

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



CARRERA DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA

EFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Annona cherimola* EN EL CONTROL DE *Oligonychus coffeae* (NIETNER, 1861) (ACARI: TETRANYCHIDAE)

CRISTIAN RAFAEL GAVILANES GAVILANES

TUTOR:
Ph. D. Carlos Vásquez

CEVALLOS – 2017

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

El suscrito, CRISTIAN RAFAEL GAVILANES GAVILANES, portador de cédula de identidad número: 180450419-7, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “EFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Annona cherimola* EN EL CONTROL DE *Oligonychus coffeae* (NIETNER, 1861) (ACARI: TETRANYCHIDAE)” es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mí sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.

CRISTIAN RAFAEL GAVILANES GAVILANES

DERECHO DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “EFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Annona cherimola* EN EL CONTROL DE *Oligonychus coffeae* (NIETNER, 1861) (ACARI: TETRANYCHIDAE)” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniero Agrónomo en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.

CRISTIAN RAFAEL GAVILANES GAVILANES

“EFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Annona cherimola* EN EL
CONTROL DE *Oligonychus coffeae* (NIETNER, 1861) (ACARI:
TETRANYCHIDAE)”

REVISADO POR:

.....
Ph. D. Carlos Vásquez
TUTOR

.....
Ing. Mg Giovanni Velástegui
ASESOR DE BIOMETRIA

APROBADO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO:

FECHA

Ing. Mg. Hernán Zurita Vásquez
PRESIDENTE

Ing. Mg. Marco Pérez
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO

Ing. Mg. Segundo Curay
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO

AGRADECIMIENTOS

Las palabras faltan para poder expresar cuan agradecido estoy, con Dios con mi familia, con mis padres y hermanos en especial mi madre que fue y será el motor que me impulse a superarme cada día más.

Me siento muy feliz de haber culminado una hermosa etapa de mi vida llena de alegrías, tristezas, junto a compañeros, maestros, amigos que supieron compartir conocimientos que quedaran gravados y muy arraigados en mi corazón.

A la Universidad Técnica de Ambato en especial a la Facultad de Ciencias Agropecuarias que con sus distinguidos maestros supieron acogerme e inculcarme no solo conocimientos también valores morales y ética profesional.

Mi sincero agradecimiento al Ph. D. Carlos Vásquez el cual me supo guiar en el proceso de la investigación y así pudiendo culminar este importante proyecto.

Además mi agradecimiento a los Ingenieros Agrónomos Mg. Sc. Hernán Zurita, Giovanni Velástegui y Marco Pérez que fueron pilares fundamentales en el proceso de esta investigación.

Un especial agradecimiento a la institución AGROCALIDAD, en especial al Dr. Veterinario Javier Rodríguez, que permitieron realizar esta investigación.

DEDICATORIA

. . . . Al final, lo que importa no son los años de vida,

Sino la vida de los años. (Abraham Lincoln)

Agradecido con Dios por las bendiciones derramadas en mí, por guiarme en el camino de la sabiduría y el conocimiento, tanto en el diario vivir como en el estudiantil.

A mis seres más amados que son mis padres Magda y Noé, que gracias a su esfuerzo y sacrificio en su diario vivir, me han sabido encaminar y han permitido mi superación, llenándome no únicamente de conocimientos sino de valores de ética en cada actividad que se me encomendare.

A mis hermanos Patricio, Mónica y Javier que con su sabiduría y ejemplo me han guiado en cada una de mis etapas, siendo pilares fundamentales para la culminación de esta investigación.

A la persona más especial en mi vida Valeria, que me apoyado y ha estado no solo en los buenos momentos si no también cuando más lo necesite.

Gracias a ustedes por todo el apoyo brindado, Dios los bendiga.

Para ustedes por su confianza he aquí mi trabajo de investigación

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	V
DEDICATORIA	VI
ÍNDICE DE CONTENIDO	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
RESUMEN	XII
SUMMARY	XIII
CAPÍTULO I	14
INTRODUCCIÓN	14
CAPÍTULO II	16
MARCO TEÓRICO	16
2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	16
2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES	18
2.2.1. Variable independiente	18
2.2.2. Variable dependiente:	21
CAPÍTULO III	28
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	28
3.1. HIPÓTESIS	28
3.2. OBJETIVOS	28
3.2.1. OBJETIVO GENERAL	28
3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
CAPÍTULO IV	29
MATERIALES Y MÉTODOS	29
UBICACIÓN DEL ENSAYO	29
EQUIPOS Y MATERIALES	29
FACTORES EN ESTUDIO	29
Obtención de los extractos vegetales	31
Efecto de las diferentes dosis de los extractos obtenidos de hoja y semilla de chirimoya sobre la mortalidad y tasa de oviposición de hembras de <i>O. coffeae</i>	33
Tratamientos	34
Diseño experimental	35
Variables respuesta	36
Procesamiento de la información	36
CAPÍTULO V	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
a. Tasa de mortalidad de las hembras de <i>O. coffeae</i> tratadas con diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>A. cherimola</i>	37
b. Concentración letal media (CL ₅₀)	40

c. Efecto subletal de los extractos de <i>A. cherimola</i> sobre hembras de <i>O. coffeae</i>	41
.....	41
CAPÍTULO VI	50
CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS.....	50
BIBLIOGRAFÍA	51
CAPÍTULO VII.....	58
PROPUESTA.....	58
TÍTULO.....	58
7.1. DATOS INFORMATIVOS.....	58
7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA	58
7.3. JUSTIFICACIÓN.....	58
7.4. OBJETIVOS.....	59
7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD.....	59
7.6. FUNDAMENTACIÓN.....	59
7.7. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO	60
7.8. ADMINISTRACIÓN.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferentes dosis (D) del extracto de <i>A. cherimola</i> (mL/L).....	34
Tabla 2. Mortalidad promedio de hembras de <i>O. coffeae</i> tratadas con diferentes concentraciones de extractos etanólicos de hojas y semillas de <i>A. cherimola</i>	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de una acetogenina (Tomado de Dzhemilev et al., 2016).....	20
Figura 2. Sistema de transporte de electrones en la mitocondria: Diagrama del complejo I donde ilustra el modo de acción de los insecticidas-acaricidas. Tomado de: http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/mitochondria/mitets.html	21
Figura 3. Aspecto general de la hembra de <i>O. coffeae</i> (a); patas terminando en uña (b); setas dúplex sobre el tarso I próximas y peritrema recto (c); placa anal con dos pares de setas anales y un par para-anales (d); edeago curvado ventralmente y se reduce abruptamente a una punta delgada (e).....	30
Figura 4. Obtención de los extractos etanólicos de hoja y semilla de chirimoya..	32
Figura 5. Estimación de la concentración letal media (CL ₅₀) de los extractos de hoja (a) y semilla (b) de <i>Annona cherimola</i> contra hembras de <i>Oligonychus coffeae</i>	40
Figura 6. Tasa de oviposición de hembras de <i>O. coffeae</i> tratadas con diferentes concentraciones del extracto de hojas y semilla de <i>A. cherimola</i>	42
Figura 7. Oviposición diaria de hembras de <i>O. coffeae</i> tratadas con diferentes concentraciones del extracto de hojas (a) y semilla (b) de <i>A. cherimola</i>	43
Figura 8. Fecundidad de las hembras de <i>O. coffeae</i> tratadas con diferentes concentraciones de extractos etanólicos de hoja y semilla obtenidos de <i>A. cherimola</i>	44
Figura 9. Fecundidad de las hembras de <i>Oligonychus coffeae</i> a las 24 h	

despues de la aplicacion de diferentes dosis de los extractos de hoja (a) y
semilla (b) de *Annona cherimola*..... 46

Figura 10. Fecundidad de las hembras de *Oligonychus coffeae* a las 48 h
despues de la aplicacion de diferentes dosis de los extractos de hoja (a) y
semilla (b) de *Annona cherimola*..... 47

Figura 11. Fecundidad de las hembras de *Oligonychus coffeae* a las 72 h
despues de la aplicacion de diferentes dosis de los extractos de hoja (a) y
semilla (b) de *Annona cherimola*..... 48

Figura 12. Fecundidad de las hembras de *Oligonychus coffeae* a las 96 h
despues de la aplicacion de diferentes dosis de los extractos de hoja (a) y
semilla (b) de *Annona cherimola*..... 49

RESUMEN

Oligonychus coffeae (Nietner) es considerada una plaga de importancia económica en plantas de café y otros cultivos en regiones tropicales y subtropicales por lo que requiere de constantes métodos de control. En el presente estudio se evaluó la actividad acaricida de diferentes dosis de los extractos de hoja y semilla de *Annona cherimola* (625, 1250, 2500, 5000 y 10000 mL/L) sobre la tasa de mortalidad, tasa de oviposición y fecundidad en las hembras de *O. coffeae* bajo condiciones de laboratorio. La efectividad de los extractos fue evaluada mediante la técnica de contacto residual en unidades de cría criadas usando discos de hoja de café. La mortalidad, oviposición y fecundidad de las hembras de *O. coffeae* fueron afectadas por el tipo y concentración del extracto. La mayor tasa de mortalidad fue alcanzada con la aplicación del extracto de semillas de chirimoya. Adicionalmente, provocó disminución de la oviposición entre 46,7 y 82,5% con el extracto de semilla a 625 y 10.000 mL/L, respectivamente, mientras que con el extracto de hojas, la disminución varió desde 29,9 hasta 62,0 % a concentraciones de 625 y 10000 mL/L. El extracto de semilla también resultó más efectivo en reducir la fecundidad de las hembras de *O. coffeae* (28,9 huevos/hembra), al ser comparada con las hembras tratadas con extractos de hoja (36,1 huevos/hembra). Los resultados obtenidos demostraron que la chirimoya podría constituir una alternativa sustentable para el manejo de poblaciones de *O. coffeae* en plantaciones de café, sin embargo se sugiere realizar estudios de campo para validar los estudios de laboratorio.

Palabras clave: manejo sustentable, control de ácaros, acetogenina

SUMMARY

Oligonychus coffeae (Nietner) is considered an economic importance pest in coffee trees and other crops from tropical and subtropical regions so that constant methods of control are required. In this study, the acaricidal effect of different extract doses obtained from leaf and seed of *Annona cherimola* (625, 1250, 2500, 5000 and 10000 mL/L) on mortality rate, oviposition rate and fecundity in *O. coffeae* females under laboratory conditions. The effectiveness of extracts was evaluated using the residual contact technique in rearing units using coffee leaf discs. Mortality, oviposition and fecundity of *O. coffeae* females were affected by type and concentration of extract. Highest mortality rate was achieved with the application of seed extract. Additionally, it caused oviposition decrease by 46.7 or 82.5% with the seed extract at 625 mL/L and 10,000 mL/L, respectively, while the leaf extract, decreasing varied from 29.9 to 62.0% at 625 and 10000 mL/L. Seed extract was also more effective in reducing the fecundity of *O. coffeae* females (28.9 eggs/female), as compared to females treated with leaf extract (36.1 eggs/female). The results showed that cherimoya could be a sustainable alternative for the management of *O. coffeae* populations in coffee plantations, however field studies are suggested to validate laboratory studies.

Key words: sustainable management, mite control, acetogenine

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Muchas especies de ácaros dentro de las familias Eriophyidae, Tetranychidae, Tenuipalpidae y Tarsonemidae causan daños importantes en cultivos en todo el mundo (Oliveira et al., 2012, Gerson et al., 2003; Bolland et al., 1996), por lo que se hace necesario el establecimiento de métodos de manejo encaminadas a mantener sus poblaciones por debajo del nivel de daño económico. En América Latina, el uso de plaguicidas convencionales se ha convertido en una herramienta indispensable en el control de plagas de importancia económica (Bellotti et al., 1990). Sin embargo, su uso indiscriminado puede conducir a un número de efectos secundarios indeseables incluyendo el desarrollo de resistencia y resurgimiento de plagas primarias y secundarias y además puede provocar efectos adversos en agentes de control biológico y contaminación del ambiente (Aktar et al., 2009). En tal sentido, en los últimos años ha surgido mayor interés en el uso de plaguicidas botánicos para la protección de cultivos de manera más sustentable. Estos plaguicidas botánicos pueden ser en forma de polvo y extractos acuosos o etanólicos, son derivado de diferentes especies de plantas y han demostrado eficiencia en el control de plagas a bajos costos y con bajo riesgo los seres humanos y el ambiente, por lo que su uso como un método de control para el manejo de población de ácaros plagas ha aumentado en todo el mundo (Vásquez et al., 2016).

La diversidad de metabolitos encontrada en las plantas resulta de interacciones con patógenos y depredadores (Theis y Lerda, 2003), pero también depende de la influencia de factores abióticos. El descubrimiento de algunas propiedades biológicas de una gran cantidad de productos naturales ha propiciado la investigación y el aprovechamiento de muchos metabolitos en la agricultura por su efecto insecticida, acaricida o herbicida (Croteau et al., 2000). Recientemente, se ha demostrado que las especies de Annonaceae y Lauraceae neotropicales son capaces de sintetizar metabolitos secundarios bioactivos llamados acetogeninas, que son ácidos grasos de cadena larga con una unidad de 2-propanol, el cual ha mostrado tener diferentes tipos de bioactividad (Ribeiro et al., 2014; Andrade et al., 2006), incluyendo actividad insecticida y acaricida por inhibición del complejo I (NADH:

ubiquinona oxidoreductasa) del sistema de transporte de electrones en la mitocondria y la enzima NADH oxidasa en la membrana plasmática (González-Coloma et al. 2002).

En tal sentido, Ribeiro et al. (2014a) observaron más de 98% de mortalidad tanto en larvas de tercer instar de *Trichoplusia ni* (Hübner) como en *Myzus persicae* (Sulzer) por aplicación de extractos obtenidos de *Annona mucosa* Jacq. De manera similar, Ribeiro et al. (2013) concluyeron que los extractos de *A. mucosa*, particularmente los obtenidos de semillas, constituyen una fuente promisorio de compuestos químicos que pueden ser usados en el control de *Sitophylus zeamais* Motschulsky en granos almacenados. Las principales acetogeninas encontradas en *A. montana* han sido identificadas como annonacina, cis-annonacin-10, densicomacin-1, gigantetronenina, murihexocina-B y tucupentol, las cuales provocaron 100% de mortalidad en larvas de *Spodoptera frugiperda* Smith y Abbot alimentadas con dietas artificiales con 100 µg de acetogeninas/g de dieta y también algunos de esos compuestos provocaron disuasión de la alimentación en más de un 80% (Di Toro et al. 2010).

Con relación al uso de este tipo de plantas para el control de ácaros fitófagos, pocos estudios están disponibles. Ribeiro et al (2014b) demostraron que el extracto de *A. mucosa* causó mortalidad de las hembras de *Panonychus citri* (McGregor) y reducción de la oviposición, sin embargo no afectó la fertilidad (tasa de eclosión). Tomando en consideración la falta de información sobre el efecto de estos compuestos sobre los especies de ácaros plaga, en el presente estudio se planteó evaluar el efecto del extracto etanólico de hoja y semilla de chirimoya en el control del acaro *Oligonychus coffeae*.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Durante los últimos 20 años, varias especies de la familia Annonaceae provenientes de bosques tropicales han sido investigadas intensamente, principalmente a causa del descubrimiento de acetogeninas como parte de su composición química. Las acetogeninas son de gran poder citotóxico que tienen una aplicación potencial como insecticidas, antiparasitarios, acaricidas, fungicidas, y fármacos antitumorales debido a la presencia de compuestos llamados acetogeninas.

De acuerdo con Guadaño et al. (2000), las acetogeninas representan una nueva clase de compuestos bioactivos cuyo modo de acción principal es la inhibición de la NADH-oxidoreductasa. Diversos insecticidas y acaricidas sintéticos han demostrado que inhiben la translocación de protones NADH: ubiquinona oxidoreductasa. También, los metabolitos secundarios de fuentes microbianas y vegetales actúan sobre el complejo I y han demostrado tener actividad biológica contra las plagas de insectos agrícolas y ambientales. El mecanismo de acción insecticida/acaricida de los inhibidores de complejos I ha sido evaluado basándose tanto en los estudios de cinética enzimática como de unión con inhibidores radiomarcados. Los resultados de los estudios sobre cinética enzimática han sido controversiales. En general, los datos de unión de radioligandos con membranas submitochondrial estaban en línea con los resultados (Lümmen, 1998).

Las hojas de guanábana (*Annona muricata* L.) son utilizadas por algunas personas que intentan tratar e incluso curar el cáncer, a pesar de que el exceso de consumo de la fruta, que contiene las neurotoxinas esquamocinas ha causado una forma atípica de la enfermedad de Parkinson (Moraes et al., 2016). Estos autores demostraron que las hojas de guanábana contienen neurotoxinas tales

como annonacinas y esquamocinas, así como también compuestos fenólicos que son potencialmente usados en salud.

Dado el potencial uso como plaguicida, se ha prestado mayor atención al efecto de anti-alimentación e insecticida de la esquamocina y annonacina obtenidas a partir de estas especies anonáceas sobre especies plaga, tales como *Spodoptera littoralis* (Boisd.), *Leptinotarsa decemlineata* (Say) y *Myzus persicae* (Sulzer) (Guadaño et al., 2000).

La aplicación tópica en ninfas de *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) con extractos obtenidos a partir de *Annona cherimola* Mill. y *Annona montana* Macfad. produjo mortalidad aguda y retrasó el desarrollo del insecto (Colom et al., 2008). Adicionalmente estos autores demostraron que el extracto estaba compuesto por diferentes tipos de acetogeninas tales como: esquamocinas, molvizarinas, itrabinas, almuñequinas, cherimolin-1, annonacina, annonacina-A, densicomacin-1, cis-annonacina-10-ona y murihexocin-A. De acuerdo con Di Toro et al. (2010), el extracto de *A. montana* mostró composición similar y fue capaz de producir mortalidad del 100% en larvas y pupas de *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) y además, algunos de sus compuestos provocaron disuasión de la alimentación de más del 80%. Estos autores no observaron ninguna correlación entre la toxicidad de los compuestos mencionados a larvas y la capacidad conocida de las acetogeninas de inhibir la NADH-oxidasa, lo que sugiere que la inhibición del complejo I mitocondrial no es la única causa de mortalidad de las larvas de *S. frugiperda*.

Debido a los problemas de resistencia de las poblaciones de insectos a los insecticidas y la creciente preocupaciones de los consumidores en relación con los residuos de plaguicidas en los productos alimenticios se ha hecho necesario el uso de métodos sustentables de manejo de plagas. Ribeiro et al. (2013), evaluaron la bioactividad de los extractos y fracciones obtenidas de diferentes tejidos (hojas, ramas y semillas) de *A. mucosa* contra *S. zeamais*, la cual es una plaga principal en granos almacenado en el trópico. Los tratamientos más prometedores fueron los extractos preparados a partir de las semillas de *A. mucosa* en hexano y diclorometano (DL₉₀ de 259,31 y 425,15 mg/kg,

respectivamente) y, en menor medida, el extracto hexánico obtenido de hojas (DL₉₀ de 1047,15 mg/kg). Los análisis químicos mostraron la presencia de alcaloides y acetogeninas que probablemente estén relacionados con la bioactividad.

A pesar de la promisoría actividad tóxica (aguda y crónica) de los bioinsecticidas comerciales basados en formulaciones con acetogeninas para diferentes artrópodos plaga, existen pocos estudios que determinen su compatibilidad con hongos entomopatógenos, que podrían constituir una excelente herramienta de control sustentable de plagas. En tal sentido, Ribeiro et al. (2014c) investigaron la compatibilidad del extracto etanólico de semillas de *A. mucosa* con tres especies de hongos entomopatógenos, *Beauveria bassiana* (aislado ESALQ-PL63), *Isaria fumosorosea* (aislado ESALQ-1296) y *Metarhizium anisopliae* (cepa ESALQ-E9) a diversas concentraciones en ensayos in vitro. Estos autores observaron que los efectos del insecticida botánico variaron dependiendo de la especie y concentración del hongo, sin embargo, basado en el índice de compatibilidad adoptado, este extracto fue considerado como compatible con las 3 especies de hongos anteriores, excepto en el concentración más alta (8000 mg/L) para *M. anisopliae* y por lo tanto se clasificó como moderadamente tóxico en este caso.

2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES

2.2.1. Variable independiente

Dosis del extracto etanólico de semillas y hojas de *Annona cherimola*

Uso de extractos de planta con acción acaricida

Debido a los efectos nocivos de la aplicación irracional de productos químicos, muchos investigadores están desarrollando alternativas de control de ácaros fitófagos basadas en el uso de extractos de plantas. Estos productos botánicos (en polvo o extractos acuosos o etanólicos) han probado ser efectivos en el manejo de

poblaciones de plagas a bajo costo y principalmente presentan un bajo riesgo al ambiente y al ser humano, por lo que su uso se ha incrementado a nivel mundial (Vásquez et al. 2016).

Clasificación de los plaguicidas botánicos:

De acuerdo al efecto fisiológico que producen sobre los herbívoros, los plaguicidas de origen vegetal han sido clasificados en seis grupos: repelentes, disuasivos de alimentación, tóxicos, retardadores del crecimiento, quimio-esterilizantes y atrayentes (Jacobson, 1982). Sin embargo, de acuerdo con Vásquez et al. (2016), solo cinco de estos explican el efecto sobre ácaros fitófagos, tales como Tetranychidae y Tenuipalpidae.

a. *Disuasivos de alimentación*: este es quizás uno de los efectos más estudiados y se incluyen en este grupo aquellos compuestos (algunos pueden ser tipo terpenos) que inducen que el herbívoro detenga de alimentarse, provocándole la muerte. Uno de los componentes más efectivos es conformado por la azadiractina (Jacobson, 1982), aunque también puede funcionar como repelente, regulador de crecimiento y afectar la oviposición de varias especies plaga (Senthil-Nathan, 2013; Ascher, 1993).

b. *Repelente*: estos repelen la plaga por efecto olfativo y son considerados como seguros al ambiente (Silva-Aguayo, 2013).

c. *Tóxicos*: entre los plaguicidas de origen vegetal más comúnmente usados se incluyen la rotenonas y piretrinas, sin embargo, éstas han tendido a ser reemplazadas por las isobutil amidas, obtenidas de especies dentro de las familias Asteraceae y Rutaceae, dado que muestran propiedades insecticidas similares. El limoneno extraído de *Rosmarinus officinalis* L. ha mostrado efectividad en reducir la fecundidad, fertilidad y viabilidad de larva-adultos de *Tetranychus urticae* Koch (Ismail et al., 2011).

d. *Quimio-esterilizantes/inhibidores de la reproducción*: los extractos, aceites esenciales, polvos obtenidos de plantas o partes de plantas han demostrado poder reducir la oviposición, viabilidad de los huevos, desarrollo post-embriionario y el número de progenie en artrópodos plaga (Saxena et al., 1986).

e. *Inhibidores del crecimiento o desarrollo*: algunos extractos vegetales pueden presentar en su composición ciertos compuestos químicos que afectan la metamorfosis, lo cual incide sobre el crecimiento y desarrollo de los insectos, incluyendo reducción del peso de larvas, pupas y/o adultos así como aumento del tiempo del período larval (Silva-Aguayo, 2013). De acuerdo con Isman et al. (2006), la azadiractina es capaz de bloquear la síntesis de ecdisteroides u hormona de la muda provocando una ecdisis (muda) incompleta en insectos.

Las Annonaceas como fuente de acetogeninas con acción plaguicida

Las hojas, raíces y semillas de las especies de Annonaceae de las regiones tropicales y subtropicales son fuente natural de acetogeninas (ACG), los cuales químicamente se caracterizan por ser ácidos grasos de cadenas no ramificados con 32-34 átomos de carbonos y un grupo γ -lactona (Dzhemilev et al., 2016). En la mayoría de los casos, las moléculas de acetogenina poseen grupos químicos adicionales (Figura 1).

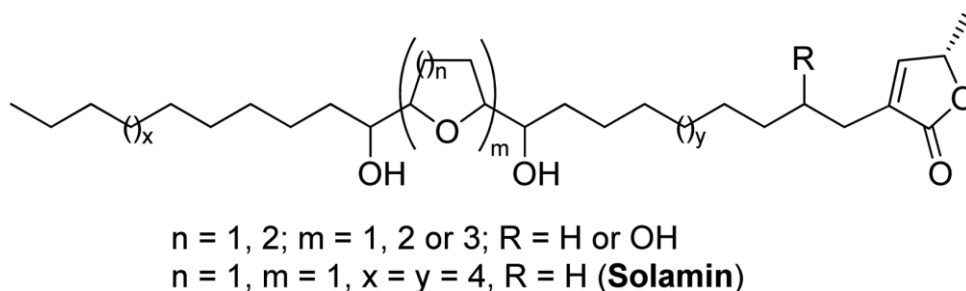


Figura 1. Estructura general de una acetogenina (Tomado de Dzhemilev et al., 2016)

El mecanismo de acción de las ACG consiste en la inhibición selectiva de la NADH: ubiquinona oxido-reductasa (complejo I) en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, que es la principal fuente de producción de energía en la célula (Tormo et al. 1999). Específicamente, las ACG actúan en el paso final de la transferencia de electrones del complejo I, es decir entre el grupo Fe-S y la ubiquinona (Fig. 2) (Miyoshi et al., 1998). Este hecho le confiere un efecto plaguicida sobre varias especies de artrópodos, incluyendo lepidópteros plaga como: *Chrysodeixis includens* (Walker) y *S. frugiperda* (Massarolli et al., 2016; Dio Toto et

al., 2010) y al ácaro *P. citri* (Ribeiro et al., 2014b), entre otros. Adicionalmente, tienen otros efectos biológicos pudiendo actuar como citotóxicos, actividad antitumoral y antimalárica, acción contra protozoarios e inmunosupresión (Dzhemilev et al., 2016; Miyoshi et al., 1998).

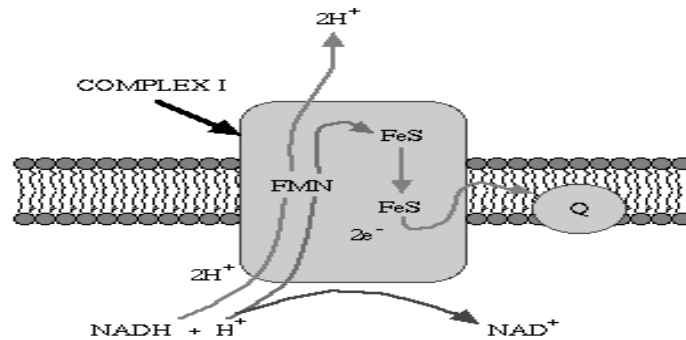


Figura 2. Sistema de transporte de electrones en la mitocondria: Diagrama del complejo I donde ilustra el modo de acción de los insecticidas-acaricidas. Tomado de: <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/mitochondria/mitets.html>

2.2.2. Variable dependiente:

Tasa de mortalidad y de fecundidad de *Oligonychus coffeae*

El ácaro rojo del café, *Oligonychus coffeae* (Nietner) (Acari: Tetranychidae) es una especie fitófaga reportada sobre varias especies de plantas en 45 países (Bolland et al., 1998). *Oligonychus coffeae* es reconocida como plaga de importancia en aproximadamente 133 cultivos de regiones tropicales y subtropicales, incluyendo rosa (*Rosa damascena*), azalea (*Rhododendron* spp.) y café (*Coffea arabica*) (Roy et al., 2014; Haque et al., 2007). Su alimentación sobre plantas de té ha provocado pérdidas económicas entre 17 a 46 % en el sur de la India (Babu et al., 2008). Aunque el nivel de daño económico puede variar con la fenología del cultivo, aplicación de plaguicidas, condiciones ambientales, precios de mercado, etc., estudios previos han reportado que este parámetro varía entre 4 ácaros/hoja en el Sur hasta 2-3 ácaros/planta que en el noreste de la India (Roy et al., 2014).

Recientemente, Vásquez et al (2017) reportaron por primera vez a *O. coffeae* sobre plantas de aliso, *Alnus acuminata* en la región de la sierra en el Ecuador, lo cual representa una amenaza potencial sobre otros cultivos de importancia en la región, por lo que debería tomarse medidas de control en el caso de futuras explosiones poblacionales de esta especie plaga.

Biología de Tetranychidae

Los ácaros tetraníquidos pasan por varios estados de desarrollo: huevo, larva, protoninfa, deutoninfa y adulto, con un estado de quiescencia entre dos estadios activos de desarrollo llamados protocrisálida (entre larva y proninfa), deutocrisálida (entre protoninfa y deutoninfa) y tritocrisálida (entre deutoninfa y adulto) (Crooker, 1985). La duración de estas fases de desarrollo dependen, entre otros factores, de la temperatura, debido a que este es el factor ambiental que ejerce mayor efecto sobre los ácaros y otros animales poiquilotermos (Riahi et al., 2013). Aparte de la temperatura, la planta hospedera también produce diferencias en el desarrollo, reproducción, longevidad y dinámica poblacional de los ácaros debido a que presentan barreras morfológicas para que el ácaro se alimente y/o por el efecto del estado nutricional y fisiología de la planta (Crooker, 1985).

Adicionalmente, tanto la temperatura como la composición química de la planta hospedera pueden ejercer un efecto sobre otros parámetros biológicos tales como fecundidad y longevidad. Con relación al efecto de la temperatura, Riahi et al. (2013) encontraron que el tiempo de desarrollo de *T. urticae* criado sobre hojas de durazno decreció gradualmente por efecto del aumento de la temperatura desde 17 a 27 °C e incrementó nuevamente a temperaturas entre 27 y 33 °C. Estos autores observaron que la producción promedio de huevos por hembra fue de 40,1; 18,7; 8,0 y 21,3 a 25, 27, 30 and 33 °C, respectivamente, mientras que en esas mismas temperaturas, la longevidad promedio fue de 12,9; 5,9, 3,6 y 6,5 días, respectivamente. Por otra parte, Das et al. (2012), demostraron que aparte de la reducción del tiempo de desarrollo en *O. coffeae* con el incremento de la temperatura de 20 a 35 °C en plantas de té, también la fecundidad disminuyó de 120,5 a 50,2 huevos/hembra, respectivamente.

Así mismo, estos autores determinaron que la fecundidad también varió por efecto del clon de té usado, siendo mayor en el clon TV1 (105,2 huevos/hembra), seguido de los clones TV10 y TV6 en donde se obtuvieron 98,6 y 95,3 huevos/hembra, respectivamente. De la misma manera, Abou-Awad et al. (2012) notaron que la combinación de alta temperatura y menor humedad relativa aceleraron la tasa de desarrollo y reproducción de *Oligonychus mangiferus* (Rahman and Sapra). Así la población del ácaro se multiplicó 30,8 veces en un tiempo generacional de 27 días a 31,0 °C y 65% HR, mientras que a 15 °C con 75 % HR, la misma población incrementó solo 7,5 veces en un tiempo generacional mayor (48,1 días). Asimismo, la mayor fecundidad (46,4 huevos/hembra) fue obtenida con la combinación de temperatura de 31,0°C y 65 % HR.

Daño por alimentación

Los ácaros de las familias Tetranychidae (ácaros araña), Tenuipalpidae (falsos ácaros araña) y algunas especies de Eriophyoidea son fitófagos obligados y constituyen plagas agrícolas en cultivos de importancia económica. De acuerdo con Alberti y Kitajima (2014), el aparato bucal de estos ácaros presenta estiletes quelicerales que les permite perforar el tejido vegetal para consumir el contenido celular. Aunque actualmente existen controversias sobre el modo en que los tetraníquidos se alimentan, se sabe que estos ácaros introducen sus quelíceros estiletiformes (que varía entre 100 µm en larvas y 150 µm en ácaros adultos) con los que succionan el contenido de las células del mesófilo de la hoja (Bensoussan et al., 2016; Park y Lee, 2002).

Los ácaros tetraníquidos son considerados como las plagas más comunes en plantas en donde se alimentan principalmente sobre las hojas, sin embargo, también pueden causar daños a otras partes de la planta, tales como cotiledones, frutos, flores, frutos o brotes (Tomczyk y Kropczyńska, 1985). Los síntomas de alimentación de los ácaros tetraníquidos se caracterizan por la presencia de puntos blanquecinos dispersos en la superficie adaxial de la lámina foliar; las cuales pueden llegar a ocupar toda la lámina foliar en caso de infestaciones severas (Suekane et al., 2012). En este último caso, las hojas pueden secarse y los altos niveles poblacionales del

ácaro pueden conllevar a la colonización de pecíolos, flores y otros tejidos de la planta hospedera llegando a secar toda la planta.

Con relación a los daños ocasionados por tetránquidos, la mayor parte de las investigaciones han sido enfocadas a estudios sobre *T. urticae*, puesto que esta es la principal plaga en cultivos a nivel mundial (Bolland et al., 1998). En tal sentido, González-Domínguez et al. (2015), evaluaron el efecto de tres diferentes densidades de ácaros iniciales sobre el crecimiento poblacional, la duración de cada etapa de desarrollo y la supervivencia de *T. urticae* en tres variedades de fresa mexicana (CP0615, CPLE-7 y CPJacona), adicionalmente compararon la actividad fotosintética (Fn), la concentración de CO₂ estomático (Ce), la conductancia estomática (gs) y el área de la hoja dañada en las tres variedades. La mayor densidad de ácaros ocurrió en CP0615, seguida por CPLE-7 y CPJacona, mientras que la menor supervivencia fue observada en la variedad CPLE-7, sin embargo, no se observaron diferencias en la duración de los estadios de desarrollo de *T. urticae* entre las variedades. Por otra parte, en este estudio no se detectaron diferencias en los valores de Fn, Ce y gs entre variedades. Con base en estos resultados se señala que la variedad CPLE-7 mostró el mayor potencial para su uso a escala comercial. De manera similar, en ensayos de campo se evaluó el daño causado por diferentes densidades poblacionales de *T. urticae* (5, 10, 15 o 20 ácaros/hoja) sobre plantas jóvenes de pepino (*Cucumis sativus* L.) y se encontró que las hojas maduras fueron más susceptibles a la infestación de ácaros y además se registró una correlación negativa y significativa entre la población de ácaros y la disminución de los pigmentos fotosintéticos (clorofila total, la clorofila-a, la clorofila-b y los carotenoides) hasta 40,0; 43,6; 45,5 y 47,3 %, respectivamente a la densidad de infestación más alta en comparación con el control (Tehri et al., 2014). Estos autores también reportaron efecto sobre el rendimiento del pepino, reportando reducción en el número de frutos (6,2-12,4 %), longitud de la fruta (0,6-1,6 %) y ancho del fruto (0,9-3,3 %) (Suekane et al., 2012). Adicionalmente, estos autores encontraron que el número de semillas en plantas de soya atacadas por *T. urticae* disminuyeron a medida que se incrementó la densidad de ácaros por planta, hasta en un 75,2 % en plantas con máximo nivel de clorosis.

Tetranychus urticae puede ocasionar sobre el fruto de tomate un daño denominado mancha dorada que consiste en pequeños puntos irregulares de color verde claro a blanco que se vuelven amarillos cuando maduran los frutos, lo cual puede resultar en pérdidas económicas debido a la necesidad de eliminación los frutos afectados (Meck et al., 2012). La reducción en la productividad y calidad de la cosecha pudieran deberse a que durante la alimentación de los ácaros araña, además de sustraer contenido celular, estos ácaros introducen toxinas y reguladores de crecimiento (Albuquerque et al., 2003; Flechtmann, 1985).

Estrategias de control de ácaros fitófagos

Dada la importancia como plaga de algunas especies de Tetranychidae, los agricultores deben hacer frecuentes aplicaciones de acaricidas durante el ciclo de cultivo (Nicetic et al., 2001). Estudios hechos con *T. urticae* han demostrado que esta especie tiene una gran habilidad de desarrollar resistencia a los plaguicidas sin importar el tipo de molécula e incluso pocos años después de haber sido introducida un nuevo acaricida (Dermauw et al., 2012; van de Vrie, 1985). El rápido desarrollo de resistencia en *T. urticae* está determinado por el ciclo de vida corto, la alta fecundidad y por el sistema de determinación del sexo por haplodiploidía, en la cual una hembra no fecundada produce machos haploides (van Leeuwen et al., 2010; Carière, 2003). Aunque no existen estudios sobre el desarrollo de resistencia en *O. coffeae*, es posible inferir que tiene similar probabilidad de desarrollar resistencia debido a que comparten características biológicas similares a *T. urticae*. En consecuencia, se han propuesto alternativas de control de estos ácaros plaga, tales como el uso y aprovechamiento de la resistencia de la planta, uso de prácticas culturales, uso de agentes de biocontrol, que incluye ácaros depredadores, hongos y bacterias acaropatógenos y uso de extractos vegetales con acción acaricida.

El cultivo de café

Generalidades

El café es uno de los productos agrícolas de mayor valor en el comercio internacional, además de su marcado valor social puesto que forma parte de la costumbre de muchos pueblos (Temis-Pérez et al., 2011; Labouisse et al., 2008). A nivel mundial son consumidos dos tipos de café: el café Robusta proveniente de *Coffea canephora* Pierre y el café Arabica de *C. arabica* L., siendo este último de mayor calidad y de mayor precio en el mercado (Bertrand et al., 2008). *Coffea arabica* se caracteriza por una baja diversidad genética, lo que se refleja en su susceptibilidad a numerosas enfermedades, mientras que *C. canephora* exhibe una diversidad considerable y representa una valiosa fuente de genes de resistencia a enfermedades (Bertrand et al., 2003).

Durante el inicio de la explotación comercial del café en el Neotrópico, los problemas de plagas no representaron un riesgo muy alto para el rendimiento, puesto que muchas plagas no estaban presentes en las nuevas zonas productoras. Incluso con la práctica de siembra con árboles de sombra, favorecía el mantenimiento de las poblaciones de plagas por debajo de los niveles de daños y además facilitaba su control (Staver et al., 2001). Sin embargo, posterior a la introducción del cultivo de *C. arabica* en América también fueron introducidas algunas plagas y enfermedades importantes tales como: la roya del cafeto, *Hemileia vastatrix* Berkeley y Broome, y la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Staver et al., 2001).

Principales plagas y enfermedades

La roya de la hoja de café causa fuertes defoliaciones en *C. arabica* cultivado en zonas de poca altura, causando debilitamiento de las plantas en ataques frecuentes, lo que afecta la producción y consecuentemente al rendimiento (Alpizar, 2006). Por otra parte, *H. hampei* (Coleoptera: Scolytidae) constituye una de las plagas principales del café en casi todos los países productores (Fernández y Cordero, 2007). Aparte de estas, varias especies de ácaros Tetranychidae y Tenuipalpidae han sido reportadas sobre plantas de café. De acuerdo con Bolland et al. (1998), siete

especies de Tetranychidae pueden alimentarse sobre especies de *Coffea*, incluyendo a *Eutetranychus banksi* (McGregor), *T. urticae*, *Oligonychus annonicus* (McGregor), *Oligonychus peruvianus* (McGregor), *Oligonychus punicae* (Hirst), *Oligonychus yothersi* (McGregor) y *Oligonychus coffeae* (Nietner). Por otra parte, solo dos especies de Tenuipalpidae, *Brevipalpus obovatus* Donnadieu y *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes), pueden convertirse en plagas del café (Childers et al. 2003). Hasta el presente, en el Ecuador no existen reportes de las especies de ácaros tetraníquidos en el café.

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

¿El extracto etanólico obtenido de semillas y hojas de *Annona cherimola* provoca algún efecto sobre la mortalidad y fecundidad de las hembras de *Oligonychus coffeae*?

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del extracto etanólico de *Annona cherimola* sobre el control de *Oligonychus coffeae*

3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de diferentes dosis del extracto de semilla y hoja de *Annona cherimola* sobre la mortalidad de *O. coffeae*
- Evaluar el efecto de diferentes dosis del extracto de semilla y hoja de *Annona cherimola* sobre la tasa de fecundidad de *O. coffeae*
- Determinar la DL₅₀ del extracto etanólico de semilla y hoja de *Annona cherimola* para en el biocontrol de *Oligonychus coffeae*

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

UBICACIÓN DEL ENSAYO

El presente ensayo fue realizado en Laboratorio de Entomología de Agrocalidad, en la ciudad de Ambato, Provincia de Tungurahua a temperatura ambiente de 20 ± 1 °C.

EQUIPOS Y MATERIALES

FACTORES EN ESTUDIO

Se evaluó el efecto de la dosis de aplicación de los extractos obtenidos de *Annona cherimola* sobre la tasa de mortalidad, oviposición diaria y acumulada en hembras de *Oligonychus coffeae* bajo condiciones de laboratorio.

Los ensayos fueron iniciados con poblaciones de *O. coffeae* colectados sobre plantas de aliso (*Alnus acuminata*) en la Estación Experimental de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato (FCAGP-UTA), Cantón Cevallos. Las muestras de hoja de aliso con síntomas de ataques por este ácaro fueron colocadas en bolsas plásticas de cierre hermético, internamente recubiertas con papel absorbente. Las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Biotecnología para la confirmación de la especie, para la cual las muestras de hoja fueron observadas al esteromicroscopio para seleccionar los ácaros, los cuales fueron montados en láminas para la observación al microscopio usando líquido de Hoyer. Los caracteres morfológicos usados para la determinación de *Oligonychus coffeae* (Nietner) (Fig. 3a) fueron los siguientes: empodio en forma de uña sin pelos próximo-ventrales (Fig. 3b), dos pares de setas dúplex adyacentes en el tarso I (Fig. 3c), hembras con dos pares de sedas anales (Fig. 3d) (Gutierrez, 1985). Adicionalmente fue considerada la presencia de un par de sedas para-anales (Fig. 3d), presencia de tres setas táctiles en el tarso, peritrema no curvado distalmente y terminando en una estructura ensanchada (Fig. 3c), y edeago curvado formando un ángulo recto y se hace abruptamente angosto formando un ápice delgado (Fig. 3e) (Gutierrez y Schicha, 1983).

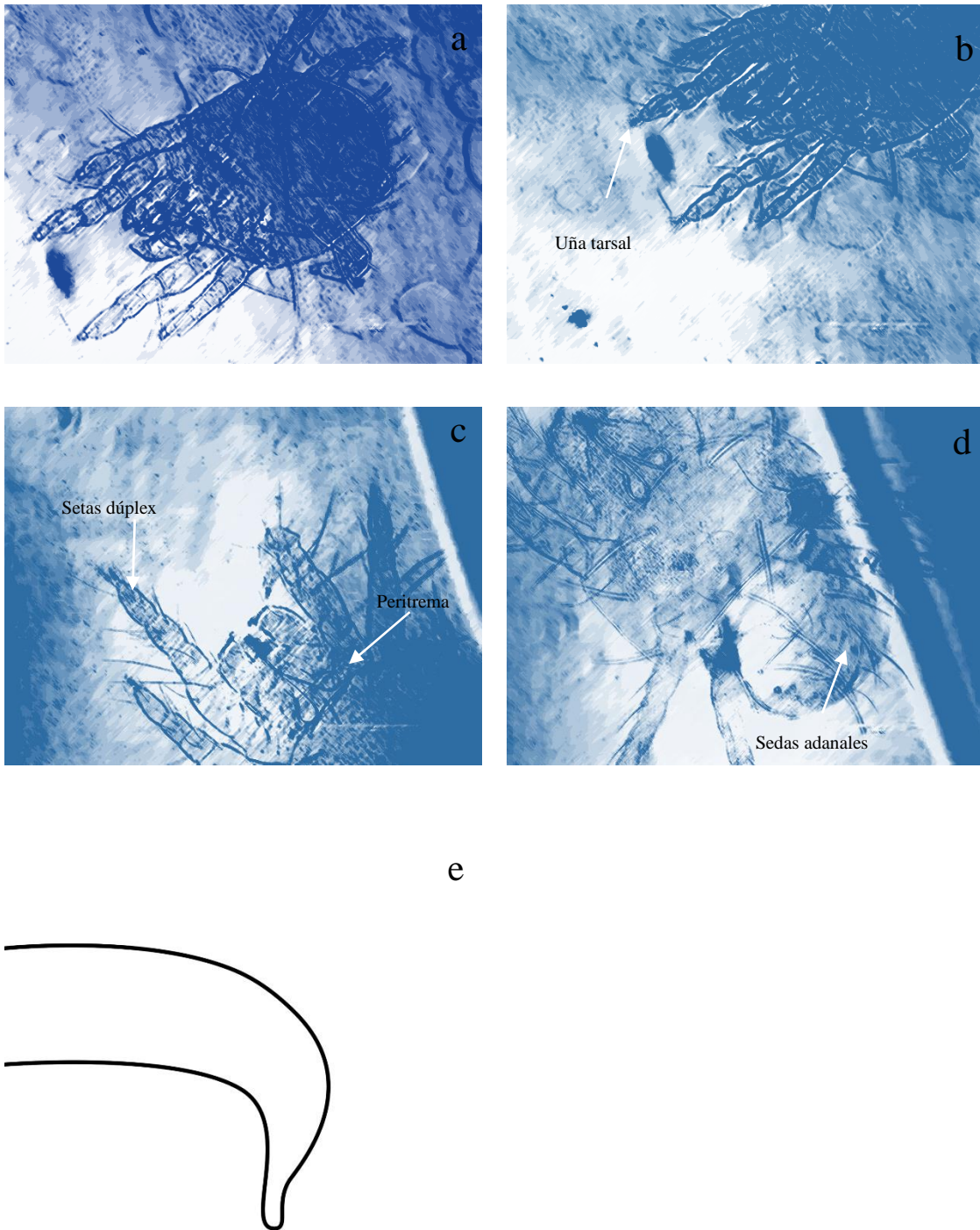


Figura 3. Aspecto general de la hembra de *O. coffeae* (a); patas terminando en uña (b); setas dúplex sobre el tarso I próximas y peritrema recto (c); placa anal con dos pares de setas anales y un par para-anales (d); edeago curvado ventralmente y se reduce abruptamente a una punta delgada (e).

Una vez confirmada la especie, se procedió a la obtención de una cohorte de edad homogénea. Para ello, los ácaros traídos del campo fueron transferidos a unidades de cría de acuerdo a la metodología de Helle y Overmeer (1985). Cada unidad de cría consistió de una placa Petri dentro de la cual se ajustó una almohadilla circular de poliuretano de 1 cm de espesor. En cada unidad de cría fue colocado un disco de hoja de café con el envés hacia arriba que fue rodeado con una banda de algodón humedecida (1 cm de ancho) para evitar el escape de los ácaros y mantener la turgencia de la hoja. Sobre cada unidad de cría fueron transferidas 30 hembras y machos de *O. coffeae* para promover la oviposición. Una vez obtenidos 950 huevos, tanto las hembras como machos fueron descartados. Diariamente, estas unidades de cría fueron observadas hasta la obtención del estado adulto, con los cuales se dio inicio a los ensayos de efectividad de los extractos etanólicos de hojas y semilla de chirimoya. Las unidades de cría fueron humedecidas diariamente para mantener la turgencia de la hoja y aquellas hojas que mostraban síntomas de deterioro fueron sustituidas por hojas nuevas.

Obtención de los extractos vegetales

Las hojas y semillas obtenidas de frutos maduros de *A. cherimola* usadas para la preparación del extracto crudo fueron colectadas en el sector Chilepata del Cantón Patate, Provincia de Tungurahua.

Para la preparación de los extractos tanto las hojas como semillas fueron secadas a estufa (40 °C durante dos días) (Fig. 4a) y posteriormente molidas con un molino eléctrico (Fig. 4b). Los extractos orgánicos fueron preparados a partir del polvo de hoja o semilla, el cual fue mezclado con etanol 96% (en proporción 1:5 p/v). Esta mezcla fue mantenida en maceración durante 3 días y finalmente fue filtrada usando papel de filtro (Fig. 4c). El solvente remanente de la solución filtrada fue sometido a eliminación en un roto evaporador a 70°C (Fig. 4d).



Figura 4. Obtención de los extractos etanólicos de hoja y semilla de chirimoya

Efecto de las diferentes dosis de los extractos obtenidos de hoja y semilla de chirimoya sobre la mortalidad y tasa de oviposición de hembras de *O. coffeae*

Los bioensayos fueron conducidos a temperatura ambiente de 20 ± 1 °C. La actividad acaricida de los extractos de hoja y semilla fue evaluada mediante la técnica de contacto residual usando hembras de *O. coffeae* de 48 h de edad provenientes de la cría general (Ribeiro et al., 2014c). Para ello, las hojas maduras de café fueron usadas como sustrato de cría, las cuales fueron colocadas en unidades de cría, similares a las ya descritas. A partir de los extractos etanólicos crudos obtenidos fueron preparadas diluciones a concentraciones de 625, 1250, 2500, 5000 y 10000 mL/L. Se aplicó agua como tratamiento control. Para la aplicación de los tratamientos, los discos de hoja fueron sumergidos en cada una de las concentraciones del extracto respectivo durante 20 s y posteriormente colocados en papel toalla hasta que el líquido se evaporara. Después de esto, los discos de hoja fueron colocados sobre las unidades de cría con la cara adaxial hacia arriba. Sobre cada arena fueron colocadas 10 hembras de la cría general. Cada tratamiento fue replicado 5 veces y el bioensayo fue repetido 3 veces para convalidar los datos.

Cada 24 horas se hicieron evaluaciones de la mortalidad de las hembras expuestas a los residuos durante 4 días consecutivos. Las hembras fueron consideradas muertas cuando no mostraron ninguna reacción al toque con un pincel superfino (000). Los ácaros que fueron atrapados en la banda de algodón no fueron considerados para el análisis.

El efecto de las diferentes dosis de los extractos de hoja y semilla de chirimoya sobre la oviposición y fecundidad de hembras de *O. coffeae* fue evaluado usando las mismas concentraciones y procedimiento experimental usados en el ensayo de toxicidad aguda. En cada unidad de cría fueron colocadas 10 hembras de 48 h de edad y expuestas a las diferentes dosis en un ensayo de contacto. Cada tratamiento fue replicado 5 veces y repetido 3 veces en el tiempo. El número de huevos colocados sobre los discos de hoja tratados con las diferentes concentraciones de los extractos fue contabilizado cada 24 horas durante 4 días. La fecundidad fue determinada como la suma del número promedio de huevos puestos por una hembra durante el período de evaluación. El número promedio de huevos fue calculado

dividiendo el número total de huevos y el número de hembras vivas en un período de 24 horas.

Tratamientos

Los tratamientos que correspondieron a las diferentes dosis de los extractos etanólicos de semillas y hojas de *A. cherimola* son mostrados en la tabla 1.

Tabla 1. Diferentes dosis (D) del extracto de *A. cherimola* (mL/L)

	D1	D2	D3	D4	D5
Semilla	625	1.250	2.500	5.000	10.000
Hoja	625	1.250	2.500	5.000	10.000

Los extractos fueron denotados con Se (semilla) y Ho (hojas), mientras que las dosis fueron denotadas como D1 (625 mL/L), D2 (1250 mL/L), D3 (2500 mL/L), D4 (5000 mL/L) y D5 (10000 mL/L) y una dosis D0 usada como control, en la cual solo le aplicó agua. Los tratamientos fueron los siguientes:

N°	Órgano de la planta	Símbolo	Dosis (ml de extracto/L)
1	Control	0	0
2	Extracto de semilla	SeD1	625
3	Extracto de semilla	SeD2	1250
4	Extracto de semilla	SeD3	2500
5	Extracto de semilla	SeD4	5000
6	Extracto de semilla	SeD5	10000
7	Extracto de hoja	HoD1	625
8	Extracto de hoja	HoD2	1250
9	Extracto de hoja	HoD3	2500
10	Extracto de hoja	HoD4	5000
11	Extracto de hoja	HoD5	10000

Diseño experimental

El ensayo fue conducido en un diseño de experimentos completamente al azar con un arreglo de tratamientos en parcelas divididas, siendo la parcela principal constituida por el órgano de la planta de donde se obtuvo el extracto (semilla u hoja) y las subparcelas representadas por la dosis del extracto a aplicar (0, 625, 1250, 2500, 5000 y 1000 mL/L).

Esquema de distribución de las parcelas

	R 1		R 2		R 3		R 4		R 5
Parcela 1: Extracto 1: semilla de chirimoya	E1D0		E1D1		E1D5		E1D2		E1D4
	E1D1		E1D3		E1D0		E1D4		E1D2
	E1D2		E1D5		E1D2		E1D0		E1D1
	E1D3		E1D2		E1D3		E1D1		E1D4
	E1D4		E1D4		E1D1		E1D5		E1D0
	E1D5		E1D0		E1D4		E1D3		E1D3

Parcela 2: Extracto 2: hojas de chirimoya	E2D0		E2D1		E2D5		E2D2		E2D4
	E2D1		E2D3		E2D0		E2D4		E2D2
	E2D2		E2D5		E2D2		E2D0		E2D1
	E2D3		E2D2		E2D3		E2D1		E2D4
	E2D4		E2D4		E2D1		E2D5		E2D0
	E2D5		E2D0		E2D4		E2D3		E2D3

Variables respuesta

- 1.2.2 Mortalidad:** también conocido como efecto knock-down. Para ello, se contabilizó el número de hembras muertas en un tiempo de 24, 48, 72 y 96 horas después de la aplicación de las diferentes dosis de los extractos de semilla y hoja de chirimoya.
- 1.2.3 Tasa de oviposición:** se determinó el número de huevos/día producido por las hembras sobrevivientes a la aplicación de las diferentes dosis de los extractos de semilla y hoja de chirimoya (efecto subletal).
- 1.2.4 Longevidad:** se determinó el número de días que sobrevivió una hembra posterior a la aplicación de las diferentes dosis de los extractos de semilla y hoja de chirimoya (efecto subletal).

Procesamiento de la información

Las variables mortalidad (efecto tóxico), oviposición y fecundidad (efecto sub-letal) en hembras de *O. coffeae* fueron sometidas a análisis de varianza (ANOVA) y aquellas variables que mostraron diferencias significativas fueron sometidas a prueba de medias según Tukey usando el programa estadístico Statistix versión 9.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a. **Tasa de mortalidad de las hembras de *O. coffeae* tratadas con diferentes concentraciones del extracto etanólico de *A. cherimola***

Se comprobó efecto tanto del tipo de extracto así como de las concentraciones usadas sobre la mortalidad de las hembras de *O. coffeae* (Tabla 2). En general, la mayor tasa de mortalidad de las hembras de *O. coffeae* fue alcanzada con la aplicación del extracto obtenido de semillas de chirimoya en comparación con la mortalidad provocada por el extracto de hojas. Adicionalmente, se observó aumento de la mortalidad por efecto de la concentración con ambos tipos de extracto. Con la aplicación del extracto de semilla, la tasa de mortalidad se incrementó de 3,80 hasta 12,83 hembras muertas con el incremento de la dosis de 625 a 10.000 mg/L a las 24 h después de la aplicación. A estas mismas concentraciones, el número de hembras muertas incrementó en 31,6 y 36,4% a las 48 h, mientras que a las 72 h el incremento de la mortalidad fue de 63,2 y 81,8%, respectivamente.

Con relación al extracto de hojas, se detectó que la mortalidad promedio provocada varió desde 1,98 hasta 5,80 hembras muertas a las 24 y 72 h después de la aplicación, respectivamente, lo cual fue 3,8 y 2,4 veces menor que los promedios observados con el extracto de semilla. Cuando fue analizada la mortalidad en cada tiempo de observación (24, 48 o 72 h después de la aplicación), se encontró que aunque el efecto sobre la mortalidad fue menos evidente, se mantuvo la tendencia al incremento de la mortalidad a medida que se incrementó la concentración. El efecto del extracto de hoja mostró una eficiencia relativamente baja a las 24 y 48 h después de la aplicación puesto que el número de hembras muertas a la mayor concentración solo produjo porcentajes de control de 14,2 y 19,2 % a las 24 y 48 h después de la aplicación, respectivamente, alcanzando 40% de mortalidad a las 72 h.

Existen varios estudios que evalúan el efecto de los extractos de diferentes especies de *Annona* sobre varios grupos de insectos y ácaros plaga. Ribeiro et al. (2014a) encontraron que los extractos etanólicos de *A. montana* y *A. sylvatica* produjeron más

Tabla 2. Mortalidad promedio de hembras de *O. coffeae* tratadas con diferentes concentraciones de extractos etanólicos de hojas y semillas de *A. cherimola*

Concentración	Extracto de hoja			Extracto de semilla		
	24	48	72	24	48	72
0	1,40±0,548bc	2,60±0,894b	3,20±0,837c	0,40± 0,548c	2,60±0,894c	3,20±0,837d
625	0,40±0,548c	1,80±0,837b	3,60±1,140c	3,80±0,837bc	5,00±0,707c	6,20±0,837d
1250	1,40±0,548bc	1,80±0,837b	4,20±0,837c	6,20±1,304bc	10,80±0,837bc	13,20±1,304c
2500	1,80±0,837bc	3,00±0,707b	5,20±0,837bc	8,40±1,140ab	13,60±1,517ab	17,20±1,483bc
5000	2,80±0,837ab	3,80±0,837ab	6,80±1,304b	13,80±1,304a	16,60±2,793ab	21,60±1,517ab
10000	4,25± 1,258a	5,75±1,7078a	12,0±0,817a	12,83±5,845a	17,50±7,176a	23,33±6,088a
Promedio General	1,98 ± 1,387	3,10 ± 1,592	5,80 ± 3,005	7,61 ± 5,458	11,09 ± 6,536	14,17 ± 8,090

Valores promedios obtenidos de 30 observaciones

Valores promedio en una misma columna con la misma letra no mostró diferencias significativas de acuerdo a Prueba de rangos de Tukey ($p < 0,001$)

de 98% de mortalidad en larvas del tercer instar de *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) y sobre el áfido verde del durazno, *M. persicae* (Hemiptera: Aphididae) tanto en ensayos de laboratorio como en estructuras protegidas. De manera similar, la aplicación del extracto etanólico de *Annona mucosa* produjo alta mortalidad en hembras sobre el ácaro rojo de los cítricos, *P. citri* (Acari: Tetranychidae), la cual fue incrementándose con el aumento de la concentración y el tiempo de exposición (Ribeiro et al., 2014b), similar a los resultados observados en el presente estudio. Estos autores sugirieron que dado que este extracto provocó resultados de control similares al spirodiclofen, este podría ser considerado como una alternativa de control sustentable para el uso en huertos citrícolas.

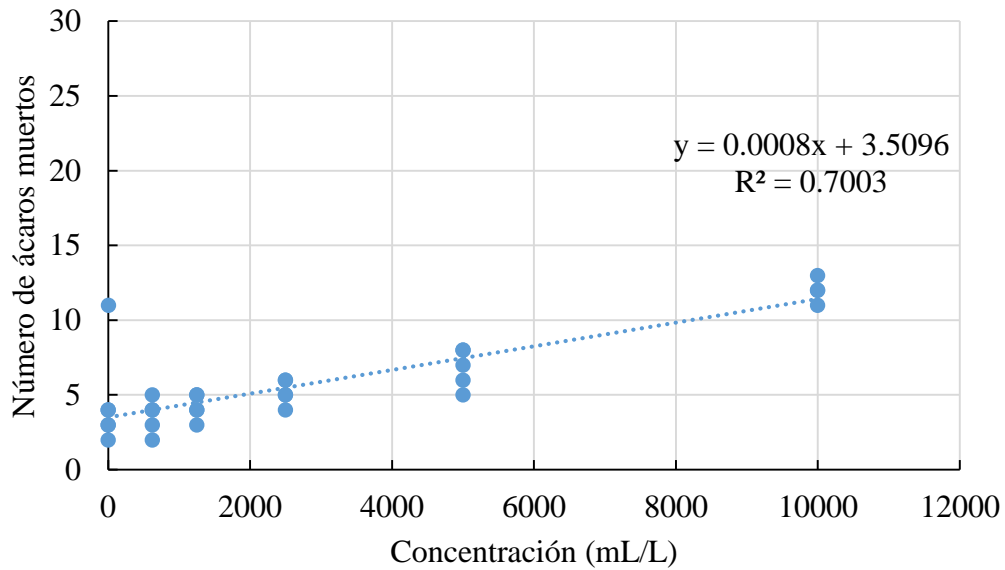
Aparte del efecto sobre la mortalidad, las acetogeninas contenidas en especies de Anonáceas pueden producir un efecto sobre el desarrollo de algunos insectos plaga. En tal sentido, el extracto etanólico de semilla de *A. mucosa* redujo reducción de la viabilidad de larvas y pupas, de *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), así como también provocó reducción en el peso de la pupa, incremento en la duración de la fase larval y de la proporción de pupas y adultos con cambios morfológicos, sin embargo el extracto no causó disuasión de la alimentación (Ribeiro et al., 2016).

De manera interesante, Guadaño et al. (2000), demostraron que la composición de los extractos obtenidos de especies de anonáceas puede explicar diferencias en el efecto producido en la plaga. Así, estos autores observaron que el efecto de anti-alimentación provocado por extractos de semilla de *A. glabra* en *L. decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) fue debido a la presencia de annonacina, sin embargo este mismo producto no produjo el mismo efecto sobre *S. litoralis* o *M. persicae*. Contrariamente, el efecto del extracto de semillas de *A. cherimola*, que estaba principalmente compuesto de esquamocina, fue principalmente evidenciado en la mortalidad de *L. decemlineata* y *M. persicae*, pero no sobre *S. litoralis*, probablemente debido a que esta especie posee mecanismos de inactivación de estos compuestos.

b. Dosis letal media (DL₅₀)

La pendiente de la curva de la relación concentración-mortalidad fue menor con el extracto de hoja ($m= 0,0008$), mientras que esa pendiente fue relativamente más pronunciada en el extracto de semilla ($m= 0,002$) (Fig. 5).

a



b

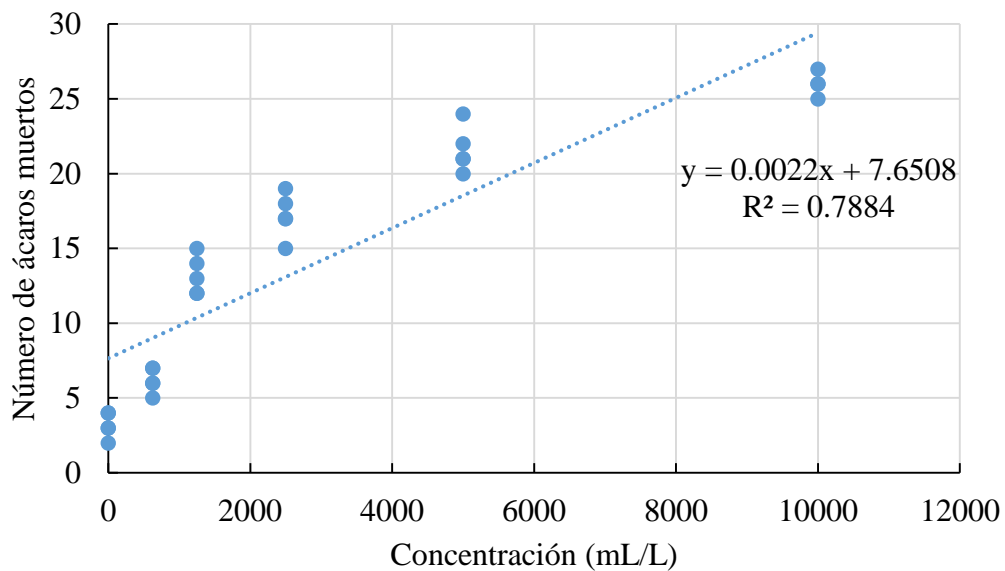


Figura 5. Estimación de la concentración letal media (DL₅₀) de los extractos de

hoja (a) y semilla (b) de *Annona cherimola* contra hembras de *Oligonychus coffeae*.

La pendiente baja en el extracto de hojas evidencia que incluso las concentraciones más altas no provocaron un nivel de mortalidad alto lo que no permitió calcular la DL_{50} , mientras que con el extracto de semilla la DL_{50} calculada fue de 3.340,5 mL/L. Esto indica que con esta concentración se lograría eliminar a la mitad de la población, por lo que se recomendaría su uso para manejar las poblaciones de *O. coffeae* en plantaciones de café.

c. Efecto subletal de los extractos de *A. cherimola* sobre hembras de *O. coffeae*

Aparte de la toxicidad aguda expresada como la mortalidad de *O. coffeae*, los extractos de hojas y semillas de *A. cherimola* produjeron un efecto subletal que fue evidenciado en términos de la tasa diaria de oviposición y fecundidad de las hembras de esta especie de ácaro.

La oviposición diaria en hembras de *O. coffeae* fue afectada por el efecto conjunto tanto por el tipo de extracto como por su concentración puesto que todos los tratamientos lograron reducir el número diario de huevos/hembra en relación al tratamiento control ($p < 0,0003$; $F = 6,08$, $gl = 5$) (Fig. 6).

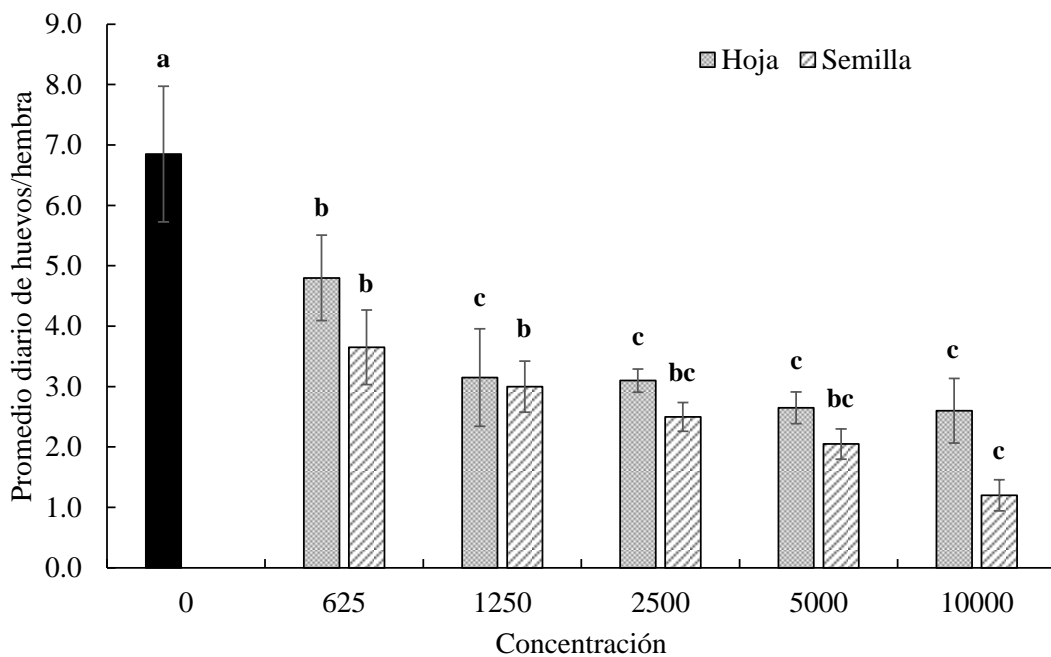


Figura 6. Tasa de oviposición de hembras de *O. coffeae* tratadas con diferentes concentraciones del extracto de hojas y semilla de *A. cherimola*

La mayor disminución de la oviposición fue lograda con el extracto de semilla, incluso con concentración más baja, con la cual la tasa de oviposición disminuyó 46,7%, mientras que a la concentración de 10.000 mL/L esta logró disminuir hasta 82,5%. Con relación al extracto de hojas, la disminución fue relativamente menor variando desde 29,9 hasta 62,0 % a concentraciones de 625 y 10000 mL/L.

Cuando se consideró la oviposición diaria, el número de huevos/hembra tendió a incrementarse en las hembras del grupo testigo y un comportamiento similar fue notado en las hembras tratadas con 625 mg/L de ambos extractos a las 48 y 72 h después de la aplicación, sin embargo el número de huevos/hembra tendió a disminuir a las 96 h después de la aplicación (Fig. 7).

La disminución en la oviposición diaria comenzó a evidenciarse a partir de la concentración de 1250 mg/L, aunque no se detectaron diferencias significativas en los tratamientos de 1250 hasta 10000 mg/L del extracto de hoja. Contrariamente, el extracto de semilla a 10000 mg/L provocó una disminución significativa de la

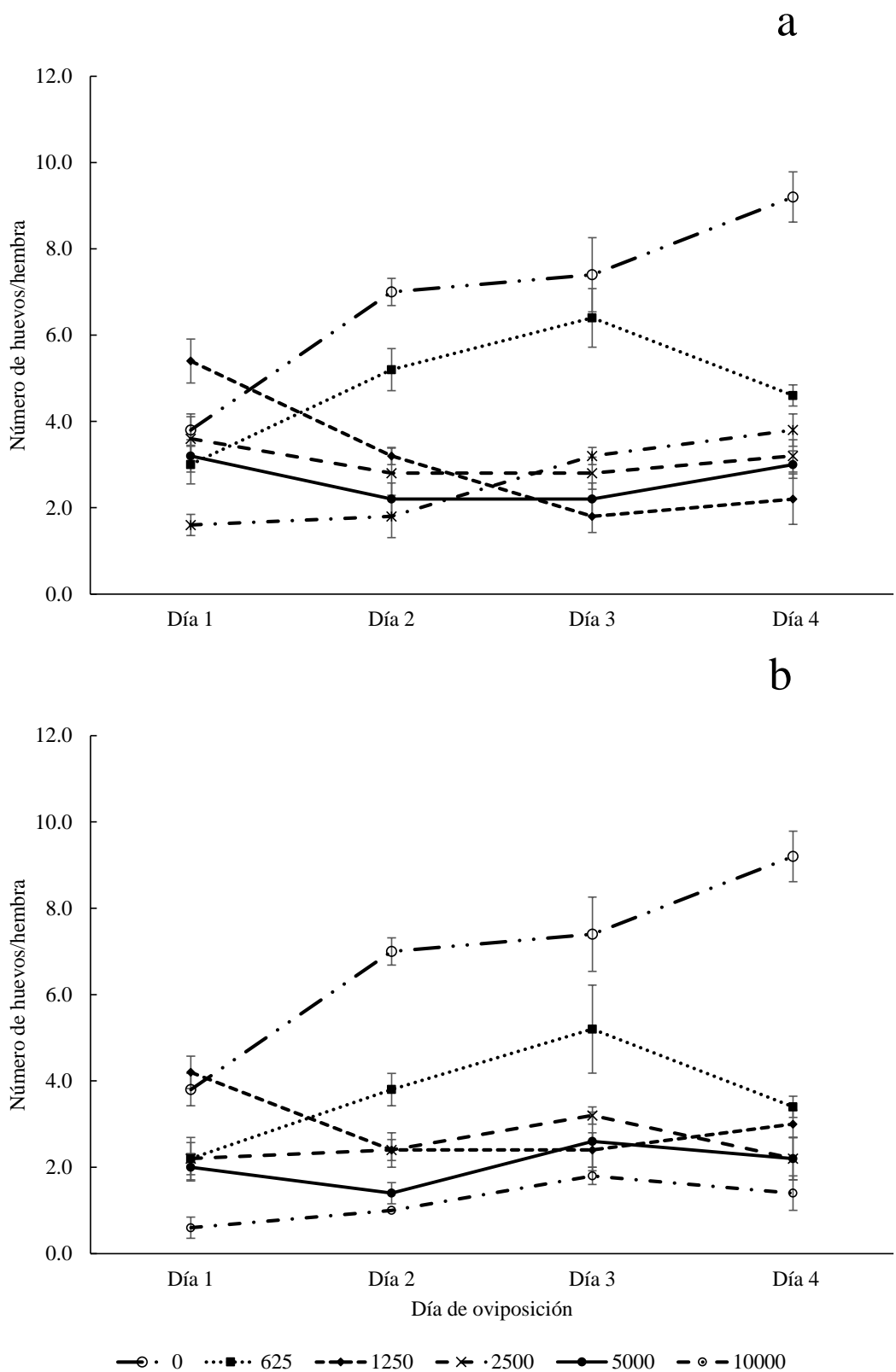


Figura 7. Oviposición diaria de hembras de *O. coffeae* tratadas con diferentes concentraciones del extracto de hojas (a) y semilla (b) de *A. cherimola*

oviposición. De acuerdo con Ribeiro et al. (2014d), el efecto sub-lethal del extracto de *A. mucosa* provocó disminución de la descendencia de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), lo cual sugería que este extracto tuvo efecto sobre la alimentación, oviposición e incluso sobre el desarrollo embrionario y post-embrionario de la plaga.

La fecundidad de las hembras de *O. coffeae* fue negativamente afectada por la aplicación de las diferentes concentraciones de extractos de hoja y semilla de *A. cherimola* (Figura 8). El extracto de semilla resultó más efectivo en reducir la fecundidad en hembras de *O. coffeae*, la cual disminuyó de 34 a 10,4 huevos/hembra a 625 y 10.000 mL/L, mientras que las hembras tratadas con extracto de hoja se observó una fecundidad de 45,8 hasta 22,0 huevos/hembra a las mismas concentraciones.

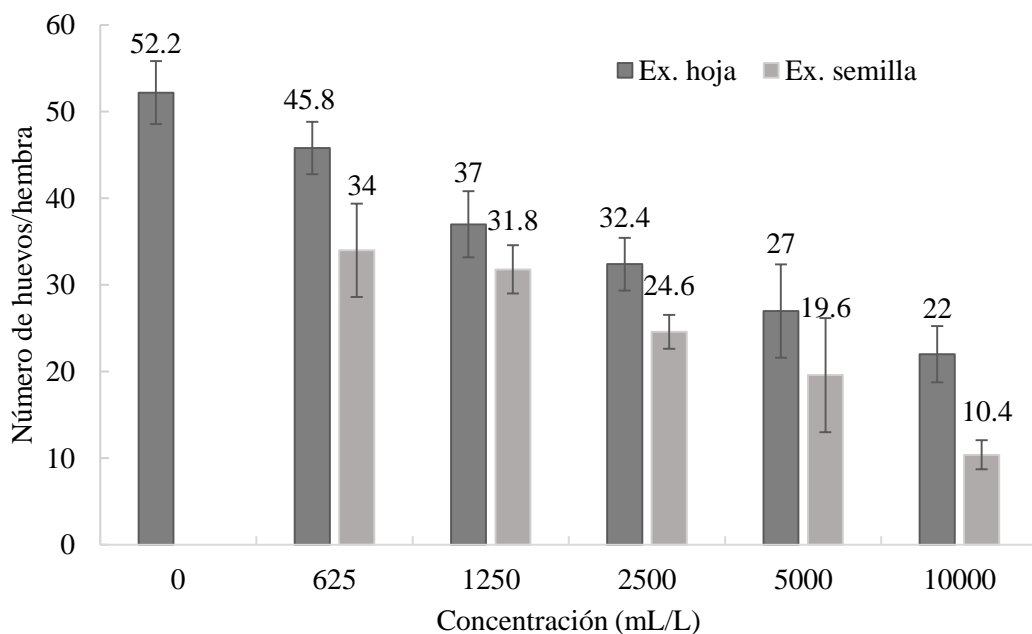


Figura 8. Fecundidad de las hembras de *O. coffeae* tratadas con diferentes concentraciones de extractos etanólicos de hoja y semilla obtenidos de *A. cherimola*

El extracto de semilla provocó reducción de la fecundidad total en 34 % con la concentración 625 mg/L, mientras que con la máxima concentración logró reducir hasta un 80,1 %. Por otra parte, el extracto de hoja solo alcanzó reducción alrededor

del 50% con las concentraciones de 5000 y 10000 mg/L, mientras que con la concentración más baja apenas provocó reducción del 12,3%.

Adicionalmente, se observó una correlación negativa entre la concentración del extracto y la fecundidad/hembra, la cual fue lineal a las 24 horas después de la aplicación pero luego fue una respuesta cuadrática a las 48, 72 y 96 horas después de aplicar cada uno de los tratamientos ($F_{4, 20} = 2.3479$, $p = 0.089$) (Figs. 9-12). Posiblemente, la respuesta lineal a las 24 h pudo deberse, a la variabilidad de los datos durante el período de observación, la cual es verificada por la dispersión en todas las concentraciones. En las observaciones hechas entre las 48 y 96 horas después del tratamiento, la respuesta cuadrática mostró que no existe disminución notable de la fecundidad con concentraciones mayores a 5000 mL/L, lo cual podría sugerir que esta concentración podría ser suficiente para causar un efecto deletéreo sobre las poblaciones del ácaro de modo de ejercer control efectivo. Esto pudiera ser soportado por los resultados de Ribeiro et al., (2014b), quienes encontraron que la DL_{50} del extracto de *A. mucosa* fue de 4.662 mg/l sobre hembras de *P. citri*. Por otra parte, estos autores demostraron una reducción de la fecundidad en hembras de *P. citri*, la cual fue proporcional a la concentración del extracto de *A. mucosa*.

Aparte del estudio de Ribeiro et al. (2014b), los resultados obtenidos en la presente investigación constituyen un importante aporte para el manejo de las poblaciones de ácaros tetraníquidos en el Ecuador. Basándose en el efecto tóxico y sub-letal de los extractos de hojas y semillas de chirimoya permiten sugerir que estos constituyen una herramienta promisoría para el manejo de ácaros plagas en cultivos extensivos. Sin embargo, se requiere evaluar el efecto de estos extractos en condiciones de campo y/o en cultivos protegidos para determinar el efecto de los factores ambientales sobre la efectividad de control. Adicionalmente, considerando la diversidad de especies de Annonaceae presentes en el Ecuador, se sugiere realizar estudios similares de modo de establecer la potencialidad de su uso en programas de manejo de plagas agrícolas.

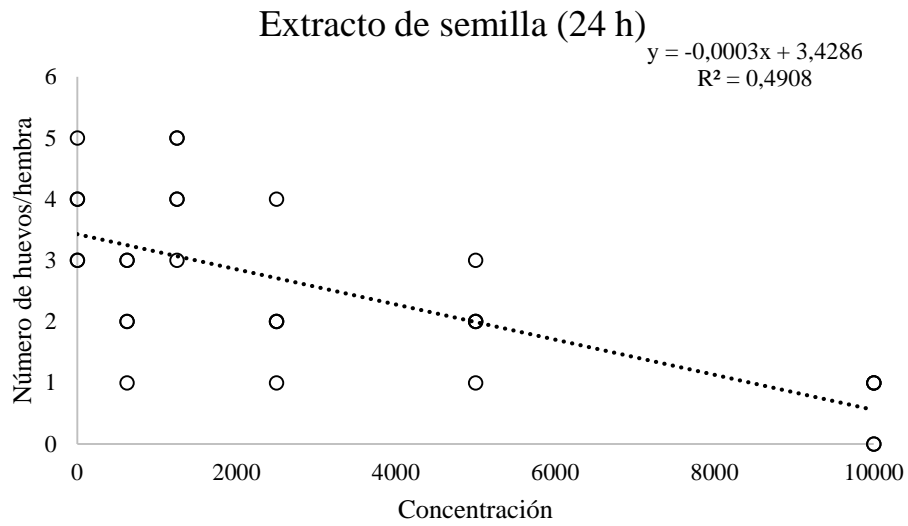
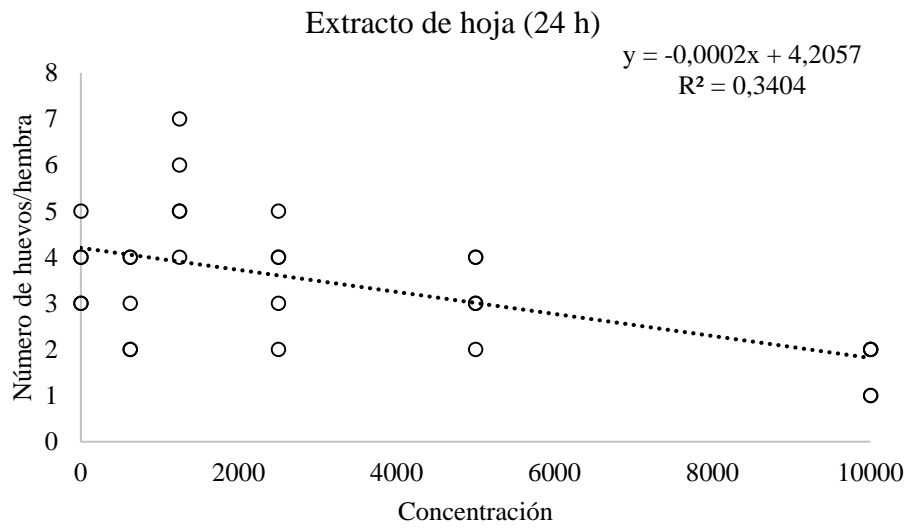


Figura 9. Fecundidad de las hembras de *Oligonychus coffeae* a las 24 h despues de la aplicacion de diferentes dosis de los extractos de hoja (a) y semilla (b) de *Annona cherimola*

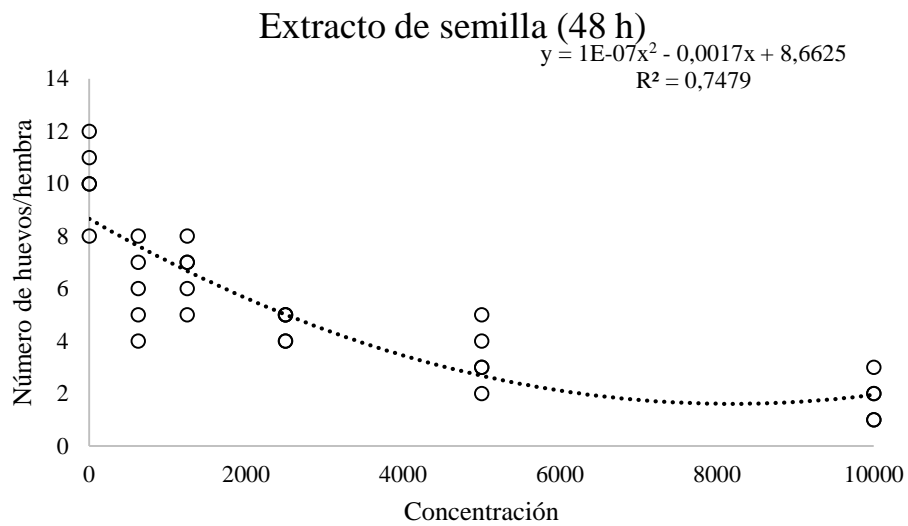
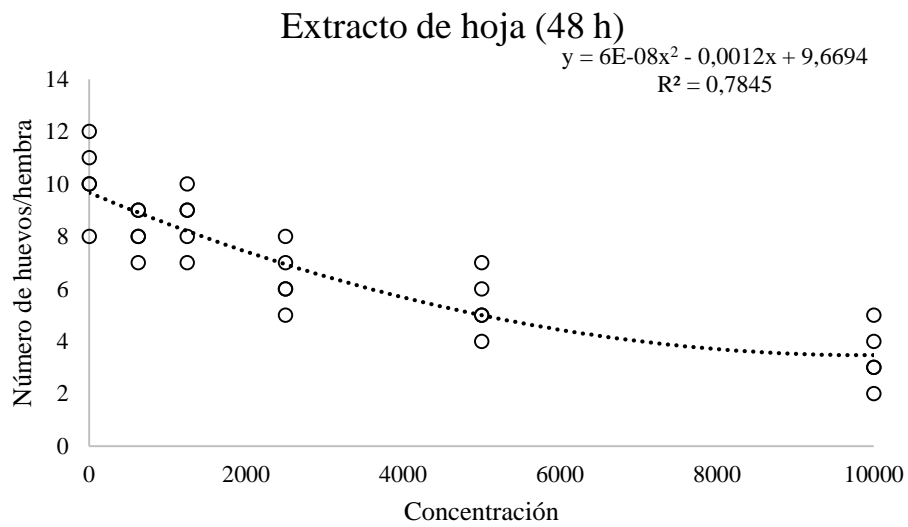


Figura 10. Fecundidad de las hembras de *Oligonychus coffeae* a las 48 h despues de la aplicacion de diferentes dosis de los extractos de hoja (a) y semilla (b) de *Annona cherimola*

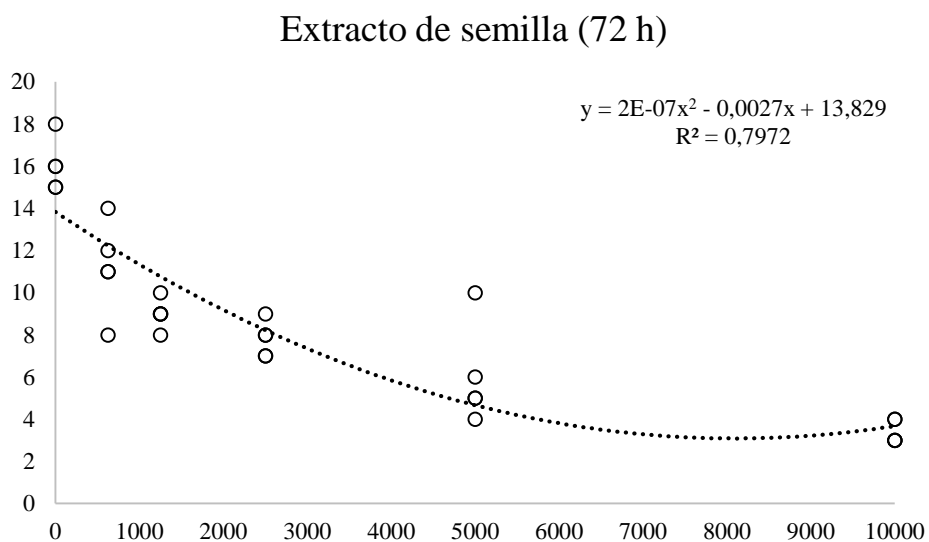
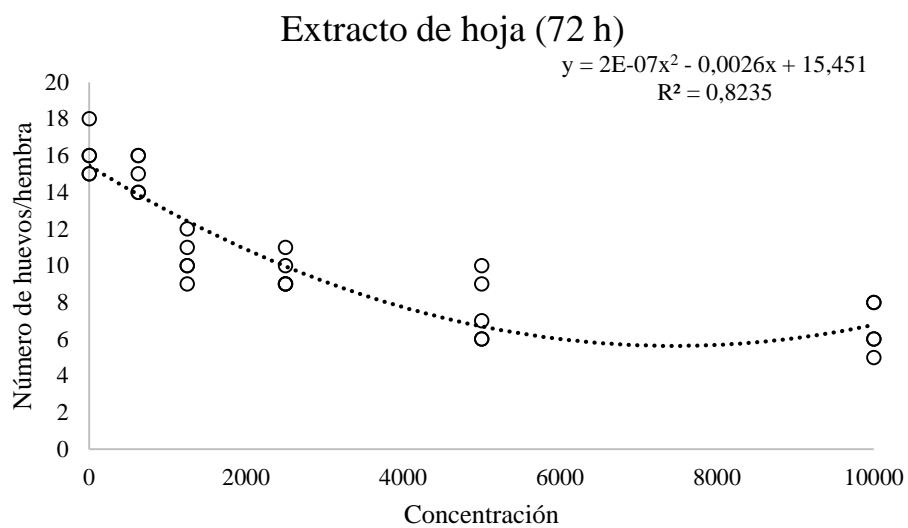
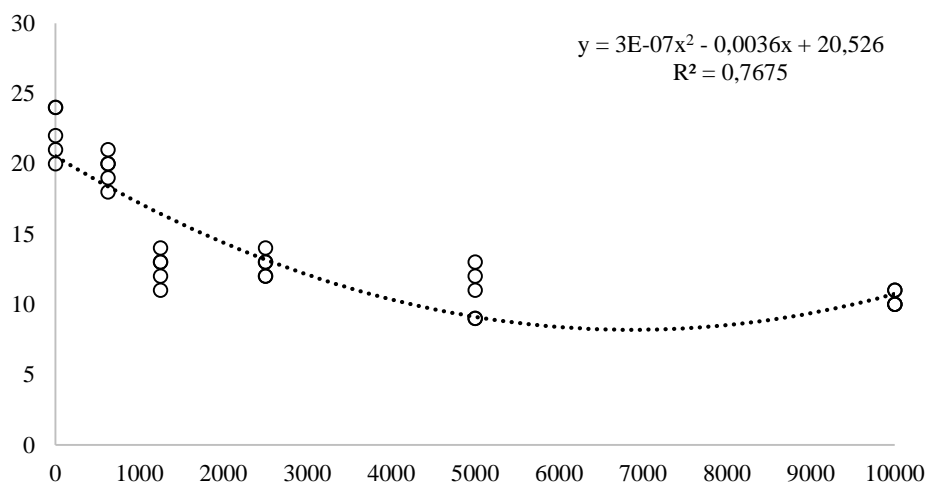


Figura 11. Fecundidad de las hembras de *Oligonychus coffeae* a las 72 h despues de la aplicacion de diferentes dosis de los extractos de hoja (a) y semilla (b) de *Annona cherimola*

Extracto de hoja (96 h)



Extracto de semilla (96 h)

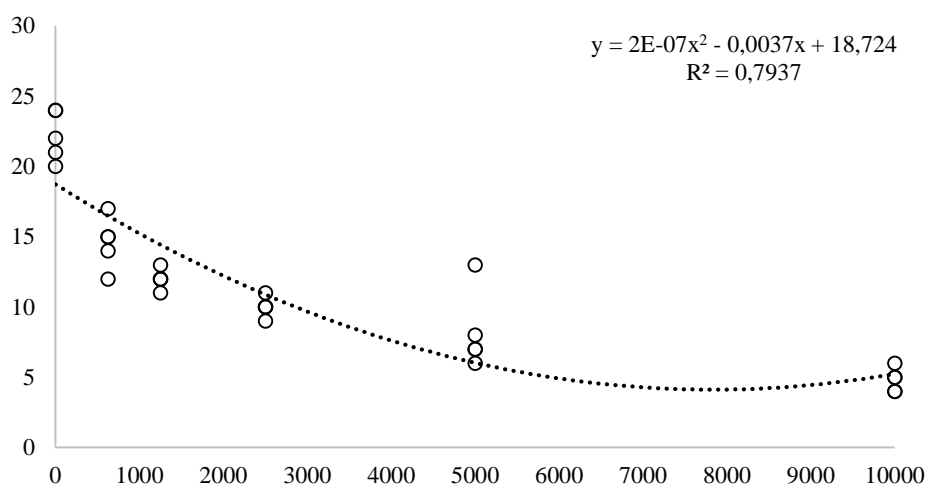


Figura 12. Fecundidad de las hembras de *Oligonychus coffeae* a las 96 h despues de la aplicacion de diferentes dosis de los extractos de hoja (a) y semilla (b) de *Annona cherimola*

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

CONCLUSIONES

Los resultados demostraron que el extracto de hojas y semillas de *A. cherimola* mostró tanto un efecto tóxico manifestado en el porcentaje de mortalidad, así como efecto subletal que fue evidenciado en la disminución de la tasa de oviposición y fecundidad total en hembras de *O. coffeae*.

A pesar de que ambos extractos causaron efecto acaricida, el extracto obtenido de semillas mostró ser superior dado que provocó mayor tasa de mortalidad y menor oviposición en los ácaros.

Basados en la tasa de mortalidad y reducción de la oviposición y fecundidad de las hembras de *O. coffeae*, el extracto de semilla y, en segundo lugar el extracto de hoja, podrían ser incluidos en programas de manejo de este ácaro plaga en plantaciones de café, sin embargo, se requiere validar los datos obtenidos en el laboratorio con ensayos conducidos en campo.

Dado el potencial mostrado por varias especies de Annonaceae para el control de plagas agrícolas y considerando la diversidad de esta familia en el trópico, se sugiere realizar estudios donde se evalúe el efecto plaguicida de las especies silvestres presentes en el Ecuador de modo de ofrecer nuevas alternativas sustentables a los pequeños y medianos productores del país.

BIBLIOGRAFÍA

- Aktar M.W., Sengupta D., Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*. 2009; 2(1): 1-12.
- Albuquerque F.A., Oliveira J.V., Gondim J.R.M.G.C., Torres J.B. Efeito de inseticidas e acaricidas sobre ovos e fêmeas adultas do ácaro-rajado, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*. 2003; 13:1-8.
- Alpizar E. Etude de la résistance du *Coffea arabica* au nématode *Meloidogyne exigua* conférée par le gène *Mex-J* et mise au point des outils pour son analyse fonctionnelle. Tesis Doctoral. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, Francia. 135 pp.
- Andrade D.A., Atzin J., Domínguez-Martínez V.G. Acetogeninas en idioblastos de semilla de guanábana (*Annona muricata*). Memorias del XXVI Congreso de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. 2006. Guanajuato, México.
- Ascher K. Nonconventional insecticidal effects of pesticides available from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 1993; 22; 433-449.
- Babu A.K., Perumalsamy M., Subramaniam S.R. and Muraleedharan N. Use of neem kernel aqueous extract for the management of red spider mite infesting tea in South India. *Journal of Plantation Crops*. 2008; 36(3): 393-397.
- Bellotti A.C., Cardona C., Lapointe S.L. Trends in pesticide use in Colombia and Brazil. *Journal of Agricultural Entomology*. 1990; 7(3): 191-201.
- Bensoussan N., Santamaria M.E., Zhurov V., Diaz I., Miodrag Grbić, Grbiv V. Plant-herbivore interaction: dissection of the cellular pattern of *Tetranychus urticae* feeding on the host plant. *Frontiers in Plant Science*. 2016, 7: 1-13.
- Bertrand B, Villarreal D, Laffargue A, Posada H, Lashermes P, Dusse S. Comparison of the effectiveness of fatty acids, chlorogenic acids, and elements for the

- chemometric discrimination of coffee (*Coffea arabica* L.) varieties and growing origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 56, 2273-2280.
- Bertrand B., Guyot B, Anthony P, Lashermes P. Impact of the *Coffea canephora* gene introgression on beverage quality of *C. arabica*. *Theoretical and Applied Genetics*. 2003; 107, 387-394.
- Blessing L.D.T., Colom O.A., Popich S., Neske A., Bardón A. Antifeedant and toxic effects of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Pest Science*. 2010; 3(3): 307-310.
- Carrière Y. Haplodiploidy, sex, and the evolution of pesticide resistance. *Journal of Economic Entomology*. 2003; 96(6):1626-1640.
- Childers CC, Rodrigues JCV, Welbourn C. Host plants of *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, and *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) and their potential involvement in the spread of viral diseases vectored by these mites. *Experimental and Applied Acarology*. 2003; 30: 29-105.
- Colom O.A., Barrachina I., Mingol I.A., Mas M.C.G., Sanz P.M., Neske A., Bardon A. Toxic effects of annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. *Journal of Pest Science*. 2008; 81(2): 85-89.
- Crooker A. Embryonic and juvenile development. En: Helle W., Sabelis M.W. (eds.): *Spider mites: their biology, natural enemies and control*. Elsevier Science Publisher B.V. 1985; 149-163.
- Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G. Natural products (secondary metabolites). En: Buchanan B, Gruissem W, Jones R (eds): *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Biologists. Segunda edición. 2000; 1250-1318.
- Das P., Saikia S., Kalita S., Hazarika L.K., Dutta S.K. Effect of temperature on biology of red spider mite (*Oligonychus coffeae*) on three different TV clones. *Indian Journal of Agricultural Sciences*. 2012; 82 (3): 255-259.

- Dermauw W., Wybouw N., Rombauts S., Menten B., Vontas J., Grbic M., Clark R.M., Feyereisen R., van Leeuwen T. A link between host plant adaptation and pesticide resistance in the polyphagous spider mite *Tetranychus urticae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012; 113-122.
- Di Toto L., Álvarez O., Popich S., Neske A., Bardón A. Antifeedant and toxic effects of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Pest Science*. 2010; 83:307-310.
- Dzhemilev U.M., D'yakonov V.A., Tuktarova R.A., Dzhemileva L.U., Ishmukhametova S.R., Yunusbaeva M.M., de Meijere A. Short route to the total synthesis of natural muricadienin and investigation of its cytotoxic properties. *Journal of Natural Products*. 2016; 79: 2039-2044.
- Fernández S., Cordero J. Biología de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) en condiciones de laboratorio. *Bioagro*. 2007; 19 (1): 35-40.
- Flechtmann C.H.W. Ácaros de importância agrícola. 6ª. Ed. São Paulo, Nobel. 1985; 169 p.
- Gerson U., Smiley R.L., Ochoa R. Mites (Acari) for pest control. Blackwell Science Ltd. Oxford, UK. 2003.
- González-Coloma A., Guadaño A., Inés C., Martínez-Dias R., Cortes D. Selective action of acetogenin mitochondrial complex I inhibitors. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2002; 57: 1028-1034.
- González-Domínguez S.G., Santillán-Galicia M.T., González-Hernández V., Suárez Espinosa J., González-Hernández H. Variability in damage caused by the mite *Tetranychus urticae* (Trombidiformes: Tetranychidae) Koch on three varieties of strawberry. *Journal of Economic Entomology*. 2015; 1-10.
- Guadaño A., Gutiérrez C., de la Peña E., Cortes D., González-Coloma A. Insecticidal and mutagenic evaluation of two annonaceous acetogenins. *Journal of natural products*. 2000; 63(6): 773-776.

- Ismail M.S.M., Ghallab M.M.A., Soliman M.F.M., AboGhalia A.H. Acaricidal activities of some essential and fixed oils on the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. 2011; 3: 41-48.
- Isman, M. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annual Review of Entomology. 2006; 51: 45-66.
- Jacobson, M. Plants, insects, and man: their interrelationships. Economic Botany. 1982; 36: 346.
- Labouisse JP, Bellachew B, Kotecha S, Bertrand B. Current status of coffee (*Coffea arabica* L.) genetic resources in Ethiopia: implications for conservation. Genetic Resources and Crop Evolution. 2008; 55:1079-1093.
- Lümmen P. Complex I inhibitors as insecticides and acaricides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1998; 1364(2), 287-296.
- Meck E.D., Walgenbach J.F., Kennedy G.G. Association of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) feeding and gold fleck damage on tomato fruit. Crop Protection. 2012; 42: 24-29.
- Miyoshi H., Ohshima M., Shimada H., Akagi T., Iwamura H., McLaughlin J.L. Essential structural factors of annonaceous acetogenins as potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998; 1365: 443-452.
- Moraes I.V.M.D., Ribeiro P.R.V., Schmidt F.L., Canuto K.M., Zocolo G.J., Brito E.S.D., et al. UPLC–QTOF–MS and NMR analyses of graviola (*Annona muricata*) leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2016; 26(2), 174-179.
- Nicetic O., Watson D.M., Beattie G.A.C., Meats A., Zheng J. Integrated pest management of two-spotted mite *Tetranychus urticae* on greenhouse roses using petroleum spray oil and the predatory mite *Phytoseiulus persimilis*. Experimental and Applied Acarology. 2001; 25: 37-53.

- Oliveira D.C., Moraes G.J., Dias C.T.S. 2012. Status of *Aceria guerreronis* Keifer (Acari: Eriophyidae) as a pest of coconut in the State of Sao Paulo, Southeastern Brazil. *Neotropical Entomology*. 2012; 41:315-323.
- Park Y.L., Lee J.H. Leaf cell and tissue damage of cucumber caused by two spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*. 2002; 95: 952-957.
- Riahi E., Shishehbor P., Nemati A.R., Saeidi Z. Temperature effects on development and life table parameters of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Agricultural Science and Technology*. 2013; 15: 661-672.
- Ribeiro L., Vendramim J.D., Bicalho K.U., dos Santos A.M, Fernandes JB, de Andrade M, et al. *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae): A promising source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*. 2013; 55: 6-14.
- Ribeiro L.P., Akhtar Y., Vendramim J.D., Isman M.B. Comparative bioactivity of selected seed extracts from Brazilian *Annona* species and an acetogenin-based commercial bioinsecticide against *Trichoplusia ni* and *Myzus persicae*. *Crop Protection*. 2014a; 62: 100-106.
- Ribeiro L.P., Ansante T.F., Vendramim J.D. Efeito do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* no desenvolvimento e comportamento alimentar de *Spodoptera frugiperda*. *Bragantia*. 2016; En imprenta. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.473>.
- Ribeiro L.P., Mota L.H.C., D'Alessandro C.P., Vendramim J.D., Delalibera Jr, I. In vitro compatibility of an acetogenin-based bioinsecticide with three species of entomopathogenic fungi. *Florida Entomologist*. 2014c; 97(4):1395-1403.
- Ribeiro L.P., Vendramim J.D., Andrade M.S., Bicalho K.U., Silva M.F.G.F., Vieira P.C., Fernandes J.B. Tropical Plant Extracts as Sources of Grain-protectant compounds against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Neotropical Entomology*. 2014d; 43:470-482.

- Ribeiro L.P., Zanardi O.Z., Vendramim J.D., Yamamoto P.T. Comparative toxicity of an acetogenin-based extract and commercial pesticides against citrus red mite. *Experimental and Applied Acarology*. 2014b.
- Saxena B.P., Tikku K., Atal C.K., Koul O. Insect anti-fertility and antifeedant allelochemicals in *Adhatoda vasica*. *Insect Science and its Application*. 1986; 7(4): 489-493.
- Senthil-Nathan S. Physiological and biochemical effect of neem and other Meliaceae plants secondary metabolites against Lepidopteran insects. *Frontiers in Physiology*. 2013; 4: 1-17.
- Silva-Aguayo, G., Botanical Insecticides, E. Radcliffe, W. Hutchison and R. Cancelado (Eds.), University of Minnesota, St. Paul. URL: <http://ipmworld.umn.edu2013>
- Staver C, Guharay F, Monterroso D, Muschler RG. Designing pest-suppressive multistrata perennial crop systems: shade-grown coffee in Central America. *Agroforestry Systems*. 2001; 53: 151-170.
- Suekane R., Degrande P.E., de Melo E.P., Bertonecello T.F., de Lima Jr I.S., Kodama C. Damage level of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) in soybeans. *Revista Ceres*. 2012; 59(1): 77-81.
- Tehri K., Gulati R., Geroh M. Damage potential of *Tetranychus urticae* Koch to cucumber fruit and foliage: Effect of initial infestation density. *Journal of Applied and Natural Science*. 2014; 6(1): 170-176.
- Temis-Pérez AL, López-Malo A., Sosa-Morales M. Producción de café (*Coffea arabica* L.): cultivo, beneficio, plagas y enfermedades. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 2011; 5(2): 54-74.
- Theis N, Lerdau M. The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal of Plant Sciences*. 2003; 164(3): 93-102.

- Tormo J.R., Gallardo T., Gonzalez M.C., Bermejo A., Cabedo N., Andreu I., Estornell E. Annonaceous acetogenins as inhibitors of mitochondrial complex I. *Current Topics in Phytochemistry*. 1999. 2:69-90.
- Van de Vrie, M. 1985. Greenhouse ornamentals. In: Spider mites. Their biology, natural enemies and control, W. Helle and M.W. Sabelis (eds.), Vol 1b, pp. 273-283. Elsevier, Amsterdam.
- van Leeuwen T., Vontas J., Tsagkarakou A., Dermauw W., Tirry L. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: A review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2010; 40(8):563-572
- Vit P, Santiago B, Pérez-Pérez EM. Composición química y actividad antioxidante de pulpa, hoja y semilla de guanábana *Annona muricata* L. *Interciencia*. 2014; 39(5): 350.

CAPÍTULO VII

PROPUESTA

TITULO

Efecto del extracto etanólico de semilla de *Annona cherimola* en el control de *Oligonychus coffeae*

7.1. DATOS INFORMATIVOS

Se localizará en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, conjuntamente con la asesoría técnica de profesionales de AGROCALIDAD.

7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA

De acuerdo a los registros de aplicaciones de acaricidas en el cultivo de café, lo cual conlleva numerosos problemas ambientales y de salud pública. En tal sentido, se hace necesario propiciar y fomentar el conocimiento acerca de alternativas de control de los ácaros plagas, tales como *Oligonychus coffeae* (arañita roja del café) de manera que resulten sustentables y amigables con el ambiente pero asegurando una buena productividad y rentabilidad entre los productores de café del Ecuador. De esta manera se intenta contribuir a la concientización a los productores sobre el impacto del uso excesivo de acaricidas para tratar de mitigar su efecto sobre el ambiente y también evitar el desarrollo de resistencia de la plaga.

7.3. JUSTIFICACIÓN

Con la aplicación de los extractos etanólicos obtenidos de chirimoya con el fin de controlar a la arañita roja en plantas de café se intenta proponer una alternativa ecológicamente sustentable para el manejo de poblaciones de ácaros plaga de manera de ofrecer una opción para substituir el uso indiscriminado de plaguicidas. Esta experiencia se soporta en la idea del uso de plaguicidas botánicos que podrían estar disponibles tanto a pequeños como medianos y grandes productores, disminuyendo los costos de producción y consecuentemente los daños al ambiente. Además de ofrecer la posibilidad a los consumidores de adquirir productos sanos debido a que

disminuye el contenido de residuos de plaguicidas, lo que repercute en mejor salud del público consumidor.

7.4. OBJETIVOS

- Aplicar extractos etanólicos de semillas de *Annona cherimola* (chirimoya) para el control de *Oligonychus coffeae* en el cultivo de café en dosis entre 625 y 10.000 mg/L.

7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD

Con la aplicación de esta propuesta se podrá disminuir las diferentes formas móviles de *O. coffeae* en plantaciones de café. La factibilidad del uso de esta alternativa propuesta se fundamenta en la posibilidad de su obtención dada la disponibilidad del recurso (semillas de chirimoya), el bajo costo para su obtención, facilidad e inocuidad de su aplicación y principalmente en la efectividad del control que ejerce sobre la plaga.

7.6. FUNDAMENTACIÓN

La obtención de frutos de café sanos es un requerimiento de consumidores y mercados internacionales. Para ello, es preciso tener en cuenta medidas de manejo de plagas que cumplan con esta necesidad, entre las cuales se incluye el uso de plaguicidas botánicos, los cuales dado su contenido de metabolitos secundarios con efecto biocida, se asegura un nivel aceptable de control de las poblaciones plagas con el mínimo impacto en el ambiente y en la salud pública.

7.7. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO

- **Determinación de la incidencia de ácaros en el cultivo de café (etapa de monitoreo)**

Se deben hacer muestreos frecuentes en plantaciones de café, revisando el haz de la hoja para determinar síntomas de alimentación de las arañas rojas que se caracterizan por la presencia de punteaduras blanco-amarillentas y además la presencia de la plaga, la cual es evidente por su coloración marrón.

- **Preparación del extracto etanólico de semillas de chirimoya**

Se deben secar y triturar las semillas obtenidas de frutas fisiológicamente maduras. Posteriormente el polvo es sometido a maceración con etanol concentrado y destilación. Con este extracto se prepararán las diluciones respectivas, de acuerdo al grado de infestación de la plaga.

- **Aplicación del extracto etanólico de semillas de chirimoya**

Una vez obtenida la dilución requerida, se procederá a aplicarlos con la ayuda de una bomba mochila, teniendo el cuidado de cubrir toda la hoja, principalmente las del tercio medio de la copa que es la zona preferida por la plaga.

7.8. ADMINISTRACIÓN

Se trabajará con los productores bajo el asesoramiento del investigador. Conjuntamente con la supervisión y asistencia técnica de profesionales de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.