

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
DEPARTAMENTO DE PROTECCION VEGETAL

ESTUDIO DE LOS CONSTITUYENTES QUIMICOS DEL GENOTIPO APN-83
DE Phaseolus vulgaris, RELACIONADO CON LA RESISTENCIA A -
Apion godmani

POR :

ANA LILIAM CABRERA QUINTANILLA
AMALIA ALEJANDRINA VARGAS TORRES

REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE :
INGENIERO AGRONOMO

SAN SALVADOR, OCTUBRE DE 1991

Tesis
C117

U.E.S. BIBLIOTECA
FACULTAD DE AGRONOMIA

Inventario: 13100322

000939
Ej 7

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR : DR. FABIO CASTILLO FIGUEROA

SECRETARIO GENERAL : LIC. MIGUEL ANGEL AZUCENA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS

DECANO : ING. AGR. GALINDO ELEAZAR JIMENEZ MORAN

SECRETARIO : ING. AGR. MORENA ARGELIA RODRIGUEZ DE SOTO

d) por la desatada de la Fac. de e.e. a.a. 15-XI-91

RESUMEN

El frijol juega un papel importante en nuestra alimentación y siendo éste una fuente principal de proteínas para la población, es de vital importancia tratar de aumentar los rendimientos de dicho cultivo; sabiendo que además de otros problemas éste se ve afectado por el picudo de la vaina de frijol Apion godmani, y ésta es una plaga que representa un factor limitante en la producción. Una alternativa para reducir el daño es el aprovechamiento de la resistencia vegetal, utilizando, fuentes de resistencia tales como la línea de frijol APN-83. Este genotipo presenta mecanismos de resistencia,; a los cuales se le desconocen los constituyentes químicos, por lo que es necesario realizar investigaciones encaminadas a reconocimiento de la naturaleza de las sustancias químicas que ejerzan efectos desfavorables al insecto, de modo que disminuyan o anulen su daño económico.

El trabajo fue realizado en las Facultades de Química y Farmacia y Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador; de abril de 1990 hasta marzo de 1991.

Para iniciar el estudio se establecieron siembras de frijol Rojo de Seda y APN-83 en la localidad de Tonacatepeque y en la Ciudad Universitaria; para obtener vainas de --

4-6 cm de largo.

Luego de haber obtenido suficiente cantidad de material vegetal seco, se realizaron las extracciones con alcohol - etílico al 95%, cloroformo y éter de petróleo en hojas, vainas sin semillas y semillas inmaduras de los dos genotipos antes mencionados; los cuales posteriormente fueron evaluados con el insecto para tratar de determinar los grupos químicos que pudieran estar relacionados con la resistencia a Apion godmani, para ello, además de haber sido realizado bioensayos a pequeña escala de los extractos con los insectos, se realizaron pruebas fitoquímicas y de cromatografía en capa fina. Con estos ensayos y pruebas se obtuvo un entendimiento más claro de las respuestas de los extractos alcohólicos en los cuales se determinó la posible presencia de grupos químicos tales como alcaloides, taninos, glicósidos saponínicos y terpenos.

Con respecto a las pruebas biológicas con los insectos se tuvo una mayor respuesta tanto alimenticia como la atracción del adulto de Apion godmani con el genotipo APN-83; lo que sugiere que dicho genotipo es atractivo pero que posiblemente posee algún componente ^{*} que afecta al insecto en su comportamiento desconociéndose hasta el momento en forma completa y precisa la explicación de dicho efecto. En cuanto a las larvas hubo un porcentaje de mortalidad del 100% en las prue

bas realizadas, debido posiblemente en gran parte al efecto del disolvente sobre los tejidos de las vainas tratadas y al grado de descomposición de las mismas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo deseamos expresar nuestros sinceros agradecimientos a las siguientes personas e instituciones :

- A nuestros asesores Ing. Leopoldo Serrano Cervantes y Lic. Salvador Castillo, por su valiosa ayuda, su orientación y respaldo en la realización de nuestro trabajo.
- A la Lic. Rhina Toledo, por su gran ayuda y comprensión que siempre nos mostró motivándonos para ser posible la elaboración del trabajo.
- Al Ing. Ramos Oliva y al Lic. Rosales, por proporcionarnos un lugar adecuado para el montaje de la fase de campo en la Ciudad Universitaria.
- Al Ing. Roberto Alegría, Jefe de la División de Investigación del CENTA, por su generosa donación de reactivos.
- Al Programa de Maenjo de Apion godmani dirigido por el Ing. Mancía y a sus ayudantes por su colaboración en la recolección del insecto.
- A nuestros compañeros Carlos Erazo, Marti Lazo, Oscar E. Lovo, Otto L. Valle, Maximiliano Flores, Ricardo Nieto, José A. Torres y Mario O. Avelar, por proporcionarnos su ayuda en el desarrollo del trabajo.

- A la señora Marina del Carmen Rodríguez, por su eficiente trabajo mecanográfico.

- A todos los miembros del Departamento de Investigación Aplicada y Tesis Profesional de la Facultad de Química y Farmacia por facilitarnos su ayuda y confianza para la realización de nuestro trabajo.

DEDICATORIA

- A DIOS TODOPODEROSO
Que con su voluntad y sabiduría guió mi camino e iluminó mi mente para el logro de mi ideal.

- A LA MEMORIA DE MI PADRE
Pedro Sergio Cabrera (de grata recordación).

- A MI MADRE
Quien con su abnegación y sacrificio hizo posible la culminación de mi carrera.

- A MIS HERMANAS
Quienes con su comprensión y cariño, contribuyeron a la realización de mi meta.

- A MI ESPOSO
Quien con su comprensión y apoyo contribuyó a hacer posible la culminación de mi meta.

- A MIS FAMILIARES Y AMIGOS
Por compartir la alegría en el logro de mi ideal.

Ana Liliam Cabrera Quintanilla

DEDICATORIA

- A DIOS todopoderoso, que iluminó mi camino y mi mente para llegar a culminar mi carrera.

- A MIS PADRES
Alejandro y Victoria. Por brindarme su amor, comprensión y esfuerzo.

- A MIS HERMANAS
Ana y Liliam, por ofrecermme su confianza y ayuda.

- A MIS SOBRINOS
Iris, Yhoni, Alex y Alejandrino. Por su cariño.

- A MI TIA
Carmen. Que siempre me motivó a seguir adelante.

- A MI ABUELITA
Tina. Por la confianza que depositó en mí.

- A MI NOVIO
Oscar Enrique. Por demostrarme su amor y respaldo en todo momento.

- A MIS FAMILIARES Y AMIGOS
Ya que de una u otra forma contribuyeron para alcanzar esta difícil meta de mi vida.

Amalia Alejandrina Vargas Torres

I N D I C E

	Página
RESUMEN	iv
AGRADECIMIENTOS	vii
DEDICATORIA	ix
INDICE DE CUADROS	xvi
INDICE DE FIGURAS	-
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA	4
2.1. Importancia económica	4
2.2. Distribución geográfica	5
2.3. Taxonomía	7
2.4. Ciclo biológico, hábitos y daños	7
2.5. Relación insecto-planta	9
2.6. Sustancias químicas que confieren resis- tencia	12
2.7. Mecanismos de las plantas que confieren re- sistencia a los insectos	17
2.8. Cromatografía en capa fina	18
2.9. Grupos químicos que de alguna manera causan alteraciones en los procesos biológicos de - de los insectos	19
3. METODOLOGIA	22
3.1. Fase de campo	22

	Página
3.2. Fase química de laboratorio	24
3.2.1. Obtención de extractos	24
3.2.2. Pruebas fitoquímicas	26
3.2.3. Análisis de cromatografía en capa fi na	28
3.3. Fase entomológica de laboratorio	29
3.3.1. Obtención de insectos para pruebas - biológicas	29
3.3.2. Evaluación de la respuesta de los - adultos	30
3.3.2.1. Prueba de alimentación uti- lizando discos de hoja	30
3.3.2.2. Prueba de alimentación uti- lizando discos de papel fil- tro	31
3.3.2.3. Prueba de atracción utili- zando discos de papel y ex- tractos de hoja de Rojo de Seda y APN-83 (con los tres disolventes)	33
3.3.2.4. Prueba de atracción utili- zando discos de papel y ex- tracto de vaina sin semilla de Rojo de Seda y APN-83 (con los tres disolventes) ..	34

3.3.2.5. Prueba de atracción alimenticia a diferentes extractos de vaina depositados en papel filtro en condiciones de libre elección	35
3.3.2.6. Prueba de alimentación utilizando hoja de frijol de Rojo de Seda	36
3.3.3. Evaluación de la respuesta de las larvas	36
3.3.3.1. Deposición de larvas en papel filtro	37
3.3.3.2. Deposición de larvas en vainas utilizando testigo absoluto	38
3.3.3.3. Deposición de larvas en vainas, utilizando testigo absoluto y relativo	39
4. RESULTADOS Y DISCUSION	40
4.1. Fase de campo	40
4.2. Fase química de laboratorio	41
4.2.1. Pruebas fitoquímicas	41
4.2.1.1. Pruebas de alcaloides	41

	Página
4.2.1.2. Prueba de taninos	41
4.1.2.3. Prueba de glicósidos sa- ponínicos	41
4.2.2. Análisis de cromatografía en capa fina	41
4.3. Fase entomológica de laboratorio	53
4.3.1. Evaluación de la respuesta de los adultos	53
4.3.1.1. Prueba de alimentación utilizando discos de ho- ja	53
4.3.1.2. Prueba de alimentación - utilizando discos de pa- pel	55
4.3.1.3. Prueba de atracción uti- lizando discos de papel y extracto de hoja de Ro- jo de Seda y APN-83 (con los tres disolventes) ..	55
4.3.1.4. Prueba de atracción uti- lizando discos de papel y extracto de vaina de Rojo de Seda y APN-83 (con los tres disolven- tes)	56

4.3.1.5.	Prueba de atracción alimenticia a diferentes extractos de vaina depositados en papel filtro en condiciones de libre elección	57
4.3.1.6.	Prueba de alimentación - utilizando hojas de frijol común Rojo de Seda ..	58
4.3.2.	Evaluación de la respuesta de las larvas	58
4.3.2.2.	Deposición de larvas en vainas utilizando testigo absoluto	59
4.3.2.3.	Deposición de larvas en vainas utilizando testigo absoluto y relativo	60
5.	CONCLUSIONES	68
6.	RECOMENDACIONES	70
7.	BIBLIOGRAFIA	72
8.	ANEXOS	77

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Resultados de las pruebas fitoquímicas para alcaloides en extractos de hojas	43
2	Resultados de las pruebas fitoquímicas para alcaloides en extractos de vainas sin semillas	44
3	Resultados de las pruebas fitoquímicas para alcaloides en extractos de semillas ...	44
4	Resultados de las pruebas fitoquímicas para taninos en extractos de hojas	45
5	Resultados de las pruebas fitoquímicas para taninos en extractos de vainas sin semillas	45
6	Resultados de las pruebas fitoquímicas para taninos en extractos de semillas	46
7	Resultados de las pruebas fitoquímicas para glicósidos saponínicos en extractos de hoja	46
8	Resultados de las pruebas fitoquímicas para glicósidos saponínicos en extractos de vainas sin semillas	47

Cuadro		Página
9	Resultados de las pruebas fitoquímicas para glicósidos saponínicos en extractos de semillas	47
10	Resultados de las cromatografías para alcaloides con extractos de hoja	48
11	Resultado de las cromatografías para alcaloides con extractos de vainas sin semillas.	48
12	Resultados de cromatografías para alcaloides con extractos de semillas	49
13	Resultados de las cromatografías para glicósidos saponínicos con extractos de hoja	49
14	Resultados de las cromatografías para glicósidos saponínicos con extractos de vaina sin semillas	50
15	Resultados de las cromatografías para glicósidos saponínicos con extractos de semilla.	50
16	Resultados de las cromatografías para terpenos con extractos de hoja	51
17	Resultados de las cromatografías para terpenos con extractos de vainas sin semillas ..	51
18	Resultados de las cromatografías para terpenos con extractos de semilla	52

Cuadro		Página
19	Prueba de alimentación de adultos de <u>Apion godmani</u> en discos foliares de frijol común Rojo de Seda y APN-83	62
20	Respuesta de atracción olfatoria de adultos de <u>Apion godmani</u> ; ante extractos de hoja del genotipo de frijol común Rojo de Seda	62
21	Respuesta de atracción olfatoria de adultos de <u>Apion godmani</u> ; ante extractos de hoja del genotipo de frijol APN-83	63
22	Respuesta de atracción olfatoria de adultos de <u>Apion godmani</u> , ante extractos de vaina del genotipo APN-83	63
23	Respuesta de atracción olfatoria de adultos de <u>Apion godmani</u> , ante extractos de vaina del genotipo Rojo de Seda	64
24	Prueba de alimentación de larvas utilizando extracto alcohólico de semilla de APN-83 ..	64
25	Prueba de alimentación de larvas utilizando extracto de éter de petróleo de semilla de APN-83	65
26	Prueba de alimentación de larvas utilizando extracto clorofórmico de semillas de APN-83.	65

Cuadro

Página

27	Prueba de alimentación de larvas utilizando extracto alcohólico de semilla de APN-83 y dos testigos	66
28	Prueba de alimentación de larvas utilizando extracto de éter de petróleo de semilla de APN-83 y dos testigos	66
29	Prueba de alimentación de larvas utilizando extracto de cloroformo de semilla de APN-83 y dos testigos	67

INTRODUCCION

Entre los granos básicos el frijol (Phaseolus vulgaris) constituye uno de los cultivos más importantes de la dieta alimenticia rural y urbana, debido a su alta preferencia de consumo, valor alimenticio y a su costo relativamente bajo.

Este cultivo se ve afectado en su rendimiento por muchos factores, siendo uno de los más importantes el ataque del insecto Apion godmani (14); el cual causa grandes daños sobre todo en la época lluviosa, llegando a ocasionar hasta un 94% de pérdidas en el rendimiento. Por lo que se considera de vital importancia la búsqueda de alternativas apropiadas para solventar dicho problema; entre las que se está trabajando en el aprovechamiento racional de la resistencia varietal. Tal alternativa se perfila como muy promisorio, especialmente en la actualidad cuando se experimenta claro incremento en los costos de insecticidas y en los problemas ambientales por el uso de los mismos.

Se considera que el empleo de variedades resistentes cobrará creciente importancia para Programas de manejo de Apion godmani en el área de distribución geográfica de esta plaga (4).

En estudios realizados en Honduras y El Salvador se ha determinado que el genotipo de frijol común conocido como línea APN-83, presenta mecanismos de resistencia vegetal contra el picudo de la vaina Apion godmani; sin conocerse hasta la

fecha, la naturaleza de la resistencia de dicho genotipo.

El presente trabajo es un estudio inicial de diferentes extractos de hoja, vainas sin semilla y semillas inmaduras de dicho genotipo, en relación a su efecto sobre adultos y larvas de Apion godmani; comparando éstos con los que ocurren con extractos semejantes del genotipo Rojo de Seda, conocido como susceptible a la plaga. Se utilizaron tres disolventes para obtener diferentes extractos de diferente polaridad : alcohol etílico, cloroformo y éter de petróleo.

El ensayo se realizó en los Laboratorios de Investigación Aplicada y Tesis Profesionales y de Entomología de las Facultades de Química y Farmacia y de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador, respectivamente.

Los diferentes ensayos que se realizaron con los extractos comprendieron pruebas de alimentación y de atracción olfatoria con adultos y bajo condiciones de libre elección cuando los extractos se depositaron en sustratos artificiales (papel filtro) o naturales (discos de hoja). También se expusieron larvas de Apion godmani a tejidos de vainas inmaduras humedecidas con diferentes extractos; así como sustratos artificiales (papel filtro) para observar posibles efectos de comportamiento y sobrevivencia.

El trabajo pretende constituirse en una primera aproximación de los componentes químicos de Phaseolus vulgaris relacionados como causa posible de resistencia genética contra Apion godmani, aportando experiencias metodológicas y sugerencias pa

ra ahondar en estudios similares con más precisión y especificidad de compuestos a estudiar.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Importancia económica del frijol

Dentro del grupo de las leguminosas comestibles, el frijol común es una de las más importantes debido a su amplia distribución en los cinco continentes y por ser complemento nutricional indispensable en la dieta alimenticia principalmente en Centro y Sur América (5). Según datos proporcionados por el Ministerio de Agricultura y Ganadería de El Salvador, su contenido protéico es de 22% y se estima una producción nacional arriba de 900 Ton/año (14).

Considerando la importancia que este cultivo tiene es indispensable tratar de aumentar la producción, incrementando los rendimientos por unidad de área. Para lograr este objetivo se deben buscar soluciones a los diferentes problemas que éste presenta. De estos problemas los de carácter entomológicos son de gran importancia, ya que todos los años se presentan pérdidas económicas debido a los daños que causan las plagas (27).

Dentro de las principales plagas insectiles que afectan la producción del frijol se encuentran el picudo del ejote Apion godmani, el cual es una plaga exclusiva de este cultivo en México y Centro América. Este insecto llega a causar serios daños y reduce considerablemente las cosechas en un 50%, incluso hasta un 98%. El control de esta plaga resulta difícil ya que su presencia se nota cuando las larvas ya han

causado daño debido a que los adultos pasan inadvertidos por su tamaño reducido y habilidad para volar. Los frijoles trepadores, por su prolongado período de floración, están expuestos al ataque del insecto por más tiempo, lo que dificulta su control. Por tal motivo el control químico no es una de las alternativas, sobre todo si se toma en cuenta que el productor de frijol es un agricultor de subsistencia (10). Los costos de insecticidas sintéticos han aumentado notablemente; ellos han alcanzado un nivel tan alto que los agricultores no están en condiciones de comprar estos productos en las cantidades necesarias. Además sus efectos no son específicos para combatir cierta plaga, ellos son nocivos al beneficio de los insectos. Aplicaciones masivas han tenido como resultado, la aparición emergente de otra dosis para insectos que son resistentes (29). Pero debido a las serias plagas que atacan a los cultivos un control es necesario para obtener rendimientos razonables (13).

La presencia de variedades resistentes es un medio simple y barato para solucionar este problema (13). En el cultivo del frijol la línea APN-83 presenta resistencia a Apion godmani; la cual deriva su resistencia de tres nuevas fuentes: G 13614; G 08142 y G 03578 (2).

2.2. Distribución geográfica de Apion godmani

El picudo de la vaina del frijol Apion godmani, fue reportado en 1912 en Guatemala; a partir de entonces, se han -

identificado varias especies, Apion godmani, es el de más amplia distribución, ha sido reportado desde México hasta el norte de Nicaragua, causando pérdidas importantes en las principales zonas frijoleras de estos países, incluyendo a Guatemala, El Salvador y Honduras. El picudo de la vaina no ha sido detectado en Costa Rica ni en Sur América (10).

Las primeras referencias publicadas en El Salvador se deben a Mancía, el cual reporta que en el año de 1966 a 1971, se evaluaron 2 004 variedades de la colección mundial del U.S.D.A. de las cuales se obtuvieron nueve variedades de frijol común con alta resistencia de campo y dos resistentes al daño de Apion godmani W. (23).

En El Salvador Apion godmani, es una de las principales plagas del frijol en época lluviosa. Su distribución e importancia fue estudiada en 1973 por la Dirección de Investigación Agropecuaria del CENTA (10). Este estudio reveló que el picudo de la vaina del frijol está distribuido en todas las zonas frijoleras del país, pero no se consideró un problema en todas las regiones y que en los departamentos que había causado más daño eran : Ahuachapán, Santa Ana y La Libertad, los de menor daño son : Cuscatlán, Cabañas, Chalatenango y San Salvador; y los que tienen un porcentaje medio de daño son: San Vicente y Sonsonate (10).

2.3. Taxonomía

Mancía (22), resume la clasificación taxonómica de Apion godmani W., de la siguiente manera :

Reino	:	Animal
Phylum	:	Arthropoda
Sub-phylum	:	Antennata
Clase	:	Insecta
Sub-clase	:	Pterygota
Orden	:	Coleoptera
Sub-orden	:	Polyphaga
Super-familia	:	Curculionoidea
Familia	:	Curculionidae
Tribu	:	Apionini
Género	:	Apion
Especie	:	godmani

2.4. Ciclo biológico, hábitos y daños

Mckelvey citado por Mancía (22), dice que el ciclo biológico de Apion godmani; desde huevo hasta adulto corre paralelo al desarrollo de vainas y semillas, desde que la planta florece hasta su madurez.

Menciona este autor que los adultos son picudos muy pequeños de color negro grisáceo que la hembra mide 2,85 y el macho 2,51 mm, que el rostrum comprende 1/3 de la longitud total del cuerpo de la hembra y un poco menor en el macho, que el insecto tiene pelos blancos escamosos distribuidos sobre -

toda la superficie externa del cuerpo, excepto en la hembra, en que la parte del rostrum comprendida entre el punto de inserción de las antenas y un extremo anterior es desnuda y brillante, y con el macho la mitad distal.

Los adultos empiezan a aparecer en los campos de frijol, cuando las plantas son jóvenes y continúan aumentando en cantidad mientras las plantas de frijol florecen y se forman las pequeñas vainas. Se alimentan de follaje, flores y vainas en formación. El período de vida del adulto, no lo establecen, pero creen que pueden vivir cuando menos de 2-3 meses (22).

Las hembras adultas ovipositan generalmente en vainas recién formadas que son muy pequeñas atravesándolas primero con su rostrum, insertan después el ovipositor en el agujero y generalmente depositan un solo huevecillo cada vez en el mesocarpio de la vaina.

El huevo antes de emerger la larva presenta su corión completamente transparente. Tanto el huevo como el primer estadio larvario son muy difíciles de observar.

La longitud de la larva recién emergida es de 0,905 mm, la cabeza tiene 0,160 mm de longitud, por lo tanto el primer estadio la longitud total es 5,6 veces la longitud de la cabeza. El color de las larvas varía desde blanco hasta casi transparentes. En el último estadio la larva es de color amarillento, y puede alcanzar una longitud de 3,6 mm con el cuerpo 16 veces mayor que la cabeza; la larva pasa por cuatro es-

tadios.

La larva en su último estadio, forma un capullo o cocón, de la pulpa del frijol que mastica e ingiere parcialmente. El mismo autor (22), menciona que la larva al terminar de formar su cocón entra en un período prepupal, que dura entre 2 y 3 días; la eclosión del adulto ocurre después de 8 a 12 días de la formación de la pupa y que el ciclo completo de huevo a adulto dura de 6 a 8 semanas.

Durante su desarrollo, las larvas se alimentan de las semillas y tejido tierno de los ejotes causando en este período el mayor daño dentro de las vainas (16, 22).

2.5. Relación insecto-planta

Cuando se procura establecer la relación insecto-planta es necesario conocer cual es el comportamiento del insecto en la selección del hospedante. El problema que en general el insecto encuentra en los ecosistemas naturales es que la distribución de sus plantas hospederas es esparcida y no está concentrada como en los cultivos agrícolas (4). Por lo tanto, el insecto en su dispersión inicia vuelos de búsqueda del ambiente de su hospedante. Si lo encuentra continúa con la etapa siguiente que es guiada por los estímulos de la planta que actúan a corta y larga distancia. Los estímulos pueden ser el color de la planta, su forma y estímulos químicos que pueden determinar si el insecto se posa o no sobre la planta. Cuando el insecto está sobre la planta los estímulos son olfato-

rios, táctiles o gustatorios, son estímulos de contacto y si éstos son los correctos continúa entonces examinando y probando sus componentes químicos por medio de sus piezas bucales. Si los estímulos son los apropiados el hospedante es aceptado para consumo o para oviposición. El hospedante aceptado puede ser utilizado sólo para alimentación de los adultos los cuales continúan sus vuelos de dispersión o la hembra puede utilizarlo para la oviposición y alimento de las larvas; si los factores nutricionales esenciales están presentes se produce otra generación de adultos que inician de nuevo el ciclo. Si los nutrientes no son los adecuados o hay factores antibióticos el insecto puede morir (4).

De este esquema general de selección del hospedante por los insectos fitófagos, se puede deducir que los factores de resistencia pueden interferir con los sistemas de comunicación entre el insecto y la planta. El insecto es un detector sensorial de los estímulos que son detectados por el insecto.

Desde el punto de vista práctico la resistencia es el resultado de la ruptura de esos mecanismos de comunicación.

Se ha determinado que los metabolitos secundarios (terpenos, taninos, flavonoides alcaloides), tienen influencia sobre los animales herbívoros que se alimentan de las plantas.

Se ha observado que una función importante de los metabolitos secundarios es la interferencia en la relación insecto-

planta. En ciertos casos se ha probado que metabolitos específicos podrían actuar como factores de protección de la planta contra el ataque de insectos (4).

Los atractivos de los insectos más conocidos son los que actúan afectando los sentidos de gusto y del olfato. Ellos son los que llevan a los insectos en busca de los alimentos que han de nutrirlos.

La atracción nutricional que ejerce una planta para un determinado insecto suele estar condicionado a la existencia en ella de ciertos compuestos químicos (1).

La mayor parte de nuestro conocimiento a cerca de los atractores ha sido derivado de observaciones y de experimentos basados en uno o más procedimientos fundamentales como modelo. Para asegurar si una sustancia dada es o no atractiva o para comparar y evaluar atractores actuales o no conocidos se puede recurrir al uso de: 1) prueba de alimentación; 2) trampa con atrayentes; y 3) olfatómetros.

Por medio del primer método, la sustancia a ser examinada es ofrecida directamente al insecto siempre y cuando sea alimento natural, alimento tratado o alimento artificial. Las trampas con atractores ofrecen un orden donde las sustancias de prueba son expuestas dentro del campo a una población de insectos normales que habitan en su ambiente normal (8). Por medio de los olfatómetros se puede determinar si hay atracción por determinadas sustancias o grupo químico utilizando

una corriente de aire lo cual sirve de estímulo para orientar al insecto hacia determinado extracto (21), el cual puede ser elegido a libre selección, utilizando para ello olfatómetros de selección múltiple (19).

Un método muy utilizado para realizar ensayos con los olfatómetros es el método de discos de hoja el cual es muy utilizado en pruebas de alternativas; la solución de muestra puede ser aplicada directamente en varias hojas de la planta (19).

En ensayos de referencia de Stadler y Hanson (1978), se han utilizado discos de papel filtro de fibra de vidrio; los cuales sirvieron para realizar ensayos de preferencia en la alimentación en larvas (9).

En ensayos realizados con extractos de tejidos de árbol de Neem (Azadirachta indica), se han cortado los discos de hoja y se han sumergido en dichos extractos, dejando un tiempo de 30 minutos, para que se seque el material y se evapore el disolvente; también se han utilizado testigos absolutos para realizar dichas pruebas, así como también testigos relativos (17).

2.6. Sustancias químicas que confieren resistencia

La evolución de la vida vegetal trajo consigo, por necesidad, una química de defensa desde su comienzo, la historia de la botánica es, en gran parte, una historia de las adapta-

ciones que hizo el hombre de las defensas fitoquímicas. Por lo tanto la humanidad conoce desde la antigüedad muchas defensas químicas contra depredadores y parásitos; sin embargo la aplicación de ese conocimiento al desarrollo de plantas más resistentes a los insectos todavía está en su infancia científica.

Durante los últimos quince años, el conocimiento de la química de las plantas avanzó con gran rapidez.

Para estudiar la resistencia química no basta con moler la planta entera y detectar alomonas contra las plagas de insectos, ya que existen diferencias cualitativas y cuantitativas entre las alomonas de las distintas partes de la planta que llegan a ser tan grandes como las diferencias entre especies vegetales (24).

Para que las sustancias fitoquímicas actúen como alomonas contra los insectos, es necesario que ocurra cierto intercambio o participación de energía (es decir, un electrón, un protón, o ambos) entre dichas sustancias y el insecto.

Entre las sustancias que producen resistencia vegetal contra los insectos existen algunas inorgánicas (selenio), metabolitos primarios e intermediarios (ácido cítrico, cisteína y ciertos aminoácidos aromáticos) y compuestos secundarios (alcaloides).

Sin embargo, desde el punto de vista de la biosíntesis, las clases de sustancias secundarias se pueden clasificar den

tro de tres grupos superiores. Algunas (por ejemplo, isoprenoides, acetogeninas, protoalcaloides y verdaderos alcaloides) se sintetizan a través de vías importantes simples; otras (por ejemplo, los glucósidos flavonoides, benzofenonas, ciertas cumarinas, taninos condensados y estilbenos), son productos de más de una vía (24).

Cuando la biosíntesis depende de una sola vía, el conocimiento de ésta permite a los genetistas detectar los productos intermedios y así cuantificar en forma eficaz su avance hacia la consecuencia de mayores concentraciones de alomonas en los cultivos (24).

Cuando una defensa química depende de varias vías metabólicas, como ocurre en las benzofenonas y otras clases de compuestos, el conocimiento de cada vía aumenta el número de indicadores químicos mediante los cuales puede seguirse el avance del programa (24).

En el caso de los glucósidos, se sintetiza a través de una o varias vías combinadas; el otro componente, si bien puede variar, proviene del metabolismo de los azúcares. El conocimiento de la biosíntesis de la glicona específica que forma parte de un glicósido, es particularmente útil cuando se quiere incrementar la defensa química, ya que por lo general la glicona es la alomona activa (24).

En cuanto a los isoprenoides éste es un grupo de sustancias fitoquímicas que abarca a los terpenos en su totalidad y

se han encontrado alomonas sobre todo entre los monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenoides, saponinas y otros esteroides. Los monoterpenoides son compuestos predominantes de los "aceites volátiles" de los vegetales. Las investigaciones indican que cada molécula tiene por lo menos un doble papel como mensajero. Ya se demostró la existencia de una amplia gama de efectos alomónicos entre dichas sustancias (alteraciones de la conducta, fisiología sensorial, metabolismo y endocrinología de los insectos). Ciertas plantas contienen hormonas isoprenoidales que afectan las tasas de desarrollo, metamorfosis, fecundidad, longevidad de los insectos. Dichas hormonas son capaces de regular la máxima abundancia de la plaga o los tejidos específicos dañados o consumidos, de tal modo que la planta consigue mantener intacto su vigor (24).

Las propiedades alomónicas de los isoprenoides son un foco de atención muy valioso para dirigir hacia ellos los esfuerzos para aumentar la resistencia química de las plantas contra los insectos.

Los flavonoides se han estudiado sobre todo como alomonas contra insectos. La quercentina es un ejemplo de su capacidad alomónica contra una serie de plagas entomológicas. La myristicina, morina y D-catequina son otros flavonoides con potencialidades alomónicas comprobadas sobre ciertas especies; sin embargo estos cuatro flavonoides repelen o inhiben a varias especies o biotipos; pero atraen o excitan a otros (24).

En cuanto a los alcaloides sus propiedades tóxicas y medicinales se conocen en farmacología desde los orígenes de la medicina vegetal. (24).

El alcaloide nicotina, funciona como alomona contra muchas especies de insectos. Sus particulares propiedades insecticidas ocasionaron que se le utilizara extensamente como uno de los primeros plaguicidas agrícolas todavía en uso comercial en la actualidad. Su rango de efectos alomónicos sobre los insectos va más allá de afectar el sistema nervioso y abarca por lo menos otras actividades adicionales que los entomólogos agrupan bajo el título de "envenenamiento estomacal". (24).

Las investigaciones dirigidas a entender mejor la función de los alcaloides en la defensa de la planta han dado énfasis a los seudoalcaloides esteroideos (14).

Kuhn y Gauhe citado por Maxwell, llevaron a cabo extensos estudios sobre la función de tales alcaloides en la disuación la Leptinotarsa decemlineata en plantas de Solanum.

Entre los principales compuestos identificados están la solanina, tomatina y demisina los efectos observados fueron disuación de alimentación de larvas y adultos, e inhibición de la tasa de crecimiento de las larvas. Por lo general, las alomonas alcaloidales conservan su eficacia durante períodos relativamente largos en la evolución de las plantas (24).

Las plantas en sus procesos metabólicos y fisiológicos lle

gan a sintetizar sustancias bioactivas que de alguna manera pueden causar alteraciones en los procesos biológicos de los insectos. Estas sustancias pueden tener características de repelencia antialimentaria o acción insecticida y en algunos casos pueden modificar los hábitos de comportamiento (26).

2.7. Mecanismos de las plantas que confieren resistencia a los insectos.

La disponibilidad de una fuente regenerativa natural como las plantas y sus productos, para desarrollar nuevas estrategias en el manejo de plagas, puede servir en el desarrollo de productos biológicos para el control de plagas bajo condiciones ecológicas bien definidas (28).

Prácticamente todas las plantas contienen o acumulan una gran diversidad de compuestos químicos, que sólo tienen en común el hecho de no ser parte esencial del metabolismo primario. Estos se conocen como compuestos vegetales secundarios, entre los que figuran ácidos orgánicos. Sin embargo, la función principal de los compuestos secundarios es indudablemente proteger a las plantas contra herbívoros en general, dado su carácter repelente, irritante o altamente tóxico, es decir, actuando como alomonas (20).

Los compuestos químicos que la planta acumula pueden ser clasificados en dos categorías: a) Sustancias que actúan en el comportamiento de los insectos, como glicósidos, alcaloides,

terpenos, fenoles; b) sustancias que actúan en el metabolismo de los insectos como glicósidos, alcaloides, etc. (25).

En el frijol de soya existe una amplia gama de resistencia natural al daño causado por los insectos. Varias de las plantas en prueba poseen una variedad de niveles de resistencia hacia una variedad de insectos. Esta resistencia alcanza su inmunidad como en el caso del escarabajo del frijol, Epilachna varivestis para el cual se observó un alto nivel de antibiosis (29).

2.8. Grupos químicos que de alguna manera causan alteraciones en los procesos biológicos de los insectos.

Alcaloides: Estos compuestos constituyen un grupo heterogéneo de bases vegetales nitrogenadas con acción fisiológica más o menos intensa sobre los animales (11). Se les ha considerado como productos terminales del metabolismo del nitrógeno, también se les ha asociado con la protección del vegetal ante los actos predatorios del insecto y animales herbívoros, aunque hay alcaloides que son tóxicos tanto para el hombre como para animales superiores. En lo que concierne a su distribución en la planta, en ocasiones se hallan restringidos a ciertos órganos o a ciertas partes de la planta, a veces se les encuentra en toda la planta. En cuanto a su aislamiento e identificación existen métodos que por lo general aprovechan su basicidad. Aunque muchos alcaloides pueden ex

traerse con disolventes neutros como alcoholes y cloroformo, para su identificación existen pruebas de precipitación las cuales son: Mayer, Dragendorff y Wagner entre otras (11).

Taninos: Comprenden un gran grupo de sustancias heterogéneas que están ampliamente distribuidas en el reino vegetal (7); casi en todas las familias vegetales existen especies que los contienen. Cuando se presentan en cantidades considerables, los taninos suelen localizarse en determinadas partes de la planta, como las hojas, los frutos, la corteza o el tallo. Los taninos por su acción antiséptica evitan el ataque de los insectos y los hongos.

Los taninos son compuestos químicos no cristalizables que forman con el agua soluciones coloidales de reacción ácida y de sabor muy acre (6, 15). Los taninos son solubles en agua y en alcohol (30). Algunas pruebas utilizadas para su identificación son: con solución de gelatina, solución de cafeína, acetato de plomo, tricloruro de hierro; las cuales producen precipitado (6).

Glicósidos saponínicos: Se le da el nombre de saponinas a un grupo de glicósidos que se disuelven en agua y disminuyen la tensión superficial de ésta; por tanto, al sacudir sus soluciones, se forma una espuma abundante, y relativamente estable.

Las saponinas son sustancias muy polares, y es posible extraerlas en caliente o en frío, con agua o alcohol. Las pruebas utilizadas para la identificación de glicósidos sa-

ponínicos son las de Lieberman-Burchard y la de Salkowski.

Se conocen más de 200 saponinas esteroidales, localizadas en los monocotiledones (liliáceas, amarilidáceas) y otras saponinas triterpenoides, aisladas principalmente en dicotiledóneas.

Ambos grupos de saponinas se han aislado de diversos órganos vegetales; encontrándose en la raíz, hojas, flores y semillas (11).

Terpenos: Son una familia química de hidrocarburos, cuya oxigenación puede producirse naturalmente, como lo demuestra la presencia de alcoholes, aldehídos, cetonas, fenoles, éteres fenólicos, ésteres y óxidos.

Dado que estos compuestos oxigenados son los responsables de los olores, sabores y propiedades terapéuticas que caracterizan a los aceites volátiles, se desprende que la clasificación química de las esencias debe basarse en los principales constituyentes químicos.

Por lo general los terpenos se localizan en las hojas (6).

2.9. Cromatografía en capa fina

La técnica de la cromatografía en capa fina consiste en que el adsorbente se mezcla con el aglutinante, a menudo yeso; esta mezcla se suspende en agua y se deposita sobre una placa de vidrio o sobre una superficie plana rígida (por

medio de un dispositivo embadurnador apropiado), al secarse la suspensión queda adherida a la placa de vidrio, bien directamente o por efecto del aglutinante, como una capa delgada y rugosa de un espesor de 0,1 a 2,0 mm (12).

La cromatografía en capa fina es un método analítico y versátil, sencillo en alto grado y rápido, para separar en forma bien definida compuestos estructuralmente muy parecidos (12).

También por medio de la cromatografía en capa fina podemos identificar los diversos compuestos químicos que existen, haciendo uso de reactivos específicos para su detección.

3. METODOLOGIA

El trabajo constó de tres fases : 1) una fase de campo; 2) una fase química de laboratorio; y 3) una fase entomológica de laboratorio.

3.1. Fase de campo

Esta fase se inició con el establecimiento de una parcela cultivada con frijol común; en el Cantón San José La Fuente, jurisdicción de Tonacatepeque, Departamento de San Salvador. Ubicado a una altura de 750 msnm, con una precipitación promedio anual de 1 302 mm, y valores anuales promedios de humedad relativa del aire y temperatura de 75% y 24,3 °C, respectivamente (3).

Dicha parcela se sembró en la cuarta semana del mes de abril de 1990; utilizando dos variedades de frijol común (Phaseolus vulgaris); las cuales fueron Rojo de Seda variedad susceptible al daño y APN-83 (línea resistente al daño de Apion godmani).

El área sembrada fue de 90 m², en un terreno inclinado, en las cuales se delimitaron 2 sub-parcelas; una de 30 m² para la variedad susceptible y otra de 60 m² para la línea resistente. Se delimitó el terreno utilizando estacas y pitas; posteriormente se preparó el terreno en forma manual, los surcos se dispusieron separados 60 cm entre sí y 15 cm entre

planta; distanciamiento que facilitó las labores del cultivo y la recolección del material vegetal necesarios para la obtención de extractos de diferentes partes de la planta: hojas, vainas sin semillas y semillas. Las dos sub-parcelas se manejaron de la misma manera; realizándoles labores como fertilización (a razón de 3 lb de fórmula 20-20-0 a la siembra); y control preventivo de algunas plagas aplicando Volatón (a razón de 3 lb a la siembra); y realizando posteriormente dos aplicaciones de Malathión utilizando 10 cc por galón de agua; en los primeros días del cultivo para controlar la mosca blanca (Bemisia tabaci). Inmediatamente después del inicio de la floración en ambas parcelas se realizaron observaciones diarias con el fin de cosechar periódicamente vainas inmaduras de 4-6 cm para iniciar el estudio.

Para obtener suficiente cantidad de material vegetal, fue necesario sembrar parcelas adicionales a la original. En consecuencia se realizó otra siembra en la misma localidad; utilizando un área de 120 m²; 60 m² para Rojo de Seda y 60 m² para APN-83, siendo las labores de cultivo similares a la de la parcela anterior pero debido a problemas en el control químico de Bemisia tabaci esta siembra se perdió por la fuerte infestación del virus transmitido por dicho insecto (enfermedad del tipo mosaico dorado del frijol). Posteriormente se sembró otras parcelas dentro de la Ciudad Universitaria en San Salvador, en el área experimental de Fito

tecnia de la Facultad de Ciencias Agronómicas, utilizando un área de 120 m²; 50 m² para Rojo de Seda y 70 m² para APN-83, siguiendo la metodología utilizada para la primera parcela. En esta parcela se realizó una aplicación preventiva del producto Talstar a los 15 días de haber emergido las plántulas para eliminar la infestación viral causada por Bemisia tabaci. Una última parcela se manejó desde agosto hasta octubre utilizando un área de 120 m²; 60 m² para Rojo de Seda y 60 m² para APN-83. En estas parcelas se utilizó una aplicación preventiva del mismo producto Talstar a los 15 días de emergidas las plántulas. Las labores del cultivo fueron iguales a las utilizadas en la primera parcela.

3.2. Fase química de laboratorio

El trabajo químico de laboratorio consistió en tres tipos de actividad : a) obtención de extractos de hojas, vainas sin semilla y semillas inmaduras de los genotipos Rojo de Seda y APN-83; b) pruebas fitoquímicas para la posible identificación de principios activos como alcaloides, glicósidos saponínicos y taninos; c) pruebas de cromatografía en capa fina, para confirmación de la posible presencia de los principios activos detectados en las pruebas fitoquímicas; también se le realizó cromatográfica a las extractos para detectar terpenos.

3.2.1. Obtención de extractos

Al inicio de la formación de vainas en la fase de campo,

fueron tomadas varias muestras en ambas parcelas; cada una de estas muestras estaba constituida de vainas tiernas de una longitud de 4-6 cm (el total de muestra fresca utilizada fue de 2 915,11 g para Rojo de Seda y 2 917,59 para APN-83). Las muestras fueron sometidas a disección con el objeto de separar semillas inmaduras y las vainas aún verdes. Con estos dos tipos de material y con planta (hojas) de un mes de edad de cada uno de los genotipos se hicieron los procedimientos químicos que se describen a continuación:

- Secado del material al sol (con el objeto de obtener 50 gr de peso seco para vainas, 16,4 gr para semilla y 20 gr para hoja).
- Las muestras secas fueron sometidas a un proceso de extracción sucesiva por el método de reflujo utilizando los disolventes siguientes: Eter de petróleo, cloroformo, alcohol etílico; empleando un tiempo de 20 horas de extracción para cada uno y para cada órgano de la planta.

El proceso de extracción fue de la siguiente manera: se colocaron en balones de 500 ml cada uno; 50 gr de la muestra vegetal (vainas) y se les agregó 400 ml de cada uno de los disolvente dándoles un tiempo de 20 horas de extracción a reflujo. Esta misma metodología fue utilizada para hacer extracciones tanto en hojas como en semillas.

Cada extracto se evaporó con la finalidad de eliminar el disolvente y se hizo por medio de una destilación simple. -

Con los extractos obtenidos de esta manera, se hicieron las pruebas con insectos (adultos y larvas), según la metodología explicada en la fase entomológica de laboratorio y también las pruebas fitoquímicas para los diferentes metabolitos secundarios presentes, y las respectivas cromatografías en capa fina.

3.2.2. Pruebas fitoquímicas

Con los extractos obtenidos se hicieron pruebas fitoquímicas para identificar ciertos tipos de metabolitos secundarios, tales como: Alcaloides, taninos, glicósidos saponínicos. Dichas pruebas se realizaron con cada uno de los extractos obtenidos a partir de cada uno de los órganos de la planta utilizada para tener una mayor confiabilidad de los datos.

Prueba de alcaloides : Para identificar este tipo de metabolitos se hicieron las pruebas siguientes utilizando como tés^{ti}g^o una solución acuosa de cafeína al 1%.

- 1) Prueba de Dragendorff
- 2) Prueba de Mayer
- 3) Prueba de Wagner

Las pruebas consistieron en colocar en tubos de ensayo 2 ml de los extractos preparados con los diferentes disolventes y cada uno de los órganos de la planta.

Se les agregó a cada tubo 10 gotas de ácido clorhídrico al

10% y 10 gotas del reactivo de Dragendorff; y posteriormente se procedió a las observaciones respectivas, y así de igual forma con las otras dos pruebas.

Prueba de taninos: Para su identificación se utilizaron cuatro reactivos:

- 1) Acetato de plomo
- 2) Tricloruro de hierro
- 3) Solución gelatina simple al 1%
- 4) Solución cafeína acuosa al 1%.

Se colocó en tubos de ensayo 2 ml de extracto; a los cuales se les agregó un ml de reactivo y luego se hicieron las observaciones correspondientes. Exceptuando el reactivo de acetato de plomo en el cual sólo se utilizaron 3 gotas y de la solución de gelatina se utilizaron 2 ml.

Prueba para glicósidos saponínicos: Para la identificación de este grupo de compuestos se hicieron las pruebas siguientes :

- 1) Prueba de Salkowski
- 2) Prueba de Lieberman-Burchard

Las pruebas consistieron en colocar en tubos de ensayo 2 ml de extracto; a los cuales se les agregó 5 gotas de ácido sulfúrico, para la prueba de Salkowski y para la de Lieberman se agregó un ml de dicho reactivo. Luego se procedió a hacer las observaciones respectivas.

3.2.3. Análisis de cromatografía en capa fina

Después de haber realizado las pruebas fitoquímicas correspondientes para alcaloides, taninos y glicósidos saponínicos, de acuerdo a los resultados obtenidos, en donde los extractos alcohólicos resultaron con mayores constituyentes químicos y para presentar datos de identificación más específica, se hicieron las cromatografías en capa fina; a cada uno de los extractos donde se encontraron resultados positivos.

Hay que hacer notar que para la identificación de terpenos solamente se hizo por medios cromatográficos específicos; usando como eluyentes Tolueno-acetato de etilo 93:7 y como reactivo detector ácido sulfúrico y vainillina; apareciendo manchas de color violeta que confirman la posible presencia de terpenos. Para alcaloides se usó como eluyente Etanol-Metanol 8:2 y fueron detectados con el reactivo de Dragendorff, modificado; apareciendo manchas de color naranja confirmando la posible presencia de alcaloides.

Para glicósidos saponínicos se efectuaron dos análisis :
a) usando como eluyente acetona-alcohol 3:7 para los extractos alcohólicos y cloroformo-benceno 8:2 para los extractos clorofórmicos y de éter de petróleo y como reactivo detector ácido sulfúrico, apareciendo manchas de color verde y marrón que confirma la posible presencia de saponinas; b) usando como reactivo detector Lieberman-Burchard apareciendo manchas

de color verde que confirmaban la posible presencia de glicósidos saponínicos.

Todas las cromatoplasmas utilizadas fueron de 5 x 20 cm y como material de soporte sílica gel GF 254 calidad Meck.

Después de haber corrido cada una de las cromatoplasmas y efectuado la separación de sus componentes; se utilizó como revelador la lámpara de luz ultravioleta para poder observar las manchas que aparecían. Luego después se rociaron con el respectivo reactivo detector.

3.3. Fase entomológica de laboratorio

La fase entomológica consistió en realizar pruebas de exposición de adultos y larvas de Apion godmani a extractos obtenidos de los dos genotipos.

3.3.1. Obtención de insectos para pruebas biológicas

Una vez preparados los extractos en la fase química de laboratorio; se realizaron actividades tendientes a localizar y coleccionar material infestado por Apion godmani, para lo cual se visitaron varios lugares con cultivo de frijol infestado por la plaga tales como: Atiquizaya, Ahuachapán y Hacienda Montecristo (Metapán), durante el período de noviembre y diciembre del 90. Se tuvo además acceso a material de vivero de frijol infestado sembrado para evaluación de resistencia a la plaga; por el Programa de Frijol de CENTA. Una vez reco-

lectados los picudos se colocaron en una jaula y posteriormente se sexaron. Después de sexados los insectos se separaron y se realizaron las pruebas siguientes.

3.3.2. Evaluación de la respuesta de los adultos

3.3.2.1. Prueba de alimentación utilizando discos de hoja

Para esta prueba se diseñaron olfatómetros sencillos utilizando seis recipientes herméticos (plásticos), a los cuales se les hicieron varias perforaciones y luego se taparon con organdi (Anexo 1), esto se hizo con el objeto de proporcionarles ventilación a los insectos también se les hizo un orificio en la parte superior del recipiente para introducir los insectos. Al centro del recipiente, se colocó una fuente de humedad (caja Petri conteniendo una esponja húmeda cubierta con un disco de papel filtro).

Una vez instalados los olfatómetros se procedió a cortar discos de hojas de frijol de los genotipos Rojo de Seda y APN-83 de 2 cm de diámetro. Los discos de hoja de Rojo de Seda se trataron por inmersión con los extractos de hoja de APN-83 y los discos de hoja de APN-83, se trataron con los extractos de hoja de Rojo de Seda. Se esperó que se evaporara el disolvente durante 30 minutos. Se utilizaron hojas de frijol Rojo de Seda y APN-83 sin inmersión en los extractos, en calidad de testigos para esta prueba.

Posteriormente se montaron los discos de hoja, se identi

ficaron y se procedió a colocarlos en los olfatómetros alrededor de la fuente de humedad en el siguiente orden: Eter de petróleo - APN-83, éter de petróleo Rojo de Seda - Cloroformo APN-83, cloroformo Rojo de Seda - Alcohol APN-83, alcohol Rojo de Seda - testigo APN-83, testigo Rojo de Seda. Se colocaron dos tandas de discos por olfatómetro, luego se tapó el aparato y se introdujeron los insectos con ayuda de un aspirador entomológico, construido con una micropipeta de vidrio. Para esta prueba se utilizaron un total de 30 hembras y 9 machos los cuales tenían un día de ayuno (manteniéndose en un frasco grande con papel humedecido).

Para cada sexo se hicieron tres repeticiones; en cada repetición se utilizaron 10 hembras y 3 machos. Ya instalados los picudos en los olfatómetros, éstos se introdujeron en bolsas plásticas para conservar la humedad.

Esta prueba se realizó a la sombra, con luz difusa natural a una temperatura de: 28,3 °C y una humedad relativa del 28%.

Los datos que se tomaron fueron: - Cantidad de perforaciones en discos foliares; - cantidad de individuos sobrevivientes; realizando cuatro lecturas después de instalada la prueba :
- A los 30 minutos, 1 hora, 2 horas y 24 horas.

3.3.2.2. Prueba de alimentación utilizando discos de papel filtro

Para esta prueba se utilizaron los mismos olfatómetros des

critos para la prueba anterior.

En esta prueba se cortaron discos de papel filtro de 2 cm de diámetro; de los cuales unos se sumergieron en los extractos de hoja de Rojo de Seda y otros en los extractos de hoja de APN-83 (en ambos utilizando los tres disolventes). Se esperó que se evaporara el disolvente durante 30 minutos. Se utilizó papel filtro como testigo los cuales se sumergieron en agua. Posteriormente se montaron los discos de papel, en alfileres entomológicos, se identificaron y se procedió a colocarlos en los olfatómetros alrededor de la fuente de humedad en el mismo orden que en los discos de hoja. Se colocaron dos tandas por olfatómetro. Luego se tapó y se introdujeron los insectos previamente sexados.

Para esta prueba se utilizaron un total de 30 picudos los cuales tuvieron un período de ayuno de un día; estos se distribuyeron en 5 repeticiones; utilizando seis picudos por repetición (para esta prueba y las posteriores solamente se utilizaron hembras, debido a que los machos parecen ser más débiles para ser manipulados, ya que murieron pronto.

Los datos que se tomaron fueron: Número de sobrevivientes, número de perforaciones.

Las observaciones se hicieron : 30 minutos, 1 hora, 2 horas y 24 horas.

3.3.2.3. Prueba de atracción utilizando discos de papel y extracto de hoja de Rojo de Seda y APN-83 (con los tres disolventes).

Para esta prueba se diseñó un olfatómetro con ventilación y celdas de entrada múltiple, utilizando un ventilador de mesa, un recipiente captador de aire de múltiple salida (huacal plástico), cuatro recipientes plásticos pequeños, papel filtro, esponjas, capas petri, organdi, frascos plásticos de películas fotográficas, alfileres, tapones de hule, pegamento y 6 yardas de manguera de 1 cm de diámetro (Anexo 2).

Al captador de aire se le hicieron varias perforaciones alrededor para colocar pedazos de manguera y sujeto frente al ventilador.

A los recipientes plásticos de múltiple salida se les hicieron cuatro perforaciones periféricas para introducirle, los frascos de película fotográfica y pegarlos. Al recipiente también se le hizo un orificio en la parte superior para introducir los picudos. Una vez preparados los recipientes de plástico se procedió a introducir las mangueras en los tubos fotográficos, utilizando tubos en T de vidrio para la adecuada distribución de las mangueras.

Una vez construido el olfatómetro se procedió a cortar discos de papel filtro para ser tratados por inmersión con los extractos obtenidos con los tres disolventes; a partir -

de hoja de frijol Rojo de Seda y de hojas de APN-83. Se esperó que se evaporara el disolvente durante 30 minutos y posteriormente se colocaron los testigos y los discos de papel se colocaron en cada uno de los extremos de las mangueras la cual estaba dentro del frasco de película fotográfica tapado con organdí para evitar que los picudos tuvieran contacto directo ya sea con el papel o con el disco de hoja exponiéndose así sólo al olor de los mismos.

Posteriormente se procedió a colocar los insectos en cada uno de los recipientes. Los insectos tenían un día de ayuno.

Para esta prueba se utilizaron 32 insectos, 16 para Rojo de Seda y 16 para APN-83; con dos repeticiones para cada uno.

Una vez instalado todo el equipo se procedió a conectar la fuente de aire (ventilador de mesa). El aparato así construido ofrecía un flujo de aire de 0,00005 lts/seg. Los datos a tomar fueron:

- Número de adultos atraídos por extracto.
- Número de picudos vivos; realizando tres lecturas: a los 30 minutos, 1 hora y a las 2 horas.

3.3.2.4. Prueba de atracción utilizando discos de papel y extracto de vaina sin semilla de Rojo de Seda y APN-83 (con los tres disolventes).

Para esta prueba se utilizó el mismo olfatómetro que en -

la prueba anterior, la misma metodología ya descrita, y se tomó la misma información.

3.3.2.5. Prueba de atracción alimenticia a diferentes extractos de vaina depositados en papel filtro en condiciones de libre elección.

Se humedecieron con una jeringa nueve cuadritos de papel filtro de 1,5 cm de lado con extracto de vaina de APN-83, utilizando dos disolventes (alcohol etílico y cloroformo). Se utilizaron tres cuadros para cada uno de los tratamientos siguientes:

- Extracto de vaina con alcohol etílico
- Extracto de vaina con cloroformo
- Testigos (humedecidos con agua).

Posteriormente se colocaron los nueve cuadros en una caja Petri provista de papel filtro humedecido y se colocaron cinco hembras.

Los datos que se tomaron fueron :

- Alimentación.
- Número de individuos vivos y muertos al final de la prueba.

Esta prueba tuvo una duración de dos días.

3.3.2.6. Prueba de alimentación utilizando hoja de frijol de Rojo de Seda.

Se humedecieron hojas de frijol Rojo de Seda de 45 días de edad con extracto alcohólico de APN-83, y se humedecieron otras sólo con alcohol (testigo); se esperó que se evaporara el disolvente durante 30 minutos. Posteriormente se prepararon tres cajas Petri provistas de papel filtro humedecido, dos para colocar hojas tratadas con el extracto alcohólico y otra para el testigo, en cada caja Petri se colocaron tres adultos de Apion godmani (hembras).

Los datos a tomar fueron:

- Atracción alimenticia en las hojas de frijol.
- Sobrevivencia de los insectos a la prueba. La prueba tuvo una duración de cinco días.

3.3.3. Evaluación de la respuesta de las larvas.

En esta evaluación se hicieron experimentos preliminares empleando algunas larvas de Apion godmani, obtenidas de vainas de frijol común ejotero; colectadas en una parcela cultivada al final de su período de cosecha comercial; a finales del mes de enero del 91. Dicha parcela estaba ubicada en el Cantón El Paraíso, del Municipio de San Pedro Perulapán en el departamento de Cuscatlán. A esa fecha y después de buscar probable material infestado por la plaga en mercados locales de San Salvador, la disponibilidad de larvas e incluso

adultos de la plaga fue mínima. Sin embargo, se aprovecharon las pocas larvas para instalar experimentos preliminares con los extractos obtenidos de semilla de la línea de frijol APN-83, en relación a la cual se conocen antecedentes de mortalidad de larvas en sus vainas inmaduras.

3.3.3.1. Deposición de larvas en papel filtro

Se cortaron seis cuadros de papel filtro de 1,5 cm de lado y se humedecieron con extractos de semilla de APN-83, así: 2 con extracto alcohólico; 2 con extracto clorofórmico y 2 con extracto de éter de petróleo. Se esperó que se evaporara el disolvente durante 30 minutos y posteriormente se procedió a colocar los cuadros de papel filtro ya tratados con el extracto alcohólico en una caja Petri la cual contenía papel filtro humedecido para proporcionarle un ambiente de alta humedad relativa, lo mismo se hizo para el extracto clorofórmico y para el de éter de petróleo. Luego se colocaron las larvas sobre los cuadros de papel filtro; quedando una larva por cuadro de papel filtro.

Se taparon las tres cajas Petri y se colocaron en una caja de cartón para proporcionarles oscuridad.

Para esta prueba se utilizó un total de seis larvas; 2 por tratamiento, teniendo dicha prueba una hora de duración.

Los datos a tomar fueron:

- Movimiento de larvas
- Perforaciones en el papel.

3.3.3.2. Deposición de larvas en vainas utilizando testigo absoluto.

Para esta prueba se utilizaron vainas sanas de Rojo de Seda de 4-6 cm de largo, las cuales fueron disectadas en forma asimétrica y en sentido longitudinal a fin de conservar una de las mitades (valvas) con sus semillas completas. Estos materiales así disectados fueron humedecidos con extractos de semilla de APN-83 (con los tres disolventes), previamente a la deposición de las larvas; y se esperó que se evaporara el disolvente durante 30 minutos.

Se utilizaron vainas disectadas de Rojo de Seda como testigo.

Para esta prueba se utilizaron seis vainas; tres tratadas con los extractos alcohólicos, clorofórmico y de éter de petróleo y tres como testigo.

En una caja Petri se colocaron dos vainas; una tratada y el testigo. Esto se hizo para cada uno de los extractos. En cada vaina se depositó una larva de Apion godmani; se taparon las tres cajas Petri y se colocaron en una caja de cartón para proporcionarles oscuridad.

La duración de esta prueba dependió de la duración del tejido vegetal y de la larva, que fue de aproximadamente cuatro días. La información que se obtuvo de esta prueba se relacionó con la consistencia de las vainas después de aplicar el extracto en estudio, la conducta de alimentación y la mortalidad de las larvas.

3.3.3.3. Deposición de larvas en vainas, utilizando testigo absoluto y relativo.

Esta prueba fue similar a la anterior; con la excepción de que aquí se utilizaron nueve vainas disectadas: tres como testigo (sin aplicarles nada); tres como testigo relativo (asperjadas con los disolventes); tres tratadas con los extractos.

Para esta prueba se utilizaron tres cajas Petri; en cada una de ellas se colocaron tres vainas; los dos testigos y la tratada con el extracto, y se colocó una larva por vaina. Posteriormente las cajas se taparon y se colocaron en una caja de cartón para proporcionarles oscuridad. La prueba se instaló previendo una duración de tres días.



4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Fase de campo

La primera siembra se realizó en el Cantón San José La Fuente, jurisdicción de Tonacatepeque, departamento de San Salvador, teniéndose dos parcelas de las cuales se obtuvo poco material vegetal para las pruebas, debido a problemas con la mosca blanca (la cual se trató con Malathión 57 C.E. en dosis de 10 cc/galón de agua), y además con animales domésticos (patos), y alguna incidencia de tortuguillas (Cerótoma sp, Diabrotica balteata, Diabrotica fuscumaculata, Diabrotica viridula), y Trichoplusia ni. Posteriormente con las parcelas sembradas en la Ciudad Universitaria se obtuvo material vegetal adicional para la obtención de los extractos.

Se presentaron problemas de incidencia de tortuguillas (Diabrotica sp), chinches (Prepops sp), mosca blanca (Bemisia tabaci) y presencia de enfermedades tales como Roya (Uromyces phaseoli), Mustia hilachosa (Thanatephorus cucumeris). Estos problemas fueron manejados preventivamente aplicando Talstar (en dosis de 8 cc/galón de agua), para las plagas; en el caso de las enfermedades no se usó ningún tratamiento preventivo debido a que éstos podían interferir en los análisis químicos posteriores.

4.2. Fase química de laboratorio

4.2.1. Pruebas fitoquímicas

4.2.1.1. Pruebas de alcaloides

En esta prueba los extractos que dieron resultado fueron los alcohólicos de vaina sin semilla y los de semilla no así los de hoja; como se puede observar en los Cuadros 1, 2 y 3. Los mismos resultados se presentaron en los dos genotipos como fue la presencia de un color anaranjado que indica la posible presencia de alcaloides.

4.2.1.2. Prueba de taninos

En esta prueba los extractos que dieron resultados fueron los alcohólicos en ambos genotipos (Cuadros 4, 5 y 6). Presentando un precipitado blanco que indica la posible presencia de taninos en los tres órganos de la planta.

4.2.1.3. Prueba de glicósidos saponínicos

En esta prueba solamente los extractos alcohólicos dieron resultados positivos ya que en ellos hubo formación de un anillo que es característico en la presencia de glicósidos saponínicos (Cuadros 7, 8 y 9).

4.2.2. Análisis de cromatografía en capa fina

En el ensayo de cromatografía para alcaloides en extracto de hoja se comprobó que no es notable la presencia de alcaloides; pues al rociarlas con el reactivo de Dragendorff, no apa

recibió el cambio de color naranja esperado (Cuadro 10).

A diferencia del anterior el ensayo de cromatografía para alcaloides en extracto de vaina sin semilla y de semilla se comprobó la posible presencia de alcaloides, en comparación con los resultados obtenidos en las pruebas fitoquímicas de estos mismos órganos (Cuadros 11, 12).

Como se puede observar solamente hubo presencia de alcaloides en los extractos alcohólicos de vainas sin semilla y de semilla de ambos genotipos.

Según Domínguez (11), muchos alcaloides pueden extraerse con disolventes neutros como los alcoholes; lo que comprueba los resultados obtenidos, tanto en las pruebas fitoquímicas como en las cromatografías de capa fina.

Los resultados obtenidos en los análisis de cromatografía para glicósidos saponínicos en los extractos alcohólicos, de hoja, vaina sin semilla y semilla, comprueban la posible existencia de glicósidos saponínicos al igual que el resultado obtenido en las pruebas fitoquímicas (Cuadros 13, 14 y 15). Se tuvo la posible presencia de éstos solamente en los extractos alcohólicos de los órganos antes mencionados para los dos genotipos. Según Domínguez (11), los glicósidos saponínicos son solubles en agua y alcoholes lo que comprueba los resultados obtenidos en las pruebas antes mencionadas.

En las pruebas para glicósidos saponínicos y alcaloides se realizó la cromatografía en capa fina para corroborar los

resultados de las pruebas fitoquímicas, obteniéndose de esta manera resultados positivos iguales usando dos métodos diferentes de identificación; este tipo de compuestos son mucho más complejos que los taninos.

Para taninos no se hicieron las cromatografías en capa fina, pues las pruebas fitoquímicas son categóricas debido a la presencia de grupos químicos específicos (OH^-) y además porque son compuestos no tan complejos como los anteriores.

Para terpenos solamente se presentan resultados de cromatografía en capa fina, pues no hay pruebas fitoquímicas específicas para ellos.

Las cromatografías para terpenos fueron rociadas con vainillina y con ácido sulfúrico como detectores y después fueron calentadas en estufa a 60°C , apareciendo manchas de color violeta y verde, colores que determinan la posible presencia de terpenos (Cuadros 16, 17, 18 y Anexo 3).

De todas las pruebas realizadas, se determinó que no existe diferencia cualitativa en cuanto a los constituyentes químicos en ninguno de los dos genotipos, excepto en terpenos.

Cuadro 1. Resultados de las pruebas fitoquímicas para alcaloides en extracto de hojas.

E X T R A C T O	GENOTIPO	
	Rojo de Seda	APN-83
Eter de petróleo	-	-
Cloroformo	-	-
Alcohol	-	-

(-) Indica la ausencia del metabolito.

Cuadro 2. Resultados de las pruebas fitoquímicas para alcaloides en extracto de vainas sin semilla.

E X T R A C T O	GENOTIPO	
	Rojo de Seda	APN-83
Eter de petróleo	-	-
Cloroformo	-	-
Alcohol	Color naranja	Color naranja.

(-) Indica ausencia del metabolito.

Cuadro 3. Resultados de las pruebas fitoquímicas para alcaloides en extracto de semillas.

E X T R A C T O	GENOTIPO	
	Rojo de Seda	APN-83
Eter de petróleo	-	-
Cloroformo	-	-
Alcohol	Color naranja	Color naranja

(-) Indica ausencia del metabolito.

Cuadro 4. Resultados de las pruebas fitoquímicas para taninos en extracto de hojas.

E X T R A C T O	GENOTIPO	
	Rojo de Seda	APN-83
Eter de petróleo	-	-
Cloroformo	-	-
Alcohol	Precipitado blanco	Precipitado blanco

(-) Indica ausencia del metabolito.

Cuadro 5. Resultados de las pruebas fitoquímicas para taninos en extractos de vainas sin semilla

E X T R A C T O	GENOTIPO	
	Rojo de Seda	APN-83
Eter de petróleo	-	-
Cloroformo	-	-
Alcohol	Precipitado blanco	Precipitado blanco

(-) Indica ausencia del metabolito.

Cuadro 6. Resultados de las pruebas fitoquímicas para taninos en extractos de semillas.

E X T R A C T O	GENOTIPO	
	Rojo de Seda	APN-83
Eter de petróleo	-	-
Cloroformo	-	-
Alcohol	Precipitado blanco	Precipitado blanco

(-) Indica ausencia del metabolito.

Cuadro 7. Resultados de las pruebas fitoquímicas para glicósidos saponínicos en extractos de hoja.

E X T R A C T O	GENOTIPO	
	Rojo de Seda	APN-83
Eter de petróleo	-	-
Cloroformo	-	-
Alcohol	Formación de anillo color marrón (Salkoski)	Formación de anillo color marrón (Salkoski)

(-) Indica ausencia del metabolito.

Cuadro 8. Resultados de las pruebas fitoquímicas para glicósidos saponínicos en extracto de vainas sin semilla.

E X T R A C T O	GENOTIPO	
	Rojo de Seda	APN-83
Eter de petróleo	-	-
Cloroformo	-	-
Alcohol	Formación de anillo color marrón	Formación de anillo color marrón

(-) Indica ausencia del metabolito.

Cuadro 9. Resultados de las pruebas fitoquímicas para glicósidos saponínicos en extractos de semillas.

E X T R A C T O	GENOTIPO	
	Rojo de Seda	APN-83
Eter de petróleo	-	-
Cloroformo	-	-
Alcohol	Formación de anillo color marrón (Salkoski) Verde (Lieberman)	Formación de anillo color marrón (Salkoski)

(-) Indica ausencia del metabolito.

Cuadro 10. Resultados de las cromatografías para alcaloides con extractos de hoja.

EXTRACTO	F A S E - I		F A S E - II	
	Rojo de Seda	APN-83	Rojo de Seda	APN-83
Eter de petróleo	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	No cambió color	No cambió color
Cloroformo	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	No cambió color	No cambió color
Alcohol	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	No cambió color	No cambió color

Usando como eluyente : Etanol-me
tanol 8:2.

Eluyente : Etanol-metanol 8:2
Detector : Dragendorff

Detector : Luz ultra violeta

(-) Indica la no presencia del metabolito secundario.

Cuadro 11. Resultados de las cromatografías para alcaloides con extractos de vainas sin semillas.

EXTRACTO	F A S E - I		F A S E - II	
	Rojo de Seda	APN-83	Rojo de Seda	APN-83
Eter de petróleo	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	No cambió color	No cambió color
Cloroformo	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	No cambió color	No cambió color
Alcohol	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	Mancha de color naranja (+)	Mancha de color naranja (+)

Eluyente etanol-metanol 8:2
Detector : Luz ultra violeta

Eluyente etanol-metanol 8:2
Detector : Dragendorff

Cuadro 12. Resultados de las cromatografías para alcaloides con extractos de semillas.

EXTRACTO	FASE - I		FASE - II	
	Rojo de Seda	APN-83	Rojo de Seda	APN-83
Eter de petróleo	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	No cambió color	No cambió color
Cloroformo	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	No cambió color	No cambió color
Alcohol	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	Mancha de color naranja (+)	Mancha de color naranja (+)

Eluyente: Etanol-metanol 8:2
Detector : Luz ultra violeta

Eluyente : Etanol-metanol 8:2
Detector : Dragendorff

Cuadro 13. Resultados de las cromatografías para glicósidos saponínicos con extractos de hojas.

EXTRACTO	FASE - I		FASE - II	
	Rojo de Seda	APN-83	Rojo de Seda	APN-83
Eter de petróleo	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	No cambió color	No cambió color
Cloroformo	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	No cambió color	No cambió color
Alcohol	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	Mancha de color marrón (Salkoski) verde (Lieberman)	Mancha de color marrón (Salkoski) verde (Lieberman)

Eluyente : Alcohol-acetona 7:3
Detector : Luz ultra violeta

Eluyente: Alcohol-acetona 7:3
Detector : ácido sulfúrico concentrado

NOTA : Esta tabla representa el resultado de las dos pruebas efectuadas para glicósidos saponínicos, dándonos igual resultado por lo que se resume en uno.

Cuadro 14. Resultados de las cromatografías para glicósidos saponínicos con extractos de vainas sin semillas.

E X T R A C T O	F A S E - I		F A S E - II	
	Rojo de Seda	APN-83	Rojo de Seda	APN-83
Eter de petróleo	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	No cambió color	No cambió color
Cloroformo	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	No cambió color	No cambió color
Alcohol	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	Mancha de color marrón (Salkoski) verde (Liebermann)	Mancha de color marrón (Salkoski) verde (Liebermann)

Eluyente: Alcohol-acetona 7:3

Eluyente : Alcohol-acetona 7:3

Detector : Luz ultravioleta

Detector : Acido sulfúrico Concent.

NOTA : Estas tablas representan el resultado de las dos pruebas efectuadas para glicósidos saponínicos, dándonos igual resultado por lo que se resume en uno.

Cuadro 15. Resultados de las cromatografías para glicósidos saponínicos con extractos de semilla.

E X T R A C T O	F A S E - I		F A S E - II	
	Rojo de Seda	APN-83	Rojo de Seda	APN-83
Eter de petróleo	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	No cambió color	No cambió color
Cloroformo	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	No cambió color	No cambió color
Alcohol	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	Mancha de color marrón (Salkoski) verde (Liebermann)	Mancha de color marrón (Salkoski) verde (Liebermann)

Eluyente : Alcohol-acetona 7:3

Eluyente : alcohol acetona 7:3

Detector : Luz ultravioleta

Detector : ácido sulfúrico Concent.

NOTA : Estas tablas representan el resultado de las dos pruebas efectuadas para glicósidos saponínicos, dándonos igual resultado por lo que se resume en uno. Al rociar con el reactivo de Lieberman no se observó nada; pero al calentar a 60 °C, se dió el cambio de color.

Cuadro 16. Resultados de las cromatografías para terpenos con extractos de hojas

EXTRACTO	FASE - I		FASE - II	
	Rojo de Seda	APN-83	Rojo de Seda	APN-83
Eter de petróleo	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	No cambió color	No cambió color
Cloroformo	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	No cambió color	No cambió color
Alcohol	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	Mancha de color verde amarillen to (-)	Mancha de color verde amarillen to (-)
Eluyente: Tolueno-acetato de etilo 93:7 Detector: Luz ultravioleta		Eluyente: Tolueno-acetato de etilo 93:7 Detector: Vainillina y ácido sulfúrico + calor.		

Cuadro 17. Resultados de las cromatografías para terpenos con extractos de vainas sin semillas.

EXTRACTO	FASE - I		FASE - II	
	Rojo de Seda	APN-83	Rojo de Seda	APN-83
Eter de petróleo	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	No cambió color	Mancha de color violeta (+)
Cloroformo	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	No cambió color	Mancha de color verde (+)
Alcohol	Separación de <u>com</u> ponentes	Separación de <u>com</u> ponentes	Mancha de color verde amarillen to (-)	Mancha de color verde amarillen to (-)
Eluyente: Tolueno-acetato de etilo 93:7 Detector: Luz ultravioleta		Eluyente: Tolueno-acetato de etilo 93:7 Detector: Vainillina y ácido sulfúrico + color.		

Cuadro 18. Resultado de las cromatografías para terpenos con extractos de semilla.

EXTRACTO	F A S E - I		F A S E - II	
	Rojo de Seda	APN-83	Rojo de Seda	APN-83
Eter de petróleo	Separación de componentes	Separación de componentes	Mancha de color violeta (+)	Mancha de color violeta (+)
Cloroformo	Separación de componentes	Separación de componentes	No cambió color	No cambió color
Alcohol	Separación de componentes	Separación de componentes	No cambió color	No cambió color

Eluyente : Tolueno-acetato de etilo 93:7

Detector : Luz ultravioleta

Eluyente : Tolueno-acetato de etilo 93:7

Detector : Vainillina y ácido sulfúrico + calor

4.3. Fase entomológica de laboratorio

Una vez obtenidos los extractos se procedió a realizar las pruebas con los insectos.

4.3.1. Evaluación de la respuesta de los adultos

4.3.1.1. Prueba de alimentación utilizando discos de hoja

Para esta prueba se utilizaron hembras y machos; con los machos no se obtuvo ningún resultado para ser presentados en el trabajo; ya que resultaron muy susceptibles al período de ayuno, muriendo pronto en su mayoría, Otros murieron en el manipuleo; sin mostrar actividad locomotriz definida hacia uno u otro extracto. Esto prácticamente eliminó la ya escasa disponibilidad de muestra para obtener resultados.

Con respecto a las hembras, la preferencia alimenticia en base al número de perforaciones realizadas en los discos foliares presentó amplia variación en sus datos numéricos (Cuadro 19).

En los testigos de la línea APN-83 se tuvo una mayor respuesta de alimentación que en los testigos de rojo de seda. Además en los discos de hoja de APN-83 tratados con extractos de hoja de Rojo de Seda se obtuvo una mayor respuesta de alimentación, tanto en los extractos obtenidos con éter de petróleo, alcohol y cloroformo; en cambio en los discos de hoja de Rojo de Seda tratados con los extractos de hoja de APN-83, la respuesta alimenticia no fue significativa.

El porcentaje de mortalidad en esta prueba fue del 50, 20, y 30% en las repeticiones I, II y III, respectivamente.

Los ensayos de discos foliares de APN-83 tratados con extracto de follaje de Rojo de Seda produjeron datos que no permiten discriminar en este momento cual de las fracciones de APN-83 podría ser la principal responsable de la actividad de las hojas de este genotipo para la alimentación de los adultos del insecto.

En esta prueba pudo observarse que la aplicación de los diferentes extractos sobre los discos foliares de los dos genotipos afecta notablemente la textura de la lámina foliar aparentemente deshidratándola y corrugándola hacia abajo, poniéndola rígida y quebradiza. Probablemente este daño pudo deberse a la acción de los disolventes; lo cual no se asegura como causa exclusiva ya que no se previó la instalación de discos como testigos relativos.

Estos resultados obtenidos muestran que al insecto le es atractivo la línea de frijol APN-83; ya que además de alimentarse del testigo, también se alimentaron de los discos de hoja que contenían extracto de hoja de Rojo de Seda. Lo que nos indica que la línea de frijol APN-83 posiblemente posee algún componente que le es atractivo pero que a la vez le afecta al insecto en su comportamiento; desconociéndose hasta el momento las causas de dicho efecto, pero que posiblemente estén relacionados los grupos químicos siguientes: Taninos, alcaloides, glicósidos, saponínicos y/o terpenos; ya que estos grupos de

una u otra forma protegen a las plantas contra el ataque de algunos insectos (11).

4.3.1.2. Prueba de alimentación utilizando discos de papel

En esta prueba no se obtuvo ninguna respuesta de alimentación de los insectos; ya que al examinar los discos de papel filtro por el estereoscopio, no se observó ninguna perforación. Lo que indica que los picudos no se alimentaron y por lo cual los extractos aplicados en discos de papel filtro no se comportaron como un estímulo para su alimentación.

Con respecto a la mortalidad se presentó un porcentaje del 50%; esto pudo ser debido al período de ayuno de los insectos y además a la duración de la prueba en la cual tampoco se alimentaron.

4.3.1.3. Prueba de atracción utilizando discos de papel y extracto de hoja de Rojo de Seda y APN-83 (con los tres disolventes).

En esta prueba en la cual se utilizó extracto de hoja de Rojo de Seda; tanto en la repetición I y II no se tuvo respuesta de atracción con ninguno de los extractos obtenidos con alcohol, cloroformo y éter de petróleo. Solamente hubo atracción con los testigos en ambas repeticiones y no hubo mortalidad pudiendo ser por la duración de la prueba; la cual duró dos horas (Cuadro 20).

Con respecto a la prueba de atracción con extracto de hoja

del genotipo APN-83; tampoco hubo mortalidad, pero sí atracción en los extractos alcohólicos de ambas repeticiones y en el testigo de la repetición I (Cuadro 21).

En el genotipo Rojo de Seda, el tejido foliar evaluado como testigo claramente ejerce una atracción para los adultos desde los 30 minutos hasta el final de la prueba.

El extracto alcohólico de hojas del genotipo Rojo de Seda, en todas las lecturas y repeticiones no ejerció ninguna atracción sobre los adultos de Apion godmani; lo cual ocurre en forma diametralmente opuesta con el mismo tipo de extracto procedente de APN-83.

Con respecto a esta prueba no se tiene criterio seguro si el tiempo que se usó como máxima duración es el más apropiado tanto para la difusión completa de los olores como para la saturación de las celdas del olfatómetro utilizado y para la percepción por parte del insecto, ya que al revisar la literatura no se encontró ninguna referencia que proporcionara tal información.

4.3.1.4. Prueba de atracción utilizando discos de papel y extracto de vaina de Rojo de Seda y APN-83 (con tres disolventes).

En esta prueba con los extractos de vaina de Rojo de Seda, en la repetición I, no hubo respuesta de atracción en ninguno de los extractos obtenidos con alcohol, cloroformo y éter de

petróleo ni con los testigos. En cambio en la repetición II, solamente hubo atracción en el extracto alcohólico (Cuadro 23) y en ninguna de las repeticiones hubo mortalidad.

Con respecto a la prueba de atracción utilizando extracto de vaina del genotipo APN-83; no hubo mortalidad. En cuanto a la atracción, solamente en el extracto alcohólico hubo respuesta y la cual se dió a la tercera lectura que fue a las 2 horas. En la repetición II, hubo respuesta de atracción en el extracto alcohólico y el testigo en ambas se dió a partir de la primera hora (Cuadro 22).

Los únicos extractos que produjeron consistentes respuestas para vaina en las dos repeticiones para ambos genotipos y en las tres lecturas fueron los de tipo clorofórmico y los de éter de petróleo para los cuales las respuestas fueron negativas; es decir que probablemente no tienen poder atractivo para los adultos de Apion godmani o si tienen algún poder atractivo; el aparato usado no fue capaz de detectarlo.

4.3.1.5. Prueba de atracción alimenticia a diferentes extractos de vaina depositados en papel filtro en condiciones de libre elección

En esta prueba no hubo respuesta alimenticia ya que en el papel filtro no se observó ninguna señal de alimentación por parte del insecto. Con esta prueba se comprobó que los extractos depositados en papel filtro no son fagoestimulante para

el picudo de la vaina Apion godmani. En dicha prueba el porcentaje de mortalidad fue cero.

4.3.1.6. Prueba de alimentación utilizando hojas de frijol común Rojo de Seda.

En esta prueba hubo respuesta alimenticia en las hojas de Rojo de Seda tratadas con extracto de hoja y vaina de APN-83 obtenidos con alcohol; y también en hoja que contenían solamente alcohol. Lo que indica que al insecto le es atractivo el genotipo APN-83.

En cuanto a las hojas; al final de la prueba se observó que tenían presencia de hongos, supuestamente fue debido a los inóculos existentes en el ambiente y a la humedad que había en las cajas Petri. El porcentaje de mortalidad fue del 67% en las hojas tratadas con el extracto de hoja de APN-83 y en las demás no hubo mortalidad.

4.3.2. Evaluación de la respuesta de las larvas

4.3.2.1. Deposición de larvas en papel filtro

Para esta prueba se utilizaron cuadros de papel filtro humedecidos con extracto de semilla de la línea APN-83, sobre los cuales se colocaron 2 larvas por extracto. En dicha prueba no se tuvo ninguna respuesta en cuanto a la alimentación, pero sí pudo observarse movimiento de las larvas en los tres extractos; vistos al estereoscopio, pero a simple vista

sólo se observó algún desplazamiento en los cuadrillos tratados con extracto alcohólico.

4.3.2.2. Deposición de larvas en vainas utilizando testigo absoluto

Para esta prueba se utilizaron vainas de frijol Rojo de Se da las cuales fueron disectadas y humedecidas con extractos de semilla de APN-83. Posteriormente se colocaron las larvas. En esta prueba se observó que las vainas que fueron tratadas con los extractos de cloroformo y éter de petróleo se deterioraron (sufrieron ataque por hongos y bacterias) al cabo de 24 horas; no así para las vainas tratadas con extracto alcohólico y los testigos (Cuadros 24, 25 y 26). En cuanto a la alimentación, aquí solamente se tuvo respuesta positiva con los extractos alcohólico, clorofórmico y en los testigos de cada uno; en donde se observó un incremento en el consumo después de cada lectura; en cuanto a la mortalidad se pudo observar que fue el 100% al cabo de las 96 horas; esta mortalidad podría deberse al grado de descomposición de las vainas, puesto que al interior de la vaina se encontró la larva inundada por el tejido descompuesto de la vaina; cuyo daño fue debido en alguna medida a las condiciones de humedad que se le proporcionó dentro de la caja Petri.

4.3.2.3. Deposición de larvas en vainas utilizando testigo absoluto y relativo

En esta prueba se utilizaron vainas de frijol Rojo de Seda las cuales fueron tratadas igual que la prueba anterior. En dicha prueba se observó que las vainas que fueron tratadas con éter de petróleo y el testigo relativo del mismo disolvente no hubo alimentación y además la mortalidad del 100% se dió a las 24 horas, por lo que podría ser que el disolvente ejerza un efecto negativo al insecto. En cuanto a las vainas tratadas con cloroformo y el testigo relativo del mismo disolvente sí se observó alimentación durante las primeras 24 horas; pero al cabo de las 48 hubo mortalidad del 100% en ambas vainas por lo que se cree que al igual que el éter de petróleo, también el cloroformo ejerce un efecto negativo sobre el insecto; pero su reacción es un poco más tardía. Con relación a las vainas tratadas con extracto alcohólico y el testigo relativo del mismo sí se observó una alimentación durante las 24 y 48 horas al igual que el testigo absoluto; pero al cabo de las 72 horas sí se tuvo una mortalidad del 100%, pero ésto podría ser debido al grado de descomposición que presentaban las vainas, las cuales sufrieron ataques por hongos y bacterias. Con respecto a los testigos absolutos para las pruebas realizadas con los extractos de éter de petróleo y cloroformo; sucedió lo mismo que con el testigo absoluto de los extractos alcohólicos (Cuadros 27, 28 y 29).

Además de los factores antes mencionados, otras circunstancias que podrían incidir en la naturaleza de los resultados son :

- Edad no definida de las larvas
- El escaso número de larvas en estudio
- Falta de cambio diario de sustrato utilizado en las pruebas.

Cuadro 19. Prueba de alimentación de adultos de Apion godmani en discos foliares de frijol común Rojo de Seda y APN-83, utilizando un olfatómetro sencillo.

EXTRACTO	APLICADO EN	No. de Perforaciones		
		PERFORACIONES		
		I	II	III
Eter de Petróleo de APN-83	Discos de Rojo de Seda	-	2	4
Eter de Petróleo de Rojo de Seda	Discos de APN-83	18	46	72
Alcohólico de APN-83	Discos de Rojo de Seda	2	1	3
Alcohólico de Rojo de Seda	Discos de APN-83	28	-	3
Clorofórmico de APN-83	Discos de Rojo de Seda	-	-	-
Clorofórmico de Rojo de Seda	Discos de APN-83	1	17	76
Testigo : discos de APN-83	-	171	7	158
Testigo : discos de Rojo de Seda	-	1	3	-
Mortalidad (%)	-	50	20	30

NOTA : Los discos de hoja de frijol Rojo de Seda fueron sumergidos con los extractos de hoja de la línea APN-83 y viceversa.

Cuadro 20. Respuesta de atracción "olfatoria" de adultos de Apion godmani; ante extractos de hoja del genotipo de frijol común Rojo de Seda.

ESTIMULOS OLFATORIOS	T I E M P O					
	30 M.	60 M.	120 M.	30 M.	60 M.	120 M.
	REPETICION I			REPETICION II		
- Extracto obtenido con alcohol etílico.	-	-	-	-	-	-
- Extracto obtenido con cloroformo.	-	-	-	-	-	-
- Extracto obtenido con éter de petróleo	-	-	-	-	-	-
- Hoja entera (testigo)	x	x	x	x	x	x

M. = Minutos

(x) Hubo atracción a la fuente de olor

(-) No hubo atracción a la fuente de olor.

Cuadro 21. Respuesta de atracción "olfatoria" de adultos de Apion godmani ante extractos de hoja del genotipo de frijol APN-83.

ESTIMULOS OLFATORIOS	T I E M P O					
	30 M.	60 M.	120 M.	30 M.	60 M.	120 M.
	REPETICION I			REPETICION II		
Extracto obtenido con alcohol etílico	x	x	x	x	x	x
Extracto obtenido de cloroformo.	-	-	-	-	-	-
Extracto obtenido de éter de petróleo	-	-	-	-	-	-
Hoja entera (testigo)	x	x	x	-	-	-

- (x) Hubo atracción a la fuente de olor
 (-) No hubo atracción a la fuente de olor

Cuadro 22. Respuesta de atracción olfatoria de adultos de Apion godmani, ante extractos de vainas del genotipo APN-83.

ESTIMULOS OLFATORIOS	T I E M P O					
	30 M.	60 M.	120 M.	30 M.	60 M.	120 M.
	REPETICION I			REPETICION II		
Extracto obtenido con alcohol etílico.	-	-	x	-	x	x
Extracto obtenido con cloroformo	-	-	-	-	-	-
Extracto obtenido con éter de petróleo	-	-	-	-	-	-
Hoja (testigo)	-	-	-	-	x	x

- (x) Hubo atracción a la fuente de olor
 (-) No hubo atracción a la fuente de olor

Cuadro 23. Respuesta de atracción olfatoria de adultos de Apion godmani, ante extractos de vaina del genotipo Rojo de Seda.

ESTIMULOS OLFATORIOS	T I E M P O					
	30 M.	60 M.	120 M.	30 M.	60 M.	120 M.
	REPETICION I			REPETICION II		
Extracto obtenido con alcohol etílico	-	-	-	x	x	x
Extracto obtenido con cloroforno	-	-	-	-	-	-
Extracto obtenido con éter de petróleo	-	-	-	-	-	-
Vaina (testigo)	-	-	-	-	-	-

(x) Hubo atracción a la fuente de olor
 (-) No hubo atracción a la fuente de olor

Cuadro 24. Prueba de alimentación de larvas utilizando extracto alcohólico de semilla de APN-83.

Tiempo de Exposición	Alimentación en vainas tratadas	Alimentación en vainas no tratadas (testigo)	Mortalidad en vainas tratadas	Mortalidad en vainas no tratadas
24 horas	+	-	-	-
48 horas	+	+	-	-
96 horas	+	+	+	+

Nota : Signo + : Indica alimentación y mortalidad
 - : Indica no alimentación y no mortalidad

Cuadro 25. Prueba de alimentación de larvas utilizando extracto de éter de petróleo de semilla de APN-83.

Tiempo de Exposición	Alimentación en vainas tratadas	Alimentación en vainas no tratadas (testigo)	Mortalidad en vainas tratadas	Mortalidad en vainas no tratadas
24 horas	-	+	+	-
48 horas	-	+	+	-
96 horas	-	+	+	-

Signo + : Indica alimentación y mortalidad
- : Indica no alimentación y no mortalidad.

Cuadro 26. Prueba de alimentación de larvas utilizando extracto clorofórmico de semillas de APN-83.

Tiempo de Exposición	Alimentación en vainas tratadas	Alimentación en vainas no tratadas (testigo)	Mortalidad en vainas tratadas	Mortalidad en vainas no tratadas
24 horas	+	+	-	-
48 horas	+	+	+	-
96 horas	-	-	+	+

Signo + : Indica alimentación y mortalidad
- : Indica no alimentación y no mortalidad.

Cuadro 27. Prueba de alimentación de larvas utilizando extracto alcohólico de semilla de APN-83 y dos testigos.

Tiempo de Exposición	Alimentación en vaina tratada	Alimentación en vaina testigo absoluto	Alimentación en vaina testigo relativo	Mortalidad en vaina tratada	Mortalidad en vaina testigo absoluto	Mortalidad en vaina testigo relativo
24 horas	+	+	+	-	-	-
48 horas	+	+	+	-	-	-
72 horas	-	-	-	+	+	+

Signo (+) : Indica alimentación y mortalidad

(-) : Indica no alimentación y no mortalidad.

Cuadro 28. Prueba de alimentación de larvas utilizando extracto de éter de petróleo de semilla de APN-83 y dos testigos.

Tiempo de Exposición	Alimentación en vaina tratada	Alimentación en vaina testigo absoluto	Alimentación en vaina testigo relativo	Mortalidad en vaina tratada	Mortalidad en vaina testigo absoluto	Mortalidad en vaina testigo relativo
24 horas	-	+	-	+	-	+
48 horas	-	+	-	+	-	+
72 horas	-	+	-	+	+	+

Signo (+) : Indica alimentación y mortalidad

(-) : Indica no alimentación y no mortalidad.

Cuadro 29. Prueba de alimentación de larvas utilizando extracto de cloroformo de semilla de APN-83 y dos testigos.

Tiempo de Exposición	Alimentación en vainas tratadas	Alimentación en vaina testigo absoluto	Alimentación en vaina testigo relativo	Mortalidad en vaina tratada	Mortalidad en vaina testigo absoluto	Mortalidad en vaina testigo relativo
24 horas	+	+	+	-	-	-
48 horas	+	+	-	+	-	+
72 horas	-	-	-	+	+	+

Signo (+) : Indica alimentación y mortalidad
 (-) : Indica no alimentación y no mortalidad.

5. CONCLUSIONES

- 1 - En las pruebas fitoquímicas realizadas con los extractos alcohólicos de ambos génotipos se obtuvo la posible presencia de alcaloides, taninos y glicósidos saponínicos.
- 2 - En los análisis de cromatografía en capa fina se comprobó la posible presencia de alcaloides y glicósidos saponínicos.
- 3 - Con los resultados de las cromatografías en capa fina para terpenos, hubo diferencia significativa con respecto a la línea APN-83 en los extractos de éter de petróleo y cloroformo de vainas sin semillas; no así en la variedad Rojo de Seda.
- 4 - La línea de frijol común APN-83 posee algún componente que afecta al insecto en su comportamiento, pudiendo ser los terpenos los posibles responsables de dicho efecto.

6. RECOMENDACIONES

- Mejorar el diseño de olfatómetros y dispositivos apropiados para hacer ensayos de atracción de adultos de Apion godmani, en relación a sustancias de genotipos de frijol resistentes o susceptibles a la plaga.
- Realizar otros trabajos en donde se estudie más a fondo, y que pueda asegurarse la presencia de las estructuras químicas específicas responsables de la resistencia a Apion godmani.
- Planificar de manera adecuada la ejecución de las pruebas con el picudo Apion godmani de manera tal que no se tenga problemas con la disponibilidad de éste al momento de realizar dichas pruebas.
- Procurar que en todos los estudios a realizar cuando se utilizan disolventes; contemplar siempre en la prueba un testigo relativo y un testigo absoluto.
- Una vez determinado el grupo químico o sustancia responsable de la resistencia a Apion godmani en la línea de frijol común APN-83, realizar estudios para ver de que manera esta resistencia puede ser transferida a la variedad susceptible.

- Con el objeto de poder almacenar por tiempo indefinido las sustancias extraídas con diferentes disolventes, se recomienda liofilizar, lo cual facilitaría su utilización posterior.

7. BIBLIOGRAFIA

1. ALFARO MORENO, A. 1968. Plaguicidas agrícolas y su aplicación, sustancias atractivas. 3 ed. Madrid, España. p. 223.
2. BEBE, S. 1988. Mejoramiento de la resistencia al Apion: La contribución del CIAT. In. II Taller Internacional sobre Apion. (1980, Honduras). Memorias. Danli, Honduras, CIAT. p. 124.
3. CENTRO DE RECURSOS NATURALES, SERVICIO DE METEOROLOGIA E HIDRAULICA. 1987. Almanaque Salvadoreño. Sonsonate, El Salvador. MAG. P. 96.
4. CIAT. 1983. Programa de yuca. Cali, Colombia. P. 33-36.
5. CIAT. 1985. Programa de frijol. Cali, Colombia. P. 7.
6. CLAUS, E. 1968. Farmacognosia. Trad. Jorge D. Coussio. 5 ed. El Ateneo. Argentina. P. 167.
7. CRONQUIST, A. 1969. Introducción a la botánica. Continental. México. P. 240, 653.
8. DETHIER, V.G. 1947. Olfactometers and threshold concentration. Chemical Insect Attractants and repellents (Philadelphia). P. 240.
9. DE BOER, G.; HANSON, F.E. 1987. Feeding Responses to solanaceous allelochemicals by larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Entomol. Exp. Appl. (U.S.A.). Vol. 45: 123-130.

10. DIAZ, A.O. 1988. Distribución e importancia de Apion Spp en Centro América y México. In. II Taller In ternacional sobre Apion. (1988, Danlí, Honduras). Cali, Colombia, CIAT. P. 11.
11. DOMINGUEZ, X.A. 1973. Investigación fitoquímica. Li musa, Arcos de Belén, México, D.F. P. 149, 161, 195, 211-215, 228.
12. _____. 1975. Cromatografía en papel y en capa del- gada. Secretaría General de Organización de los Es tados Americanos. Monterrey, México. P. 35-57.
13. DREYER, M. 1983. Efecto de extractos acuosos del árbol de neem y del aceite de semillas del neem en la plaga más importante de cucurbita pepo en Togo. In. Segun da Conferencia del árbol de neem. (República Fede- ral de Alemania). Eschborn, Alemania. P. 39.
14. FRANCO LANDAVERDE, E.S.; HERNANDEZ, A.; RIVERA RIVAS, R. 1989. Estudios de antibiosis y antixenosis como cau sas de la resistencia de los genotipos de frijol co- mún (Phaseolus vulgaris) al picudo de la vaina (Apion godmani). Tesis Ing. Agr. San Salvador, Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas. P. 22.
15. FULLER, H.J.; RITCHI, D.D. 1967. Botánica general. Trad. Antonio Marino Ambrosio. Continental. Méxi co. P. 25, 258.

16. GARZA GARCIA, R. 1988. Mecanismos de resistencia en materiales de frijol P.V.L.; seleccionados como resistentes al picudo del ejote Apion sp. In. II Taler Internacional sobre Apion. (1988, Honduras). Momorias. Danlí, Honduras. CIAT. P. 42-43.
17. GEOFFREY SEHNDER; J.D. WARTHEN. 1988. Feeding inhibition and mortality effects of Neem Seed extract on the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). Econo Entomol. (Washington). 81(4): 1040-1044.
18. KLEIN, J.A. 1983. Sawtooth projections and associated secretion of Oryzaephilus surinamensis (coleoptera: cucujidae) pupae: Structure and función. Annals of the Entomological Society of America (Washington) Board. 76(1): 69-73.
19. KUBO, I.; NAKANISHI, K. 1977. Insect antifeedants and repellents from african plants. Host plant resistance to pest (N.Y.). No. 62:165.
20. LARIOS, J.F. 1987. Fundamentos y componentes del manejo integrado de plagas. Artículos selectos del curso filosofía y componentes del manejo integrado de plagas. CATIE. El Salvador. P. 45, 47.

21. LOFGREN, C.S. 1983. Behavior of workers of solenopsis invicta (Hymenoptera: formicidae) to the queen recognition pheromone: Laboratory studies with an olfactometer and surrogate Queens. Annales of the Entomological Society of America (Washington) Board. 76(11): 44-48.
22. MANCIA, J.E. 1973. La biología del picudo de la vaina, Apion godmani W. y su distribución en El Salvador. SIADES (E.S.). 2(2): 12-29.
23. _____. 1973. Evaluación de variedades de frijol tolerante al picudo de la vaina (Apion godmani Wagn). SIADES (El Salvador). 2(3): 15-18.
24. MAXWELL, F.G.; JENNINGS, P.R. 1984. Mejoramiento de plantas resistentes a insectos. Comp. Fowden G. Maxwell; Peter R. Jennings. México, D.F. Limusa. P. 44-59.
25. MESQUITA, L.F. 1986. Resistencia de plantas a insectos. Inf. Agropec., Belo Horizonte (Br). Vol. 12: 23-28.
26. RODRIGUEZ HERNANDEZ, D. 1987. Búsqueda de plantas nativas del estado de México con propiedades tóxicas contra el gusano cogollero (Spodoptera frugiperda) y mosquito casero (Culex quinquefasciatus). In V Congreso Nacional y I Centroamericano, México y El Caribe de Manejo Integrado de Plagas. Guatemala. Asociación Guatemalteca de Manejo Integrado de Plagas, Guatemala, Centro América. Agosto de 1987. P. 35-39.

27. SAN ANDRES, CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA.
1980. Documentos técnicos sobre aspectos agropecua
rios. 1 - Granos básicos y calibración de equipos
de aspersión. La Libertad, El Salvador, C.A. CENTA.
P. 14.
28. SHARMA, R.N. 1983. Desarrollo de productos vegetales
para controlar plagas, una estrategia de trabajo in-
tegrado. In. Segunda conferencia del árbol de neem.
(República Federal de Alemania). Eschborn, Alemania.
P. 51.
29. TESTER, C.F. 1977. Constituents of soybean cultivars
Differing in insect resistance. Phytochemistry
(England) Vo-. 16: 1899-1901.
30. TREASE, G.E. 1987. Tratado de farmacognosia. 12 ed. In
teramericana. P. 75, 236, 258.

8. ANEXOS

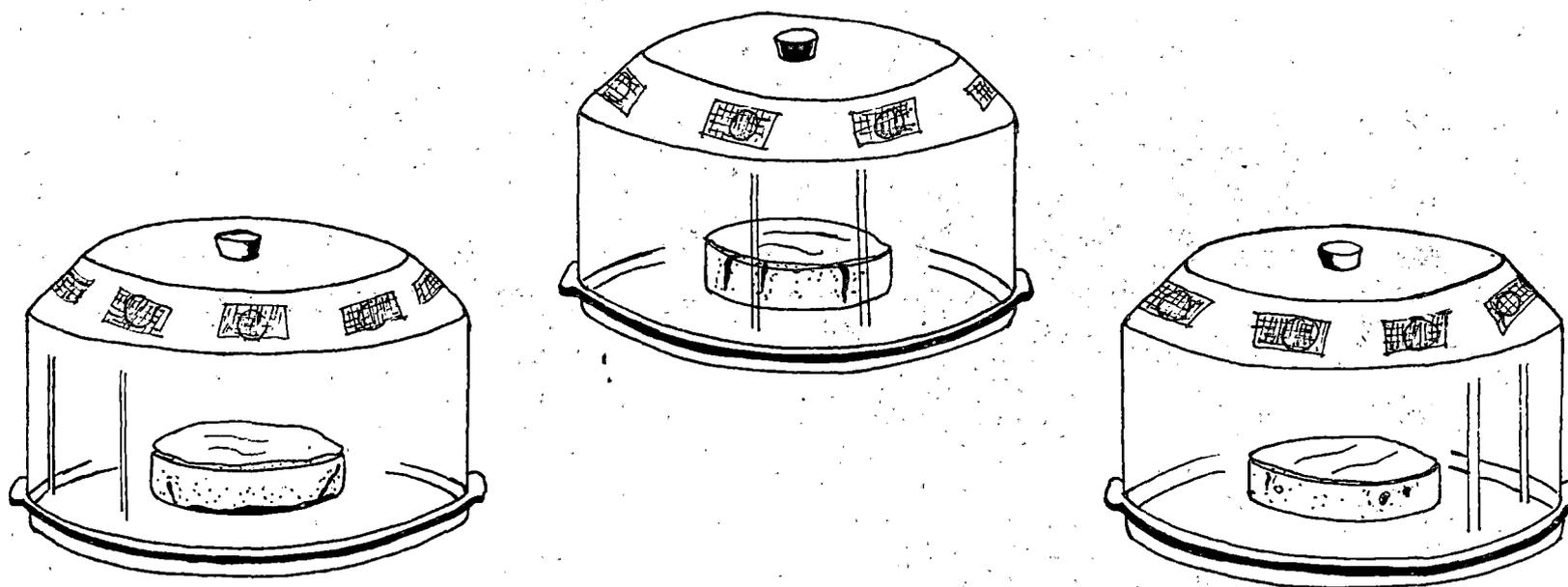


Figura 1. Olfatómetros sencillos, utilizado para pruebas de alimentación.

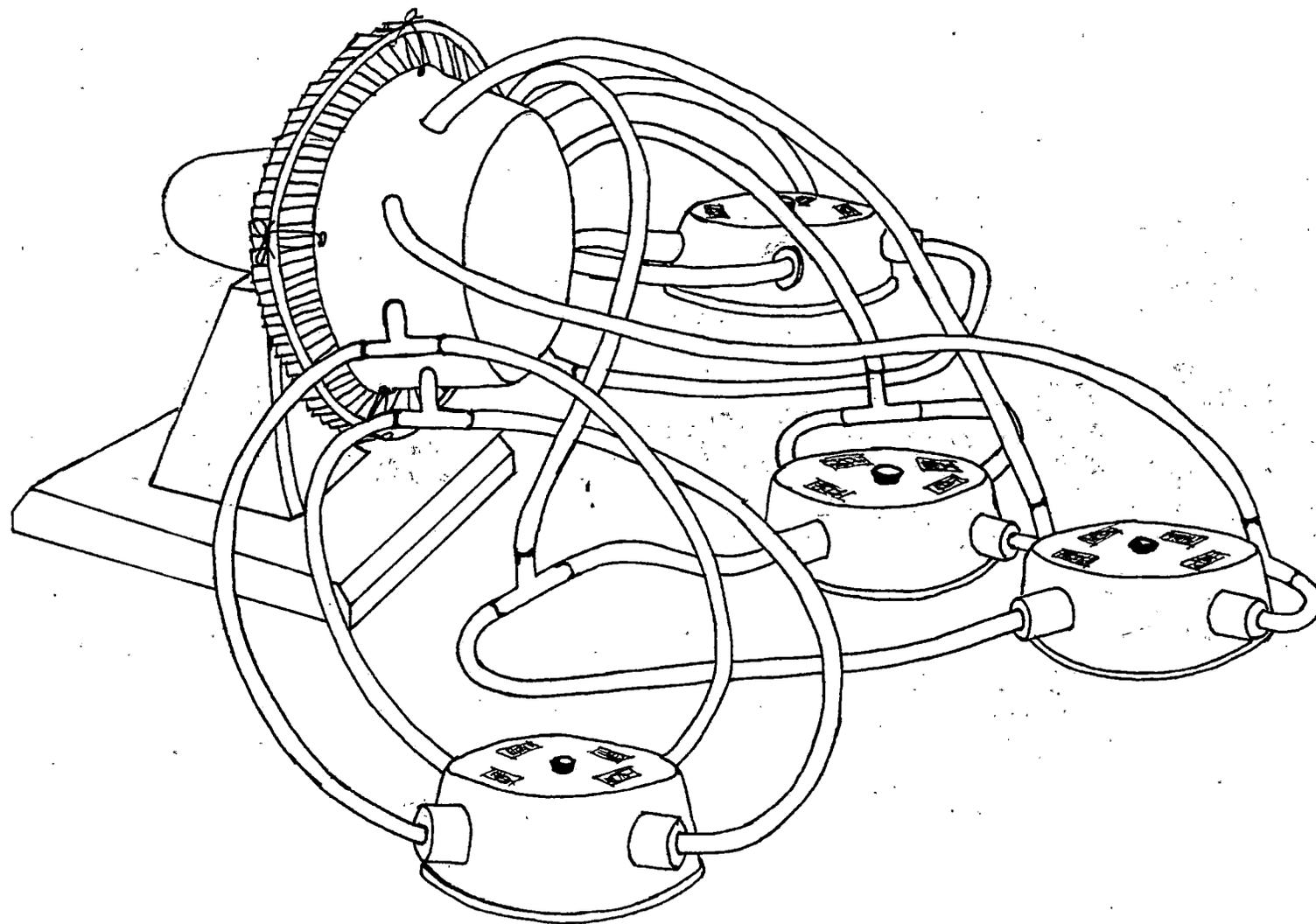
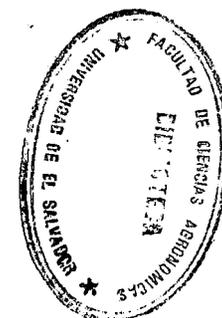


Figura 2. Olfatómetro con ventilación y celdas de entrada múltiple, utilizado para pruebas de atracción olfatoria.



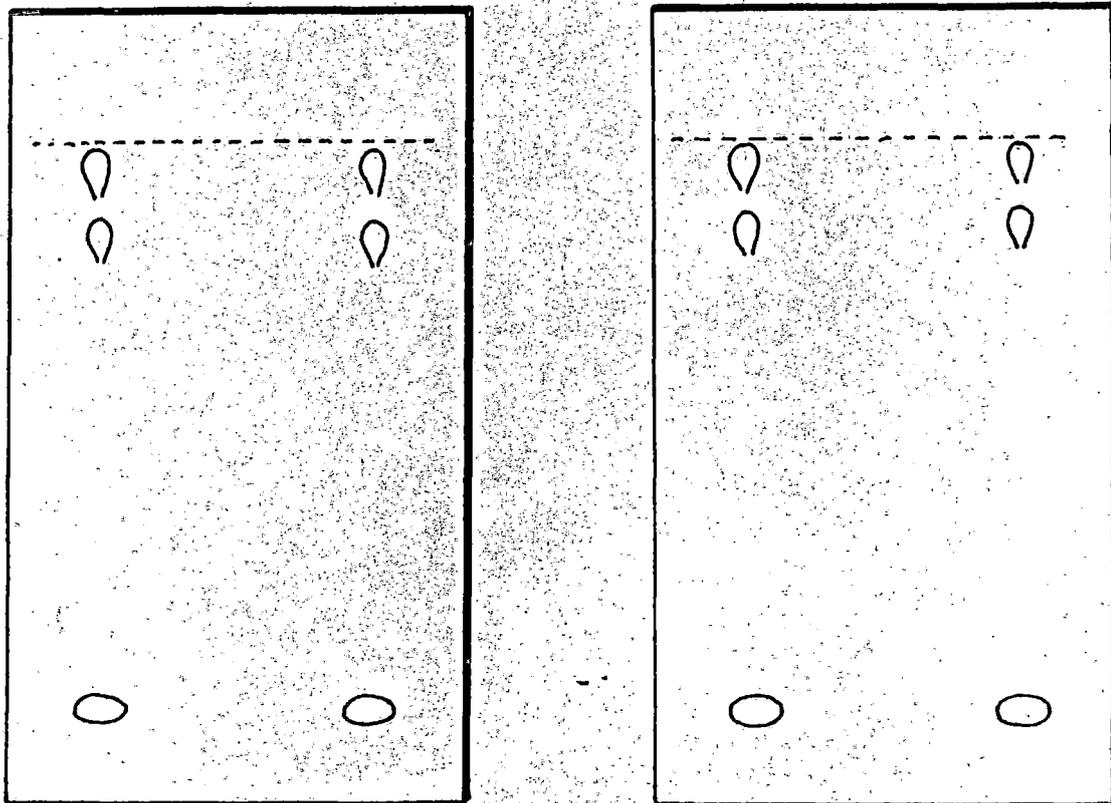


Figura 3. Presentación general de como se obtuvo el análisis de cromatografía en capa fina para terpenos, con extractos alcohólicos. De igual manera se hicieron, para los otros extractos, cambiando únicamente la muestra eluyente y detector.

Eluyente: tolueno-acetato de etilo 93:7

Detector : Luz ultra violeta

A : Color rojo

B : Color rojo

C : Color rojo

Eluyente : Tolueno-acetato de etilo 93:7.

Detector : Vanillina y ácido sulfúrico.

A : Color verde amarillento

B : Color verde amarillento

C : Color café