

Actividad insecticida y reguladora del crecimiento de extractos de *Blechnum chilense* (Blechnaceae) y *Condalia microphylla* Cav. (Rhamnaceae), sobre larvas de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)

[Insecticidal activity and growth regulatory of *Blechnum chilense* (Blechnaceae) and *Condalia microphylla* Cav. (Rhamnaceae) extracts, on larvae of *Galleria mellonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Pyralidae)]

Nelson Zapata¹, Ricardo Ceballos², Carlos Céspedes³, Julio Alarcon³ & Andrés Leyton¹

¹Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Chillán, Chile

²Laboratorio de Ecología Química, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Chillán, Chile

³Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias, Universidad del Bío-Bío, Chillán, Chile

Contactos | Contacts: Nelson ZAPATA - E-mail address: nzapata@udec.cl

Abstract: *Galleria mellonella* (L.) is the most detrimental pest to beekeeping, due the larvae feeds on hive of *Apis mellifera* (L.) consuming the wax, pollen and honey. The aim of this study was to determine the insecticidal activity and growth regulatory activity of extracts obtained from leaves and stems of *Blechnum chilense* (Kaulf.) Mett and *Condalia microphylla* Cav. for larvae of *G. mellonella*. The extracts were obtained with organic solvents of different polarity. The results show that the extract of *B. chilense* obtained with ethyl acetate, and the extract of *C. microphylla* obtained with acetone have effective insecticidal activity on larvae of *G. mellonella*, when applied at sub-lethal doses affect adversely the larval weight gain. In turn, the extract obtained from *B. chilense* showed regulatory activity on larval development of *G. mellonella*, inducing pupal stage prematurely.

Keywords: Wax moth, pest, botanical insecticides, bio-insecticides

Resumen: *Galleria mellonella* (L.) es una de las plagas más importantes para la apicultura, debido a que en su estado larval se alimentan de la cera, polen y miel almacenados en los panales de *Apis mellifera* (L.). El objetivo del presente estudio fue determinar la actividad insecticida y reguladora del crecimiento de extractos obtenidos a partir de hojas y tallos de *Blechnum chilense* (Kaulf.) Mett y *Condalia microphylla* Cav. sobre larvas (L2) de *G. mellonella*. Los extractos fueron obtenidos con solventes orgánicos de diferente polaridad. Los resultados obtenidos indican que, el extracto de *B. chilense* obtenido con acetato de etilo y el extracto de *C. microphylla* obtenido con acetona, tienen efecto insecticida efectivo sobre larvas de *G. mellonella* y a aplicado en dosis sub-letales afectan negativamente la ganancia de peso larvario. A su vez, el extracto obtenido de *B. chilense* presentó actividad reguladora del desarrollo larvario de *G. mellonella*, induciendo el estado de pupa en forma prematura.

Palabras clave: Polilla de la cera, plagas, insecticidas botánicos, bioinsecticidas

Recibido | Received: 28 de Mayo de 2014

Aceptado | Accepted: 3 de agosto de 2015

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 17 de Diciembre de 2015

Publicado en línea | Published online: 30 de Marzo de 2016

Declaración de intereses | Declaration of interests: NZ agradece el apoyo parcial de proyecto Fondecyt # 1130351. CLC y JA agradecen el apoyo parcial de Proyectos Fondecyt # 11001003, 1130242 y 1130463 y a la Dirección de Investigación de la Universidad del Bío Bío.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: N Zapata, R Ceballos, C Céspedes, J Alarcon, A Leyton. 2016. Actividad insecticida y reguladora del crecimiento de extractos de *Blechnum chilense* (Blechnaceae) y *Condalia microphylla* Cav. (Rhamnaceae), sobre larvas de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae). **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 15 (2): 77 – 87.

INTRODUCCIÓN

Galleria mellonella L. (Lepidóptera: Pyralidae), conocida como la polilla grande de la cera, es una de las plagas más importantes para la apicultura (Llorente, 2003). La cual posee una amplia distribución a nivel mundial, y es capaz de infestar colonias de *Apis cerana* F., *Apis dorsata* F., y *Apis mellifera* L. (Contreras, 2009). En Chile, esta especie se distribuye en todas las áreas apícolas del país (Gonzalez, 1989). Las larvas de *G. mellonella* se alimentan de cera, polen y miel almacenados en los panales de colonias activas de abejas, dónde además construyen galerías (Jafari et al., 2010). Por otra parte, la seda producida por esta plaga al momento de pupar, puede cubrir gran parte del panal e impedir la salida de las abejas que han terminado su desarrollo (Llorente, 2003). Además, en casos de alta infestación la cubierta originada por esta seda podría impedir la eliminación de esta plaga por parte de las abejas. Junto con lo anterior, esta plaga posee una alta tasa de consumo de cera, la cual supera ampliamente la capacidad de elaboración de ésta por parte de las abejas (Artigas, 1994). El daño provocado por esta plaga, consiste en la destrucción de la colonia de *A. mellifera*, el cual es el resultado de la acción de las larvas, –consumiendo la cera y las reservas alimenticias. Las pérdidas económicas se han estimado entre un 30 y 60% de los cuadros almacenados (Jafari et al., 2010), llegando a una pérdida total cuando la cera está almacenada en lugares oscuros, temperados y sin mover por periodos de tiempo prolongado (Llorente, 2003).

El control de esta plaga se realiza mediante diferentes estrategias, como el control físico, químico y biológico. El control físico se realiza mediante la aplicación de ciclos de calor cuyas temperaturas son de 45 °C por 80 min y de -12 °C por 3 horas. La principal dificultad de este método es el riesgo de la fundición de la cera y la necesidad del uso de cámaras de frío para lograr reducir la temperatura. El control químico se realiza aplicando productos como sulfuro de carbono, anhídrido sulfuroso, dibromuro de metilo y *p*-diclorobenceno (Aldea, 2010). La más exitosa medida de control químico ha sido el uso de insecticidas en la etapa larval (Jafari et al., 2010). Sin embargo, la mayoría de estos productos posee efecto residual tóxico para las abejas y nocivo para la salud humana (Aldea, 2010). También se ha evaluado la técnica de macho-esterilidad con rayos gamma, no

obstante su baja efectividad exige su empleo en combinación con otras alternativas como el uso de insecticidas (Jafari et al., 2010). Entre las estrategias de control biológico para *G. mellonella*, se señala a los parasitoides *Apanteles galleriae* Wilkinson y *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) (Parra et al., 2006; Dweck et al., 2010). La principal desventaja de este método es la alta dependencia, de estos enemigos naturales, de las condiciones climáticas y biológicas del lugar (Cisneros, 1995). Por otra parte, algunas cepas de *Bacillus thuringiensis* B., de bajo riesgo ambiental y humano, han sido empleadas como exotoxina para controlar esta plaga. En general, estas cepas de *Bacillus* poseen un efecto antialimentario y en algunos casos pueden llegar a causar la muerte del insecto (Ferrero et al., 2004). Aún cuando los métodos anteriores han sido aplicados, su éxito ha sido relativo (Cisneros, 1995).

En la búsqueda de nuevas alternativas de control, las plantas constituyen una amplia y variada fuente de sustancias químicas con amplio potencial de uso. Las plantas sintetizan una gran cantidad de compuestos químicos como producto de su metabolismo (Valladares et al., 2003). Algunas de estas sustancias, como terpenos, alcaloides, flavonoides entre otras, le permiten a estas interactuar con su medioambiente y los organismos presentes en él (Marín & Céspedes, 2007). Otras pueden interferir en el desarrollo y comportamiento de los insectos (Valladares et al., 2003, López & Estrada, 2005). Lo anterior, debido a que algunos de los compuestos químicos producidos por las plantas constituyen análogos químicos de hormonas y proteínas sintetizadas por los insectos, que pueden actuar interrumpiendo o alterando su ciclo biológico (Ferrero et al., 2004). Estos compuestos naturales, pueden servir de base para el desarrollo de nuevos productos fitosanitarios más selectivos y menos contaminantes (Pascual, 1996). Existen estudios que demuestran la presencia de compuestos naturales en plantas que producen efectos bioinsecticidas en lepidópteros (Novo et al., 1998). Céspedes (2000) utilizó limonoides extraídos de *Cedrela* spp. (Meliaceae), sustancias que además de inhibir el crecimiento fueron letales para larvas de *Spodoptera frugiperda* Smith. Estos triterpenoides, potencian la acción antialimentaria e inhiben la ecdisis o muda de los insectos (Primo, 2007). Otro ejemplo, es la actividad de azaradictina un limonoide, extraído del

árbol del Nim (*Azadirachta indica* A. Juss.), que posee una alta eficacia en el control de algunos lepidópteros (López & Estrada, 2005; Contreras 2011).

La presencia de algunos fitoecdisteroides en especies nativas como *Blechnum chilense* (Kaulf.) Mett y *Condalia microphylla* (Gunckel, 1984), han demostrado la potencialidad de estas especies vegetales como fuentes de bioinsecticidas para algunas especies de lepidópteros y coleópteros (Alarcón, 2009; Céspedes *et al.*, 2009; Céspedes *et al.*, 2013; Hincapié *et al.*, 2011). Los fitoecdisteroides, corresponden a homólogos de la ecdisona sintetizados por las plantas para defenderse de los insectos fitófagos (Viñuela *et al.*, 1991). Estos compuestos actúan en la epidermis de las larvas, alterando la muda y metamorfosis de los insectos (Dinan, 2001). Además, estos compuestos pueden ocasionar malformaciones, esterilidad y hasta la muerte de insectos (Alonso, 1999). Algunas especies de la familia Rhamnaceae, poseen en su composición química compuestos fenólicos que pueden tener efecto insecticida y triterpenos con efecto tipo ecdisteroides (Ateyyat & Abu-Darwish, 2009; Céspedes *et al.*, 2013). En relación a lo anteriormente expuesto, el objetivo general de esta investigación fue evaluar el efecto de extractos de *B. chilense* y *C. microphylla* sobre la mortalidad y regulación del crecimiento de larvas de *G. mellonella*, con el fin de contribuir al desarrollo de alternativas de control de esta plaga.

MATERIALES Y MÉTODOS

Crianza de insectos

Las larvas de *G. mellonella* empleadas en este estudio se obtuvieron de una colonia de laboratorio que se mantiene en el Centro Tecnológico de Control Biológico del Instituto de Investigaciones Agropecuarias Quilamapu. La crianza se realizó a partir de pupas, las cuales se situaron en recipientes de vidrio de forma cilíndrica (12 cm de diámetro, 16 cm de alto), recubiertos por su interior con papel filtro para facilitar la oviposición de las hembras que emergían. Los huevos recolectados fueron depositados en placas de Petri e incubados en oscuridad a una temperatura de $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$ y $75 \pm 5\%$ de humedad relativa. Trascorrida una semana se iniciaba la emergencia de larvas, las cuales se depositaban en tubos plásticos (4,0 cm de diámetro, por 5,0 cm de alto) y eran alimentadas con dieta artificial apropiada hasta alcanzar el estado de pupa

(King & Hartley, 1985). Para realizar los bioensayos se emplearon larvas de segundo estadio (L2) cuyo tamaño alcanzaba a 6 mm.

Recolección de plantas y obtención de extractos

En la primavera de 2010 se recolectaron tallos y hojas de *Condalia microphylla* en la localidad de Los Andes, región de Valparaíso, Chile y en la zona del Campus agrícola de la Universidad Católica de Córdoba, Córdoba, Argentina. Vouchers de especímenes fueron depositados en el Herbario del Departamento de Ciencias Básicas, de la Universidad del Bio-Bio, Chillán, Chile (Voucher CLC/0035); y en el Herbario “Dr. Marcelino Sagayo” de la Universidad Católica de Córdoba, Argentina (UCCOR). Las muestras vegetales fueron identificadas por el Prof. Gustavo Ruiz, Ph. D. (Ingeniero Agrónomo, Director y curador del Herbario “Dr. Marcelino Sagayo” (UCCOR—acrónimo no registrado), Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Católica de Córdoba, Argentina. El material vegetal recolectado fue separadamente secado, triturado y sometido a extracción con metanol. Posteriormente, los extractos fueron concentrados en evaporador rotatorio a presión reducida hasta obtener una consistencia viscosa. *B. chilense* fue colectado en la isla de Chiloé, región de Los Lagos - Chile. El extracto seco obtenido de *B. chilense* se resuspendió en agua y se extrajo sucesivamente en embudo de decantación con hexano y acetato de etilo hasta agotamiento. Para la obtención extractos de *C. microphylla*, se empleó el mismo procedimiento, pero empleando metanol en lugar de hexano. Se obtuvieron tres extractos, los cuales fueron diluidos con hexano (fh), acetato de etilo (fae) y agua (fa). En el caso de *C. microphylla* se obtuvieron dos extractos, el extracto metanólico que fue concentrado hasta un aceite siruposo el cual fue posteriormente diluido con etanol (C1) y este luego fue particionado con acetona (C2).

Actividad insecticida y reguladora del crecimiento

Con los extractos obtenidos de cada especie (*B. chilense*: fae, fh, fa y *C. microphylla*: C1 y C2) se estableció un experimento, aplicando a una sección de 1 cm^3 de dieta artificial para *G. mellonella* 1 mL de solución de cada extracto a una concentración de $500\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. También se estableció un control por cada solvente utilizado y un control con dieta sin solvente. Antes de situar las larvas sobre la dieta, las placas fueron ventiladas aproximadamente por 45

minutos para permitir la volatilización de los solventes utilizados. Las larvas de *G. mellonella* (L2) fueron alimentadas individualmente, con 1,0 cm³ de dieta tratada dispuesta en placas de policarbonato transparente (Thermo Scientific Nunc ®) de 24 alveolos. Se consideraron tres repeticiones por tratamiento y 24 larvas por repetición. Todas las placas fueron incubadas a una temperatura de 27 °C ± 1 y 24 h en oscuridad. Transcurridos 5, 10 y 15 días de iniciado el experimento se determinó peso de larvas vivas, y se registró el número de larvas muertas. La mortalidad acumulada de los tratamientos que consideraban la aplicación de los extractos fue corregida restando la diferencia obtenida entre el control con el solvente respectivo y control sin solvente. Adicionalmente y para evaluar la evolución del desarrollo de los insectos, se observó los cambios de muda de las larvas a los 5, 10, 15, 20 y 25 días de iniciado el experimento.

Ensayo de dosis respuesta con extractos seleccionados

Aquellos extractos, con los cuales se obtuvo mortalidad efectiva sobre 50%, fueron empleados en un siguiente ensayo de dosis respuesta. Estos correspondieron a *B. chilense* fase acetato de etilo (fae) y *C. microphylla* solvente acetona (C2), se adicionó 1 mL de cada extracto sobre una sección de 1 cm³ de dieta artificial en concentraciones de 25, 50, 100 y 250 µg mL⁻¹ de acuerdo a la metodología y evaluaciones descritas previamente.

Diseño experimental y Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron empleando un diseño experimental completamente al azar. Los datos de mortalidad fueron sometidos a análisis de varianza ($p < 0,05$). La separación de medias se realizó mediante la prueba de Duncan ($p < 0,05$). El peso de las larvas fue analizado mediante el ajuste a un modelo de regresión lineal. Para todos estos análisis se utilizó el software Stat Direct, versión 2.6.8.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición Fitoquímica de los extractos

Los perfiles fitoquímicos de extractos de ambas plantas seleccionadas en este trabajo se pueden ver en las publicaciones previamente reportadas por Alarcón et al. (2009), Céspedes et al. (2009), Hincapié et al. (2011) y Céspedes et al. (2013).

Actividad insecticida y reguladora del crecimiento Efecto sobre la Mortalidad

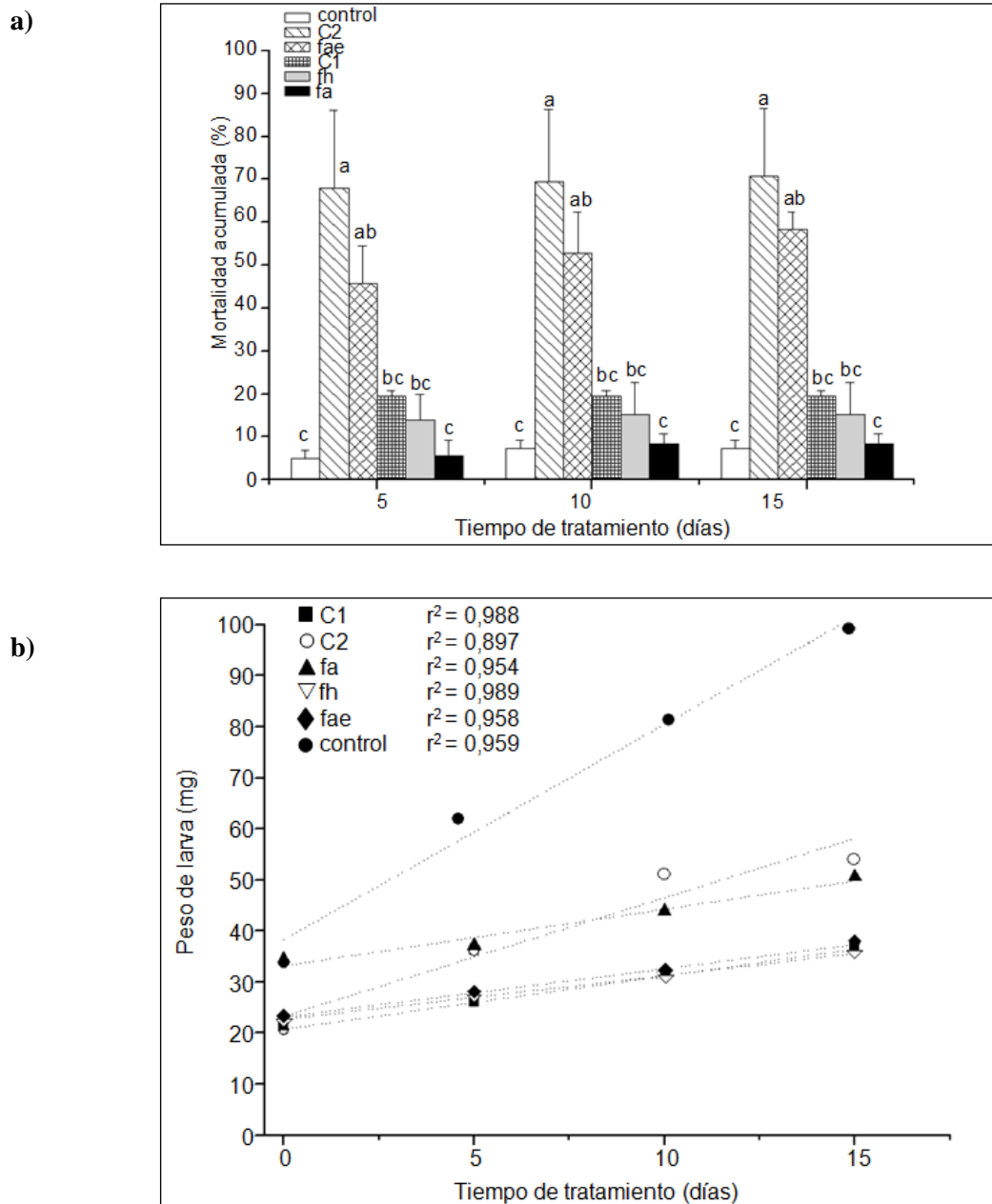
Las dietas tratadas a razón de 500 µg mL⁻¹ con los extractos de *B. chilense* y *C. microphylla* presentaron toxicidad variable para las larvas de *G. mellonella* (Figura 1a). Los extractos obtenidos de *B. chilense* fase acetato de etilo (fae) y de *C. microphylla* obtenido con acetona (C2), causaron la mayor mortalidad, la cual alcanzó a un 58 y 72% respectivamente. Esto demuestra que los extractos evaluados tienen actividad insecticida. Torres et al. (2007) plantean que según las características y modo de acción de extractos de origen vegetal, sólo una mortalidad superior al 50% se puede considerar efectiva. Por otra parte, el extracto fae mostró un incremento de la mortalidad a mayor tiempo de exposición. Esto podría estar relacionado con la presencia de fitoecdisteroides en *B. chilense* (Alarcón, 2009; Hincapié et al., 2011), los cuales tienen severos efectos en el crecimiento y metamorfosis de larvas, pudiendo ocasionar su muerte (Lozano, 1991). El resto de los extractos evaluados no sobrepasaron el 19% de mortalidad.

Efecto sobre el peso larvario

Los extractos de *B. chilense* y *C. microphylla* afectaron diferencialmente la ganancia de peso de las larvas de *G. mellonella* (Figura 1b). Los extractos etanol (C1) obtenidos de *C. microphylla*, fase hexánica (fh) y fase acetato de etilo (fae) obtenidos de *B. chilense*, presentaron la mayor actividad que se tradujo en una menor ganancia de peso larvario. Esta actividad podría deberse a características antialimentarias de estos extractos, como se señalado en estudios previos realizados con especies similares a las aquí empleadas. Céspedes et al. (2009), concluyeron que extractos de *Condalia microphylla* Cav. presentan actividad antialimentaria frente a larvas de *Orgyia antiqua* L. (Lepidoptera: Lymantriidae). Extractos y compuestos de esta planta también han mostrado similares efectos frente a *Drosophila melanogaster* Meigen y *Spodoptera frugiperda* Smith (Céspedes et al., 2013). Por otra parte, se indica que *B. chilense* posee fitoecdisteroides (Alarcón, 2009), como ecdisona, ponasterona, shidasterona y 2-desoxicrustecidona (Hincapié et al., 2011), que afectarían el crecimiento de larvas (Lozano, 1991). Sin embargo para dilucidar este posible efecto antialimentario sería necesario efectuar en el futuro experimentos específicos con este fin.

Figura 1

Efecto de diferentes extractos obtenidos de *B. chilense* y *Condalia spp* aplicados en dieta artificial ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) sobre a) mortalidad y b) peso de larvas de *G. mellonella*



Letras distintas, para cada tiempo, indican diferencia significativa según la prueba Duncan ($P < 0,05$). C1: Extracto de *Condalia spp.* solvente etanol; C2: Extracto de *Condalia spp.* solvente acetona; fa: Extracto de *B. chilense* fase acuosa; fh: Extracto de *B. chilense* fase hexánica; fae: Extracto de *B. chilense* fase acetato de etilo.

Tabla 1
Evolución del desarrollo de *G. mellonella* alimentada en su estado larvario con dieta artificial tratada con diferentes extractos obtenidos de *B. chilense* y *Condalia spp.*

Extracto (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Estado de desarrollo a distintos días de iniciado el tratamiento				
	Día 5	Día 10	Día 15	Día 20	Día 25
C1	L3	L3-L4	L5	pupa	adulto
C2	L2-L3	L3	L4	pupa	adulto
fa	L3	L4	L5	pupa	adulto
fh	L3	L4	L5	pupa	adulto
fae	L3-pupa	L4-pupa	pupa	adulto	adulto
Control	L3	L3-L4	L4	pupa	adulto

C1: Extracto de *Condalia spp.* solvente etanol; C2: Extracto de *Condalia spp.* solvente acetona; fa: Extracto de *B. chilense* fase acuosa; fh: Extracto de *B. chilense* fase hexánica; fae: Extracto de *B. chilense* fase acetato de etilo; L3: Estadio larval 3; L4: Estadio larval 4; L5: Estadio larval 5.

Efecto sobre la evolución del desarrollo larvario

El extracto fae (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) obtenido de *B. chilense* causó mudas extemporáneas en larvas de *G. mellonella* y en comparación con el control aceleró su metamorfosis. (Tabla 1). Cuando las larvas se alimentaron con dieta que contenía este extracto a razón de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de dieta, tardaron sólo cinco días en alcanzar el estado de pupa. En cambio cuando se alimentaron con dieta tratada con los otros extractos tardaron 20 días en alcanzar dicho estado. A su vez, los insectos alimentados cuando larva con el extracto fae alcanzaron el estado adulto pasados 20 días de iniciado el tratamiento; el resto de los tratamientos, incluido el control, alcanzó este estado en 25 días. La actividad reguladora del crecimiento que se obtuvo con el extracto de *B. chilense*, pueden estar relacionada con la presencia de fitoecdisteroides en esta especie de helecho (Alarcón, 2009). Es sabido que estos metabolitos causan trastornos en la metamorfosis de los insectos, induciendo mudas extemporáneas (Viejo, 1996). Su efecto es subletal, es decir, no causa la muerte del insecto directamente, sino que incide su crecimiento, desarrollo y capacidad reproductiva lo cual reduce sus posibilidades de supervivencia (Serrano, 2003).

Ensayo de dosis respuesta con extractos seleccionados. Efecto sobre la mortalidad

El extracto fase acetato de etilo (fae), aplicado hasta una concentración de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de dieta, no causó mortalidad relevante de larvas de *G. mellonella*, después de 15 días de tratamiento la mortalidad, en ningún caso superó el 20% (Figura 2a). Es decir, bajo las condiciones de este estudio este extracto no presenta actividad insecticida efectiva (Torres et al., 2007). Al parecer *G. mellonella* es capaz de metabolizar cierto nivel de fitotóxicos presentes en su dieta sin resultar afectada, aunque también es posible que parte del extracto adicionado a la dieta interactuara con ésta afectando su actividad insecticida. Esto debido a que la dieta contiene ciertos componentes que presentan la misma polaridad que este tipo de extractos (King & Hartley, 1985).

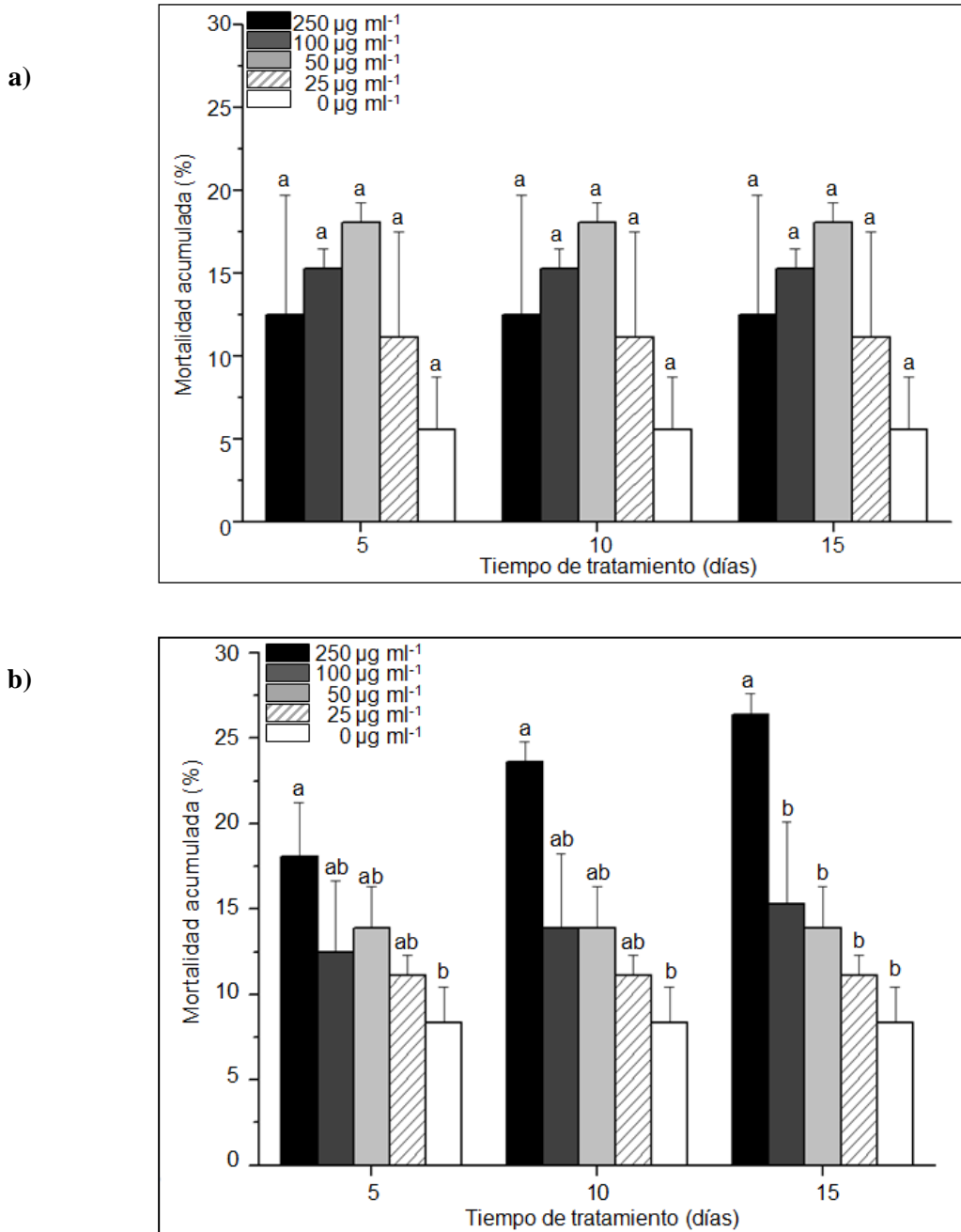
El extracto solvente acetona (C2) obtenido de *C. microphylla* mostró baja actividad insecticida cuando fue adicionado a una concentración de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en la dieta larvaria de *G. mellonella*, la mortalidad obtenida pasados 15 días de tratamiento sólo alcanzó al 26% (Figura 2b). Cuando la dieta fue tratada con este extracto a razón de 100 y 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de dieta La mortalidad de las larvas se incrementó con el tiempo de exposición. Es decir, la

actividad insecticida de este tipo de extractos dependería de la concentración aplicada y del tiempo de exposición de los insectos. Los compuestos presentes en los extractos podrían presentar

interacciones sinérgicas con otros compuestos insecticidas cuando el tiempo de exposición y/o su concentración se incrementa (Ateyyat & Abu-Darwish, 2009).

Figura 2

Mortalidad de larvas de *G. mellonella* alimentadas con dieta artificial tratada con diferentes concentraciones de extracto a) *B. chilense* fase acetato de etilo (fae) b) *Condalia spp.* solvente acetona (C2)



Letras iguales para cada tiempo, indican que no existe diferencia significativa según la prueba Duncan (P < 0,05).

Efecto sobre el peso larvario

Las larvas de *G. mellonella* alimentadas con dieta tratada con diferentes concentraciones de extracto fase acetato de etilo (fae) presentaron escaso incremento de peso en todo el periodo de evaluación (Figura 3a). La mayor concentración de extracto evaluada ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$), restringió de manera más drástica la ganancia de peso larvario, siendo ésta equivalente a la obtenida con este mismo tipo de extracto en el ensayo anterior ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cabe señalar que todas las concentraciones del extracto fae aplicadas en la dieta implicaron menor ganancia de peso, respecto al control, observándose al finalizar el experimento, una relación negativa entre peso

larvario acumulado y concentración de extracto en la dieta.

Las larvas de *G. mellonella* que fueron alimentadas con dieta tratada con diferentes concentraciones de extracto de C2 también presentaron una menor ganancia de peso en relación al control (Figura 3b). Cabe señalar que este tipo de efecto también ha sido observado para otras especies de lepidópteros cuando se han alimentado con extractos de origen vegetal a niveles sub-letales (Serra *et al.*, 1998; Nathan, 2005). Aunque no se tenga certeza si el efecto es anti-alimentario o anti-nutricional, el retraso en el crecimiento larvario que pueda ocasionar una sustancia, puede tener aplicaciones prácticas importantes, ya que disminuye su capacidad para ocasionar daño a través de su alimentación.

Tabla 2
Evolución del desarrollo de *G. mellonella* alimentada en su estado larvario con dieta artificial tratada con extracto de *B. chilense* y *Condalia spp*

Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Estado de desarrollo a distintos días de iniciado el tratamiento				
	Día 5	Día 10	Día 15	Día 20	Día 25
<i>B. chilense</i> fase acetato de etilo (fae)					
250	L3-L4	L4-pupa	pupa	adulto	adulto
100	L3	L4	L5-pupa	adulto	adulto
50	L3	L3-L4	L4	pupa	adulto
25	L3	L3-L4	L4	pupa	adulto
Control	L3	L3-L4	L4	pupa	adulto
<i>Condalia spp.</i> solvente acetona (C2)					
250	L3	L3-L4	L5	pupa	adulto
100	L3	L3-L4	L5	pupa	adulto
50	L3	L3-L4	L5	pupa	adulto
25	L3	L3-L4	L5	pupa	adulto
Control	L3	L3-L4	L5	pupa	adulto

L3: Estadio larval 3; L4: Estadio larval 4; L5: Estadio larval 5.

Efecto sobre el desarrollo larvario de *G. mellonella*

El extracto fae obtenido de *B. chilense* aceleró la muda de las larvas de *G. mellonella* cuando fue aplicado a concentraciones de 100 y $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ en la dieta (Tabla 2). El consumo de dieta tratada, con este extracto y a estas concentraciones, detuvo prematuramente la alimentación de las larvas y

aceleraron su entrada a estado de pupa. Como se indicó previamente, *B. chilense* posee una composición fitoquímica similar a fitoecdisteroides (Alarcón, 2009). Los cuales al ser consumidos por los insectos, interfieren en los cambios de muda del exoesqueleto (Fidelis, 2003). Un efecto similar al observado en este estudio, también ha sido informado

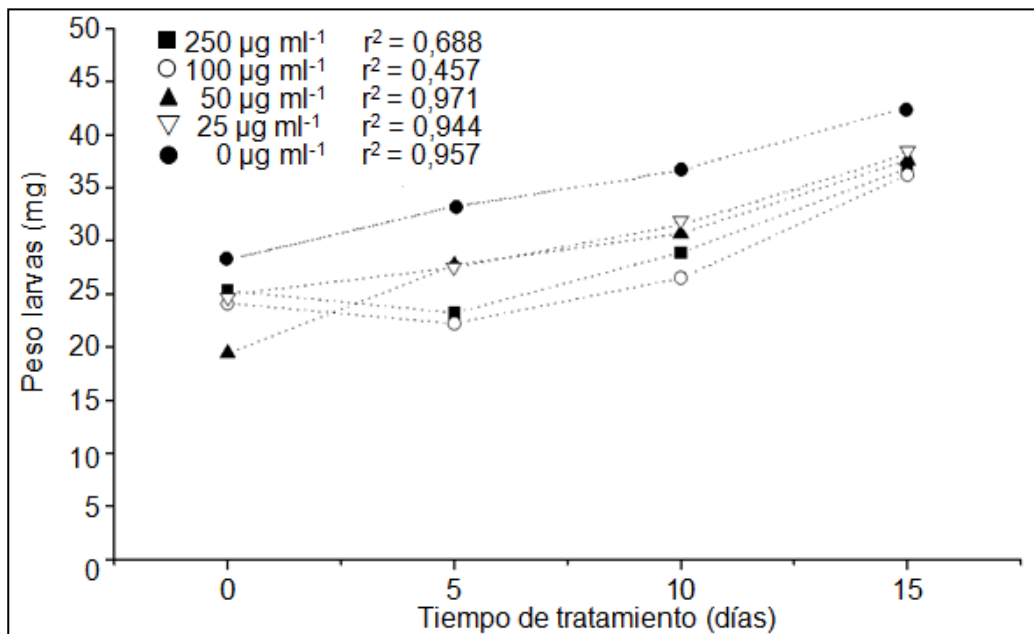
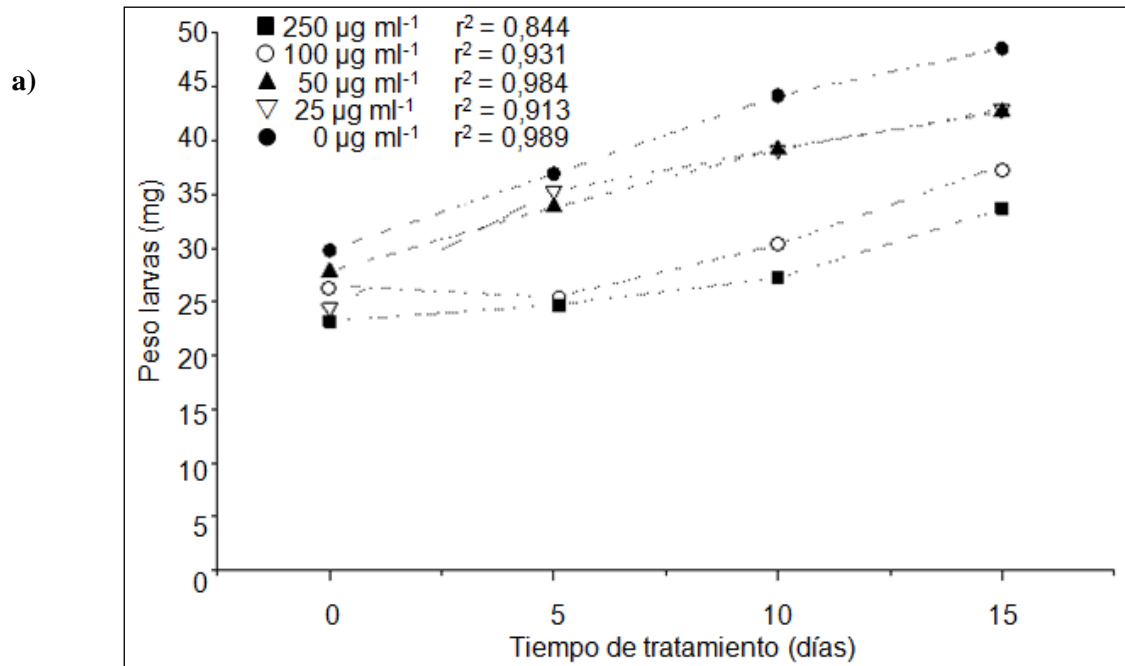
para extractos de *B. chilense* por Hincapié et al., (2011), quienes señalan que extractos de esta planta aplicados a concentraciones de 200 µg mL⁻¹ en dieta artificial para larvas de *Drosophila melanogaster* Meigen, provocaron que las larvas de este díptero puparan en forma prematura.

En cambio, ninguna de las concentraciones

aplicadas del extracto C2 obtenido de *C. microphylla* incidió en la velocidad del desarrollo de *G. mellonella* (Tabla 2). Este extracto afectó negativamente la ganancia de peso larvario de este lepidóptero, pero no tiene incidencia en su desarrollo.

Figura 3

Peso de larvas de *G. mellonella* sometidas a diferentes concentraciones de extracto a) *B. chilense* fase acetato de etilo (fae) b) *Condalia spp.* solvente acetona (C2)



CONCLUSIONES

El extracto de *B. chilense* obtenido con acetato de etilo y el extracto de *C. microphylla* obtenido con acetona, tienen efecto insecticida efectivo sobre larvas de *G. mellonella*. Aplicado en dosis sub-letales afectan negativamente la ganancia de peso larvario. A su vez, el extracto obtenido de *B. chilense* presenta actividad reguladora del desarrollo larvario de *G. mellonella*, induciendo el estado de pupa en forma prematura.

AGRADECIMIENTOS

NZ agradece el apoyo parcial de proyecto Fondecyt # 1130351. CLC y JA agradecen el apoyo parcial de Proyectos Fondecyt # 11001003, 1130242 y 1130463 y a la Dirección de Investigación de la Universidad del Bio Bio.

REFERENCIAS

- Alarcón J. 2009. Estudio químico y biológico de helechos chilenos: genero *Adiantum*, *Blechnum* y *Cheilantes*. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 8: 548.
- Aldea P. 2010. **Fundamentos de la producción apícola para la producción limpia**. CEAPI. Universidad Mayor, Santiago, Chile.
- Alonso O. 1999. Los insecticidas botánicos: una opción ecológica para el control de plagas. **Pastos y Forrajes** 22: 1 - 16.
- Artigas J. 1994. ***Galleria mellonella* (Lineo) polilla grande de la cera (Greater wax moth)**. En: Entomología económica: insectos de interés agrícola, forestal, médico y veterinario (nativos, introducidos y susceptibles de ser introducidos). Volumen II. Ediciones Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- Ateyyat M, Abu-Darwish M. 2009. Short communication. Insecticidal activity of different extracts of *Rhamnus dispermus* (Rhamnaceae) against peach trunk aphid, *Pterochloroides persicae* (Homoptera: Lachnidae). **Span J Agric Res** 7: 160 - 164.
- Céspedes CL, Calderón J, Lina L, Aranda E. 2000. Growth inhibitory effects on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* of some limonoids isolated from *Cedrela* spp. (Meliaceae). **J Agric Food Chem** 48: 1903 - 1908.
- Céspedes CL, Alarcón J, Avila J. 2009. Biopesticidal activity of terpenes isolated from selected chilean plants: *Calceolaria talcana* (Scrophulariaceae) and *Condalia microphylla* Cav (Rhamnaceae). **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 8: 579 - 580.
- Céspedes CL, Molina SC, Muñoz E, Lamilla C, Alarcon J, Palacios SM, Carpinella MC, Avila JG. 2013. The insecticidal, molting disruption and insect growth inhibitory activity of extracts from *Condalia microphylla* Cav. (Rhamnaceae). **Ind Crops Prod** 42: 78 - 86.
- Cisneros F. 1995. **Control de plagas agrícolas**. Segunda Edición. AGCIS Electronics, Lima, Perú.
- Contreras L. 2009. **Utilización de un extracto alcohólico de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) para el control de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidóptera: Pyralidae)**. Memoria de título, Ing. Agrónomo. Universidad Austral de Chile, Escuela de Agronomía, Valdivia, Chile.
- Contreras L. 2011. **Utilización de un extracto alcohólico de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) para el control de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidóptera: Pyralidae)**. Memoria de título Ingeniero Agrónomo, Escuela de Agronomía, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Dinan L. 2001. Phytoecdysteroids: biological aspects. **Phytochemistry** 57: 325 - 339.
- Dweck H, Svensson G, Akman E, Anderbrant O. 2010. Kairomonal response of the parasitoid, *Bracon hebetor* Say, to the male-produced sex pheromone of its host, the greater waxmoth, *Galleria mellonella* (L.). **J Chem Ecol** 36: 171 - 178.
- Ferrero A, Descamps L, Reviriego M. 2004. **Estrategias para el control de insectos plaga**. En: V. Echenique, C. Rubinstein y L. Mroginski (Eds.). Biotecnología y mejoramiento vegetal. INTA, Buenos Aires, Argentina.
- Fidelis I. 2003. **Crescimento, armazenamento, hopeopatia, produção de metabólitos secundários e teste biológico do extracto de *Sphagneticola trilobata* (L.). Pruski em coelhos diabéticos**. Tese, Doctor Scientiae. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.
- González R. 1989. **Insectos y ácaros: de**

- importancia agrícola cuarentenaria en Chile.** Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Gunckel H. 1984. **Helechos de Chile.** Ediciones de la Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Hincapié C, Monsalve Z, Parada K, Lamilla C, Alarcón J, Céspedes C, Seigler D. 2011. Insect growth regulatory activity of *Blechnum chilense*. **Nat Prod Comm** 6: 1085 - 1088.
- Jafari R, Goldasteh S, Afrogheh S. 2010. Control of the wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) by the Male Sterile Technique (MST). **Arch Biol Sc Belgrade** 62: 309 - 313.
- King E, Hartley G. 1985. *Galleria mellonella*. En: P Singh & R Moore (Eds.). Handbook of insect rearing. Elsevier, Amsterdam, Neatherlands.
- Llorente J. 2003. **Enemigos de las abejas.** En: Principales enfermedades de las abejas. (3a. ed.). Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Madrid, España.
- López M, Estrada J. 2005. Los bioinsecticidas de nim en el control de plagas de insectos en cultivos económicos. La Habana (Cuba). **Rev Fac Cienc Ag Univ Cuyo** 37: 41 - 49.
- Lozano C. 1991. ¿Qué tan secundarios son los metabolitos secundarios? **Hidrobiológica** 1: 45 - 57.
- Marín J, Céspedes C. 2007. Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. **Rev Fitotec Mex** 30: 327 - 351.
- Nathan S. 2005. Effects of *Melia azedarach* on nutritional physiology and enzyme activities of the rice leaffolder *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae). **Pestic Biochem Physiol** 84: 98 - 108.
- Novo R, Viglianco A, Nassetta M. 1998. Efecto antialimentario de extractos de cuatro plantas sobre *Anticarsia gemmatalis* Hub. (Lepidoptera: Noctuidae). **Bol Sanid Veg Plagas** 24: 525 - 530.
- Parra L, Rebolledo R, Rojas P, Medel V, Aguilera A. 2006. Polillas en la cera de abejas en la IX Región de La Araucanía, Chile. **Rev Chil Entomol** 32: 37 - 41.
- Pascual M. 1996. Evaluación de la actividad insecticida de los extractos vegetales de *Chrysanthemum coronarium* L. **Bol Sanid Veg Plagas** 22: 411 - 420.
- Primo E. 2007. **Esteroides.** En: Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria. Tomo II. Reverté, Valencia, España.
- Serra J, Badía S, Viladot R. 1998. Caracterización de la actividad antialimentaria de extractos de frutos y semillas de *Melia azedarach* L. y de *Azadirachta indica* A. sobre larvas del lepidóptero *Sesamia nonagrioides* Lef. **Bol Sanid Veg Plagas** 24: 1019 - 1032.
- Serrano R. 2003. **Introducción al análisis de datos experimentales: tratamientos de datos en bioensayos.** Publicacions de la Universitat Jaume, Castellon, España.
- Torres S, Nogueiras C, Moya J, Vento D. 2007. Actividad insecticida de extractos de *Maytenus buxifolia* (Griseb) sobre *Galleria mellonella*. **Rev Cub Quím** 19: 88 - 90.
- Valladares G, Garvin L, Defagó M, Carpinella C, Palacios S. 2003. Actividad antialimentaria e insecticida de un extracto de hojas senescentes de *Melia azedarach* (Meliaceae). **Rev Soc Entomol Arg** 62: 53 - 61.
- Viejo J. 1996. Coevolución de plantas e insectos. **Bol SEA** 13: 13 - 19.
- Viñuela E, Budía F, del Estal P. 1991. Los insecticidas reguladores del crecimiento y la cutícula. **Bol Sanid Veg Plagas** 17: 391 - 400.