

Evaluación de la actividad insecticida de extractos vegetales de *Chrysanthemum coronarium* L.

M. J. PASCUAL-VILLALOBOS

Del género *Chrysanthemum* es bien conocida la actividad insecticida de las piretrinas que se acumulan en las flores, habiendo sido menos estudiada la naturaleza y actividad de otros compuestos químicos de las partes vegetativas. En este estudio se ha evaluado la actividad insecticida de los extractos de partes aéreas (hojas y tallos) de *Chrysanthemum coronarium*, especie muy abundante en el sur de la Península Ibérica, utilizando el coleóptero *Tribolium castaneum*.

Al incorporar extractos crudos a la dieta a dosis de 0,1 y 0,05% se obtuvo una mortalidad alta (60-100%) y se detectó también inhibición del desarrollo en las larvas supervivientes. Las aplicaciones tóxicas causaron mortalidad en larvas y pupas y las alteraciones morfológicas características de un regulador de crecimiento, en mayor o menor intensidad dependiendo de la dosis y del extracto aplicados. En pupas se indujo la aparición de formas inviábiles pupa-adulto. En el bioensayo de toxicidad por contacto con discos de papel de filtro, se detectó metamorfosis precoz de larvas. Se discuten los distintos tipos de actividad obtenidos, y posibles compuestos responsables.

M. J. PASCUAL-VILLALOBOS: Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua, CIDA, Estación Sericícola, 30150 La Alberca, Murcia

Palabras clave: Compuestos naturales, extractos de *Chrysanthemum*, inhibición del desarrollo, *Tribolium castaneum*.

INTRODUCCIÓN

En la agricultura actual se hace necesario el uso de productos fitosanitarios, aunque la utilización masiva de plaguicidas sintéticos de amplio espectro tiene efectos negativos: desarrollo de resistencias, aparición de nuevas plagas, eliminación de insectos útiles etc.

Las plantas sintetizan gran diversidad de metabolitos secundarios, también llamados productos naturales, que intervienen en las interacciones planta-insecto. Según CAMPS (1988) se pueden encontrar sustancias de origen vegetal con actividad mimética y antagonista de hormonas de insectos: fitojuvénoides, antihormonas juveniles, fitoecdisteroides y antiecdisonas. Asimismo diversos

productos vegetales tienen actividad inhibidora de alimentación para insectos (SCHOOHOVEN, 1982). Los compuestos naturales pueden servir de base para el desarrollo de nuevos productos fitosanitarios más selectivos y menos contaminantes.

La familia Compositae se caracteriza por su gran diversidad fitoquímica. El género *Chrysanthemum* es conocido por sus propiedades insecticidas, ya que de las flores de *Chrysanthemum cinerariifolium* se extrae el piretro o pelitre, uno de los primeros insecticidas vegetales descubiertos. Distintos autores han destacado otras especies en las que se ha detectado similar actividad: *Chrysanthemum balsamita* (BESTMANN *et al.*, 1987), *Chrysanthemum coronarium* (BOWERS y AREGULLIN, 1987), *Chrysanthemum vulgare*

(HOUGH-GOLDSTEIN y HAHN, 1992) y *Chrysanthemum indicum* (KAUR *et al.*, 1989) entre otras.

C. coronarium es muy frecuente en veredas y caminos, especialmente del sur de la Península Ibérica, aunque su distribución general incluye, además del área Mediterránea, el Suroeste de Asia y la Macaronesia (VALDÉS *et al.*, 1987). Las poblaciones más frecuentes poseen flores hemiliguladas blancas, con base amarillo oro (variedad discolor) y rara vez enteramente amarillas. Se trata de una especie abundante y en general poco colonizada por insectos.

En este estudio se ha evaluado la actividad insecticida de los extractos de partes aéreas de *C. coronarium* y se profundiza sobre los distintos tipos de actividad mostrados al utilizar como patrón el coleóptero *Tribolium castaneum*, que es una plaga de productos almacenados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal y preparación de extractos

Semillas de la especie *C. coronarium* nos fueron proporcionadas del banco de germoplasma del USDA (nº de identificación PI537091). La especie se cultivó en 1994 en una finca experimental del Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario de Murcia. Cuando las plantas se encontraban en floración (Figura 1), se recolectaron partes aéreas (hojas y tallos, solo) para su posterior liofilización.

Al material liofilizado (1 g) se añadieron 10 ml de hexano permitiendo la extracción durante un periodo de 48 h a temperatura ambiente (20 °C), posteriormente se filtró y evaporó el disolvente con un rotavapor ($T^{\circ} < 40^{\circ}\text{C}$) obteniendo el extracto crudo de hexano (H). Al residuo de material vegetal (después de esta primera extracción), se añadieron 10 ml de acetona, procediéndose de idéntica manera para la obtención del extracto crudo de acetona (A).



Fig 1.—*Chrysanthemum coronarium* en floración.

Insectos

Para los ensayos se utilizaron larvas y pupas de *Tribolium castaneum* obtenidas de crías mantenidas en una estufa en el laboratorio, a temperatura constante de 30 °C y oscuridad, alimentadas con una dieta artificial a base de harina integral de trigo y levadura en la proporción 20:1, respectivamente.

Bioensayos

De incorporación a dieta

Los extractos crudos fueron incorporados a la dieta a concentraciones de 0,1 y 0,05% (1000 y 500 ppm respectivamente) y suministrados a larvas de los primeros estadios. Para cada concentración se evaluaron ambos extractos (H y A) con respecto a un control (sin extracto) en ensayos de 10 repeticiones. Cada repetición constaba de 100 mg de dieta tratada, en un pequeño vial de cristal de 4 ml con tapón de rosca, en el que se colocaban 2 larvas de 10 días (longitud aproximada de 1,5 mm). Los extractos se incorporaron a la dieta disueltos en acetona, por lo que después fue necesaria la evaporación del disolvente (48 h a 40 °C en estufa), previamente a la colocación de los insectos. El ensayo se mantuvo durante 10 días en condiciones de

cría (30 °C y oscuridad) y transcurrido ese tiempo se anotó la mortalidad y la longitud de las larvas supervivientes. Con este bioensayo se puede evaluar la actividad inhibidora del desarrollo y/o de la alimentación.

Aplicaciones tópicas

Se realizaron aplicaciones tópicas en larvas de los últimos estadios (edad 25 días) y pupas de 24 h, para evaluar la toxicidad por contacto y las posibles alteraciones morfológicas (actividad hormonal) causadas en los insectos. Se utilizaron ambos extractos (H y A) y se aplicaron tópicamente a dosis de 5, 10 y 30 µg/insecto, utilizando como disolvente acetona y controles a los que sólo se aplicaba el disolvente. Se trataron 10 pupas y 10 larvas por cada dosis y extracto, individualizando cada insecto en un tubo de ensayo de cristal y realizando las aplicaciones con una jeringa Hamilton, que se enjuagaba 10 veces con acetona entre cada dos tratamientos. Después de las aplicaciones, los tubos se mantuvieron, sin tapar, en las condiciones de cría (30 °C y oscuridad).

Las larvas se observaron a los 1, 6, y 12 días, anotando la mortalidad y el número de insectos con alteraciones morfológicas. Después de la primera observación, se añadió dieta para evitar la muerte de las larvas por falta de alimento.

Las pupas se observaron a los 1, 4, 6, 12, 18 y 21 días, anotando la mortalidad; cuando emergían los adultos se añadía dieta, para evitar la muerte por falta de alimento. Además, a los 6 días se examinaron los insectos (utilizando una lupa binocular de 10-40 aumentos) para detectar actividad reguladora del crecimiento, clasificándolos según la escala proporcionada por MANDAVA (1985):

0 = adulto normal

1 y 2 = adulto de apariencia normal, pero con alteraciones en los órganos genitales

3 = formas intermedias pupa - adulto (que presentan cabeza adultoide y tórax con abdomen pupal)

4 = pupa

Toxicidad por contacto con discos de papel de filtro

Los extractos disueltos en el disolvente a concentraciones de 10 y 1 mg/ml se aplicaron a discos de papel de filtro (250 µl por cada disco de 5 cm de diámetro) utilizando controles y dos repeticiones por dosis y extracto. El disolvente se evaporó con posterioridad, manteniendo los discos a 40 °C en una estufa durante 24 h. Sobre los discos, colocados en el interior de placas de Petri de cristal, se depositaron 20 larvas del último estadio (edad 25 días). Las placas se mantuvieron en condiciones de cría (30 °C y oscuridad) y se observó la mortalidad acumulada a los 4, 6, 8 y 10 días así como el número de días necesarios para iniciar la metamorfosis en cada tratamiento.

Métodos estadísticos

Para la comparación de los distintos tratamientos con respecto al control se utilizó el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

RESULTADOS

Bioensayo de incorporación a dieta

En el Cuadro 1 se indican los resultados obtenidos al incorporar los extractos a la dieta. Se observa variación en la mortalidad tanto entre dosis como entre tipos de extracto. En cualquier caso, las larvas supervivientes (1,5-2,0 mm) son, a los 10 días, considerablemente menores en longitud que las del control (4,2-4,6 mm) siendo el test Mann-Whitney altamente significativo ($P < 0.001$). Estos resultados indican una actividad inhibidora del desarrollo y/o de la alimentación en larvas causada por los extractos vegetales evaluados.

Aplicaciones tópicas

Las aplicaciones tópicas de los extractos causaron mortalidad y alteraciones morfológicas en larvas y pupas. En el Cuadro 2

Cuadro 1.-Mortalidad y longitud de larvas supervivientes en el bioensayo de incorporación de los extractos vegetales en la dieta.

Tratamiento ¹	Dosis (%)	Mortalidad ² (%)	Longitud larvas ² (mm)
Extracto H	0,10	100,0	-
Extracto H	0,05	87,5	1,4 ± 0,15
Extracto A	0,10	100,0	-
Extracto A	0,05	60,0	1,9 ± 0,08
Control	0,00	0,0	4,4 ± 0,19

¹H = de hexano; A = de acetona

²El test estadístico U de Mann-Whitney, para comparación de los tratamientos con el control, es altamente significativo (P < 0,001) en todos los casos

Cuadro 2.-Mortalidad en larvas y pupas a los 6 días de aplicación tópica de extractos.

Extracto ¹	Dosis µg/insecto	N.º insectos muertos (total = 10) ²	
		Larvas	Pupas
H	5	9 ***	7 *
	10	7 **	8 **
	30	10 ***	10 ***
A	5	6 *	2 n.s.
	10	3 n.s.	5 n.s.
	30	9 ***	9 ***
Control	0	0	1

¹H = de hexano; A = de acetona

²Significación estadística del test de U de Mann-Whitney

n.s. no significativo

* 0,01 < P < 0,05

** 0,001 < P < 0,01

*** P < 0,001

Cuadro 3.-Actividad reguladora del crecimiento producida por aplicaciones tópicas a pupas.

Extracto ¹	Dosis µg/pupa	Actividad reguladora del crecimiento ² (escala 0-4)
H	5	2,3
	10	2,5
	30	3,2
A	5	0,6
	10	1,6
	30	2,7
Control	0	0,0

¹H = de hexano; A = de acetona

²valores medios (n=10)

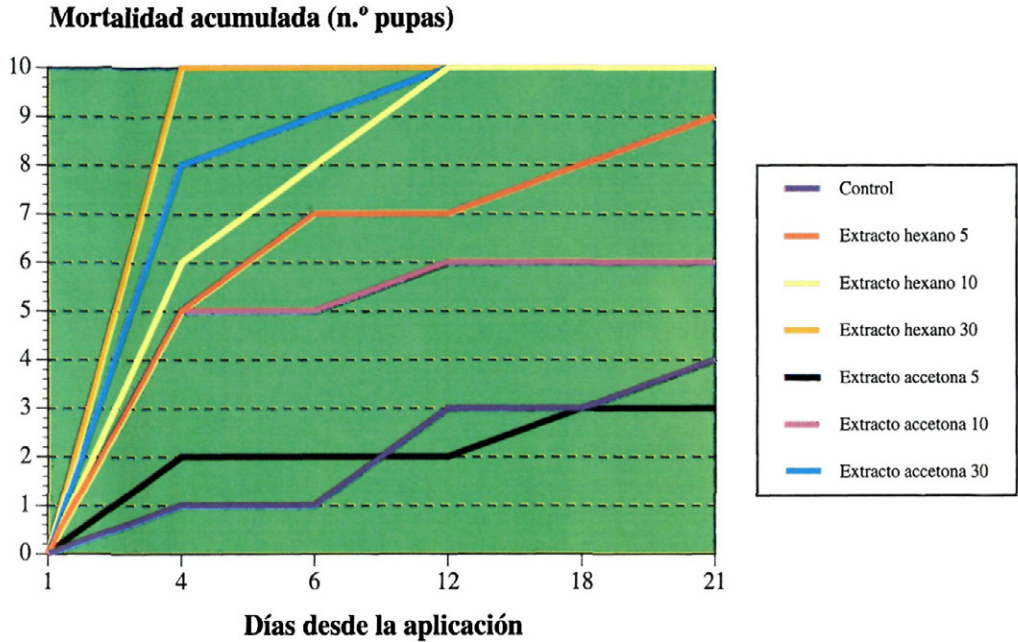


Fig 2.-Mortalidad de pupas (número total de insectos por tratamiento = 10) causada por la aplicación tópica de extractos (dosis en µg/pupa).

podemos observar que a los 6 días de la aplicación, los extractos de hexano habían producido un efecto más evidente, tanto en larvas como en pupas (mortalidad 70–100%) en comparación a los de acetona (mortalidad 20–90%). En la Figura 2, se representa la mortalidad acumulada y se observa un efecto mortal rápido a los 4 días de la aplicación a pupas y uno más lento hasta los 20 días.

Por otra parte, se observaron alteraciones morfológicas características de un regulador de crecimiento, cuando las aplicaciones se realizaron sobre pupas. En el Cuadro 3 se indican los resultados obtenidos al clasificar los insectos obtenidos según la escala (de menor a mayor actividad). Los extractos de hexano, para cualquiera de las dosis evaluadas, y también los de acetona a las mayores dosis, produjeron formas intermedias pupa-adulto (Figura 3). El histograma de la Figura 4 resume la clasificación de los insectos según los efectos obtenidos después de los



Fig 3.-Adultoide de *T. castaneum* obtenido por aplicación tópica a pupa.

distintos tratamientos; se puede observar que el control produce el 100% de adultos normales mientras que los extractos más activos (valores de 3 y 4 en la escala) son los de hexano a 5,10 y 30 $\mu\text{g/pupa}$ y el de acetona a 30 $\mu\text{g/pupa}$.

Toxicidad por contacto con discos de papel de filtro

Se detectó actividad en disoluciones de los extractos de 10 mg/ml, pero no en las de 1 mg/ml. La mortalidad causada en larvas a los 6 días de colocarlas en contacto con los discos fue del 50 y 52,5% para los extractos de hexano y de acetona respectivamente, aunque el porcentaje aumentó a los 10 días (Figura 5). En este bioensayo fueron más numerosas las alteraciones en larvas causadas por los extractos de acetona (Figura 6). La actividad por contacto en larvas se ha manifestado por parálisis y necrosis de las mismas, causando la muerte (Figura 7). Estos efectos son, probablemente, consecuencia de la actividad reguladora del crecimiento de los extractos, que produce una metamorfosis precoz en larvas ocasionando la muerte. En la Figura 8 se observa que aquellas larvas que han estado en contacto con discos tratados con el extracto, inician antes la metamorfosis (4–8 días) en comparación al control (12 días).

DISCUSIÓN

Se ha detectado y evaluado la actividad insecticida en los extractos vegetales de *C.coronarium* utilizando el insecto *T.castaneum*, aunque no se han realizado estudios sobre los compuestos responsables de dichos efectos.

Cuando se incorporan a la dieta, se produce mortalidad e inhibición del desarrollo, aunque no está claro, por el tipo de ensayo utilizado, si esto es una consecuencia de la inhibición de la alimentación o bien un efecto tóxico por ingestión. PICMAN (1985),

ha publicado una revisión sobre la actividad biológica de los sesquiterpenos del tipo lactona que son abundantes en las especies de la familia Compositae. Se menciona que este tipo de compuestos puede tener actividad inhibitoria de alimentación, del desarrollo y de la oviposición en insectos, aunque no tienen actividad por contacto. Por ejemplo, en *Chrysanthemum macrophyllum* las lactonas del tipo sesquiterpeno son deterrenes de alimentación en adultos y larvas de *Tribolium confusum* y *Sitophilus granarius*.

Cuando se evalúa la actividad por contacto, los extractos producen mortalidad y las alteraciones características de los reguladores de crecimiento, ocasionando metamorfosis precoz. BOWERS y AREGULLIN (1987) detectaron actividad de antihormona juvenil debida a un poliacetileno extraído de *C.coronarium*, cuando se aplicó a *Oncopeltus fasciatus*. CUÑAT *et al.* (1990) también ha señalado que extractos obtenidos de las partes aéreas de *C.coronarium* producían metamor-



Fig 7.—Toxicidad por contacto en larva de *T. castaneum*.

N.º insectos en cada estado a los 6 días

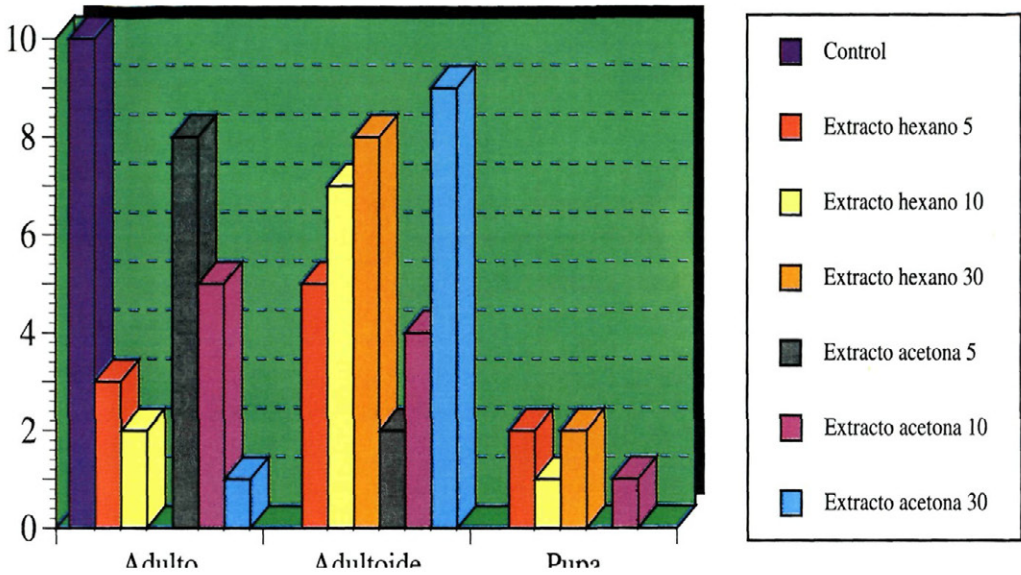


Fig 4.-Histograma de alteraciones morfológicas (número total de insectos por tratamiento = 10) obtenidas en aplicaciones tópicas a pupas (dosis en µg/pupa).

Mortalidad en larvas (%)

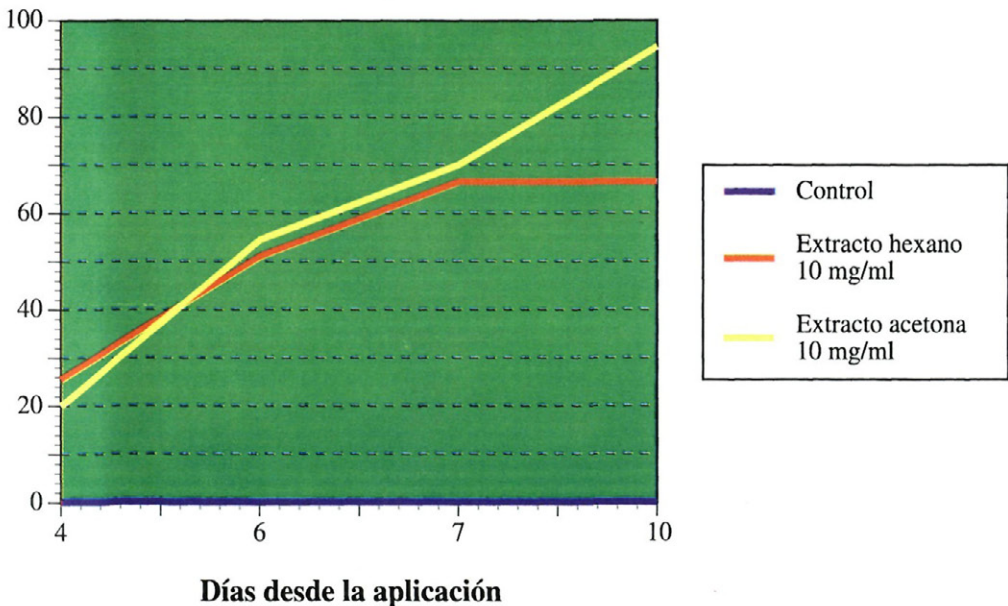


Fig 5.-Mortalidad en larvas (%) causada por contacto con discos de papel de filtro tratados con extractos.

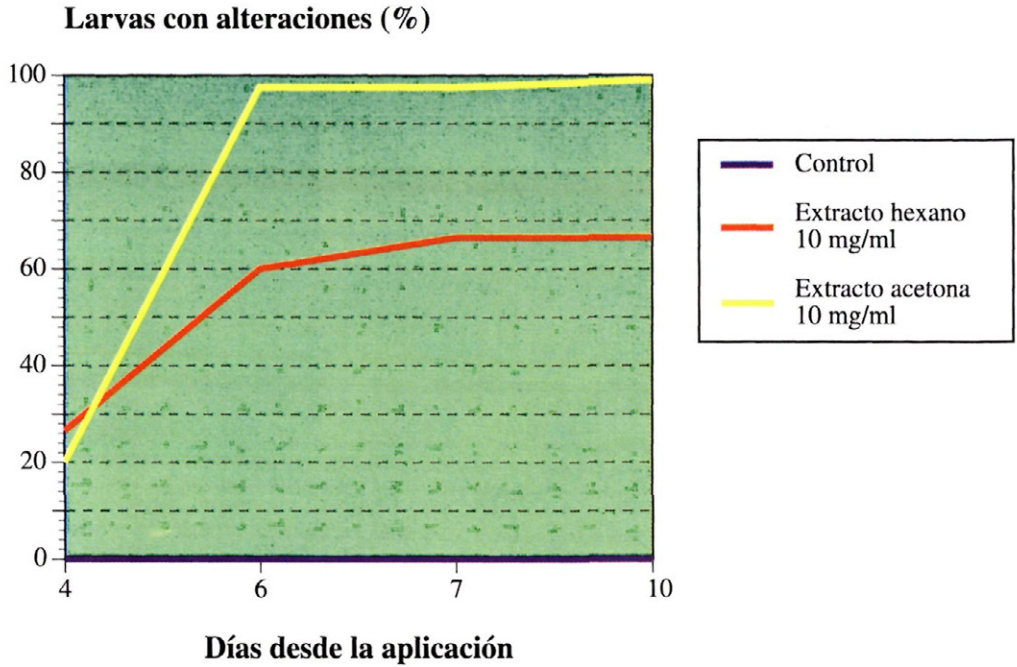


Fig 6.-Larvas con alteraciones (%) en el ensayo de toxicidad por contacto con discos de papel de filtro.

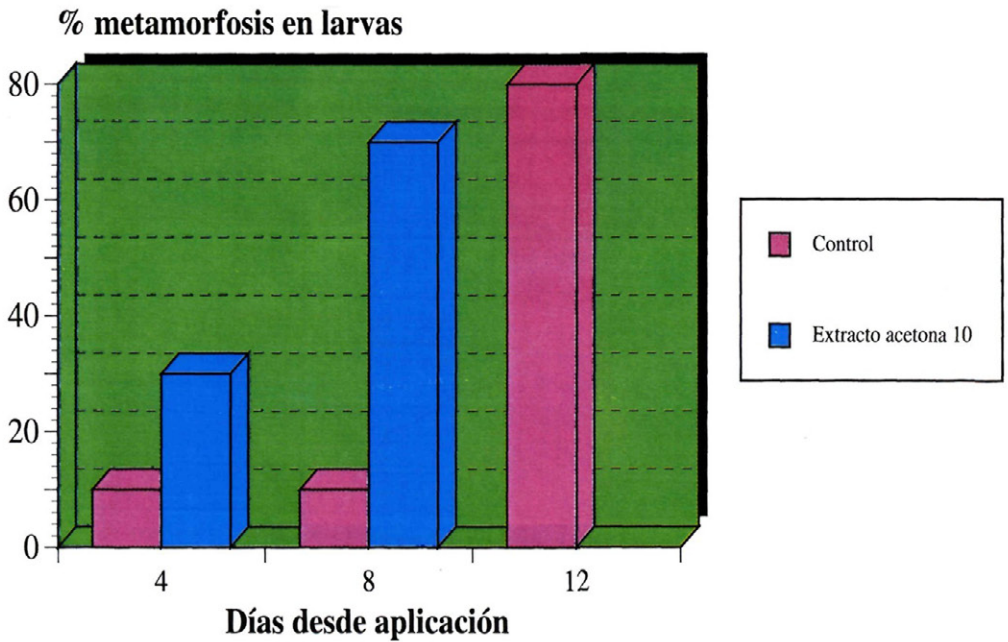


Fig 8.-Días necesarios para iniciar la metamorfosis en larvas de la misma edad que han estado en contacto con discos tratados con extractos (dosis 10 mg/ml).

fosis precoz y, aunque el compuesto responsable no se ha identificado, los estudios químicos revelan que no guarda similitud con los precocenos, que son un tipo de productos frecuentes en las compuestas y se caracterizan por inducir metamorfosis precoz (GONZÁLEZ *et al.*, 1991).

Al parecer, los compuestos presentes en *C. coronarium* presentan actividad plaguicida en otros organismos. Así, CUÑAT *et al.* (1990) señalan acción ovicida en el escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*); TIYAGI *et al.* (1988) encuentran actividad nematocida si se entierran partes de la planta troceadas y TADA y CHIBA (1984) detectan actividad inhibidora de la alimentación en el gusano de seda (*Bombix mori*). Quedaría por comprobar la eficacia de los extractos de esta especie frente a otras plagas.

En los ensayos descritos, se ha evaluado la actividad de extractos crudos que contienen numerosos compuestos, algunos de los cuales pueden ser comunes en los extractos

de hexano y acetona. Será necesario proceder a un fraccionamiento de tales extractos de *C. coronarium* para posteriormente evaluar su actividad y aislar el o los compuestos activos.

Previamente, no obstante, habrá que multiplicar el material vegetal para obtener mayores cantidades de extracto.

Se han detectado dos actividades: una inhibidora del desarrollo y una hormonal, que pueden ser debidas o no a compuestos distintos. Otros estudios indican que los reguladores del crecimiento de insectos también tienen acción por ingestión, interfiriendo con la alimentación de los insectos (BUDIA *et al.*, 1994).

AGRADECIMIENTOS

Este estudio forma parte del proyecto de investigación SC94-039 financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria.

ABSTRACT

PASCUAL-VILLALOBOS, M. J., 1996: Evaluation of the insecticidal activity of *Chrysanthemum coronarium* L. plant extracts. *Bol. San Veg. Plagas*, 22 (2): 411-420.

The genus *Chrysanthemum* is well known for the insecticidal activity of the pyrethrins accumulated in its flowers, but other possible active compounds from vegetative parts have received less attention. In this study, an evaluation of the anti-insect activity against *Tribolium castaneum* of extracts from aerial parts (leaves and stems) of *Chrysanthemum coronarium*, a composite commonly present at the South of the Iberian Peninsula, was carried out.

When extracts were mixed with the diet at doses of 0,1 and 0,05%, a high mortality (60-100%) and growth inhibition of surviving larvae were produced. Topical applications induced mortality in larvae and pupae and morphological alterations similar to those caused by insect growth regulators, although results were dependent upon dose and extract evaluated. Applications in pupae produced the appearance of pupae-adult inviable intermediates. In the bioassay of contact toxicity using filter paper discs, a precocious metamorphosis of larvae in comparison with the control was detected. Different activities observed, possible active compounds and the convenience of performing future in depth studies with this species are discussed.

Key words: Natural products, *Chrysanthemum* extracts, growth inhibition, *Tribolium castaneum*

REFERENCIAS

- BESTMANN, H. J.; CLASSEN, B.; KOBOLD, U.; VOSTROWSKY, O. Y KLINGAU, F., 1987: Botanical insecticides, IV. The insecticidal effect of the essential oil from the costmary chrysanthemum, *Chrysanthemum balsamita* L. *Anzeiger für Schadlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz*, **60** (2),31-34.
- BOWERS, W. S.; AREGULLIN, M., 1987: Discovery and identification of an antijuvenile hormone from *Chrysanthemum coronarium*. *Proceedings of the International Symposium on Insect Physiology, Biochemistry and Control*. Rio de Janeiro, Brasil, 10-13 Noviembre 1987.
- BUDIA, F.; MARCO, V. Y VIÑUELA, E., 1994: Estudios preliminares de los efectos del insecticida RH-5992 sobre larvas de distintas edades de *Spodoptera exigua* (Hübner). *Bol. San. Veg. Plagas*, **20**,401-408.
- CAMPS, F., 1988: Relaciones planta-insecto, Insecticidas de origen vegetal. En: X. Belles (ed): *Insecticidas bioracionales*. Colección Nuevas Tendencias nº9, C.S.I.C., Madrid. pp.69-86.
- CUÑAT, P.; PRIMO, E.; SANZ, I.; GARCERA, M. D.; MARCH, M. C.; BOWERS, S. B. Y MARTÍNEZ-PARDO, R., 1990: Biocidal activity of some spanish mediterranean plants. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 497-500.
- GONZÁLEZ, A. G.; AGUIAR, Z. E.; GRILLO, T.; LUIS, J. G.; RIVERA, A. Y CALLE, J., 1991: Chromenes from *Ageratum conyzoides*. *Phytochemistry*, **30** (4),1137-1139.
- HOUGH-GOLDSTEIN, J. Y HAHN, S. P., 1992: Antifeedant and oviposition deterrent activity of an aqueous extract of *Tanacetum vulgare* L. on two cabbage pests. *Environmental Entomology*, **21** (4),837-844.
- KAUR, A. K., THAKUR, S. S. Y RAJA, S. S., 1989: *Chrysanthemum indicum* an effective growth and development inhibitor of *Dysdercus similis*. *Journal of Environmental Biology*, **10** (4),373-377.
- MANDAVA, N. B., 1985: *Handbook of natural pesticides: methods. Volume I, Theory, Practice and Detection*. CRC Press, Boca Raton, Estados Unidos. p. 480.
- PICMAN, A. K., 1986: Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology*, **14** (3),255- 281.
- SCHOONHOVEN, L. M., 1982: Biological aspects of anti-feedants. *Ent.exp & appl.*, **31**, 57-69.
- TADA, M. Y CHIBA, K., 1994: Novel plant growth inhibitors and an insect antifeedant from *Chrysanthemum coronarium* (japanese name: shungiku). *Agric. Biol. Chem.*, **48** (5),1367-1369.
- TIYAGI, S. A.; BANO, M. Y ALAM, M. N., 1988: Evaluation of nematicidal potential in some plant species belonging to family Compositae. *Indian Journal of Nematology*, **18**, 228-231.
- VALDÉS, B.; TALAVERA, S. Y FERNÁNDEZ-GALIANO E., 1987: *Flora Vascular de Andalucía Occidental. Volumen 3*. Ketnes Editora, Barcelona. p. 64-65.

(Aceptado para su publicación: 12 febrero 1996).