Tallo 36 horas: $y = 5.46 + 1.93x$ Coeficiente de correlación: 0.99

- CL₅₀ Hojas 24 horas: $y = 5.46 + 0.89x$ Coeficiente de correlación: 0.92

- CL₅₀ Hojas 36 horas: $y = 5.58 + 0.74x$ Coeficiente de correlación: 0.89



Anexo B. Ubicación del sitio de desarrollo de la investigación.



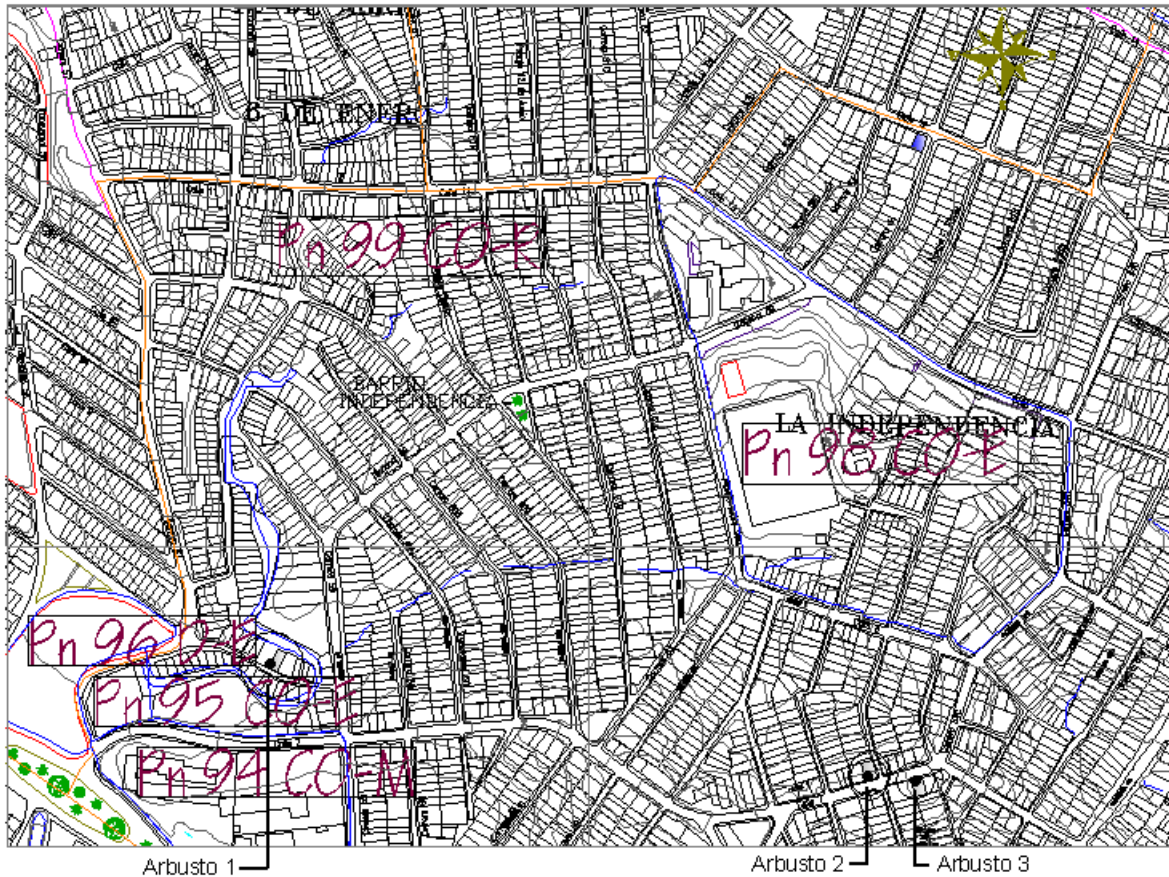


Anexo C. Salón donde se desarrolló la investigación.





Anexo D. Ubicación de arbustos utilizados como de provisión de áfidos para la investigación.





Anexo E. Arbustos utilizados como provisión de áfidos.

