



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DE LA FITOTOXICIDAD
OCASIONADA POR INSECTICIDAS EN CHILE
(*Capsicum annum* L) cv. Ancho San Luis Y TOMATE
(*Lycopersicon esculentum*) cv. Río Grande EN LA
PAZ, B.C.S. (MEXICO)**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos
Naturales
(Orientación en Ecología)

p r e s e n t a

José Luis García Hernández

La Paz, B.C.S. Junio del 2001

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 04 del Mes de Junio del 2001, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., para revisar la Tesis de Grado titulada:

"Evaluación de la fitotoxicidad ocasionada por insecticidas en chile (*Capsicum annum* L.) cv. Ancho San Luis y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Río Grande en La Paz, B.C.S. (México)"

Presentada por el alumno:

José Luis García Hernández

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN ECOLOGIA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA



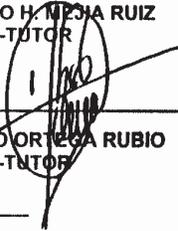
DR. ENRIQUE TROYO DIEGUEZ
DIRECTOR DE TESIS



DR. CLAUDIO H. MEJÍA RUIZ
CO-TUTOR



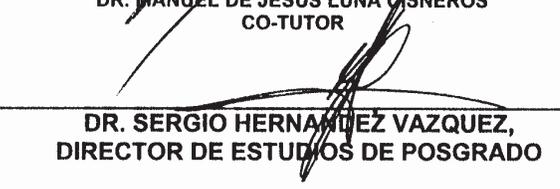
DR. HECTOR NOLASCO SORIA
CO-TUTOR



DR. ALFREDO ORTEGA RUBIO
CO-TUTOR



DR. MANUEL DE JESUS LUNA CISNEROS
CO-TUTOR



DR. SERGIO HERNÁNDEZ VAZQUEZ,
DIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Comité Tutorial

Director: Dr. Enrique Troyo Diéguez

Co-tutor: Dr. Héctor Nolasco Soria

Co-tutor: Dr. Hamlyn G. Jones

Co-tutor: Dr. Alfredo Ortega Rubio

Comité Revisor de Tesis

Dr. Enrique Troyo Diéguez

Dr. Héctor Nolasco Soria

Dr. Alfredo Ortega Rubio

Dr. Manuel de Jesús Luna Cisneros

Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz

Jurado de Examen

Dr. Enrique Troyo Diéguez

Dr. Héctor Nolasco Soria

Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz

Dr. Alfredo Ortega Rubio

Dr. Manuel de Jesús Luna Cisneros

Suplente: Dr. David Raúl López Aguilar

Ya que vamos a compartir nuestras vidas tan íntimamente con estos compuestos químicos -alimentándonos de ellos y bebiéndolos, siendo asimilados por las mismas entrañas de nuestros huesos- sería conveniente conocer algo sobre su naturaleza y su poder...

Rachel Carson, *Silent Spring*

A G R A D E C I M I E N T O S

Doy Gracias a Dios por sobre todas las cosas, el haberme permitido culminar esta etapa de mi vida.

Nada de lo que he logrado hubiera sido posible, sin la inversión que muchas personas han hecho en mi vida y a través del proceso que culmina con esta tesis, y aunque quisiera me sería imposible nombrar a todas estas personas, sin embargo, deseo nombrar a las que han estado más cerca de esta última etapa.

Quiero expresar mi agradecimiento a mi Comité Tutorial, encabezado por el Dr. Enrique Troyo quien me guió y me apoyó en todo lo necesario para desarrollar y culminar este trabajo. Asimismo agradezco a los Doctores Héctor Nolasco, Alfredo Ortega y Hamlyn G. Jones, quienes siempre estuvieron disponibles para apoyarme en cualquier necesidad académica y de cualquier otra índole que se presentó. Agradezco también a los Doctores Manuel Luna Cisneros y Claudio H. Mejía, por sus valiosas aportaciones en la revisión de esta Tesis. Agradezco también al Dr. Raúl López su participación como sinodal suplente.

Agradezco a las autoridades del CIBNOR, principalmente al Dr. Mario Martínez y al Dr. Sergio Hernández por las facilidades que me otorgaron para formar parte del Programa de Formación de Recursos Humanos. Al mismo tiempo quiero agradecer al personal del área de Posgrado, Lic. Osvelia Ibarra, Lic. Leticia González, Horacio Sandoval y Manuel Melero por las facilidades que siempre prestaron a un servidor. De igual manera al Dr. Ellis Glazier por su ayuda en la redacción de varios artículos y del Maestro Ira Fogel por su ayuda en la redacción del *abstract* de esta tesis.

Agradezco al CONACYT el haberme otorgado la beca con el registro 112066.

Esta investigación recibió apoyo de los Proyectos SIMAC 990106010, CONACYT R28947B y CIBNOR principalmente a través del proyecto AGE-4.

A quienes me ayudaron con sus consejos y valiosas sugerencias, Dr. Pedro Cano, Dr. Urbano Nava y Dr. Emiliano Gutiérrez, maestros de mi Alma Terra Mater, y al Dr. Félix Ayala (\cong). A mis compañeros y amigos: Héctor Fraga, Bernardo Murillo, Alejandra Nieto, Andres Orduño, Edgar Rueda, Juan Larrinaga, Alvaro González, Bertha A. Calderón, Rosalía Servín, Luis Landa, Lidia Hírales, Silvia Virgen, Verónica Hírales, Carmen Mercado, Pedro Saucedo, Dariel Tovar, Silverio López de todos ellos agradezco su amistad, compañerismo, sugerencias y colaboraciones. Estoy seguro que, sin querer, estoy omitiendo los nombres de algunas personas en esta lista pero a todos ellos les agradezco sinceramente su participación.

Con Amor

A Clara, de quien ahora más que nunca reconozco lo valiosa que es para mi.

A mis hijos Edgar Miguel, Cynthia Karina y José Carlos

A mis Padres José Luis y María y mis hermanos Ivonne, Griselda, Jorge

Polita y Carmela

SINTESIS DE RESULTADOS

1. La aplicación excesiva de los productos Gusatión 35 PH, Tamarón 600 LM y Paratión 720 CE, rebasando la dosis sugerida en la etiqueta, afecta la morfología de la planta de chile, así como las variables de rendimiento, peso y tamaño del fruto, afectándolos significativamente ($p = 0.05$).
2. El uso excesivo de los insecticidas evaluados ocasiona alteraciones en las variables ecofisiológicas fluorescencia y contenido de clorofila, conductancia estomática, temperatura foliar, siendo la fluorescencia y el contenido de clorofila, las variables que mostraron mayor alteración.
3. Los insecticidas aplicados en dosis mayores a la recomendación de las etiquetas causan alteraciones directas e inmediatas en la funcionalidad de las enzimas superóxido dismutasa y peroxidasa. En el primer caso, la actividad se incrementa en un más de un 100% en promedio, mientras que la peroxidasa mostró un incremento promedio del 29% en su actividad, en comparación con el control (sin aplicación de insecticidas).
4. Los insecticidas Bioneem y Confidor mostraron una menor toxicidad que los insecticidas mencionados hacia plántulas recién germinadas
5. Por su parte, los insecticidas mencionados, así como el Oxamyl provocaron una alta mortalidad en bajas concentraciones (0.001%, en promedio) en los individuos de picudo del chile colectados en la región de estudio, cuando las aplicaciones se realizan sobre los adultos de esta especie. De tal manera que se recomienda basar el control químico de esta plaga en el uso de los productos que mostraron menor toxicidad hacia la planta: Tamarón 600 LM, Oxamyl, Bioneem, bajo un manejo integrado y exclusivamente sobre el adulto.
6. El estudio de la toxicidad de insecticidas debe involucrar suficiente experimentación relacionada con sus efectos en el agroecosistema, incluyendo la fisiología de las plantas, dado que de ello depende la calidad y valor nutricional de los productos por cosechar.

SINTESIS DE METAS

La presente Tesis Doctoral esta basada en los siguientes artículos y publicaciones de transferencia y divulgación, todos ellos generados del trabajo de tesis.

A. Los artículos propuestos en el Plan de Trabajo Individual son los siguientes:

1. **García-Hernández J.L.**, E Troyo-Diéguez, H Jones, H Nolasco-Soria, A Ortega-Rubio. 2000. Efectos de dosis y frecuencias de aplicación de insecticidas organofosforados sobre parámetros fisiológicos de hoja en ají (*Capsicum annum* L. cv. Ancho San Luis). *Phyton Intern Jour of Exp Botany* 67: 103-112
2. **García-Hernández J.L.**, E Troyo-Diéguez, A Ortega-Rubio, H Nolasco-Soria, H Jones. 2000. Efecto de la aplicación de insecticidas organofosforados sobre los componentes rendimiento (y sus parámetros componentes) en ají (*Capsicum annum* L. cv. Ancho San Luis). *Phyton Intern Jour of Exp Botany* 67: 113-120

B. Adicionalmente, en el trabajo de tesis se generaron los siguientes artículos científicos y publicaciones de divulgación:

1. **García Hernández J.L.** H. Nolasco, E. Troyo-Diéguez, H. G. Jones, A. Ortega-Rubio. The effects of selected insecticides on the superoxide dismutase activity in hot pepper plants (*Capsicum annum* L. cv. Ancho San Luis). *Phyton Int. J. Exp. Bot.* Aceptado.
 2. **García-Hernández J.L.**, E. Troyo-Diéguez, B. Murillo-Amador, A. Flores-Hernández¹, A. González-Michel. The effects of selected agrochemicals on physiological traits and yield in tomato *Lycopersicon esculentum* L. cv. Rio Grande. *Agrochimica*. Enviado
 3. **García Hernández J.L.** H. Nolasco, E. Troyo-Diéguez, H. Jones, A. Ortega. The effects of some insecticides on the peroxidase activity in hot pepper plants (*Capsicum annum* L. cv. Ancho San Luis). *Phytoparasitica*. En revisión.
 4. **García Hernández J.L.**; E Troyo Diéguez; R. Servín Villegas; B Murillo Amador; J Larrinaga M. 2000. Manejo Adecuado del Picudo del Chile en Baja California Sur. Publicación para la Transferencia y Divulgación No 1. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. 29 pág. ISBN: 970-18-5713-5
 5. **García H., J.L.**, Troyo D. E., Ortega R. A. Nolasco S. H. Jones H.G. Efectos de 2 insecticidas de uso común en sobre Baja California Sur la temperatura y transpiración de la hoja en chile dulce (*Capsicum annum* L. cv. Ancho San Luis). Del 15 al 19 de Noviembre de 1999. La Paz, Baja California Sur. Segundo Ciclo Académico Agropecuario. UABCS. Memoria en extenso: Pág: 31-34
-

6. **García Hernández J.L.** E. Troyo Diéguez. Respuesta y comportamiento de plántulas de chile (*Capsicum annum* L. cv. Ancho San Luis) recién germinadas respecto a la aplicación de diferentes dosis de insecticidas seleccionados. Manuscrito en preparación.
7. Calderón Limón B. A.; **J.L. García Hernández**.; E. Troyo D.; Semiartificial Technique for Oviposition of the Pepper Weevil *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae) to Obtain Massive Colonies in the Laboratory. Enviado Folia Entomol Mex
8. **J.L. García Hernández**, E Troyo Dieguez, H. Nolasco, H.G. Jones, and A. Ortega Rubio. Phytotoxic Effects of Different Insecticides, Doses, and Application Frequencies on Physiological Traits of Chili (*Capsicum annum* L.). E la 97th Annual International Conference of the American Society for Horticultural Science. Del 23-26 Julio 2000. Lake Buena Vista, Florida, USA. Abstract publicado en el HortScience, Vol 35(3), June 2000. p-428.
9. **García Hernández JL**, E. Troyo-Diéguez. Efecto de Insecticidas y Surfactantes sobre variables Fisiológicas del tomate. III Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas. Los días 9 y 10 de noviembre del 2000. Mexicali, Baja California.

INDICE GENERAL

SÍNTESIS DE RESULTADOS.	v
SINTESIS DE METAS	ix
INDICE GENERAL.	x
RESUMEN.	xi
ABSTRACT.	xiii
1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Biología de <i>Anthonomus eugenii</i> (barrenillo del chile).	7
2.1.1. Muestreo de barrenillo del chile.	9
2.2. Métodos de control de barrenillo del chile.	11
2.2.1. Control químico.	11
2.2.2. Control biológico.	12
2.2.3. Control natural.	12
2.2.4. Métodos alternativos.	12
2.2.5. Resistencia.	13
2.3. Efectos de los insecticidas sobre la fisiología y rendimiento del chile.	13
2.4 Efectos colaterales de la aplicación de insecticidas en cultivos y el ambiente.	14
2.5. La fluorescencia de la clorofila como indicador de estrés en plantas.	15
2.6. Absorción, transporte y pérdida de agua en las plantas.	17
2.7. Proteínas y enzimas.	21
2.8. La actividad de la peroxidasa como un indicador de estrés.	24
2.9. La actividad de la superoxido dismutasa como un indicador de estrés.	25
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO	28
4. OBJETIVO GENERAL	29

4.1. Objetivos particulares.	29
5. MATERIALES Y METODOS	31
5.1. Evaluación de la fitotoxicidad por medio de variables agronómicas.	31
5.2. Evaluación de la fitotoxicidad por medio de actividad de enzimas indicadoras de estrés.	33
5.3. Evaluación de la fitotoxicidad en plántulas recién germinadas.	34
5.4. Susceptibilidad de barrenillo de chile a los insecticidas.	35
5.4.1. Bioensayos.	35
5.4.2. Avances en la técnica para cría masiva de picudo del chile bajo condiciones de laboratorio.	36
5.5. Evaluación de la fitotoxicidad en un cv. de tomate	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
6.1. Evaluación de la fitotoxicidad por medio de variables ecofisiológicas y de rendimiento.	39
6.2. Evaluación de la fitotoxicidad por medio de actividad de enzimas marcadoras de estrés.	54
6.3. Evaluación de la fitotoxicidad en plántulas recién germinadas.	61
6.4. Susceptibilidad de barrenillo del chile a los insecticidas.	67
6.4.1. Bioensayos.	67
6.4.2. Avances en la técnica para cría masiva de picudo del chile bajo condiciones de laboratorio.	71
6.5. Evaluación de la fitotoxicidad en un cultivar de tomate.	74
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	79
8. BIBLIOGRAFIA	82
ANEXO 1. PUBLICACIONES PRINCIPALES	91

RESUMEN

El manejo de los cultivos hortícolas y agrícolas, actualmente incluye la utilización de un elevado número de productos agroquímicos destinados al control de todo tipo de plagas; maleza, enfermedades de hongos, bacterias, virus e insectos. Es claro que un elevado número de productos que son usados en la actualidad han sido herramientas valiosas desde los años posteriores a la segunda guerra mundial, cuando surgió la llamada “revolución verde”. Sin embargo, a través del tiempo, los intereses económicos de las compañías productoras de agroquímicos y la falta de información que se ha tenido sobre las repercusiones del mal uso de dichos productos han provocado que el uso irracional se haya incrementado hasta niveles demasiado altos para los delicados procesos de equilibrio ecológico.

Por diferentes razones existe ahora una preocupación generalizada acerca del uso racional de los insecticidas y otros agroquímicos, entre esas razones se incluye que ciertos sectores de los pueblos de los diferentes países tienen mayor conocimiento y conciencia sobre los procesos biológicos y su afectación por productos químicos. Asimismo, la regulación económica y arancelaria de países como Estados Unidos y otros consumidores importantes de productos hortícolas, ahora impiden la comercialización de productos con residuos de sustancias peligrosas.

En el Estado de Baja California Sur, uno de los cultivos hortícolas más importantes es el chile (*Capsicum annum* L) el cual ocupa en algunos municipios como La Paz, el primer lugar en superficie sembrada, sin embargo, en los años más recientes se han tenido problemas para la comercialización de este producto, principalmente por que el producto es rechazado en la frontera con Estados Unidos, por el alto contenido de residuos tóxicos. La razón principal de el excesivo uso de insecticidas en este cultivo, es que es atacado por el picudo del chile (*Anthonomus eugenii* Cano), el cual por sus hábitos biológicos es uno de los insectos plaga más difíciles de controlar. Para poder combatir oportunamente esta plaga, es necesario un muestreo sumamente minucioso para detectar la presencia de adultos. De tal manera que no se le permita ovipositar, ya que de hacerlo el huevecillo y la larva que nace dentro del fruto, asegura su protección en contra de insecticidas y enemigos naturales, desarrollándose una nueva generación.

De los antecedentes mencionados surgió el proyecto de la presente tesis, la cual se llevó a cabo en 4 partes principales. El primer estudio se llevó a cabo en invernadero con un diseño experimental trifactorial, considerando 4 insecticidas y el control (agua) como factor A; cuatro dosis de aplicación como factor B y tres frecuencias de aplicación como factor C. En este experimento se midieron variables morfológicas, ecofisiológicas y de rendimiento. En el segundo experimento se incluyeron dos factores: insecticidas y dosis, utilizando los mismos que en el primer experimento, las plantas de este estudio se analizaron en laboratorio midiendo la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y peroxidasa. Finalmente se realizó un experimento con plántulas recién germinadas en un diseño trifactorial. En dicho estudio, las plantas fueron sometidas a tratamientos (factores) de: insecticidas, concentraciones y tiempos de inmersión.

Al mismo tiempo, se realizaron bioensayos toxicológicos de estos insecticidas con esta plaga, para evaluar el efecto que tienen al ser tratados con esos productos y en base a ello, realizar conclusiones y recomendaciones a productores y generar conocimiento a profesionistas e investigadores del área agronómica y biología vegetal.

Los resultados más sobresalientes de estos estudios nos señalan que, en general, las dosis más bajas recomendadas en los productos son suficientes para lograr niveles de control adecuados; es decir, a bajas concentraciones de los insecticidas se encontraron altos niveles de mortalidad. Esta información, sin embargo, debe ser corroborada comparando los resultados con insectos libres de la aplicación de insecticidas, lo cual se puede lograr produciendo al menos 10 generaciones continuas en cautiverio y libres de cualquier sustancia química para lograr una colonia de picudos susceptibles a cualquier insecticida y que serviría como una línea toxicológica base. Tratando de encontrar esta respuesta se establecieron las bases para una nueva técnica de producción de colonias de picudo en laboratorio, restando en este sentido, realizar las evaluaciones correspondientes y desarrollar esa colonia susceptible, en base a dietas adecuadas.

En lo que respecta al efecto de los insecticidas evaluados sobre el cultivo, encontramos que las dosis bajas incluyendo la media recomendada por la etiqueta de los productos no causó diferencias significativas con respecto a un control sin aplicación de insecticidas. Sin embargo, el hecho de aumentar dicha dosis en un 50 o 100% generó repercusiones que se evidenciaron en una mayor actividad de las enzimas peroxidasa y superóxido dismutasa, así como en alteraciones de variables fisiológicas como la transpiración, temperatura, resistencia estomática, fluorescencia de clorofila y contenido de clorofila, todo ello repercutiendo en el rendimiento y calidad del fruto.

Basados en los resultados obtenidos, sugerimos lo siguiente: (1) antes de utilizar insecticidas químicos se deben implementar otros métodos de control, como lo es el control biológico, (2) la aplicación de insecticidas se debe realizar hasta que no exista otra opción para convivir con la plaga, (3) las aplicaciones deben basarse en muestreos minuciosos, los cuales deben ser oportunos para detectar a los adultos de picudo antes de que inicien la oviposición, (4) para controlar esta plaga en la región de estudio es suficiente las dosis recomendadas, de preferencia utilizar insecticidas biológicos como extractos de neem (Bioneem) y en caso necesario usar azinfos metil o metamidofos y tratar de usar otras opciones más novedosas, descartando definitivamente el uso del paratión metílico, el cual está prohibido en otras regiones del mundo.

Se requieren más estudios para encontrar mejores alternativas de control, principalmente aquellas que sean compatibles con la naturaleza.

ABSTRACT

The management of horticultural crops and crops in general, include using many agricultural chemical products, many (or most) of them for controlling pests, such as , weeds, fungi, bacterial diseases, and insects. Many of these products have been valuable tools since the Second World War and the more recent “green revolution”. In recent years, scientific, governmental, and public organizations have come to recognize that agrochemical manufacturers, trading firms, and farmers, by ignorance or for profit, have misused insecticides. Misuse has increased to a dangerous level, leading to serious upsets in delicate ecological equilibrium.

For different reasons a general concern about the rational use of insecticides and another agricultural chemicals now exists. These reasons include the knowledge about biological processes and the effects on health and to ecological systems, and economic and market regulations created by the USA, European Union, and other consumers of horticultural products to avoid consumption of products with agrochemical residues.

In Baja California Sur, one of the most important crops is chili (hot pepper) (*Capsicum annum* L). This crop occupies the largest production area in some municipalities, like La Paz. In the last few years, farmers have had problems selling this product because it is rejected at the USA border for its high toxic residues. BCS farmers use excessive amounts of insecticides on chills because of high infestation by the pepper weevil (*Anthonomus eugenii* Cano). The biological habits of this weevil make it very difficult to control . To control this insect, a very meticulous monitoring program is maintained to avoid the adult start of ovipositioning. If this adult is not controlled in a timely manner, the following generation is saved inside the fruit, which fall, and bring high yield losses. The presence of fallen fruit cause farmers to apply excessive amounts of insecticides. Frequently these applications have little effect on the pest, but even damage the crop.

It is an generally accepted that insecticides are not harmful to plants when they are applied correctly, used on authorized crops in the recommended dose, and limited to the recommended number of applications by season. In practice, manufactures' recommendations are nor respected . Farmers overdose, apply authorized mixtures, and make continuous applications, often more than 20 applications during the growing season.

Farmers' strategies of pesticide application is contrary to the experts' recommendations that, to be profitable, pest management costs should not exceed 7% of total production costs. Reality indicates that the cost of pest management is around 30 – 40% of production costs.

From this background arises the need to study the details of how different insecticide and other agrochemical applications , dosages, and application frequencies, affect plants in practice.

Research projects were submitted to CONACY and SIMAC, based on objectives of the project AGE-4 of CIBNOR. Project grants from these agencies supported this doctoral thesis project. The study focuses on the repercussions of misusing agricultural chemicals in the cultivation of chili peppers. Experiments included analyzing the effects from physiological, agronomic, and biochemical perspectives on plants treated with different organophosphate insecticides, as well as other agricultural products, recommended in the manage of chili peppers against the pepper weevil.

At the same time, toxicological bioassays of the insecticides were performed on the pest to assess the effects of the products when applied in the doses used in the plant experiments. This information should assist interested farmers, students, researchers, and public agencies to reach appropriate conclusions and make recommendations.

The most outstanding results of this studies showed that the doses recommended on product labels is enough to control the weevil in this region. The products produced high mortality in weevils at very low concentrations. However, this information should be used with studies comparing the results with the mortality caused by these products and concentrations in susceptible insects. Susceptible insects should meet the standard of existing in captivity for at least 10 generations without exposure to insecticides. The methodology to maintain massive colonies of pepper weevil does not exist, but the principles of a new technique to maintain the weevils under laboratory conditions are known. It is necessary improve this technique with adequate diets and then perform the toxicological studies.

With respect to the effect of the insecticides on chili peppers, we found that low doses, including the mean recommended by the product label, showed no significant differences compared to the control chili peppers, which did not receive insecticide applications. However, augmentation of insecticide by 50%, and even 200%, caused undesirable consequences, which was indicated by an increased activity of peroxidase and superoxide dismutase, in alterations in physiological traits, such as transpiration, foliar temperature, stomatal resistance, chlorophyll fluorescence, and chlorophyll content. All of these changes in biochemical activity have repercussions in yield and fruit quality.

Based on the results, we can make a series of recommendations: 1) Before using chemical insecticides, methods, as the biological control should be implemented, 2) Application of insecticides should not be made until no other option is available to coexist with the pest, 3) Insecticide applications must be based on meticulous monitoring programs that detect the precise moment before adult ovipositing, 4) Botanical insecticides, such as Bioneem, should be used before chemical insecticides, 5) In this region, apply organophosphate insecticides at the lower doses, using preferably azinfos or metamidophos, and avoid parathion, which is prohibited in many countries.

More studies are required to improve the methods to control pepper pests. The focus should be in alternatives that be compatible with nature.

1. INTRODUCCION

México se encuentra ubicado entre los primeros lugares a nivel mundial como país exportador de hortalizas. El volumen de exportaciones de hortalizas se ha venido incrementando en los últimos años. En 1999 las exportaciones (con un valor de 1023 millones de dólares) crecieron un 8.0% con respecto a 1998, cuyo valor había duplicado las del año anterior (BANCOMEXT 1999, FAO 1999). Por esta razón, algunos expertos en comercialización de estos productos han mencionado que el crecimiento de esta rama de la agricultura se esta dando a paso firme (Bringas 1998).

Dentro de las hortalizas que se exportan se encuentran el tomate (*Lycopersicon esculentum*) y algunos tipos de chile (*Capsicum annum*). El tomate ha sido la hortaliza con el mayor volumen de exportación en los últimos años, ocupando el primer lugar como producto fresco (Bringas 1998).

Por su parte, la exportación de el chile se da tanto en fresco como en productos elaborados. Algunos de los tipos de chiles con mayor mercado de exportación son los siguientes: jalapeños, tipo California, pimiento morrón y chile ancho. En el período de 1994 a 1998, las exportaciones de chile en vinagre y en salsas preparadas constituyeron el 3 y el 7% respectivamente, de las exportaciones totales en la sub-rama de alimentos, bebidas y tabaco, que a su vez ocupan el segundo lugar en exportaciones en la rama de la agroindustria (BANCOMEXT 1999).

La investigación en torno a mejorar la producción de estos productos se ha venido desarrollando cada vez más, a razón de que existen aun severos problemas que resolver, obedeciendo a razones de competitividad en el actual ambiente globalizado de la comercialización. Debemos recordar que existen varios países en el mundo que producen chile, incluso con mayores ventajas económicas de producción y contra los cuales debemos de competir. Algunos de los principales países productores de hortalizas en el mundo son: España, Holanda, Turquía y Estados Unidos (BANCOMEXT 1999, FAO 1999).

Uno de los problemas que enfrenta México y principalmente el Estado de Baja California Sur, en torno a la comercialización y contaminación del ambiente, es el abundante uso de agroquímicos que se lleva al cabo, específicamente en chile. El uso de agroquímicos es una práctica necesaria y aceptada en la actualidad (Pimentel *et al.* 1991,

Prakash 1988), pero a veces el uso es indiscriminado, por lo que se pudiera pensar, que los delicados equilibrios ecológicos y los organismos integrantes de los variados ecosistemas que en conjunto conforman la biosfera se encuentran seriamente amenazados por el empleo excesivo o poco cuidadoso de plaguicidas (Albert *et al.* 1990).

En el caso específico de insecticidas, al aplicarse en exceso, colateralmente a los beneficios esperados por las aplicaciones, trae consigo consecuencias negativas, entre las cuales se pueden mencionar las siguientes: a) aumentos en los costos de producción (Gliessman 1998, García 1998, Godoy *et al.* 1998, Pimentel 1991), b) aceleración en el desarrollo de resistencia de los organismos plaga (Gliessman 1998, Ortega 1996, Servín 1996), c) generación de contaminación ambiental (Albert *et al.* 1990, Restrepo 1992) y d) afectación a las plantas en su metabolismo y desarrollo (David *et al.* 1985, Gilreath *et al.* 1987, Amer y Ali 1983, Soriano 1984), y por consiguiente también en el rendimiento (Devadas *et al.* 1986, Gilreath *et al.* 1987, Reddy y Rao 1981, Quiñónez 1993).

Cabe señalar que no existen datos oficiales del uso de sobredosis de estos insecticidas, pero en la práctica se ha observado que, al igual que en otras partes de la República Mexicana, en Baja California Sur se utilizan dosis muy superiores a las recomendadas en las etiquetas de los productos, utilizando desde 1.5, 2 y hasta 3 veces la dosis recomendada (Comité Regional La Paz-Los Cabos y Comité Estatal de Sanidad Vegetal). Esto trae como consecuencia directa que los productores no puedan exportar sus productos por excesos de residuos tóxicos y, dada la desventaja que se tiene en el mercado nacional por cuestiones de carácter geográfico, ocasiona pérdidas económicas al obligar a los productores a vender sus productos a precios demasiado bajos en centros de abasto nacionales. Lo anterior se convierte en un riesgo para la salud de los consumidores de los frutos.

Aunque en teoría, mediante estos productos se pretende mejorar la calidad de vida del hombre, proveerlo de alimentos y combatir los vectores que causan enfermedades endémicas, con frecuencia causan situaciones ambientales totalmente indeseables, peligrosas y costosas (Albert *et al.* 1990, Prakash 1988). Sin embargo, y aunque como dice Gliessman (1998), muchos agricultores se dan cuenta del problema de la dependencia al uso de agroquímicos, muchos de ellos, sobre todo en países en desarrollo, no cuentan con la información necesaria para realizar un manejo integrado de plagas que no utilice solo

químicos como táctica de control.

Este trabajo se desarrolló en cuatro partes principales; la primera parte correspondió al estudio de la fitotoxicidad en un cultivo bajo condiciones de invernadero, con tratamientos de diferentes insecticidas a diferentes dosis y frecuencias de aplicación, extrapolando las prácticas y dosis comunes en los campos comerciales. En estas plantas se midieron variables ecofisiológicas y de rendimiento. La segunda parte corresponde a un experimento bajo condiciones similares utilizando los mismos insecticidas a las mismas dosis para estudios a nivel enzimático, evaluando la actividad de enzimas comúnmente utilizadas como indicadores de estrés. La tercera parte se refiere a un experimento bajo condiciones controladas en cámara de germinación, utilizando algunos de los insecticidas más sobresalientes así como productos insecticidas novedosos de baja toxicidad. A la par de los estudios con plantas, se sentaron las primeras bases para estudios de toxicología en picudo del chile, al implementar técnicas novedosas para obtener crías masivas de dicho insecto bajo condiciones de laboratorio.

Para efectuar este trabajo se seleccionaron los insecticidas Paratión metílico CE720® (paratión metil), Gusatión 35PH® (azinfos metil) y Tamarón 600LM® (metamidofos). Lo anterior debido a que en el Noroeste de México y sobre todo en el Estado de Baja California Sur son los insecticidas organofosforados más ampliamente utilizados para el control del barrenillo del chile. Además de estos insecticidas que son mezclas comerciales, se utilizó el metamidofos como ingrediente activo solo, sin mezclas, con el fin de hacer comparaciones entre un mismo ingrediente activo con y sin aditivos comerciales. Asimismo, para el último experimento se utilizaron dos productos insecticidas novedosos de baja toxicidad; Bioneem, el cual contiene extracto de neem (*Azadirachta indica*) y cuyo ingrediente activo es azaridactina y por último Confidor (imidacloprid).

Se estableció un diseño experimental en invernadero con el cultivar Río Grande de tomate para un último experimento. Los tratamientos de este estudio fueron; como factor A, los insecticidas Thiodan 35CE (endosulfan) y Tamarón 600LM y el surfactante Inex; como factor B, se utilizaron tres dosis de estos productos y como factor C, la aplicación o no aplicación del promotor de crecimiento Biozyme.

2. ANTECEDENTES

Existe un considerable número de publicaciones que señalan o critican el uso inadecuado de los insecticidas químicos, varios de ellos con bases metodológicas firmes, aunque es posible que algunos no estén realizados tomando en cuenta procedimientos científicos. Dentro de los principales y más famosos críticos del uso de los plaguicidas destaca Rachel Carson, quien en la década de los 70's escribió un libro titulado "Primavera Silenciosa". Dicho libro, en 1992 fue considerado como la obra con mayor influencia en los últimos cincuenta años por la Casa Blanca de Washington, USA (Gore 1992).

Posteriormente, a raíz de que, a pesar del incremento en las ventas globales de plaguicidas (25 billones de dólares en 1994), las pérdidas totales de cosecha debido a plagas ha permanecido en forma constante, un considerable número de investigadores se ha dado a la tarea de encontrar causas y consecuencias directas y colaterales del uso y abuso de tales productos (Pimentel *et al.* 1991, Peveling 1999, Gliessman 1998, Uhlig y Wissemeier 1999, Straw *et al.* 1999, Picanço *et al.* 1998.).

Después de la segunda guerra mundial, los insecticidas químicos fueron ampliamente publicitados como la nueva arma científica de la humanidad en la guerra contra las plagas y patógenos de los cultivos. Esos agentes químicos tenían el atractivo de ofrecer a los agricultores una forma de aplicar sus campos una vez y para todos los organismos que continuamente amenazaban sus cosechas y literalmente consumían sus ganancias. Pero se ha probado que esa promesa era falsa. Los plaguicidas pueden bajar drásticamente una población de plagas en el corto plazo, pero como también se eliminan los enemigos naturales de las plagas, las poblaciones de éstas pueden, a menudo, rápidamente reponerse y resultar en poblaciones mucho mayores que las anteriores. El agricultor entonces, es forzado a usar aún más los agentes químicos. La dependencia de los plaguicidas que resulta ha sido llamada *pesticide treadmill*, que se traduciría como la rueda sin fin de los plaguicidas. Aumentando este problema de dependencia esta el fenómeno del incremento en la resistencia: poblaciones de plagas continuamente expuestas a los plaguicidas están sometidas a intensas presiones de selección para resistencia a estos plaguicidas. Cuando esto ocurre, los agricultores son forzados a aplicar mayores cantidades o a usar mezclas o sobredosis, contribuyendo a la promoción de una mayor resistencia (Gliessman 1998).

Aunque el problema de la dependencia a los plaguicidas puede ser fácilmente reconocida por los agricultores, muchos de ellos – especialmente en países subdesarrollados – no utilizan otras opciones (Pimentel *et al.* 1991). Resulta sobresaliente que algunas de las más altas autoridades en el control de plagas reconozcan que no es el uso de agroquímicos la razón por la cual los insectos no han llegado a sobrepoblar las zonas agrícolas, sino por la guerra que se libra entre las diferentes especies de insectos y por su patología, es decir, el control debido a enemigos naturales (Metcalf y de Bach 1991)

Además del alto costo económico que representan los plaguicidas, se pueden tener profundos efectos en el ambiente y aún sobre la salud humana. Muchos de los plaguicidas utilizados en los campos han sido lixiviados y removidos a los mantos freáticos y aguas superficiales, de tal manera que fácilmente entran en la cadena alimenticia, afectando a las diferentes especies que habitamos el planeta y permaneciendo la amenaza y el daño por décadas. En el libro Reconocimiento y Manejo de los Envenenamientos por Pesticidas de 1999, editado por EPA, USA, se describen estadísticas de casos desde leves problemas hasta neurotoxicidad o cáncer debido al mal uso de los plaguicidas.

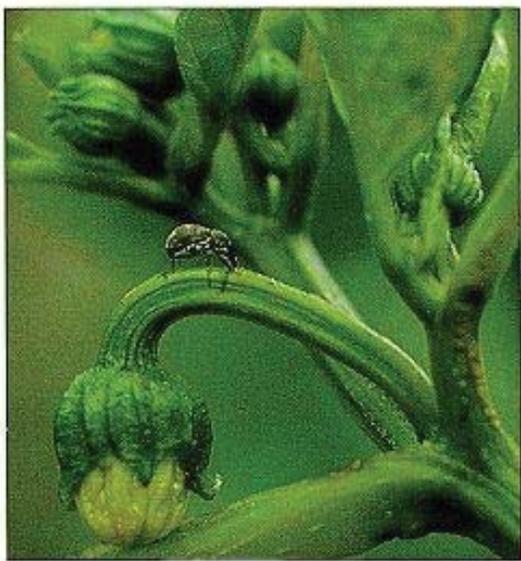


Fig. 1 Picudo del Chile

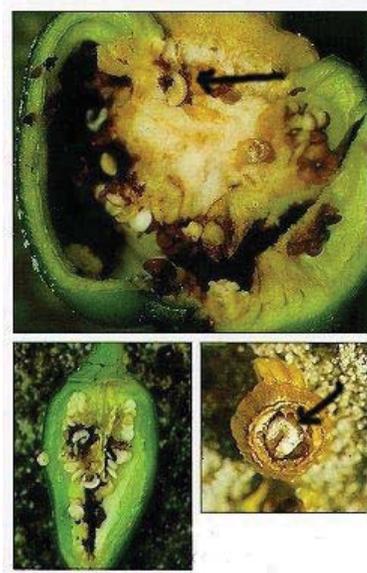


Fig. 2. Larvas de picudo en yemas y frutos

Por otra parte, el picudo o barrenillo del chile *Anthonomus eugenii* Cano (Figura 1), es la principal causa del uso de insecticidas químicos en el cultivo del chile. Es una severa plaga de los chiles picosos y dulces (*Capsicum* spp). En el sur de Estados Unidos, México, Centro América, incluso Hawaii y varias islas del Caribe. El daño típico obedece a que los adultos se alimentan del fruto y yemas, colocando sus huevecillos en yemas, flores y frutos.

Las larvas se alimentan dentro de los frutos, causando la caída prematura de los mismos, lo que resulta en importantes pérdidas mayores al 50% del valor de la cosecha (Figura 2). A menudo, cultivos enteros de chile tienen que ser derribados y destruidos mecánicamente, porque quedan muy pocos frutos para ser cosechados y la infestación representa una amenaza para los campos vecinos. En algunas parcelas experimentales se han llegado a estimar pérdidas de más del 90% (Riley 1997, Eller *et al.* 1994).

Cuando se aplican insecticidas a los cultivos, se espera que sean tóxicos a las plagas y que no lo sean para las plantas de interés. Sin embargo, la mayoría de estos productos causan efectos adversos en la fisiología de las plantas (Cottam 1965, Epstein 1971, Imbamba y Moss 1971, Reddy y Rao 1981, Albert *et al.* 1990). Pueden afectar la germinación de las semillas, el desarrollo vegetativo, la reproducción sexual, la maduración, el comportamiento durante y después de la cosecha, al igual que el valor alimenticio y la calidad comercial del producto. Se señala también que en algunos casos se ha visto que los plaguicidas inducen la formación de tumores o agallas en algunas plantas. Además de que las raíces de las plantas tienden a absorber del suelo residuos de plaguicidas, frecuentemente es mayor su concentración en ellas que en las partes altas o aéreas; esto puede ser importante en el caso de los tubérculos y las raíces comestibles.

Albert (1986) y Albert *et al.* (1990), sugieren realizar investigaciones para convencer a las autoridades de que la aplicación de plaguicidas debe ser más estrictamente regulada en países como el nuestro, ya que hasta esta fecha, la respuesta de las autoridades responsables de la toma de decisiones suele basarse en las condiciones económicas actuales. Desafortunadamente, la óptica que suele adoptarse pretende promover una decisión en la opinión pública entre “contaminar el ambiente o morir de hambre.

Sin embargo, Aranda (1990), opina que existe la forma de utilizar los productos químicos de una manera racional y segura, mediante la filosofía del manejo integrado de plagas (MIP o IPM, por sus siglas en inglés), la cual incluye la utilización de todas las

estrategias de control disponibles. Esto implica, además, la necesidad de tolerar a la plaga, aprendiendo a convivir con ella bajo las condiciones más ventajosas para los seres humanos.

En el Estado de Chihuahua en México, donde se han generado significativos avances en lo que se refiere al manejo de plagas de chile en el país, se llevó al cabo un estudio (Quiñónez 1993) donde se probaron tratamientos con diferente número de aplicaciones de insecticidas. Se encontró que a menor número de aplicaciones se obtuvo mayor rendimiento. En esa ocasión se atribuyó el efecto al surgimiento de plagas secundarias por el efecto del mayor número de aplicaciones sobre enemigos naturales de las plagas, sin considerar que el propio insecticida, aplicado a mayores dosis hubiera causado fitotoxicidad y disminución del rendimiento.

2.1 Biología del barrenillo del chile

Una de las causas por las que los plaguicidas son utilizados en forma inadecuada en la producción de chile es la falta de información equilibrada y objetiva sobre el manejo de las plagas, ya que no existen aún en México los estudios suficientes para recomendar el patrón de control más adecuado (Servín 1996). Por estas razones se ha realizado una recopilación acerca del manejo integrado del barrenillo del chile, con recomendaciones básicamente del Servicio de Extensión Agrícola de Texas (TAES).

El barrenillo del chile conserva muchas de las características de otros miembros del género *Anthonomus*. Se alimenta de relativamente pocas especies de plantas y las hembras ovipositan en las yemas florales o frutos. Las larvas se desarrollan dentro de la yema o fruto, y al igual que el barrenillo del algodón (*A. grandis*), el barrenillo del chile tiene tres instares larvales y múltiples generaciones por año. No se ha detectado diapausa (periodo de dormancia) en este barrenillo, lo cual significa que su rango de propagación está limitado a áreas que pueden aportar plantas hospederas durante el invierno (Alonso 1995).

El manejo debe empezar por un entendimiento de la biología (Cuadro 1) y del ciclo de vida del barrenillo (Figura 3) y los factores que influyen en el crecimiento de una población. El tiempo requerido por generación y el número de generaciones por año son

principalmente determinados por la disponibilidad de hospederos y las condiciones de temperatura. Algunos investigadores han reportado variaciones en el tiempo por generación, con las diferencias más grandes entre verano y otoño cuando las temperaturas son más variables. En climas muy calientes se presenta la generación más corta de aproximadamente 13 días (Riley *et al.* 1992, Riley 1997).

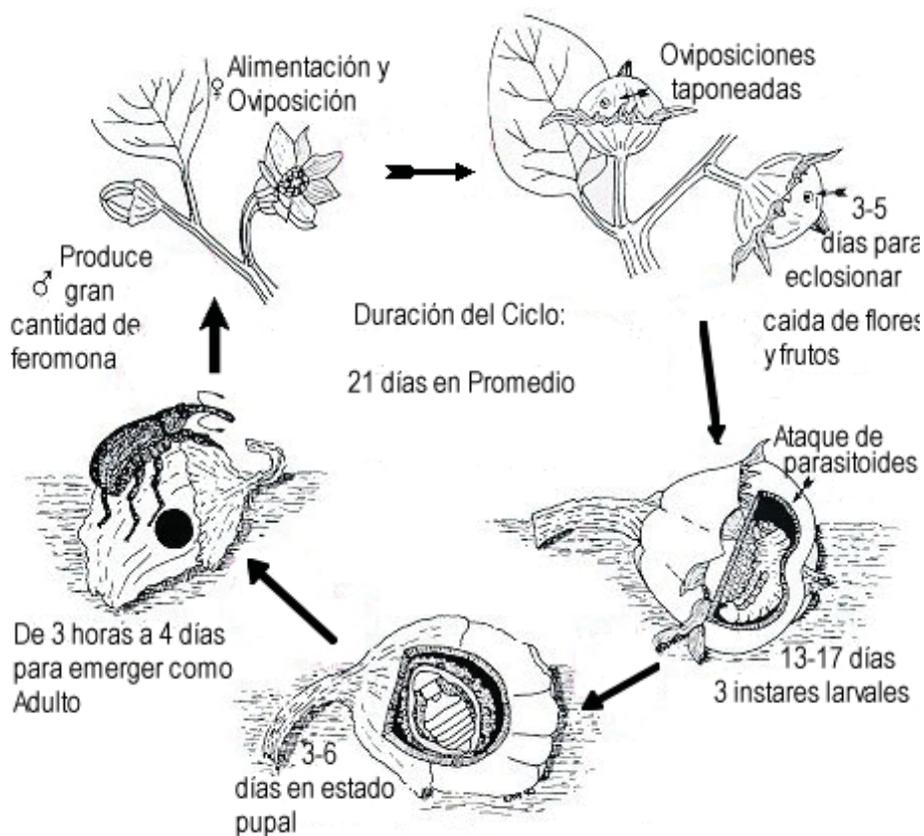


Fig. 3. Ciclo de Vida del Picudo del Chile.

Recién emergidos los adultos son de un color café claro, tornándose café oscuro y negro-grisáceo en dos o tres días. El apareamiento y oviposición empieza entre los 2 y 3 días después de la emergencia. En una temporada pueden presentarse de tres a cuatro generaciones, y si se traslapan cultivos de primavera y otoño, se pueden agravar los problemas para el segundo cultivo. El barrenillo puede completar su desarrollo larval en el fruto y/o flores de la mayoría de los tipos y variedades de Chile y en varias especies de belladona.

El tamaño del fruto y la disposición de hospederos son factores importantes en la selección de sitios de oviposición. Frutos en desarrollo de entre 1.3 y 5.0 cm de diámetro son los preferidos. Las hembras depositan la mayor parte de los huevecillos durante el día, y evitan frutos ya ovipositados. Las diferencias entre variedades pueden afectar en parte la preferencia, a menos que la población sea muy densa. Sin embargo, es necesaria más investigación para determinar las diferencias entre variedades.

Algunas pruebas recientes sugieren que las variedades que producen un elevado número de pequeños frutos (diferentes de pimiento morrón) tienen más frutos que escapan al daño (Eller *et al.* 1994).

Cuadro 1. La biología del barrenillo del chile, *Anthonomus eugenii* Cano.

Aspectos biológicos	Promedio
Tiempo de generación	2 semanas en clima cálido 3 semanas en clima templado o medio 6 semanas en clima frío.
Generaciones por año	5 a 8
Longevidad de adultos	3 meses en promedio con alimento de una a tres semanas con escasez de alimentos
Periodo de oviposición	Más de un mes
Fecundidad	Más de 340 huevos por hembra adulta
Tasa de oviposición	Seis huevos por día

2.1.1 Muestreo para barrenillo de chile

El barrenillo del chile reinfesta campos de los que se han movido y de plantas hospederas secundarias y de residuos de cosechas anteriores. Existen pocos datos del movimiento de los barrenillos, pero deben ser capaces de recorrer grandes distancias. La mayoría de las observaciones sugieren que los barrenillos se dispersan lentamente a través de los cultivos de chile en las primeras fases de la temporada, lo que puede resultar en grupos de barrenillos localizados en manchones. Los cultivos que están a un lado de algún hospedero son los primeros en ser atacados (Riley *et al.* 1992, Riley 1997).

El patrón de agrupamiento del barrenillo hace más difícil el muestreo para detectarlo. Existe la tendencia de subestimar el número de barrenillos, a menos que sean tomadas el suficiente número de muestras. Cada campo debe ser muestreado por un mínimo de media hora sin encontrar un solo adulto para decidir no aplicar un insecticida. Riley

(1997) señala que si son vistos algunos adultos en un corto tiempo la aplicación está justificada. El muestreo a lo largo de los márgenes da una mejor idea de la infestación y reduce el tiempo de colecta de muestras. Es común encontrar adultos en la misma zona de muestreo de semana a semana, por lo que es importante localizar esos "puntos calientes", determinar si ahí se necesita una aplicación de insecticida extra y buscar la posible causa de la insistente reinfestación. La causa más probable es la resistencia a uno o más productos que han sido utilizados (Alonso 1995, Scott 1991, Ramírez 1991).

Los métodos para detectar actividad del barrenillo incluyen (1) la inspección de yemas terminales y yemas axilares para adultos, (2) el uso de trampas con feromona para adultos, esto debido a que la plaga es atraída y atrapada en dicha trampa (3) conteos directos de barrenillos en cualquier etapa en plantas completas, (4) la detección de daño por alimentación o por oviposición, y (5) considerar que la presencia de frutos caídos no debe ser usada como el principal indicador, porque sería demasiado tarde para prevenir pérdidas significativas (Alonso 1995, Scott 1991, Ramírez 1991).

A pesar de las anteriores aseveraciones, Quiñónez (1993) sugiere realizar solamente una aplicación semanal durante las cuatro semanas críticas de floración y fructificación, ya que de acuerdo a sus experimentos se obtienen los mismos o incluso mejores rendimientos que al realizar un mayor número de aplicaciones. Sin embargo, Riley (1992) insiste en que cada día que sobrevive un adulto, seis nuevos barrenillos son producidos, además los barrenillos dentro de frutos caídos no son controlados por insecticidas, por lo que lo más importante es localizar a tiempo los adultos en el campo (Riley op cit., Alonso 1995 Ramírez 1991).

La falta de muestreos frecuentes y seguros (Cuadro 2) son la mayor limitante para la implementación de umbrales de acción confiables (uso de los muestreo para decidir cuando aplicar un insecticida). Una recomendación general, cuando se sabe que el barrenillo es un problema, es aplicar periódicamente desde antes de la primera flor y hasta la cosecha (Riley *et al.* 1992). Sin embargo, dicha práctica conlleva a un excesivo uso de insecticidas inútil si la plaga no se presenta, y pueden acarrear otro tipo de problemas como aumentos en la infestación de plagas consideradas como secundarias por la eliminación de los enemigos naturales, así como la afectación de abejas y algunos otros animales como aves que accidentalmente se encuentran en los campos de cultivo. Los estudios de la relación entre el

daño al cultivo y los niveles de infestación sugieren los siguientes criterios para optar por la aplicación de insecticidas y prevenir pérdidas económicas en pimiento morrón: 1) 5% de terminales dañadas o 2) un barrenillo por 200 plantas, inspeccionando dos yemas terminales por planta (Alonso 1995, Lagunes 1990).

2.2 Métodos de control de barrenillo del chile

2.2.1 Control químico

El control químico es considerado como el más efectivo. Ha permitido mantener poblaciones de la plaga en bajos niveles, pero a raíz del uso intensivo, cada día se reduce el número de insecticidas capaces de ejercer un control satisfactorio, debido principalmente al desarrollo de resistencia, considerando que solo el 1% del compuesto químico llega al insecto de manera directa (Metckalf y Luckmann 1990).

Cuadro 2. Muestreo para adultos de barrenillo o daño en chile.

Método de muestreo	Tiempo mínimo	Comentarios
Inspección en planta completa	25 plantas (1 hora)	Aproximadamente 2 minutos por planta
Inspección en yemas terminales	1600 terminales (1/2 hora)	1 segundo por terminal, buscar solo adultos
Daño en yemas terminales	200 terminales (1/2 hora)	10 segundos por terminal; inspeccionar para oviposición.

Para poder controlar una población de barrenillo una vez que se ha establecido, es necesario implementar un programa de aplicaciones basado en muestreos frecuentes y confiables. Los insecticidas enlistados en el Cuadro 3 son los recomendados por El Servicio de Extensión Agrícola de Texas y se menciona que no generan excesivos residuos en la cosecha.

Los estados inmaduros no pueden ser controlados con insecticidas, aún sistémicos. Sin embargo, hasta el 30% de las larvas en frutos caídos pueden ser eliminados si se ponen estos frutos a secar al sol.

Cuadro 3. Insecticidas registrados en Estados Unidos para barrenillo en Chile.

	Litros por hectárea	Intervalo de seguridad	Comentarios
Permethrina	0.1-0.2	3 días	No más de 1 litro por temporada por hectárea
Oxamyl	0.5-1.0	7 días	Mejor control en combinaciones. ¹
Esfenvalerato	0.025-0.05	7 días	No más de 0.3 litros por temporada por hectárea
Cryolite	25-50	0 si se lava	

¹ Productos usados en combinaciones: azinphos-methyl, methomyl.

2.2.2 Control Biológico

El único control biológico, que ha sido manejado agronómicamente hasta la fecha son ciertos parásitos hymenopteros de las larvas, ya que al parecer sobreviven a las aplicaciones de oxamyl y puede complementar el control; sin embargo, a continuación se da a conocer una lista de predadores y parásitos (Riley y Schuster 1992, Riley 1997).

Predadores: *Solenopsis geminata* (fire ant), *Strunella magna* (meadow lark), *Tetramorium guineense* (ant).

Parásitos: *Pyometes venticosis*, *Catolaccus incertus*, *Pediculoides ventricosus*, *Bracon mellitor*, *Habrocytus piercei*, *Zatropis incertus*, *C. hunteri*.

2.2.3 Control Natural

El control natural del barrenillo incluye bajas temperaturas, exposición al sol de los frutos caídos, destrucción de los mismos, escasez de hospederos (Scott 1991).

2.2.4 Métodos alternativos

Algunos investigadores están buscando nuevos compuestos que no sean tan dañinos como los insecticidas convencionales. Se han encontrado algunas respuestas positivas en Chile pero no en el pimiento morrón. Zúñiga (1993) probó extractos de dos plantas; paraíso (*Melia azeradach*) y madrecaao (*Gliricidia sepium*), comparándolos contra cuatro insecticidas químicos y encontró que dos de ellos (paratión metil y endosulfan) tuvieron mejores resultados que los extractos, los cuales sin embargo, tuvieron resultados similares a los otros dos productos (bifentrin y oxamyl).

Dentro de los métodos alternativos, deben ser considerada también la eliminación de hospederos, sobre todo en las regiones donde el invierno presenta periodos de heladas. En La Paz, B.C.S., las capturas de adultos de picudo, reportadas por la Junta Local de Sanidad Vegetal son mínimas durante el invierno, pero son continuas a pesar de que no existen cultivos comerciales en etapa de floración en esta época, lo que indica que existen refugios naturales para esta plaga. Son tales refugios los que deben ser identificados y establecer métodos de control en ellos.

Actualmente en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste se están llevando a cabo proyectos de investigación de métodos alternativos para control de barrenillo, utilizando diferentes extractos de plantas. En la práctica se ha observado que dentro de los productos más sobresalientes esta la Azaridachta o extracto de neem (*Azadirachta indica*).

2.2.5 Resistencia

La resistencia es la selección de individuos en una población por un insecticida a una dosis determinada. Biológicamente se define como el proceso evolutivo que resulta de aplicar una presión de selección en una dirección constante, sobre la variabilidad genética de una población, es decir, es un proceso de selección genética y no el resultado de alteraciones dentro del insecto (Servín 1996, Lagunes y Villanueva 1994).

2.3 Efectos de los plaguicidas sobre la fisiología y rendimiento del chile

Es un hecho que los insecticidas son aplicados a los cultivos con la firme creencia de que no se tendrá ningún efecto sobre las plantas. Las plantas no deberían sufrir daño alguno por insecticidas químicos, porque la mayoría de estos productos actúan sobre el sistema nervioso de los insectos, el cual, obviamente no se encuentra presente en las plantas. Por esta razón, la investigación en relación a los efectos que se tienen en la planta por las aplicaciones de insecticidas es mínima (Albert et al, 1990). Sin embargo, continuamente se observa en la práctica y en experimentos empíricos que al utilizar insecticidas en sobredosis o en cultivos no autorizados provoca daños en los cultivos, hasta el grado de que algunos autores como Ortega (1996) mencionan que cuando se realizan aplicaciones de dosis muy

altas de insecticidas para controlar plaga resistente, entonces la plaga tiene más posibilidades de sobrevivir que la propia planta.

Laksami *et al.* (1988) encontraron que la aplicación en forma inadecuada de los insecticidas agrícolas provoca trastornos de diferente índole en las plantas. Demostraron que en algunas variedades de Chile, la semilla producida sufre algunos efectos negativos, así mismo la viabilidad del polen, la floración y la fructificación son afectadas también, estos efectos aumentan conforme las dosis de los productos también aumenta. Los insecticidas del estudio fueron quinalfos (Ekalux EC 25[®]) y oxidimetón metílico (Metasixtos[®]). Otros estudios han demostrado que el uso de insecticidas a dosis más altas de las recomendadas por las compañías de agroquímicos son un factor de reducción de rendimiento en algunas variedades de Chile (Reddy y Rao 1981). Estos autores estudiaron los efectos de los insecticidas monocrotofos (Nuvacron) y hexaclorobenzeno (BHC), ambos organofosforados.

Devadas *et al.* (1986), realizaron estudios para ver los efectos de cuatro insecticidas organofosforados en la germinación, sobrevivencia y meiosis en semillas de Chile, encontrando alteraciones en estas características cuando las dosis de insecticidas aumentaban. Los insecticidas que ellos usaron fueron: monocrotofos, dimethoate (TARA 909[®]), fosphamidon y diclorvos (DDVP[®]). Al respecto de estas anomalías, Atale *et al.* (1995) descubrieron que el origen de dichas anomalías se dio en la división de los núcleos hijos en la Telofase I de la meiosis.

2.4 Efectos colaterales de la aplicación de insecticidas en cultivos y en el ambiente.

Un buen número de investigadores en el mundo han estudiado los efectos colaterales de la utilización de los insecticidas químicos. Algunos han encontrado que la aplicación de insecticidas en forma adecuada (siguiendo las instrucciones de la etiqueta) y combinándolos con otros métodos dentro de un manejo integrado de control de plagas, resulta en rendimientos más altos y mejor calidad; sin embargo, otros investigadores han encontrado un buen número de efectos negativos, tanto sobre el cultivo donde se aplica como en el medio ambiente que lo rodea. Recientemente, Foster y Brust (1997), sugirieron que el carbofuran (insecticida organocarbamato) puede actuar no solo como insecticida,

sino que tiene propiedades como estimulante del crecimiento en sandía. Sin embargo, Maheshwari y Singh (1989) encontraron que otros dos insecticidas organocarbamatos disminuyeron la capacidad de crecimiento y rendimiento en Chile.

Straw *et al.* (1997), evaluaron la fitotoxicidad de varios insecticidas, aplicando durante 2 y 4 años árboles de *Sitka spruce*. Realizaron aplicaciones a diferentes dosis, a la dosis recomendada y al doble de esta. Se encontró que Pynosect (una mezcla de pyretrum + resmethrin) ocasiono una disminución significativa en el peso seco de raíz y hojas, así como un 13 – 30% de mortalidad de plantas. Dimetoato y malatión a dosis recomendada no ocasionaron efectos, pero aplicados al doble de esta dosis si presentaron notable daño. Otro efecto secundario de los insecticidas fue encontrado por Koike *et al.* (1997), quienes encontraron que ciertas lesiones de color café y secas del apio (*Apium graveolens*) es provocado por insecticidas aplicados a temperaturas altas (durante el verano) en California.

Otros investigadores señalan que las aplicaciones de insecticidas contribuyen a la disminución de enemigos naturales de las plagas, provocando que éstas se reestablezcan más rápidamente. Quiñónez (1992) y Riley et al (1992) observaron esta situación en Chile (1992), Erkilic y Uygun (1997) lo observaron en durazno (*Prunus persica*), otros cultivos donde se ha cuantificado el daño a los enemigos naturales ha sido en fresa (Easterbrook 1997) y algodón (*Gossypium hirsutum*) (Alonso 1992). Otros investigadores han realizado estudios de impacto ambiental más completos, por ejemplo Pevelin *et al.* (1999) realizaron un estudio del impacto de los insecticidas que se han utilizado en la campañas contra la langosta (*Locusta migratoria*) en Madagascar. Estudiaron el efecto de estas campañas en un gran número de especies habitantes. Se encontraron diversos efectos, dentro de los cuales destacan disminuciones del orden del 60% en poblaciones de lepidopteros y acaros.

2.5 La fluorescencia de la clorofila como indicador de estrés en plantas

Cuando la energía de la luz es absorbida por una molécula de clorofila, la configuración electrónica de la molécula es temporalmente alterada. Esta configuración “excitada” es inherentemente inestable y de corta vida (típicamente menos de 10^{-8} s). En los procesos fotosintéticos: esos procesos pueden ser categorizados en dos grupos: procesos fotoquímicos; utilizan energía absorbida por fotoquímica: durante lo cual la donación del

electrón por los pigmentos a una molécula aceptor ocurre; y procesos no fotoquímicos: estos procesos disipan la energía de los aparatos fotosintéticos en una forma en la cual no se maneja fotosíntesis. La energía es usualmente re-emitada de las moléculas en forma de radiación infrarroja (calor), y radiación roja/infrarroja la cual es conocida como fluorescencia de la clorofila (Bolhar *et al.*, 1993).

La clorofila se ve verde en luz blanca debido a que absorbe luz en la porción azul (alrededor de 420 nm) y roja (alrededor de 660 nm) del espectro visible y transmite y refleja en el verde (alrededor de 500 nm). Cada fotón de la luz roja absorbida por una molécula de clorofila eleva a un electrón de un estado estacionario a un estado excitado. Toda su energía es transferida en este proceso. La absorción de la luz azul causa una excitación aún mayor (debido al mayor contenido de energía del fotón azul), pero el electrón elevado regresa entonces a la “órbita roja” con demasiada rapidez como para permitir un trabajo químico útil. Por lo tanto, cualquiera que sea la calidad de la luz absorbida, el electrón alcanza el mismo nivel de energía más o menos inmediatamente después de la excitación y todos los puntos subsecuentes se derivan de este punto común de inicio (Brown, 1993).

Absorción de clorofila y fluorescencia en membranas fotosintéticas

En las membranas fotosintéticas de las plantas verdes, la mayor parte de la clorofila esta limitada a 3 diferentes proteínas. Tanto la absorción como el espectro fluorescente de esos pigmentos proteínicos, aislados en sus estados nativos son muy diferentes unos de otros. Cada espectro de absorción puede ser acomodado dentro de curvas de componentes Gaussian, las cuales a su vez son diferentes en los tres espectros. Probablemente esos componentes son grupos de moléculas de clorofila limitando en diferentes formas a una proteína. Esto sugiere que la organización de la clorofila dentro de grupos discretos en diferentes niveles de energía incrementa la eficiencia de la energía de la luz capturada y transferida en la fotosíntesis.

El evento primario de la fotosíntesis en todas las plantas es la absorción de luz por moléculas “antena” de pigmento, seguido rápidamente de la transferencia de esta energía a moléculas de clorofila especial (Ch 1) *a*, localizadas en zonas llamadas centros de reacción (RCs). La separación de cargas y la conversión de energía radiante a energía a energía

química toma lugar en los RCs.

En las plantas verdes existen dos tipos de RCs, los cuales llegan a ser oxidados en serie, y cada uno puede tener asociación con yacimientos de pigmentos antena separados. Tanto los pigmentos antena como los RCs son de alguna manera no covalentes limitados a ciertas proteínas. De acuerdo a modelos tripartitas de organización, algunas clorofilas son funcionales solo en Fotosistemas I (PSI), otros solo en Fotosistemas II (PSII), y el resto como antenas separadas de proteínas de clorofila cosechadoras de luz (LHCP), primeramente para PSII. Aunque es lógico que moléculas de pigmento limitadas a la misma molécula de proteína estarían lo suficientemente cerca para que ocurra una rápida transferencia de energía.

Desde las mediciones de absorción anteriores de Ch1 *a* en vivo, era obvio que el espectro fuera demasiado complejo para ser de una simple entidad absorbente. A través de los años la instrumentación y técnicas espectrofotométricas han sido mejoradas y sus datos computarizados. En los 70's, los resultados de dos laboratorios sugirieron que diferentes formas de absorción de Ch1 *a* existen in todas las plantas. French et al., propuso que 4 mayores y universales de Ch1 *a* absorben dentro de la región roja de espectro, cerca de 662, 670, 677 y 684 nm.

Emisión de la fluorescencia

La relación entre los tres procesos de descomposición , fotoquímica (P), fluorescencia (F) y calor (desactivación sin radiación, D) es mejor expresada matemáticamente usando relaciones constantes: de-excitación vía fotoquímica, k_P : y vía calor, k_D . El número total de de-excitaciones por segundo es:

$$(k_P + k_F + k_D)n,$$

donde n es el numero de moléculas de clorofila. Como esencialmente toda la fluorescencia a temperatura *room* se origina de moléculas de clorofila asociadas con el PSII, la producción (ϕ) de fluorescencia PSII puede ser definida bajo condiciones de iluminación constante como:

$$\phi F = k_F (k_P + k_F + k_D).$$

Bajo condiciones de luz bajas, cuando altas producciones de quantum pueden ser apagadas, cerca del 97% de los fotones absorbidos son usados en fotoquímica, 2.5% son

transformados en calor y 0.5% re-emitidos como luz fluorescente roja. Si todos los RCs PSII son cerrados, el 95- 97% de la energía absorbida puede ser desactivada vía calor y de 2.5-5% vía fluorescencia.

La fluorescencia de la clorofila es roja porque la diferencia de energía entre el nivel tierra y el primer nivel *singlet* iguala la energía de un fotón de luz roja; p.e: aproximadamente lo contrario de lo que pasa cuando la clorofila absorbe luz roja, sin embargo la emisión de picos de fluorescencia roja, alrededor de 685 nm es cambiada hacia una longitud de onda mas larga que la de los picos de absorción de clorofila roja. Este fenómeno es llamado *Cambio de Stoke* y resulta de una pérdida de energía como calor cuando la fluorescencia es emitida.

La competición entre los procesos fotoquímicos y no fotoquímicos por la energía absorbida asegura que una reducción en la tasa de un proceso será asociado con un correspondiente incremento en las relaciones de los procesos de competencia (p.e. una reducción en la disipación de energía por fotoquímica será reflejada en un incremento en la disipación de energía por procesos no fotoquímicos tales como producción de calor y fluorescencia de la clorofila). Consecuentemente, la medición de los cambios con un aparato medidor como el Fluorescence Measuring System (FMS 2) puede ser usado para inferir información acerca de los cambios en la eficiencia de la luz usada en fotoquímica (Hansatech Instruments 1996).

La señal de inducción de fluorescencia típica en vivo en luz continua es conocida como el fenómeno Kautsky: un declinamiento en la producción de fluorescencia sigue del pico (Fp) o del máximo de emisión (Fm). Normalmente, un apagamiento polifásico es observado, algunas veces ínter espaciado por uno o varios picos secundarios, hasta llegar a un estable nivel de fluorescencia, este estado es llamado fluorescencia “terminal” (Ft), éste es alcanzado en espacio de minutos. En un sentido más general, el termino apagamiento o “quenching”, denota todos los procesos que van suprimiendo a la florescencia hasta su punto más bajo desde su punto más alto. La extensión del apagamiento es expresado por coeficientes de apagamiento ($0 \leq q \leq 1$) indicando la proporción apagada de la máxima fluorescencia (Krause y Weis 1991).

Esta bien documentado que la función de las membranas tilacoides de las plantas son sensibles a variados tipos de estrés ambiental. El fotosistema II (PSII), incluyendo el

paso de oxidación del agua, parece ser particularmente sensible a un buen número de factores de estrés como temperatura, heladas, sequía y radiación excesiva (Bolhar et al, 1993), de tal manera que puede ser un buen indicador de estrés por otro tipo de factores como el uso de agroquímicos. Como todos esos esfuerzos afectan la función de PSII, directa o indirectamente, la fluorescencia puede ser usada como una herramienta, no solo para revelar mecanismos de respuesta al estrés, sino también para cuantificar este estrés bajo condiciones de campo o laboratorio (Bolhar *et al.* 1993).

2.6 Absorción, transporte y pérdida de agua por las plantas.

Una vez emergida la plántula y formadas las primeras raicillas absorbentes, se establece el flujo de agua en el sistema suelo-planta-atmósfera, formándose en la planta (que es parte intermediaria de este sistema) una columna de agua, desde las primeras raicillas hasta las últimas hojas y meristemas, obedeciendo las leyes físicas y termodinámicas para satisfacer la demanda evaporativa (Kramer, 1983, Salisbury y Ross 1992, Troyo 1994).

La planta en crecimiento puede considerarse como una unidad intermedia en el flujo de agua del suelo a la atmósfera. La atmósfera que rodea a las plantas, en general no está saturada de agua, por lo cual ejerce una presión de succión proporcional al logaritmo neperiano del cociente de la presión de vapor de agua actual del aire entre la máxima posible a una determinada temperatura; tal presión se puede determinar mediante la ecuación siguiente:

$$S = \frac{RT}{V_a} \ln \frac{p}{p^\circ}$$

Donde R es la constante universal de los gases, T es la temperatura absoluta y p la presión de vapor del agua de la fase considerada, mientras que p° es la presión de vapor del agua pura bajo condiciones estándar de temperatura y presión.

El término $\ln (p/ p^\circ)$ representa el estado del agua en una célula, tejido o suelo; se denomina hidratación o “hidratación”, por analogía con el término temperatura, y no indica el contenido de H₂O de un sistema, sino la actividad de agua en el mismo. Si se controla la temperatura, estima con precisión el potencial de succión de tejidos o disoluciones.

Tanto en el suelo como en la planta, en condiciones normales de crecimiento, hay

un potencial de succión mucho menor que en la atmósfera, de modo que durante la mayor parte de la vida de la planta existe un flujo de agua en la dirección suelo → planta → atmósfera. La continuidad de este proceso mantiene la turgencia de las células foliares, siempre y cuando exista suficiente agua disponible en el suelo, cuya demanda varía según la especie. Este flujo obedece el gradiente de potenciales de succión. En casos extremos de sequía edáfica, y en los casos en que el rocío humedece las hojas, se puede detener o invertir el flujo, por lo menos de la atmósfera a las hojas, sin embargo, este hecho no reviste importancia ecológica (Kramer 1983, Salisbury y Ross 1992).

En plantas superiores el abasto de agua ocurre básicamente por las raíces; el agua fluye a través de los compartimentos, donde encuentra varios tipos de resistencia, que depende de las características de los compartimentos y de la magnitud del flujo (Kramer 1983).

Con respecto a la serie suelo-raíz-xilema-hoja (cámara subestomática), se puede afirmar que el flujo (F) del agua del suelo (1) a la raíz (2) depende de la diferencia de potenciales de succión (tensión) $S_1 - S_2$ y de la resistencia al flujo entre el suelo y la raíz ($R_{1,2}$). La naturaleza de la resistencia puede ser muy compleja, ya que intervienen fenómenos de hidratación, de superficie, etc. En condiciones de flujo constante a través de todos los compartimientos se obtiene:

$$F = \frac{S_{1,2}}{R_{1,2}} = \frac{S_{2,3}}{R_{2,3}} = \dots = \frac{S_{n, n+1}}{R_{n, n+1}}$$

Para un cierto flujo, las resistencias varían según las diferencias de S en los compartimentos considerados, por tanto, la mayor resistencia al flujo se encuentre donde el dS es mayor; tal situación se presenta en condiciones de aporte constante de agua, entre la hoja y la atmósfera (Slatyer 1967).

Los principales factores que afectan el movimiento estomático son los siguientes:

- a) Hídricos: la escasez del agua aportada por las hojas reduce la turgencia de las células oclusivas (estomáticas), las que terminan por cerrarse y reducen así la transpiración.

- b) Concentración del CO₂: si en la cavidad subestomática la concentración de CO₂ es mayor a la del aire, se cierra el estoma, si es menor, se abre.
- c) Luz: La exposición de las células oclusivas suscita la apertura estomática debido a dos fenómenos: la síntesis de azúcares en los cloroplastos de las células oclusivas (aumento de S), y el descenso de la concentración del CO₂ de la cámara subestomática por fijación de este gas en el mesófilo.
- d) Temperatura: un incremento moderado de la temperatura foliar provoca la apertura estomática, y un aumento excesivo causa el cierre, debido posiblemente a un aumento del nivel de CO₂ intercelular (Salisbury y Ross 1992).

Los estomas tienen ciclos diurnos de apertura y cierre, sobre los que influyen los factores señalados, aunque a veces predomine uno de ellos. Al pasar de la luz a oscuridad el cierre estomático puede responder al incremento de CO₂ debido al cese de la fotosíntesis. En el día, el ascenso de temperatura foliar y el déficit de agua, causan pérdida parcial de turgencia foliar y pueden producir cierre estomático; además, la estructura estomática afecta la resistencia al flujo de CO₂ (Kramer 1983).

2.7 Proteínas y enzimas.

Definición y características de las proteínas.

La denominación de proteínas (del griego protos, primero) fue propuesta por Berzelius a Mulder, quien la aplicó en 1938 a sustancias nitrogenadas complejas encontradas en las células de todos los organismos vivos. Las actividades físicas y químicas que constituyen la vida de la célula están catalizadas biológicamente por enzimas, las cuales funcionan reduciendo la energía de activación de las moléculas, facilitando la ocurrencia de las reacciones termodinámicamente posibles (Bidwell 1979). Todas las enzimas son de naturaleza proteica. Algunas proteínas tienen un papel como elementos estructurales, otras actúan como hormonas o transportadores de oxígeno. En animales, en algunos casos participan en la contracción muscular, se asocian con los genes y están relacionadas con los mecanismos de defensa inmunológica en forma de anticuerpos.

Una enzima es una proteína que puede aumentar enormemente la velocidad de una

reacción bioquímica y cuya acción es en general específica de dicha reacción. Al igual que todos los catalizadores orgánicos, los productos finales no son afectados por la enzima (Devlin 1980). Las enzimas son fácilmente desnaturalizadas por el calor y diversos agentes químicos y presentan una conformación tal, que ciertos grupos radicales (R) del esqueleto polipeptídico se encuentran en yuxtaposición formando una estructura altamente específica que constituye el centro activo. La organización espacial de las estructuras del centro activo, determinan no solamente qué compuestos pueden encajar estereo-específicamente en él, sino también las características de los acontecimientos posteriores que conducen a la conversión del sustrato en producto.

La enzima peroxidasa: definición y funcionalidad.

El nombre de peroxidasa fué dado por Linossier, quien las aisló en 1898 a partir de la pus. Las peroxidases (donador H_2O_2 oxidorreductasa E.C. 1.11.1.7) son un grupo heterogéneo de enzimas porfirínicas que catalizan reacciones en las que el peróxido de hidrógeno actúa como aceptor de electrones. En los últimos 50 años se ha incrementado el interés por el estudio de ésta enzima. La reacción catalizada por ésta enzima es: $AH_2 + H_2O_2 \rightarrow A + 2H_2O$, siendo AH_2 un fenol, ácido p-amino-benzoico, p-fenildiamina, ácido ascórbico o formas leuco idicadoras de oxidación-reducción; también oxida el ferrocitocromo C.

La peroxidasa que se ha estudiado más a fondo es la del rábano rústico, que contiene 1.45% de hemina y tiene un peso molecular que varía de 40, 000 a 50, 000 daltons (Barman 1985), encontrándose en ella un átomo de hierro por molécula de proteína. La peroxidasa presenta un átomo de hierro por molécula de proteína y se disocia en una mezcla de acetona x HCl a $-150^\circ C$, la ferroporfirina permanece en solución en tanto que la proteína sin pigmento se precipita. La fracción protéica es catalíticamente inactiva, pero si se le añade hemina (preparada a partir de hemoglobina) a un pH de 7.5, se restablece en gran medida la actividad catalítica original.

Los análisis específicos de la peroxidasa del rábano indican que ésta consiste en un grupo hemin prostético, $2Ca^{+2}$ y 308 residuos de aminoácidos, incluyendo 4 puentes disulfuro. Su punto isoeléctrico es de 7.2; su pH óptimo es de 7.0, es inhibida irreversiblemente por cianida y sulfitos a concentraciones de 10^{-5} M. La enzima muestra

una alta especificidad y su actividad es observada con peróxido de hidrógeno, metanol y etanol (Worthington 1972).

La localización intracelular de las peroxidasas ha sido objeto de varios estudios. Se han encontrado en las paredes celulares y dentro del citoplasma en diferentes organelos, como en la vacuola, el plasmalema, ribosomas, lisosomas, núcleo (Gaspar *et al.* 1982). La localización de peroxidasas también ha sido reportada en los espacios extracelulares. En análisis de cultivos de células en suspensión se ha observado que las peroxidasas son secretadas hacia el medio de crecimiento, para el caso de la zanahoria (Chibbar *et al.* 1984), cacahuete, papa, espinaca (Fry 1980), rábano y Cowpea (Moreno *et al.* 1989).

Procesos fisiológicos en los que intervienen las peroxidasas.

Las peroxidasas han sido asociadas directa o indirectamente con varios procesos fisiológicos, incluyendo la abscisión, enanismo, envejecimiento, dominación apical, tolerancia al frío (Gaspar *et al.* 1982), dormancia, desarrollo y maduración del fruto, germinación y desarrollo temprano, reacción y resistencia contra parásitos, expresión del sexo, tuberización, entre otras características. Además, se ha encontrado que las peroxidasas realizan varias funciones importantes dentro del crecimiento y desarrollo de la planta, entre las que destacan las siguientes:

a) el catabolismo de auxinas.

b) formación de lignina, es decir participan en los mecanismos de lignificación por medio de la oxidación alcohol fumárico y eugenol para producir lignina

c) mecanismos de defensa contra organismos patógenos, generalmente, las plantas resistentes presentan una gran actividad peroxidásica, mayor que en las plantas susceptibles, después de la inoculación con organismos patógenos, además de la resistencia natural a la infección, la resistencia puede ser inducida después de la primera infección o por agentes físicos o químicos.

d) respiración, las mitocondrias son una posible fuente de peroxidasas (Gaspar *et al.* 1982). Se ha sugerido que la peroxidasa puede proveer una ruta alternativa para la oxidación o reducción de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), la citocromo C peroxidasa es otro ejemplo de peroxidación dentro de los procesos metabólicos, dentro de condiciones normales de peróxidos hay una producción de oxígeno, lo que demuestra la

participación de la peroxidasa dentro del transporte electrónico

e) organogénesis y

f) eliminación de productos tóxicos de oxígeno, la reducción biológica del oxígeno está acompañada por la producción de radicales libres que son peligrosamente reactivos. Los radicales libres de oxígeno son producto normales del metabolismo aeróbico; la sobrevivencia de los seres que lo producen depende de un sistema de defensa enzimático. La reducción completa de una molécula de oxígeno requiere de 4 electrones y los intermediarios aparecen conforme sucede la reacción. Estos son: el radical superóxido (O_2^-) el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^-). El radical superóxido es eliminado por la enzima superóxido dismutasa (EC.1.15.1.1) que cataliza su producción a peróxido de hidrógeno y oxígeno (Fridovich, 1957). El peróxido de hidrógeno es removido por la catalasa (E.C. 1.11.1.6) que lo transforma en agua y oxígeno (Rapoport y Muller, 1974) y por la peroxidasa que lo reduce a agua empleando una gran variedad de reductores disponibles en la célula. Es evidente que una eficiente eliminación del O_2 y H_2O_2 evita la formación de radicales hidroxilo (OH^-), lo cual es afortunado, ya que el radical hidroxilo reacciona fuertemente con muchas sustancias químicas y su remoción biológica sería imposible, porque no existe ninguna enzima que lo descomponga.

2.8. La actividad de la peroxidasa como un indicador de estrés.

Las peroxidasas han sido usadas como indicadores bioquímicos debido a que su actividad y composición cambia con el estado fisiológico del organismo (Lobarzawsky et al 1991). Las peroxidasas han sido involucradas en numerosos procesos fisiológicos y bioquímicos, tales como elongación y crecimiento celular (Wallace 1994, Lin y Kao 1999), diferenciación y desarrollo (Lobarzawsky *et al.* 1991, Mansouri *et al.* 1999, Lagrimini *et al.* 1997), el catabolismo de las auxinas (Largimini 1997), lignificación (Sato *et al.* 1999, Otter y Polle 1997), así como respuesta a estrés tanto biótico como abiótico (Lin et Kao 1999, Mohan *et al.* 1993).

De acuerdo a la literatura, las plantas responden, tanto a estrés interno como externo mostrando un incremento en la actividad peroxidásica; sin embargo, unos pocos reportes muestran una disminución en esta actividad. Muchos estudios han indicado una correlación

entre altos niveles de actividad peroxidasa y bajos niveles de crecimiento en las plantas (Lobarzawsky et al 1991, Sitbon *et al.* 1999, Fang y Kao 2000).

La actividad peroxidasa ha sido usada como indicador de estrés en las plantas en estudios con exceso de hierro, cobre y zinc (Fang y Kao 2000), NaCl (Lin y Kao 1999), otros metales (Ezaki *et al.* 1996). Casi todos los tipos de estrés han incrementado la actividad peroxidasa en las plantas afectadas, pero en algunos estudios se ha reportado una disminución de esta actividad (Stevens *et al.* 1978).

A pesar de que actualmente no se ha demostrado que cada isoenzima es producto de un gen, es evidente de que cada genotipo tiene un patrón enzimático reconocible y que los híbridos muestran generalmente patrones aditivos de las peroxidases de los progenitores. Las isoenzimas pueden ser usadas como marcadores bioquímicos de expresión del sexo, ya que se han encontrado diferencias en cuanto a actividad en el gineceo en comparación con el androceo de plantas de calabaza (Retig y Rudich, 1972), mientras que no se han encontrado diferencias en los patrones de isoenzimas existen algunos datos acerca de las actividades específicas y multiplicación de las peroxidases en relación con el genotipo de cada especie (Scandalios 1979).

La actividad peroxidásica también puede ser un indicador de diferentes niveles de iones y es un marcador bioquímico de varios tipos de contaminación (Curtis *et al.*, 1976; Castillo, 1985). Las peroxidases vegetales han sido usadas frecuentemente como marcadores para estudios de la respuesta de las plantas a varios contaminantes del aire como fluoruros, ozono (Dass y Weaver, 1986), nitrato y sulfato (Horsman y Wellburn, 1975), plomo (Maier, 1978), zinc (Niemtur, 1979) y ácido clorhídrico (Endress y Suárez, 1980). Todas éstas aumentan la actividad de las peroxidases en las plantas afectadas. En algunos casos se ha encontrado un cambio en el patrón electroforético de las isoperoxidases (Curtis y Howell, 1971).

2.9 La actividad de la Superóxido dismutasa como un indicador de estrés.

Las superóxido dismutasas (SOD) son enzimas antioxidantes que se encuentran en los organismos vivos, lógicamente incluyendo los vegetales, y en todos realizan la misma función. Las SOD son consideradas la primera línea defensiva contra los efectos deletéreos

de los oxiradicales de las células. Las SOD son metaloproteínas que catalizan la dismutación de los radicales superóxidos (O_2^-) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno. Existen evidencias de que los radicales superóxidos o radicales libres dañan la secuenciación de DNA, en humanos provocan trastornos inflamatorios, degeneraciones tisulares, son iniciadores y promotores de tumores, y están inmiscuidas en la patogénesis de muchas enfermedades. En todos los casos las SOD han demostrado proteger contra esos efectos deletéreos (Hassan y Schellhorn 1988, Deby 1991).

Deby (1991) hace una descripción de la bioquímica del oxígeno y menciona que un radical libre es un átomo o molécula, de cuyos electrones uno no está aparejado, el cual es llamado “soltero”. El electrón soltero confiere reactividad muy elevada a los radicales libres, que tienden a capturar un electrón para reaparejar su electrón solitario. En la materia viva, los radicales libres se originan en la captura de átomos de hidrógeno (electrón más protón), a expensas de moléculas orgánicas próximas. Existe, entonces, ruptura de un enlace covalente entre un átomo de carbono y un átomo de hidrógeno, esto da lugar a deshidrogenaciones que crean nuevos radicales, los que a su vez capturan electrones y así sucesivamente; esto hace que el estado del radical libre sea en un principio muy inestable cuya detección resulta particularmente difícil. Señala, además, que existen radicales libres estables y poco reaccionables, como el tocoferilo y ascorbilo. Las reacciones en las que intervienen radicales libres son llamadas radicalares.

Deby (1991) apunta también que ya desde 1900 se demostró que el oxígeno reacciona con todos los radicales libres formando compuestos llamados peróxidos (como el agua oxigenada).

En los seres vivos, para que haya una reacción entre el oxígeno y una molécula orgánica, hay que proporcionar energía al sistema, gracias a las metaloenzimas y así, una de las dos moléculas pasará al estado radical. La transformación del oxígeno en radical libre puede efectuarse por reducción de la molécula de oxígeno (O_2), es decir por captación de un electrón que transforma este elemento en una especie oxigenada activada, el anión superóxido. Los enzimas que catalizan la reducción del oxígeno son las oxidasas, como la xantina-oxidasa. El anión superóxido sufre, espontáneamente o bajo la acción de una enzima (la SOD), una reacción de dismutación: dos moléculas parecidas reaccionan entre sí, una de ellas oxidándose y la otra reduciéndose, produciendo agua oxigenada que, a su

vez, se transforma, por ruptura de enlace peróxido (O-O), en especies oxigenadas muy oxidantes, especialmente el radical hidroxilo OH^- , que es un radical hiperactivo y destructivo.

Mac Cord y Fridovich (1978), atribuyeron toda la toxicidad del oxígeno al anión superóxido, aunque esto fue refutado en estudios posteriores, donde señalaban que las SODs no tenían utilidad; sin embargo, en estos estudios de Deby (1990) se señala que vuelven a demostrar la nocividad del superóxido por si mismo, además de la que significa como fuente de oxígeno “singlet”, cuyos efectos deletéreos son eliminados por la SOD.

Fridovich (1978) menciona que el herbicida Paraquat, el cual incrementa la tasa de radicales O_2 , es mucho más tóxico bajo condiciones aeróbicas que anaeróbicas, y que de hecho, el paraquat (gramoxone[®]) sinergiza la actividad del oxígeno.

La SOD juega un importante papel en la eliminación de radicales libres, formados durante el metabolismo del paraquat, el cual es ampliamente utilizado como herbicida de contacto de amplio espectro, el cual de algún modo daña las membranas de las células epiteliales (Vig y Nemcsók 1989).

Del Longo *et al.* (1993) utilizaron la actividad de SOD como un indicador del estrés por sequía en maíz, y esta actividad resultó más alta en la variedad tolerante que en la susceptible a la sequía. Las soluciones fueron ensayadas para SOD por medio de rivo flavina/nitroblue tatrastoluim (NBT), señalando una modificación descrita en un trabajo previo de este autor (Walker *et al.* 1987). Una unidad de actividad SOD fue definida como la que contiene en una cantidad de muestra requerida en el ensayo para inhibir la producción de formazan al 50%.

Bhunja *et al.* (1993) hicieron un estudio para ver los efectos en el contenido de glutation, y la actividad de la glutathionreductasa (GR) y la superóxido dismutasa (SOD) en la cianobacteria *Nostoc muscorum* y encontraron que GR y SOD fueron significativamente estimuladas a concentraciones de glutation iguales o mayores de 10mg/L. Un bajo contenido de glutation disminuyó la actividad fotosintética, fue observado un incremento en el nivel de H_2O_2 en cianobacterias tratadas con plaguicidas.

3. HIPOTESIS DE TRABAJO

En la mayoría de las hortalizas, como el tomate, producidas bajo sistemas convencionales, en ocasiones se aplican insecticidas de manera excesiva. En el cultivo del chile, las aplicaciones de insecticidas van dirigidas principalmente al picudo o barrenillo. Debido a las dificultades que se tienen para controlar esta plaga los agricultores elevan el número de aplicaciones, en mezclas y en dosis altas. Por otra parte, algunos autores han demostrado que los insecticidas químicos organofosforados pueden provocar efectos nocivos en algunas plantas cuando se aplican en dosis superiores a las recomendadas en las etiquetas o en cultivos no autorizados.

En base a lo anterior, se establece la hipótesis de el presente trabajo:

Las aplicaciones de insecticidas químicos organofosforados, dependiendo de la dosis y la frecuencia de aplicación, provocarán alteraciones en algunos procesos fisiológicos y/o metabólicos de las plantas de chile y tomate, tales como transpiración, conductancia estomática, fluorescencia de clorofila, flujo de savia, contenido de proteínas y la actividad de enzimas marcadores de estrés y finalmente en el rendimiento.

Con los resultados en los parámetros mencionados y en correlación con la respuesta de la plaga a estos productos, será posible demostrar que las dosis recomendadas en las etiquetas de los insecticidas son suficientes para controlar la plaga, aplicando los insecticidas sobre los adultos, minimizando el efecto sobre la funcionalidad de componentes fundamentales para el metabolismo de las plantas.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de los insecticidas Paratión metílico CE720®, Gusatión 35PH®, Tamarón 600LM® y metamidofos como ingrediente activo sin mezclas, así como Bioneem® y Confidor en diferentes dosis y frecuencias, en la fitotoxicidad en el chile (*Capsicum annum* L), utilizando la variedad Ancho San Luis. Para ello se considera la susceptibilidad del barrenillo del chile (*Anthonomus eugenii* Cano) con el fin de obtener las dosis y frecuencias de aplicación óptimas para el menor daño a las plantas y mayor mortalidad hacia la plaga. Asimismo, se pretende evaluar el efecto tóxico del Tamarón 600LM, del Thiodan 35CE y del surfactante Inex en un cultivar de tomate (Río Grande).

4.1 Objetivos particulares

- a) Evaluar el efecto de los insecticidas Paratión metílico CE720®, Gusatión 35PH®, Tamarón 600LM® y metamidofos a diferentes dosis y frecuencias de aplicación, sobre: a) parámetros fisiológicos de la hoja del cultivo, como lo son temperatura foliar, transpiración, fluorescencia de la clorofila, conductancia estomática y flujo de savia, b) rendimiento y dinámica de floración y fructificación.
- b) Estudiar los efectos de los mismos insecticidas y dosis sobre la actividad enzimática del cultivo, para lo cual se evalúa el contenido de proteínas, la actividad peroxidasa y superóxido dismutasa en el tejido vegetal como marcadores fisiológicos.
- c) Evaluar el efecto sobre el desarrollo de plántulas recién germinadas de los insecticidas, comparándolos con insecticidas novedosos de baja toxicidad, como lo es el extracto de neem, así como el imidacloprid.
- d) Evaluar la susceptibilidad del barrenillo del chile a los insecticidas utilizados en el estudio, considerando individuos extraídos de predios comerciales del Estado de Baja California Sur.

- e) Evaluar el efecto de los insecticidas Tamarón 600LM, Thiodan 35 CE y el surfactante Inex sobre el cultivar Río Grande de tomate y medir el efecto benéfico del promotor de crecimiento Biozyme.

5. MATERIALES Y METODOS

Este trabajo fue realizado en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR), localizado adyacente al poblado El Comitán, poblado suburbano ubicado en la porción meridional de la Península de Baja California, coordenadas 24°08'N y 110°24'W, a 17 Km al oeste de la ciudad de La Paz, B.C.S., México, a 6 m sobre el nivel del mar.

El trabajo de la evaluación de la fitotoxicidad se desarrolló en cuatro etapas principales, tal como se describe a continuación.

5.1 Evaluación de la Fitotoxicidad por medio de variables agronómicas.

El experimento se desarrolló bajo condiciones de invernadero para evitar el ataque de plagas y enfermedades en las plantas y verificar que los efectos fueran provocados solamente por los insecticidas.

El 18 de abril de 1999 se efectuó la siembra; se utilizó la variedad Ancho San Luis (Petoseed®), en virtud de que es un cultivar ampliamente utilizado en el noroeste de México. El sustrato utilizado fue una mezcla comercial de materia orgánica (Sunshine 3®). Las plántulas obtenidas fueron trasplantadas en macetas tres semanas después de la germinación. Todas las plantas recibieron el mismo manejo agronómico, el cual consistió en un riego diario de 300 mL de solución nutritiva, con la fórmula de fertilización 800 g de MgSO₄ + 1600 g de Ca (NO₃)₂ + 100 g de 06-00-09 + 400 g de 11-60-00 disueltos en 20 litros de agua.

Se utilizó un diseño trifactorial, completamente al azar, con tres repeticiones, considerando para el factor A los insecticidas: Paratión CE720®, paratión metílico (O,O-dimethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate), Gusatión 35PH®, cuyo ingrediente activo es el azinfos metil (O,O – dimethyl – s - [(4 – oxo - 1, 2, 3 – benzotriazin – 3 (4H) -yl) methyl] phosphorodithioate), metamidofos (O,S-dimetil fosforo amidotioato) y Tamarón 600 LM® (metamidofos), empleando agua como testigo. Tales insecticidas representan al grupo de organofosforados más utilizados para el control del barrenillo del chile en el noroeste de México. Como factor B se consideraron cuatro dosis de aplicación: dosis media recomendada de cada insecticida para el picudo del chile (R), media dosis (1/2 R), 1.5

veces (1.5 R) y 2 veces la dosis media recomendada (2 R). El Factor C consistió en tres frecuencias de aplicación: una vez por semana, dos veces por semana y una vez cada dos semanas.

Una semana después del inicio de floración del cultivo, se inició la aplicación de los tratamientos. Lo anterior se realizó diluyendo los insecticidas en agua en las concentraciones correspondientes, efectuando la aplicación con atomizador directamente en cada planta; los tratamientos continuaron durante 6 semanas.

Durante las seis semanas de aplicación de tratamientos, se midió una vez por semana la fluorescencia de la clorofila en las hojas con un método no destructivo (Butler 1998, Bolhar 1993). Se empleó un medidor de fluorescencia *Minolta SPAD-502*. Los datos obtenidos a través del medidor de fluorescencia se transformaron a $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de clorofila total por medio de la ecuación $y = 0.031x - 0.188$, de acuerdo a la correlación encontrada por Gratani (1992). En dicha ecuación $y =$ contenido de clorofila y $x =$ fluorescencia de clorofila. Asimismo, una vez por semana se midió la temperatura foliar en $^{\circ}\text{C}$, la transpiración en $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, y la resistencia estomática en $\text{s} \cdot \text{m}^{-1}$. Las mediciones se efectuaron en hojas entre 5 y 7 cm de longitud del tercio superior de la planta; las lecturas fueron realizadas con un porómetro *LI-1600 STEADY STATE POROMETER (LI-COR)*. Se efectuaron análisis de varianza para clorofila, temperatura foliar, resistencia estomática y transpiración y las pruebas de comparación de medias mediante el método estadístico de Duncan ($p = 0.05$). Las variables respuesta fueron medidas durante las 6 semanas en que se efectuó la aplicación de los tratamientos.

Desde el inicio de la floración se realizó un conteo semanal del número de flores por planta, para establecer la dinámica de floración DFL. Dos semanas después se iniciaron los muestreos semanales para contar el número de frutos por planta, para la obtención de la dinámica de fructificación DFR. Los valores promedio de peso de fruto y tamaño de fruto se obtuvieron pesando y midiendo los frutos maduros de cada una de las plantas a lo largo de la etapa productiva. Finalmente el valor promedio de rendimiento se calculó sumando el peso de todos los frutos producidos por planta. Se efectuaron análisis de varianza para los datos encontrados para estas variables y se realizaron también pruebas de comparación de medias, mediante el método de Duncan ($\alpha=0.05$). Los muestreos para la obtención de DFL y DFR se realizaron durante 9 y 8 semanas, respectivamente. Mientras que los muestreos

para obtener peso, tamaño de fruto y rendimiento se llevaron a cabo diariamente para poder detectar oportunamente todos los frutos en estado de madurez. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Statistical Analysis System (SAS).

5.2 Evaluación de la fitotoxicidad por medio de actividad de enzimas indicadoras de estrés

Con la finalidad de medir la actividad enzimática de las plantas como respuesta a las aplicaciones de insecticidas se estableció un nuevo experimento en invernadero. El día 30 de agosto de 1999 se sembró semilla de la misma variedad, en placas de germinación. El día 15 de octubre se trasplantaron las plántulas a macetas. Se utilizó un diseño bifactorial con las mismas dosis que las usadas en el primer experimento y los mismos insecticidas, con tres repeticiones. Las plantas recibieron un manejo similar al del primer experimento con respecto a la fertilización y el riego.

El 7 de noviembre, con las plantas en etapa de floración, se colectaron las primeras muestras de hojas para realizar las extracciones que se utilizan en los ensayos de material en tiempo cero y se realizó la primera aplicación de insecticidas. Posteriormente se siguieron tomando muestras semanales antes de la aplicación de insecticidas correspondientes durante 5 semanas.

El material biológico utilizado fue tejido vegetal (hojas) del tercio superior de las plantas, se utilizaron hojas de entre 3 y 5 cm de longitud. Para realizar el extracto de cada muestra, primero el material fue lavado con agua destilada y homogenizado en mortero en baño de hielo. Se pesó cada muestra en una balanza analítica y se adicionaron 4 volúmenes de Buffer Acetato pH 5.1 por peso. Una vez terminada la homogeneización de las muestras, se procedió a realizar una centrifugación a 30,000 x g por 15 min. El sobrenadante fue utilizado para los análisis de peroxidasa, superóxido dismutasa y proteína.

La actividad peroxidasa fue evaluada por el método de Boehringer (1975) y llevada a cabo con un espectrofotómetro SPECTRONIC 2000 (BAUSCH & LOMB USA). Los datos obtenidos fueron analizados por medio de análisis de varianza.

De igual manera se realizaron análisis de electroforesis con gel de polycrylamide (7.5%) a 120 V por 2.5 horas de acuerdo con el método reportado por Moreno *et al.* (1990)

usando geles de 8 x 6 x 0.1 cm sin adicionar SDS. Se aplicó una cantidad igual de proteína (25 µg) por cada muestra obtenida en la última semana de tratamientos. El gel fue teñido para actividad peroxidasa con una solución de 20 mM de guaiacol por 15 min, y posteriormente con peróxido de hidrógeno para el desarrollo del color.

La cuantificación del contenido de proteínas se llevó al cabo utilizando el método de Bradford (1976) utilizando albúmina bovina como *standard*. Para este análisis se utilizó un espectrofotómetro DU 640 (BECKMAN USA). La actividad de SOD fue analizada midiendo la inhibición de la tasa de reducción del ferricitocromo C por SOD, observado a 550 nm (McCord y Fridovich 1969).

5.3 Evaluación de la fitotoxicidad en plántulas recién germinadas.

El día 26 de marzo de 2001 se sembraron nuevamente semillas de chile cv. Ancho San Luis en 180 cajas de Petri. Se sembraron 30 semillas en cada caja y se agregaron 15 mL de agua destilada para su germinación. 7 días después de la siembra, las plántulas recién germinadas se cambiaron a otra caja de petri donde fueron sometidas a soluciones de diferentes insecticidas bajo un gradiente de dosis y tiempos de inmersión, estableciéndose un experimento con un diseño experimental trifactorial completamente al azar con tres repeticiones.

Como Factor A, se consideraron los insecticidas azinfos metil, metamidofos, Bioneem® (Azadiractina), y Confidor®, ingrediente activo imidacloprid (1-(6-cloro-3-piridín-3-dimetil)-N-nitroimidazolidin-2-ilidenamida) y agua como testigo.

Como factor B, tres concentraciones o dosis de aplicación, tomando como base las recomendaciones de las etiquetas de los productos comerciales, para confidor se recomienda utilizar 1 mL por medio litro de agua en estado de plántulas, pero en base a la concentración de ingrediente activo (32%), se calculó a 320 µL en medio litro de agua para la dosis media. Se utilizaron también dosis a la mitad (dosis baja) y al doble (dosis alta) de esta dosis media; esto es, 160, 320 y 640 µL por medio litro de agua destilada, respectivamente. Para Azinfos y Metamidofos se utilizaron las mismas dosis, mientras que para el Bioneem, se utilizaron 320, 640 y 1280 µL en medio litro de agua como dosis baja, media y alta.

Como Factor C, los tiempos de inmersión o exposición, esto es, cada tratamiento de insecticida y dosis fue sometido a 12, 24, 48 y 96 horas en su respectiva caja petri al efecto de 15 mL de la solución de insecticida y a la dosis correspondiente, todas las semillas fueron removidas de la solución a la que fueron sometidas en el tiempo correspondiente e inmediatamente cambiadas a otra caja petri conteniendo agua destilada.

Posteriormente, a los 16 días después de la siembra, se tomaron 5 plantas de cada caja de Petri, a las cuales se les midió la longitud de tallo y raíz así como el peso fresco y seco, también de parte aérea y raíz por separado para calcular la relación tallo/raíz de cada tratamiento. Otras 5 plantas de cada caja petri fueron tomadas para realizar análisis de contenido de carbohidratos y actividad enzimática.

5.4 Susceptibilidad de barrenillo del chile a los insecticidas.

5.4.1. Bioensayos

Para complementar la información de los insecticidas a las dosis utilizadas, se realizó un trabajo correspondiente al estudio de la toxicología o susceptibilidad de esta plaga a los productos utilizados. Este estudio se realizó de marzo a mayo de 1999 y de marzo a junio del 2000. El trabajo se inició con colectas de los individuos en predios comerciales de Pescadero y Todos Santos, B.C.S. debido a que son regiones donde el cultivo de chile ancho ocupa una amplia superficie. Se colectaron aproximadamente 2500 larvas dentro de frutos, los cuales se mantuvieron en cautiverio hasta la edad adulta en que fueron realizados los bioensayos.

El método utilizado para los bioensayos fue el de exposición residual descrito por Lagunes (1991), con modificaciones similares a las reportadas por Martínez (1994) y Servín (1996), que a continuación se describe: en frascos viales de cristal de 20 mL, se colocó 1 mL de cada una de las concentraciones (Cuadros 20-32) previamente preparadas de cada insecticida, utilizando como solvente acetona. Los frascos se dispusieron horizontalmente sobre un aparato giratorio, con el objeto de distribuir de manera uniforme el insecticida en toda la superficie interna. Con ayuda de un ventilador se dejaron secar totalmente los frascos eliminando el solvente, quedando impregnados solamente con el insecticida. Los frascos así preparados se taparon y se mantuvieron en un lugar seco y

oscuro durante períodos de tiempo no mayores a los quince días, para evitar la desnaturalización del compuesto.

En cada frasco se colocaron 5 adultos cuidando de no maltratarlos al introducirlos en los frascos. Los frascos se mantuvieron 24 horas en el laboratorio; posteriormente se calculó la mortalidad contando el número de picudos vivos o muertos en cada frasco, al cabo de ese tiempo.

5.4.2. Avances en la técnica para cría masiva de picudo del chile bajo condiciones de laboratorio

Con la finalidad de que, en estudios posteriores se puedan completar los estudios de toxicología, se establecieron algunas bases para instalar una técnica que permita obtener colonias de picudos y poder mantenerlas durante al menos 10 generaciones en cautiverio y libres del contacto con insecticidas, situación que no ha podido lograrse hasta la fecha, siendo una limitante para este tipo de estudios a nivel mundial.

Se realizó una colecta de chile poblano infestado de picudo en la localidad de Todos Santos, B. C. S., el mes de julio de 2000; éste material fue colocado en recipientes de plástico de aproximadamente 50 L de capacidad y se cubrió con tela translúcida, la cual fue sujeta con una banda elástica. Posteriormente se colocaron 50 adultos que tuvieran dos días de edad, sin diferenciar por sexo, en una jaula de 30 X 30 X 30 cm con paredes de cristal y una pared cubierta con una manga de tela translúcida para una mejor manipulación.

Para su alimentación, se les suministró miel de abeja al (10%) cada 4 días y agua en un recipiente provisto de una mecha de algodón de tal manera que el insecto tenga un mejor acceso a dicho alimento. La temperatura se mantuvo aproximadamente a 27 °C sin control de fotoperíodo (fotoperíodo natural).

Las "trampas" a probar para oviposición se elaboraron de la siguiente manera: A tres esferas de 1 cm de diámetro de unicel (nieve seca) envueltas en hojas frescas de la planta de chile, las cuales son previamente lavadas en una solución de hipoclorito al 1% aprox. (para evitar formación rápida de hongos) y eliminando el exceso de humedad con toallas de papel. Posteriormente, las esferas con hojas de plantas de chile se envolvieron en papel Parafilm. Luego se procedió a colocar un gancho a cada "chile trampa" y a sujetar las

trampas obtenidas con tela adhesiva de manera que estén sostenidos en los lugares altos de la jaula. Se revisaron cada 24 o 48 horas los “chiles-trampa”, lo cual se realizó retirando la capa de Parafilm; posteriormente se fueron retirando poco a poco las hojas. Los huevecillos que se fueron encontrando se pasaron a chiles frescos partidos por la mitad, por medio de unas pinzas entomológicas Bioquip (No.4748) se envolvieron con papel Parafilm y se colocaron en un recipiente siendo revisados diariamente. Se realizó el registro diario de las observaciones de cada chile donde los huevecillos fueron depositados para su eclosión y desarrollo larval.

5.5 Evaluación de la fitotoxicidad en un cultivar de tomate

El tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) es una especie de la misma familia (*Solanaceae*) que el chile, por lo que después de realizar los primeros análisis, surgió la interrogante de si era posible que otro cultivo de igual importancia en esta región presentara efectos similares con la aplicación de ciertos productos químicos. De tal manera que bajo objetivos e hipótesis similares que en el primer experimento con chile se desarrolló un experimento, como se describe a continuación.

Se obtuvieron plantas de tomate de la variedad Río Grande después de haber sido sembradas en germinadores. Las plantas fueron transplantadas en macetas y arregladas en un diseño experimental completamente al azar con tres factores y tres repeticiones dentro de un invernadero. Como principal factor (Factor A) se consideraron tres productos agroquímicos; los insecticidas metamidofos y endosulfan (6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiepin, 6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-, 3-oxido), así como un surfactante no iónico (INEX®). Como segundo factor (Factor B) se consideraron tres dosis de aplicación para cada uno de estos productos, estas fueron (1) la dosis correspondiente a la media recomendada en la etiqueta(R), (2) la mitad de esta dosis (0.5R) y (3) el doble de la misma (2R). La media recomendada se obtuvo al promediar la dosis máxima y mínima sugerida en la etiqueta para el cultivo de tomate para el control de mosca blanca. El tercer factor (Factor C) consistió en la aplicación de un promotor de crecimiento (Biozyme®) (c1) con aplicación, (c2) sin aplicación.

Los tratamientos se iniciaron tres semanas después de que empezó la etapa de

floración y se continuaron durante 6 semanas. Lo anterior se realizó diluyendo los insecticidas en agua en las concentraciones correspondientes, efectuando la aplicación con aspersor directamente en cada planta, utilizando un Atomizador Manual S700 (Bruden Equipamentos Ltda.). Se presentan los resultados de la última semana de aplicaciones. El contenido de clorofila fue obtenida con el método no destructivo a través de un medidor de fluorescencia (Minolta SPAD-502), convirtiendo las lecturas a $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de clorofila mediante la ecuación señalada para el cultivo de chile. Las variables temperatura foliar y transpiración se midieron con un porómetro (LI-1600 Steady State LI-COR). Los valores promedio de peso de fruto y tamaño de fruto se obtuvieron pesando y midiendo los frutos maduros de cada una de las plantas a lo largo de la etapa productiva. Finalmente, el valor promedio de rendimiento se calculó sumando el peso de todos los frutos producidos por planta. Se efectuaron análisis de varianza para los datos encontrados para peso y tamaño de fruto y rendimiento y se realizaron pruebas de comparación de medias, mediante el método de Duncan ($\alpha=0.05$). Los muestreos de frutos para obtener estas variables se llevaron a cabo diariamente para detectar de manera oportuna todos los frutos en estado de madurez.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1 Evaluación de la Fitotoxicidad mediante variables ecofisiológicas y el rendimiento

Los resultados que se presentan a continuación, corresponden al primer experimento llevado a cabo en el ciclo de 1999, donde se realizaron aplicaciones de los diversos insecticidas utilizados en ausencia de plagas. Los resultados estadísticos indicaron significancia para la mayoría de las variables medidas en la hoja mediante análisis de varianza (ANOVA) con respecto a los insecticidas, tal como lo podemos observar a continuación.

En el Cuadro 4 se observa el ANOVA, para el contenido de clorofila, es posible apreciar que los valores de F calculada fueron significativos para los factores principales, mientras que para las interacciones se observa una significancia estadística intermitente. De acuerdo a lo anterior, se presentan los Cuadros 5 y 6, donde se observan las comparaciones de medias para los factores principales y para la interacción de insecticidas (A) x dosis (B), la cual mostró la significancia estadística más continua, los valores presentados en el Cuadro 6 corresponden exclusivamente a la última semana de muestreos.

Cuadro 4. Análisis de Varianza Para Contenido de Clorofila.

FV	gl	Valores de F calculada para las variables					
		1a. sem 9 de jul	2a. sem 16 de jul	3a. sem 23 de jul	4a. sem 30 de jul	5a. sem 6 de ago	6a. sem 13 de ago
Insecticidas (A)	4	18.47**	6.20**	67.56**	116.36**	129.04**	142**
Dosis (B)	3	3.35*	12.38**	16.31**	10.43**	4.54**	11.13**
Frecuencias (C)	2	3.75*	9.44**	18.09**	13.82**	5.99**	11.46**
A x B	12	1.33 ns	4.04**	3.37*	2.11*	1.44 ns	2.61*
A x C	8	3.33*	4.67**	3.98*	4.57**	4.59**	4.51**
B x C	6	1.14 ns	1.23 ns	1.45 ns	1.90 ns	1.06 ns	1.27 ns
A x B x C	24	3.76 *	2.04 *	3.63*	3.50*	3.93*	4.05**

FV: Fuente de variación, gl: Grados de libertad, (*): diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$),

** diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$), ns: diferencia no significativa.

Cuadro 5. Contenido de clorofila ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) de la hoja de chile, con diferentes insecticidas y frecuencias de aplicación durante seis semanas de aplicaciones.

Tratamientos	1a. sem 9 de jul	2a. sem 16 de jul	3a. sem 23 de jul	4a. sem 30 de jul	5a. sem 6 de ago	6a. sem 13 de ago
Insecticidas (A)						
a1. Control	1.38 a	1.53 a	1.60 a	1.50 a	1.53 a	1.59 a
a2. Gus 35	1.31 b	1.45 b	1.36 c	1.18 c	1.16 c	1.16 c
a3. Par 720	1.25 c	1.51 a	1.38 c	1.16 c	1.11 d	1.15 c
a4. Ta 600	1.39 a	1.53 a	1.44 b	1.24 b	1.23 b	1.24 b
a5. Metami	1.39 a	1.54 a	1.45 b	1.26 b	1.23 b	1.24 b
Dosis (B)						
b1. 0.5 R	1.37 a	1.57 a	1.50 a	1.31 a	1.28 a	1.23 a
b2. 1 R	1.35 a	1.53 b	1.46 b	1.28 a	1.26 ab	1.29 b
b3. 1.5 R	1.34 ab	1.49 bc	1.42 c	1.24 b	1.24 bc	1.25 c
b4. 2 R	1.31 b	1.46 c	1.41 c	1.23 b	1.22 c	1.24 c
Frecuencia de aplicación (C)						
c1. 1 cada 2 semanas	1.34 a	1.54 a	1.47 a	1.28 a	1.25 ab	1.28 a
c2. 1 x sem	1.37 a	1.53 a	1.46 a	1.30 a	1.28 a	1.30 a
c3. 2 x sem	1.32 a	1.47 b	1.40 b	1.23 b	1.22 b	1.24 b

Nota: Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Duncan 0.05).

Cuadro 6. Valores promedio de la interacción Insecticida (A) x Dosis (B) del contenido de clorofila, en la última semana de muestreo.

	Metamidofos	Tamarón 600	Gusatión	Paratión
0.5 R	1.291*	1.270*	1.258*	1.207
R	1.234	1.275*	1.196	1.169
1.5R	1.254	1.180	1.102	1.103
2R	1.208	1.143	1.094	1.124

Valor Promedio de las plantas tratadas con agua (control): 1.492*

Nota: Los valores con asterisco (*) son estadísticamente similares. Valor Duncan = 0.237

Con respecto al contenido de la clorofila, la cual en general mostró la mayor sensibilidad a los tratamientos se presentan las Figuras 5 y 6, donde se compara el comportamiento de esta variable en la última semana de aplicaciones con respecto a las dosis.

En la Fig 5 se comparan los efectos de los insecticidas Paratión 720 y Gusatión 35 PH contra el testigo, las ecuaciones de regresión encontradas para el contenido de clorofila, con las diferentes dosis de cada tratamiento fueron las siguientes:

Gusatión, $y = 1.3098 - 0.1173x$, $r = 0.961$; Paratión, $y = 1.2301 - 0.0631x$; $r = 0.876$. De igual forma, en la Fig 6 se observan los insecticidas Tamarón 600 y metamidofos contra el testigo, cuyas ecuaciones de regresión son la siguientes:

Tamarón, $y = 1.2869 - 0.0355x$, $r = 0.524$; metamidofos, $y = 1.3049 - 0.0461x$, $r = 0.848$, en todas las ecuaciones referidas $y =$ el contenido de clorofila y $x =$ dosis de aplicación de cada producto mencionado y r es el nivel de significancia. En ambas gráficas se observa que el control mantiene un valor constante en todas las plantas medidas, mientras que los insecticidas afectan el contenido de clorofila en proporción a la dosis en la que se aplican. Esta situación resulta muy importante, debido a que, en términos reales la cantidad de moléculas de clorofila es especialmente significativa, ya que solo una pequeña parte de las clorofilas presentes en una hoja o cloroplasto, las del centro de reacción, intervienen en la transformación de la energía lumínica en energía química, es decir al reducirse el número de clorofilas, la posibilidad de llevar a cabo las reacciones que culminan en la acumulación de materia seca también disminuye (Salisbury y Ross 1992).

Cuadro 7. Análisis de Varianza Para Temperatura Foliar.

FV	gl	Valores de F calculada para las variables					
		1a. sem 9 de jul	2a. sem 16 de jul	3a. sem 23 de jul	4a. sem 30 de jul	5a. sem 6 de ago	6a. sem 13 de ago
Insecticidas (A)	4	4.12**	289.37**	35.21**	55.33**	248.76**	231.05**
Dosis (B)	3	3.20*	3.11*	12.94**	7.74**	13.14**	3.14*
Frecuencias (C)	2	3.89*	0.01 ns	9.08**	3.46*	4.56*	3.65*
A x B	12	2.83*	6.44 **	4.25**	10.32**	16.56**	4.68**
A x C	8	3.58**	3.05*	1.19 ns	3.84**	11.51**	2.50*
B x C	6	4.73**	4.99**	3.23 *	3.78**	3.48*	0.91 ns
A x B x C	24	3.28*	1.21 ns	1.54 ns	4.44**	4.11**	2.50*

FV: Fuente de variación, gl: Grados de libertad, (*): diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), ** diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$), ns: diferencia no significativa.

En el Cuadro 7 se muestra el ANOVA para la temperatura foliar, la información observada, indicó una tendencia similar a la del contenido de clorofila, se observaron valores estadísticamente significativos para los factores principales del diseño experimental y cierta intermitencia en la significancia de las interacciones. En el Cuadro 8 se presentan las comparaciones de medias de los factores principales. Al igual que con la clorofila, la temperatura resultó ser una variables sensible.

Cuadro 8. Temperatura foliar (°C) de chile, con diferentes insecticidas y frecuencias de aplicación durante seis semanas de aplicaciones.

Tratamiento	1a. sem 9 de jul	2a. sem 16 de jul	3a. sem 23 de jul	4a. sem 30 de jul	5a. sem 6 de ago	6a. sem 13 de ago
Insecticidas (A)						
a1. Control	29.78 ab	31.62 e	30.77 d	32.27 e	31.54 a	31.48 b
a2. Gus 35	28.86 bc	36.12 b	30.41 d	35.74 c	32.56 a	35.83 a
a3. Par 720	28.35 c	37.19 a	31.89 b	36.89 a	32.33 a	34.84 a
a4. Ta 600	29.92 ab	32.83 d	32.30 a	36.02 b	31.50 a	31.40 b
a5. Metami	30.34 a	34.30 c	31.48 c	35.09 d	31.93 a	31.26 b
Dosis (B)						
b1. 0.5 R	29.74 a	34.59 a	31.05 b	34.92 b	32.72 b	33.06 b
b2. 1 R	29.70 a	34.13 b	30.97 b	35.11 b	32.73 b	33.48 b
b3. 1.5 R	29.88 a	34.36 ab	31.64 a	35.38 a	33.02 a	33.85 a
b4. 2 R	28.49 b	34.56 a	31.82 a	35.41 a	33.09 a	33.92 a
Frecuencia de aplicación (C)						
c1. 1 cada 2 semanas	28.74 b	34.42 a	31.13 b	35.09 b	30.02 b	31.58 b
c2. 1 x sem	29.84 a	34.40 a	31.27 a	35.17 a	33.02 a	33.79 a
c3. 2 x sem	29.77 a	34.42 a	31.71 a	35.35 a	32.87 a	33.51 a

Nota: Valores con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales (Duncan 0.05)

Cuadro 9. Análisis de Varianza Para Resistencia estomática.

FV	gl	Valores de F calculada para las variables					
		1a. sem 9 de jul	2a. sem 16 de jul	3a. sem 23 de jul	4a. sem 30 de jul	5a. sem 6 de ago	6a. sem 13 de ago
Insecticidas (A)	4	29.31**	21.14**	2.35 ns	22.54**	4.33**	129.2**
Dosis (B)	3	5.55**	1.15 ns	1.68 ns	1.55 ns	2.00 ns	11.84**
Frecuencias (C)	2	0.62 ns	1.78 ns	0.87 ns	2.11 ns	3.00*	5.03**
A x B	12	4.10**	2.71**	1.07 ns	4.36**	2.44*	1.01 ns
A x C	8	2.72*	1.64 ns	1.00 ns	2.64*	1.65 ns	0.91 ns
B x C	6	2.35 *	1.72 ns	1.24 ns	0.87 ns	3.98**	6.89**
A x B x C	24	1.79*	1.99*	1.26 ns	3.05**	1.93*	1.53 ns

FV: Fuente de variación, gl: Grados de libertad, (*): diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), ** diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$), ns: diferencia no significativa.

Cuadro 10. Resistencia estomática ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$) en hojas de chile, con diferentes insecticidas y frecuencias de aplicación durante seis semanas de aplicaciones.

Tratamientos	1a. sem 9 de jul	2a. sem 16 de jul	3a. sem 23 de jul	4a. sem 30 de jul	5a. sem 6 de ago	6a. sem 13 de ago
	Insecticidas					
a1. Control	0.25 c	1.01 d	0.59 b	0.37 d	0.26 b	0.28 e
a2. Gus 35	1.00 b	2.50 b	1.97 a	0.66 a	0.39 a	1.48 a
a3. Par 720	1.27 a	3.54 a	1.60 ab	0.59 b	0.36 a	1.23 b
a4. Ta 600	0.47 c	1.94 bc	1.19 ab	0.50 c	0.38 a	0.97 c
a5. Metami	0.42 c	1.80 c	0.93 ab	0.57 b	0.33 ab	0.70 d

Nota: Valores con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales (Duncan 0.05)

En las dos variables que han sido mencionadas se han observado que todos los insecticidas provocaron efectos diferentes al control, pero incluso entre los insecticidas se observaron diferencias significativas. Para los casos de clorofila y temperatura, el Paratión y el Gusatión han mostrado mayor toxicidad que el metamidofos y el tamarón. En relación a los agentes oxidantes - como es el caso de los insecticidas - y la temperatura, Salisbury y Ross (1992) mencionan que ambos procesos desnaturalizan numerosas enzimas, muchas veces al inducir puentes disulfuro entre cadenas en las que normalmente se presentan grupos -SH de cisteína, éste y todos los cambios producidos en la planta con el uso de los insecticidas se ven reflejados en los datos observados. Los agentes oxidativos inhiben la fotosíntesis de la mayoría de las plantas expuestas (Stryer 1995)

Las variables resistencia estomática y transpiración mostraron un comportamiento similar entre sí. En los Cuadros 9 y 11 se presentan los ANOVA de estas variables. En ambos casos se apreciaron bajos niveles de significancia estadística, excepto para el factor insecticidas. En los Cuadros 10 y 12 se observan las comparaciones de medias de las dos variables. Estas dos variables siguen la misma tendencia, debido a que están directamente relacionadas una con otra, en cierto sentido, la transpiración depende de la apertura de los estomas.

Es probable que la transpiración y el comportamiento estomático no sigan la misma tendencia que el contenido de clorofila, debido a que, de acuerdo a la literatura, las variables que integran el comportamiento estomático están más ligadas y / o reguladas por factores ambientales, principalmente la temperatura, la humedad relativa y el déficit de vapor (Nieto-Garibay 2000, Fanjul y Barradas 1987).

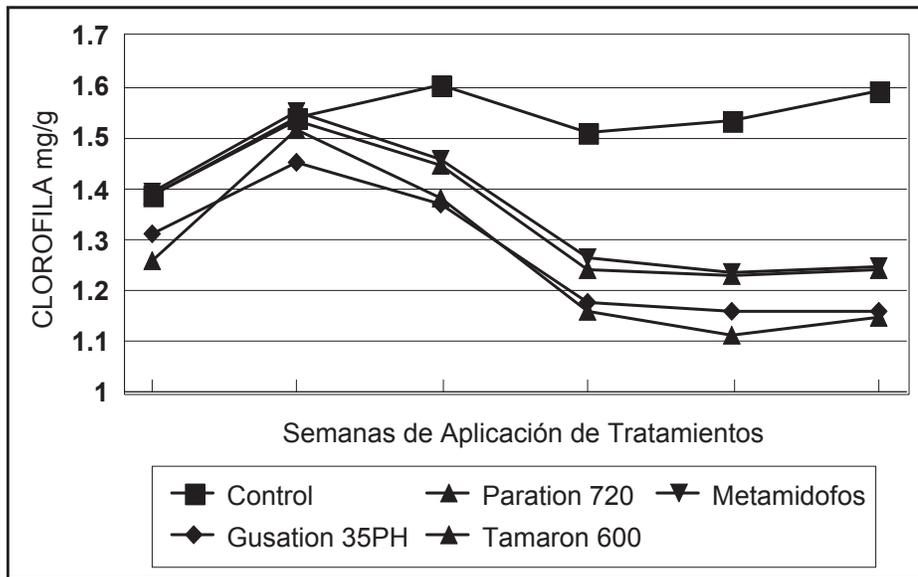


Fig 4. Contenido de clorofila de plantas de chile durante la aplicación de tratamientos

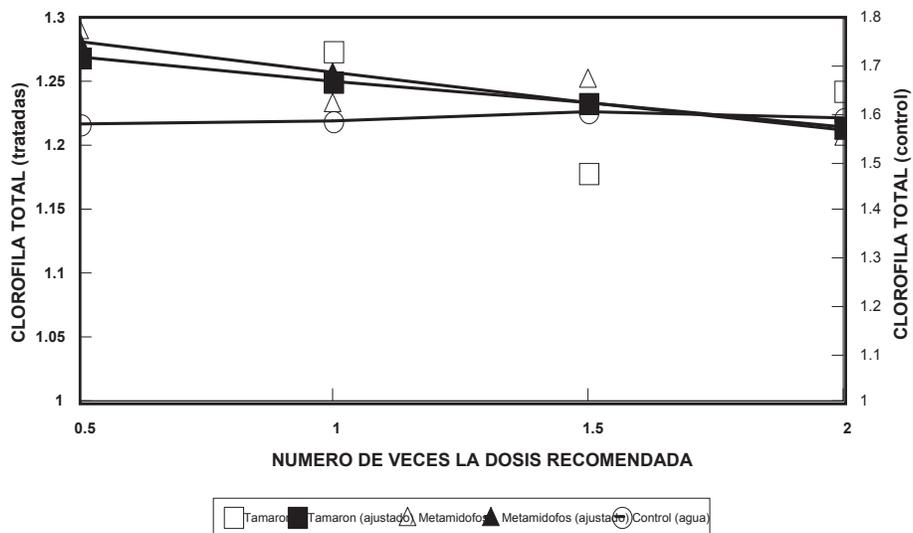


Fig 5. Contenido de clorofila del control y tratamientos con metamidofos y Tamarón 600 con respecto a las dosis utilizadas

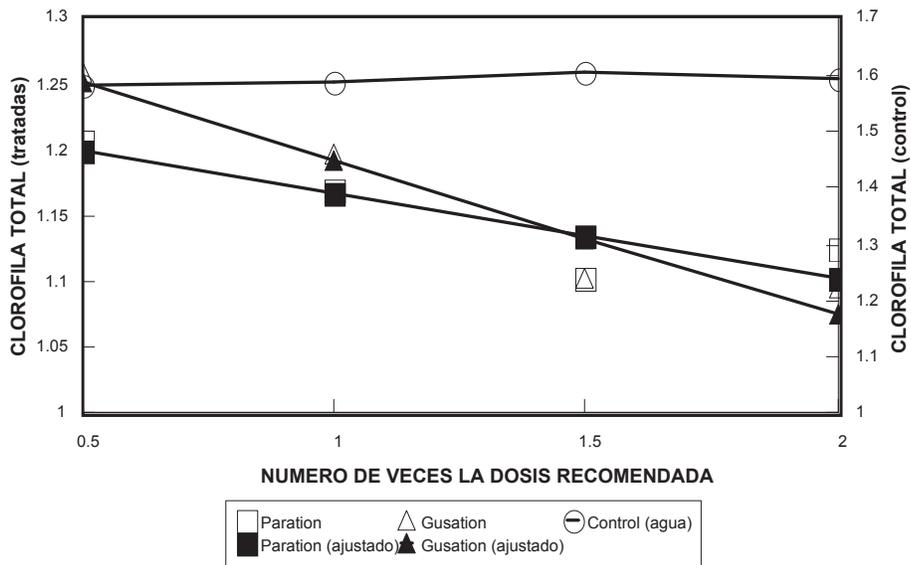


Fig 6. Contenido de clorofila del control y tratamientos con Gusación 35 PH y Paratión 720, con respecto a las dosis utilizadas

Lo anterior, en relación a que en el presente estudio, en general las plantas tratadas con insecticidas mostraron una temperatura más alta que el testigo, es posible pensar que se presente como consecuencias una disminución en el rendimiento (Cuadros 14 y 15) haya sido provocada por la desnaturalización de un gran número de enzimas, ya que como mencionan Salisbury y Ross (1992), cuando no se tiene un déficit hídrico en la planta es más fácil que el calor desnaturalice las enzimas, mencionando que esta es la razón por la que semillas (las cuales están parcialmente deshidratadas) pueden resistir temperaturas elevadas y de que la presencia de vapor en las autoclaves produzca esterilización con mayor rapidez que un horno con calor seco a la misma temperatura. El mismo autor señala que contrario a otros reinos, los vegetales no pueden regular su temperatura. Como consecuencia, todas las reacciones que en ellos ocurren son influenciadas en alto grado por las temperaturas.

Cuadro 11. Análisis de Varianza para Transpiración.

FV	gl	Valores de F calculada para las variables					
		1a. sem 9 de jul	2a. sem 16 de jul	3a. sem 23 de jul	4a. sem 30 de jul	5a. sem 6 de ago	6a. sem 13 de ago
Insecticidas (A)	4	195.65**	45.51**	127.88**	144.88**	32.75**	35.09**
Dosis (B)	3	3.58*	1.00 ns	8.13**	8.46**	1.72 ns	2.14 ns
Frecuencias (C)	2	0.41 ns	0.34 ns	0.19 ns	0.20 ns	0.96 ns	1.06 ns
A x B	12	5.05**	4.53**	1.88 ns	3.17**	1.00 ns	2.36*
A x C	8	2.46*	2.07 ns	2.99*	0.52 ns	2.09 ns	2.47*
B x C	6	0.91 ns	1.62 ns	3.82**	1.01 ns	1.24 ns	2.80*
A x B x C	24	2.45**	1.74 ns	1.69 ns	1.75*	0.65 ns	3.53**

FV: Fuente de variación, gl: Grados de libertad, (*): diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), ** diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$), ns: diferencia no significativa.

Cuadro 12. Transpiración ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) en hojas de chile, con diferentes insecticidas y frecuencias de aplicación durante seis semanas de aplicaciones

Tratamientos	1a. sem 9 de jul	2a. sem 16 de jul	3a. sem 23 de jul	4a. sem 30 de jul	5a. sem 6 de ago	6a. sem 13 de ago
	Insecticidas					
a1. Control	37.18 a	23.43 a	28.39 a	58.44 a	55.30 a	59.87 a
a2. Gus 35	17.01 d	13.75 c	14.10 d	43.71 e	54.89 a	53.67 b
a3. Par 720	14.45 e	9.68 d	12.22 e	45.44 d	55.69 a	52.16 bc
a4. Ta 600	27.92 c	14.66 c	15.91 c	50.69 c	45.91 c	49.03 c
a5. Metami	32.45 b	18.39 b	18.78 b	54.09 b	49.95 b	51.74 bc

Nota: Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Duncan 0.05)

En la comparación de medias de clorofila (Cuadro 5), se observa que en las primeras dos semanas de tratamientos solo el Gusatión 35 PH y el Paratión 720 afectaron dicha variable fisiológica; también desde la tercera hasta la última semana de aplicaciones los productos Tamarón 600 y metamidofos afectaron significativamente la clorofila. Las plantas manifestaron el efecto acumulativo de los insecticidas a través de las semanas en que se aplicaron los tratamientos (Fig. 4). En contraste, en la misma figura se observa como las plantas tratadas con agua mantuvieron valores constantes durante el mismo período.

De acuerdo con la literatura, se han observado tres fases en los que se da el metabolismo de los plaguicidas; la primera fase consiste de oxidación, reducción y reacciones hidrónicas (Orcutt y Nilsen 2000).

Las reacciones de oxidación son las más frecuentemente encontradas e incluyen la introducción de OH, NH₂ y grupos SH. Las reacciones de reducción envuelven la donación de electrones procedentes del sistema de transporte de electrones de la fotosíntesis (Orcutt y Nilsen 2000, Scheunert 1992). Probablemente es debido a este fenómeno que se presentó una disminución en el contenido de clorofila de las plantas tratadas con los insecticidas.

Las reacciones hidrolíticas están asociadas con ácidos carboxílicos, y sobre todo insecticidas organofosforados, carbamatos, entre otros. Los mismos autores señalan además, que la utilización de surfactantes en la aplicación de los productos puede originar una mayor toxicidad, porque facilita la entrada del producto al interior de la planta. Es posible entonces pensar que esta fue la causa de que el metamidofos, aplicado solo como ingrediente activo sin surfactantes evidenciara menos efectos tóxicos sobre la planta sobretodo en la clorofila y en otras que se presentan más adelante en este mismo capítulo.

Para las variables conductividad estomática y transpiración se encontraron resultados similares, se observó de manera similar que desde la tercera semana, Gusación y Paración mostraron diferencias significativas en los efectos en comparación con los otros insecticidas, los cuales mostraron comportamientos estadísticamente similares entre sí y diferentes en relación a Gusación y Paración. Los resultados sugieren que el insecticida metamidofos no fue diferente al aplicarlo como un producto convencional o como ingrediente activo, y que durante todo el experimento, Tamarón 600 y metamidofos provocaron menores efectos fitotóxicos que los otros insecticidas.

En cuanto a la frecuencia de aplicación, las aplicaciones más repetitivas (2 x sem), afectaron la clorofila significativamente más que los otros tratamientos durante las seis semanas (Cuadro 5), no siendo así para las demás variables. La clorofila resultó ser mucho más sensible a la fitotoxicidad por insecticidas que las demás variables, por lo que se esperarían menores rendimientos en las plantas, debido a la relación que existe entre clorofila y la capacidad fotosintética, al reducirse la fotosíntesis se afecta la producción de materia seca y por consiguiente el rendimiento. Lo anterior coincide con resultados obtenidos en relación a los daños fisiológicos a las plantas (Amer y Ali 1983, Amer y Farra 1983, Atale *et al.* 1995), y a los decrementos en rendimiento por efecto de uso de insecticidas (Devadas *et al.* 1986, Gilreath *et al.* 1987, Redy y Rao 1991).

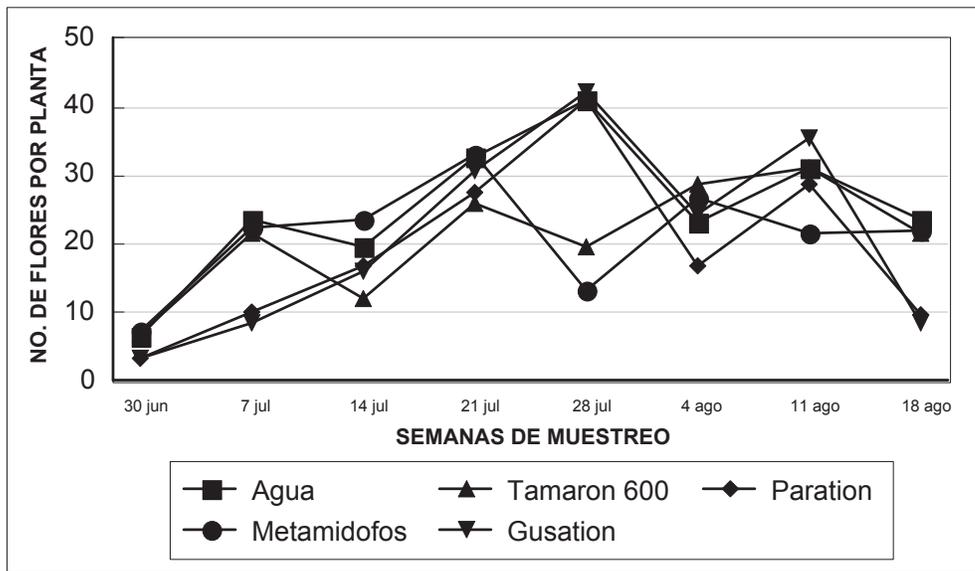


Fig 7. Dinámica de floración en el cultivo de chile, tratado con diferentes insecticidas

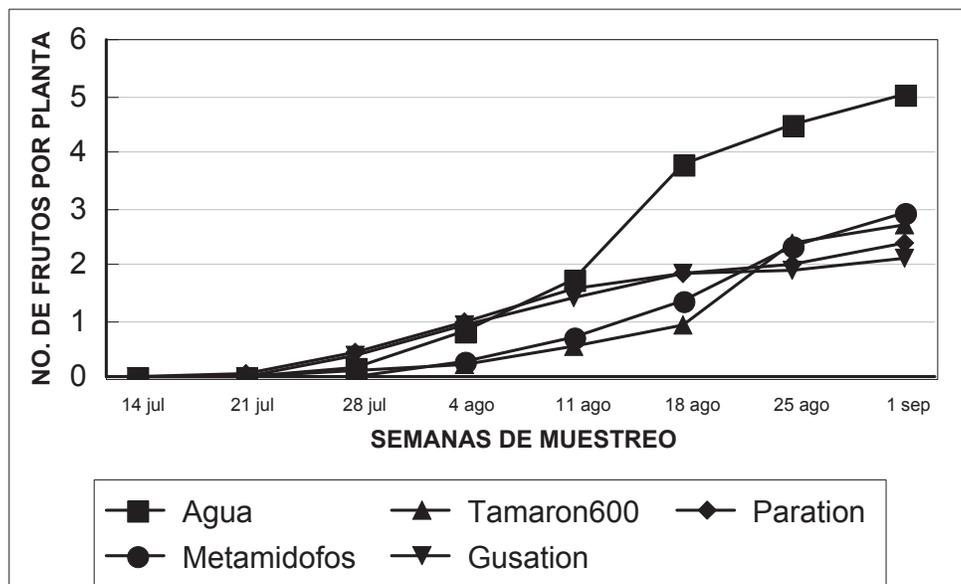


Fig 8. Dinámica de fructificación en el cultivo de chile, tratado con diferentes insecticidas

Como se verá más adelante, la aplicación de insecticidas provocó que las enzimas peroxidasa y superóxido dismutasa aumentaran su actividad (Fig 9 y 11) y que así como el contenido de clorofila disminuyó, pasó lo mismo con el contenido de proteína, y considerando que la ribulosa-1, 5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa o *rubisco* comprende más del 16% de las proteínas totales (Rawsthorne 1992) de ahí se deduce una de las principales causas probables de la disminución en el rendimiento. Además, el hecho de que disminuya el contenido de proteínas y con ello el contenido de rubisco, reduce las probabilidades de que la rubisco disponible realice la actividad carboxilasa y dadas las altas temperaturas predominantes en B.C.S. y que el Chile es una planta C_3 , aumente la actividad oxigenasa y con ello la disminución del rendimiento (Rawsthorne 1992).

Las Figuras 7 y 8 muestran la Dinámica de floración DFL y Dinámica de fructificación DFR respectivamente, con respecto a los insecticidas y el control utilizados. Podría esperarse que la mayoría de las flores producidas se convirtieran en frutos y se observaran gráficas muy similares para estos casos.

La DFL señala que la producción de flores fue muy alta, presentando valores de cerca de 40 flores por planta en una sola semana de muestreo en promedio, sin embargo, con ninguno de los tratamientos se obtuvieron más de 5 frutos por planta en promedio, como se observa en la Figura 8. Esto significa que independientemente de los tratamientos, el número de abortos fue muy alto.

Una de las causas que en conjunto con la fitotoxicidad contribuyeron al alto número de abortos fue la temperatura que se registró en la localidad durante las primeras cuatro semanas de floración, durante la etapa más cálida de la región (Schimidt 1992). La DFR muestra que en la producción de frutos se manifestaron efectos directos por los tratamientos, ya que desde la cuarta semana de muestreo, el testigo presentó una mayor producción de frutos con respecto a las plantas tratadas con insecticidas. Esta diferencia se manifestó finalmente en el rendimiento y sus componentes, como ya se ha mencionado.

La DFL muestra que la cuarta y quinta semana de floración son en las que se presentaron los picos de mayor producción y en esas mismas fechas se inició la fructificación, indicando, tal como lo mencionó Quiñónez (1993), que las semanas cuarta, quinta, sexta y séptima de floración son el “período crítico” o clave en la producción de Chile. Incluso, el autor mencionado sugirió realizar aplicaciones para controlar picudo

exclusivamente durante este período. El resultado de sus experimentos con respecto al rendimiento también coinciden con los obtenidos en este estudio, es decir, se obtuvo mayor rendimiento con dosis menores. Sin embargo, Quiñónez adjudicó esta diferencia al surgimiento de plagas secundarias, como resultado de la aplicación de dosis altas, mientras que nuestros resultados indicaron que el propio insecticida puede ser capaz de afectar el rendimiento.

Cuadro 13. Análisis de varianza para las variables Rendimiento, Peso de fruto y Tamaño de fruto de chile, con diferentes tratamientos de insecticidas, 4 dosis y 3 frecuencias de aplicación

Fuente de Variación	gl	Valores de F calculada de cada variable		
		RENDIMIENTO (g/planta)	PESO DE FRUTO (g)	TAMAÑO DE FRUTO (cm)
Insecticidas (A)	4	30.27**	2.03 ns	6.41**
Dosis (B)	3	6.36**	3.80**	5.38**
Frecuencia (C)	2	0.17 ns	0.38 ns	3.06 ns
A * B	15	2.66*	3.28**	2.69**
A * C	6	1.07 ns	1.67 ns	1.75 ns
B * C	8	1.45 ns	1.01 ns	2.64*
A * B * C	32	1.20 ns	1.33 ns	2.42**

gl: Grados de libertad, (*): diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), (**) diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) ns: diferencia no significativa.

Cuadro 14. Rendimiento, peso y tamaño de fruto en chile tratado con diferentes insecticidas

Tratamientos	Rendimiento (g)	Peso de fruto (g)	Tamaño de fruto (cm)
a1. Control	201.49 a	38.73 a	7.10 a
a2. Gusatión 35	91.42 b	35.23 ab	6.63 b
a3. Paratión 720	85.24 b	33.35 b	6.50 b
a4. Tamarón 600	105.06 b	35.63 ab	6.16 b
a5. Metamidofos	107.55 b	35.60 ab	6.56 b

Nota: Valores con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales (Duncan 0.05)

Cuadro 15. Rendimiento, peso y tamaño de fruto en chile tratado con diferentes dosis de insecticidas

Tratamientos	Rendimiento (g)	Peso de fruto (g)	Tamaño de fruto (cm)
c1. media dosis R	138.91 a	38.42 a	6.78 a
c2. dosis R	126.72 ab	33.46 bc	6.76 a
c3. 1.5 dosis R	113.83 bc	36.99 bc	6.60 a
c4. 2 dosis R	97.12 c	32.56 c	6.00 b

Nota: Valores con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales (Duncan 0.05)

El análisis de varianza aplicado a los datos obtenidos (Cuadro 13), señala que existieron diferencias estadísticamente significativas para las variables rendimiento, peso de fruto y tamaño de fruto, sobre todo con respecto a los factores insecticidas (A) y a las dosis (B), no así para el factor frecuencias (C), del diseño experimental. En el mismo cuadro se muestran los valores con respecto a las interacciones más importantes. En ella se observa que, en general, la interacción de insecticidas por dosis fue más significativa que cuando se consideraron interacciones con el factor de frecuencias.

Cuadro 16. Valores promedio de la interacción Insecticida (A) x Dosis (B) del Peso del Fruto

	Metamidofos	Tamarón 600	Gusatión	Paratión
0.5 R	36.85*	43.35*	39.01*	36.45*
R	38.75*	41.82*	34.34	27.07
1.5R	27.92	27.30	34.58	34.70
2R	31.91	30.88	32.08	30.61
Valor de las plantas tratadas con agua (control): 45.82*				

Nota: Los valores con asterisco (*) son estadísticamente similares. Valor Duncan = 9.89

Cuadro 17. Valores promedio de la interacción Insecticida (A) x Dosis (B) del Tamaño del fruto

	Metamidofos	Tamarón 600	Gusatión	Paratión
0.5 R	6.42*	6.76*	6.46*	6.36*
R	6.41*	6.28*	6.23	6.97
1.5R	6.11	6.55*	6.68*	6.38*
2R	5.70	6.65*	5.92	6.15
Valor de las plantas tratadas con agua (control): 7.10*				

Nota: Los valores con asterisco (*) son estadísticamente similares. Valor Duncan = 0.93

Por otra parte, en los Cuadros 16, 17 y 18 se muestran las comparaciones de medias con respecto a la interacción de los factores insecticidas x dosis, dado que en general, se observó una mayor significancia para esta interacción que en las interacciones con el factor frecuencia de aplicación. En estos cuadros observamos que para las tres variables existió la misma tendencia y que con respecto al rendimiento, que es una de las variables más importantes solo podría ser recomendado un solo producto a una dosis, en este caso sería el Tamarón 600LM a la dosis 0.5R, es decir solo este producto a la mitad de la dosis recomendada produjo un rendimiento estadísticamente similar al testigo. Para el peso de fruto y el tamaño de fruto, prácticamente todos los insecticidas a la dosis recomendadas

mostraron valores estadísticamente similares al control y pueden ser recomendados para su uso. Estos resultado concuerdan con los resultados obtenidos con respecto a los parámetros fisiológicos de hoja descritos anteriormente.

Cuadro 18. Valores promedio de la interacción Insecticida (A) x Dosis (B) del Rendimiento

	Metamidofos	Tamarón 600	Gusatión	Paratión
0.5 R	124.19	149.61*	96.28	108.60
R	99.52	86.51	98.48	97.50
1.5R	105.82	111.27	69.78	82.70
2R	90.88	80.62	69.46	77.77

Valor de las plantas tratadas con agua (control): 201.48*

Nota: Los valores con asterisco (*) son estadísticamente similares. Valor Duncan = 56.85

Por su parte, los factores insecticidas y dosis resultaron aparentemente más impactantes en el comportamiento de las variables estudiadas. En el Cuadro 9 se observa que respecto a tamaño de fruto no hubo diferencias entre los insecticidas, sin embargo, todos ellos mostraron diferencia significativa con respecto al control. En la misma tabla se muestra que las variables rendimiento y peso de fruto presentaron diferencias en la misma magnitud, es decir, todos los insecticidas tuvieron diferencias con respecto al control, pero el producto Paratión 720 mostró un valor significativamente más bajo que los demás insecticidas. Este resultado indica que el rendimiento esta más directamente ligado al peso del fruto que al tamaño, el cual resultó menos afectado.

Como se mencionó en los antecedentes, los insecticidas son aplicados sin temor a que causen fitotoxicidad debido a que las plantas no presentan un sistema nervioso, el cual en los insectos es el principal sitio de acción de los insecticidas, Sin embargo, es posible pensar que así como afecta a la acetilcolinesterasa entre otras enzimas del insecto, puede afectar el sistema enzimático de las plantas, principalmente aquella ligadas con el sistema de defensa antioxidante como lo son peroxidasa, superóxido dismitasa y catalasa, pensando sobre todo que dependiendo del estado fisiológico de la planta puede sintetizar isoformas diferentes de cada enzima y cada una de estas provocar una diferente respuesta en el desarrollo de dicha planta, tal como menciona Salisbury y Ross (1992).

Fletcher y Jonson (1988) y Fletcher et al (1993) realizaron una recopilación de la información de estudios de fitotoxicidad por plagucidas, reportando estudios en 1569

especies de plantas y estimaron que la proporción de plantas estudiadas es mínima tomando en cuenta que el Reino Vegetal presenta aproximadamente 250,000 especies. Además, la mayoría de los estudios se han realizado solo con herbicidas, es decir la fitotoxicidad por insecticidas aún no cobra importancia y no se han realizado los estudios necesarios.

6.2 Evaluación de la fitotoxicidad por medio de actividad de enzimas indicadoras de estrés

Como se mencionó anteriormente, este experimento se realizó con la finalidad de comprobar si el efecto fitotóxico puede detectarse en la actividad de enzimas indicadoras de estrés. Los Cuadros 19 y 19 muestran los análisis de varianza, estos cuadros explican las diferencias estadísticas para los tratamientos aplicados. Se encontraron diferencias entre insecticidas y también entre dosis. Sin embargo, se encontró significancia para la interacción entre estos factores en la respuesta de la actividad superóxido dismutasa.

Cuadro 19. Análisis de Varianza (ANOVA) para la actividad específica de peroxidasa en Unidades/mg prot.

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Significancia
Insecticidas	4	3.350	0.837	3.480	*
Dosis	3	8.767	2.922	12.145	**
Interacción					
Insec X Dos	12	3.276	0.273	1.134	n.s.
Error	40	9.625	0.240		
Total	59	25.020			

C.V.= 15.91%, G.L.= grados de libertad, *= diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), **= diferencia estadística altamente significativa ($p < 0.01$), n.s.= diferencia estadísticamente no significativa.

Dicha respuesta fue afectada significativamente por Tamarón, en comparación con el control, mostrando una mayor significancia con respecto a dosis, como se observa en el Cuadro 19.

Cuadro 20. Comparación de medias de la actividad específica de peroxidasa en extractos de hojas de plantas de chile tratadas durante 5 semanas con diferentes tratamientos de insecticidas

Dosis	Media	Insecticida	Media
1/2R	0.0695 c*	Control	0.1077 b
1R	0.1962 bc	Gusación	0.3721 b
1.5R	0.5290 b	Tamarón	0.8361 a
2R	1.0581 a	Paratión	0.5373 ab
		Metamidofos	0.4627 ab

*Valores en la misma columna con la misma letra son estadísticamente iguales, según Duncan ($p < 0.05$)

actividad peroxidasa

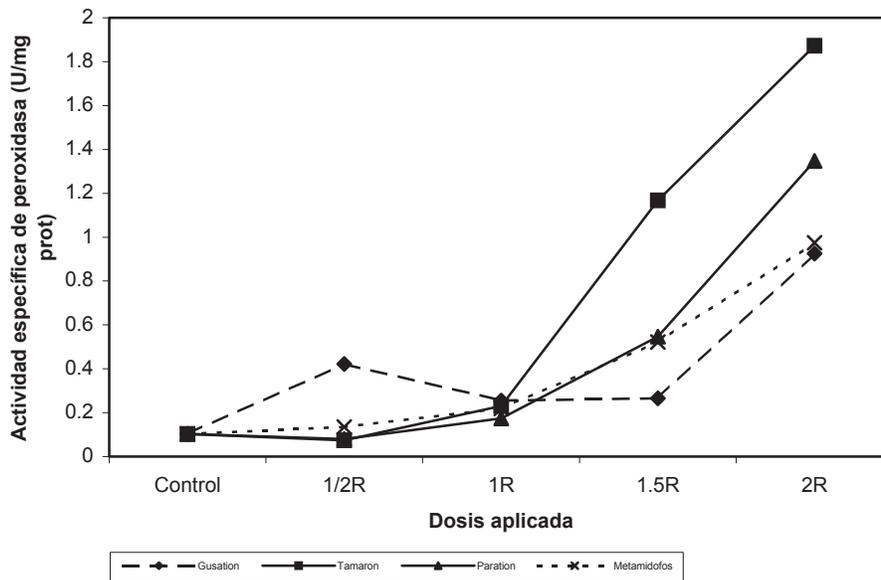


Fig 9. Actividad específica de peroxidasa en extractos de hojas de plantas de Chile con cinco semanas de tratamientos con insecticidas. Control: plantas sin insecticida; 0.5R, la mitad de la dosis recomendada; 1R, dosis recomendada; 1.5R, 1.5 veces la dosis recomendada; 2R, el doble de la dosis recomendada

La Fig 9 muestra que los insecticidas aplicados en dosis bajas no provocaron diferencias significativas respecto al control, pero en las dosis mayores a la media recomendada se ocasionaron efectos significativos, esta situación coincide con los resultados observados en el primer experimento con respecto a variables fisiológicas y rendimiento. El comportamiento de la gráfica mencionada indica que todos los insecticidas provocaron un drástico aumento en la actividad de la enzima con las dosis superiores a la recomendada (R). Esto es muy importante debido a que si bien los insecticidas provocaron diferencias y efectos con respecto al control, en el momento de utilizarlos los productores deben respetar las dosis recomendadas en la etiqueta

De acuerdo con la mayoría de los autores en este tema, se ha observado, que en general, las dosis recomendadas por los fabricantes no originan efectos negativos en las plantas, incluso pueden actuar como estimulantes del crecimiento, según lo que encontraron Foster y Brust (1995) en sandía tratada con carbofuran. Estos autores experimentaron con varios insecticidas foliares y de aplicación en suelo, sin encontrar diferencias significativas. Se podría discutir si efectivamente el carbofuran estimulo el crecimiento, o si las diferencias fueron provocadas por la fitotoxicidad de los otros insecticidas.

Los datos presentados coinciden con la Fig 10, que muestra el gel poliacrilamida obtenido después de la electroforesis. En esta figura se muestra la actividad de peroxidasa. En este caso es posible ver que la mayor coloración ocurrió el las columnas numeradas de la 5 a la 8, correspondientes a las muestras tratadas con Tamarón, sobre todo en la columna 8, con la dosis más alta. En esta misma figura, se observa que en todos los casos, la mayor coloración ocurrió para la dosis más alta de cada tratamiento. Después de analizar esta figura, suponemos que cada uno de los insecticidas influyó la aparición de diferentes isoformas de la enzima.

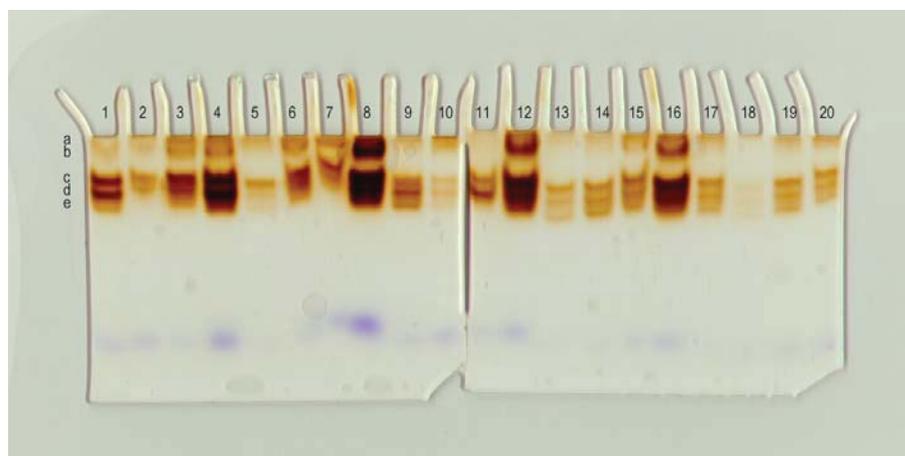


Fig 10. Análisis de Gel poliacrilamida de electroforesis con extractos de hojas de chile con 5 semanas de tratamientos de diferentes insecticidas

1 al 4: Gusatión; 1) 0.5R, 2) 1R, 3) 1.5R, 4) 2R.,
 5 al 8: Tamarón; 5) 0.5R, 6) 1R, 7) 1.5R, 8) 2R.
 9 al 12: Paratión; 9) 0.5R, 10) 1R, 11) 1.5R, 12) 2R.
 13 al 16: metamidofos; 13) 0.5R, 14) 1R, 15) 1.5R, 16) 2R.
 17 al 20: Control.

En el gel analizado, en las columnas de los tratamientos con Gusatión (1 – 4) mostraron solo dos bandas similares a las observadas en el control (17 – 20), en las posiciones *c* y *d*, pero presentaron otras bandas diferentes en las posiciones *a* y *b*. Todos los demás tratamientos (Tamarón, Paratión y metamidofos) mostraron las mismas bandas que el control en las posiciones *c*, *d* y *e*. La diferencia del control con cada uno de estos tratamientos se manifestó con la presencia de la banda en la posición *b*. Cabe señalar que el experimento se repitió varias veces, obteniendo siempre los mismos resultados. Estos resultados enfatizan que la peroxidasa es una de las enzimas que presenta una mayor variedad de isoformas, las cuales se presentan dependiendo de las condiciones de desarrollo y del estado fisiológico de la planta. (Lobarzawsky *et al.* 1991, Moreno *et al.* 1990).

Se ha mencionado que la forma o isoforma de la enzima determina su capacidad de combinarse con el sustrato (efectos sobre la K_m) y de provocar la catálisis (efectos sobre la velocidad máxima de reacción). Diversas enzimas, aún si provienen de la misma especie, a menudo difieren mucho en sus respuestas, sobre todo en asociación con la temperatura (Salisbury y Ross 1992).

Cuadro 21. Análisis de Varianza (ANOVA) para la actividad específica de SOD en Unidades/mg prot.

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Significancia
Insecticidas	4	268.8895	67.2223	15.66	**
Dosis	3	570.6588	190.2196	44.219	**
Interacción					
Insec X Dos	12	175.1824	14.5985	3.4	*
Error	40	185.6315	4.6407		
Total	59	1298.193			

C.V.= 26.28%

*Diferencia estadística significativa ($p < 0.05$)

**Diferencia estadística altamente significativa ($p < 0.01$)

Es posible pensar que la actividad de la peroxidasa finalmente esta correlacionada y reflejada con el crecimiento y rendimiento de las plantas, ya que según la literatura, esta enzima se encuentra directa o indirectamente asociada con procesos fisiológicos, tales como abscisión, dormancia, dominancia apical, resistencia a parásitos (Lobarzawsky 1991) y en algunas importantes fases del metabolismo, tal como el catabolismo de las auxinas, formación de lignina, etc. (Sitbon *et al.* 1999, Sato *et al.* 1993).

Cuadro 22. Comparación de medias de la actividad específica de SOD en extractos de hojas de plantas de Chile tratadas durante 5 semanas con diferentes tratamientos de insecticidas

Dosis	Media	Insecticida	Media
1/2R	1.111 b*	Control	0.4696 a
1R	1.927 b	Gusatión	5.2085 b
1.5R	6.263 a	Tamarón	6.7430 b
2R	8.603 a	Parathion	5.2736 b
		Metamidofos	4.6862 b

*Valores con la misma letra en sentido vertical son similares estadísticamente, según la prueba de rango múltiple de Duncan ($P < 0.05$)

Cuadro 23. Valores promedio de la interacción Insecticida (A) x Dosis (B) de la actividad superóxido dismutasa

	Metamidofos	Tamarón 600	Gusatión	Paratión
0.5 R	1.20*	3.14*	2.25*	2.36*
R	0.34*	1.79*	2.29*	0.60*
1.5R	7.18	9.10	6.23	8.35
2R	10.01	12.92	10.04	9.76

Valor de las plantas tratadas con agua (control): 0.469*

Nota: Los valores con asterisco (*) son estadísticamente similares. Valor Duncan = 4.15

Con respecto a la actividad de superóxido dismutasa (SOD), en los Cuadros 22 y 23 se muestran la prueba de comparación de medias para esta variable, primero con respecto a los factores principales y en el segundo de la interacción de los factores. Se encontraron diferencias estadísticas para los tratamientos aplicados en relación al control. De igual manera se observó diferencia significativa entre las dosis y para la interacción de insecticidas por dosis. Al igual que para la actividad peroxidasa, SOD fue más afectada por Tamarón en dosis altas, sin embargo todos los insecticidas a las dosis recomendadas tuvieron una actividad de SOD estadísticamente similar al control. En el caso del metamidofos, aplicado a la dosis más baja (0.5 R) fue la que mostró el valor de menor actividad, es decir el menos tóxico. Todos los insecticidas causaron ciertos efectos sobre la actividad SOD, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

La Fig 11 muestra el efecto de los productos sobre la actividad SOD, se observa que las dosis 0.5 (dosis media) y la dosis media recomendada, prácticamente no resultaron diferentes al control; sin embargo, las dosis superiores a la media recomendada (1.5 R y

2R) provocaron un drástico aumento en esta actividad. La actividad de esta enzima sigue una tendencia similar a la de peroxidasa, así como a la mayoría de las variables mencionadas hasta este párrafo.

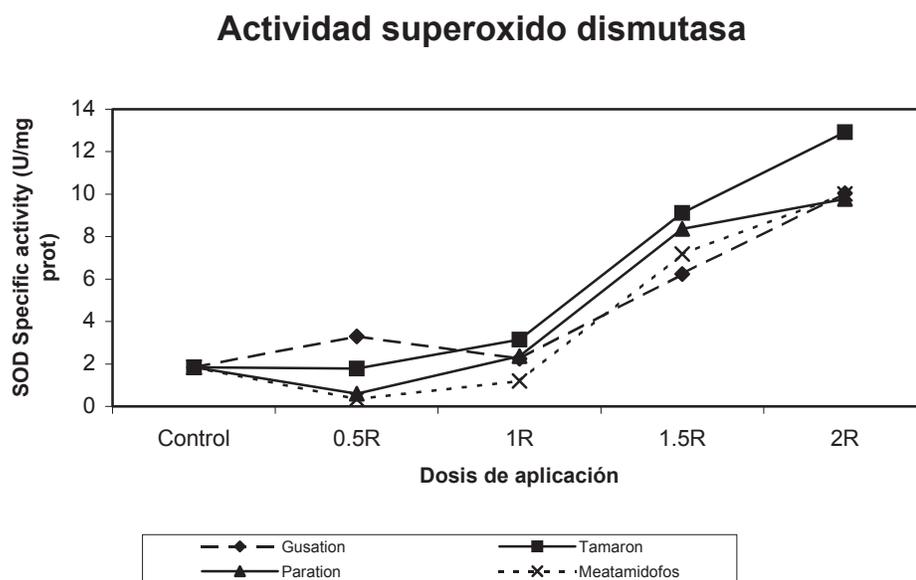


Fig 11. Actividad específica de SOD en extractos de hojas de plantas de Chile con cinco semanas de tratamientos con insecticidas. Control: plantas sin insecticida; 0.5R, la mitad de la dosis recomendada; 1R, dosis recomendada; 1.5R, 1.5 veces la dosis recomendada; 2R, el doble de la dosis recomendada

En resumen, tal como ha sido reportado por otros autores (Amer y Ali 1983, Amer y Farra 1983, Atale *et al.* 1995) los insecticidas provocaron alteraciones en la fisiología de las plantas, no solo en los fenómenos que ellos han medido, tales como la meiosis y el rendimiento, sino también en la actividad enzimática y el proceso fotosintético, tal como se vio en el apartado anterior. Es necesario pues, que en el futuro se realicen investigaciones que lleven a descubrir en forma precisa, el o los sitios de acción de los diferentes insecticidas en la planta. Cuando el ambiente que rodea a una planta cambia, es probable que la planta metabolice isoenzimas, y una consecuencia importante de que un organismo posea diferentes isoenzimas es que cada una de estas difieren en sus respuestas a los estímulos (Salisbury y Ross 1992).

Hasta la fecha, de muchos plaguicidas, sobre todo herbicidas, se sigue investigando sobre su modo de acción y la forma en que provocan el daño sobre la planta, solo de algunos de ellos se han encontrado respuestas precisa, como es el caso del paraquat (Vig y Nemcsón 1989), el cual promueve la aparición de radicales libres en forma dramática. Otros herbicidas se siguen investigando para encontrar la forma en que interactúan con microorganismos de la raíz y sus efectos colaterales (Heydari y Misaghi 1999).

Por otra parte Fletcher (1997) considera que de acuerdo a la cantidad de plaguicidas que se han emitido en el mundo, es posible pensar que una gran cantidad de afectaciones en la estructura de plantas y comunidades estén ocurriendo, por lo que es necesario investigar en torno al daño por este uso de plaguicidas.

6.3 Evaluación de la fitotoxicidad en plántulas recién germinadas

Con la finalidad de evaluar la fitotoxicidad en estado de plántula, para observar la información desde un punto de vista más amplio que permita realizar conclusiones más adecuadas se llevó al cabo un tercer experimento seleccionando dos de los insecticidas utilizados anteriormente y comparando el efecto con insecticidas menos tóxicos, incluyendo Bioneem, que es un producto botánico, que incluso está aprobado en cultivos orgánicos debido a su baja toxicidad y el imidacloprid, un insecticida químico de baja toxicidad en animales de sangre caliente, peces y enemigos naturales de las plagas.

En este sentido podemos observar los Cuadros 24 y 25 con los análisis de varianza para las variables estudiadas en este caso, la longitud de tallo y raíz y el peso fresco y seco de parte aérea y raíz. Observando los ANOVAS es notorio que, en general, las longitudes medidas resultaron más afectadas que las variables de peso, excepto para el peso seco de la raíz, las demás variables de peso muestran efectos poco significativos con este análisis estadístico. Sin embargo, se puede observar que en todas las variables los insecticidas provocaron efectos diferentes estadísticamente. Por esta razón se presenta el Cuadro 26, con el respectivo análisis de comparación con respecto a los insecticidas, los cuales fueron los factores que según el ANOVA tuvieron efectos más significativos. En este caso el factor dosis solamente mostró significancia para la longitud de tallo y el peso seco de raíz, mientras que el factor tiempo tuvo significancia en la longitud de raíz y tallo, además de peso seco de raíz.

Cuadro 24. Análisis de Varianza para Longitud.

Fuente de variación	GL	Valores de F calculada para las Variables	
		Longitud raíz CV: 16.78%	Longitud tallo CV: 10.48%
Insecticidas	4	53.99**	50.68**
Dosis	2	2.56 ns	5.51*
Tiempo	3	20.03**	4.31*
I x D	8	3.39**	5.45**
D x T	6	0.86 ns	4.15**
I x D x T	36	2.47 ns	7.06 ns

GL= grados de libertad, *= diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos ($\alpha=0.05$); **= diferencia estadística altamente significativa entre los tratamientos ($\alpha=0.01$); ns= diferencia no significativa estadísticamente. CV= coeficiente de variación.

Cuadro 25. Análisis de Varianza para el peso de los diferentes componentes de la plántula.

Fuente de variación	GL	Valores de F calculada para las Variables					
		PFA cv: 14.05%	PFR cv: 79.21%	PSA cv: 8.73%	PSR cv: 16.51%	MFT cv: 22.27%	MST cv: 7.76%
Insecticidas	4	47.38**	33.12**	13.88**	70.24**	57.42**	2.29 ns
Dosis	2	1.16 ns	0.27 ns	0.95 ns	7.37**	0.70 ns	2.48 ns
Tiempo	3	1.12 ns	0.93 ns	0.69 ns	8.68**	0.74 ns	1.64 ns
I x D	8	3.55*	1.27 ns	5.32**	16.73**	2.29 ns	12.07**
D x T	6	1.57 ns	1.11 ns	0.33 ns	0.63 ns	1.40 ns	0.47 ns
I x D x T	36	2.48**	1.27 ns	1.61 ns	2.78 **	1.54 ns	1.90 ns

GL= grados de libertad, *= diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos ($\alpha=0.05$); **= diferencia estadística altamente significativa entre los tratamientos ($\alpha=0.01$); ns= diferencia no significativa estadísticamente. cv= coeficiente de variación. PFA= Peso Fresco Parte aérea, PFR= Peso Fresco Raíz, PSA= Peso Seco Parte aérea, PSR= Peso Seco Raíz, MFT= Materia Fresca Total (parte aérea + raíz), MST= Materia Seca Total.

En el cuadro referido se muestran los valores para las variables de longitud. Aunque la longitud de tallo fue más afectada que la longitud de raíz; en general, ambos valores de longitud resultaron más afectados que los valores de peso. En este sentido, vemos que el metamidofos provocó la longitud de tallo más alta, pero una longitud de raíz muy corta, es decir, la planta finalmente mostró una relación tallo/raíz muy cercana al 1 (Cuadro 27). Lo anterior indica un estado de estrés en comparación al testigo, el cual manifestó un valor intermedio de longitud de raíz, pero acorde con la longitud del tallo para dar una relación tallo/raíz de 0.5, más favorable para el desarrollo, en el mismo Cuadro 27, se observa que el azinfos también ocasiono una relación desfavorable para la planta (0.79) y los valores de longitud de tallo y raíz más cortos.

Cuadro 26. Efecto de insecticidas sobre variables de peso de plántula.

Tratamiento	LT	LR	PFA	PFR	PSA	PSR	MFT	MST
Azinfos	14.92 c	18.75 d	0.088 d	0.015 b	0.0157 a	0.0029 c	0.104 c	0.018 a
Metamidofos	20.07 a	21.47 c	0.100 c	0.015 b	0.0162 a	0.0029 c	0.116 bc	0.019 a
Bioneem	17.08 b	23.56 b	0.108 b	0.018 b	0.0151 b	0.0034 b	0.126 b	0.018 a
Imidacloprid	15.05 c	22.72 bc	0.103 bc	0.024 b	0.0148 b	0.0033 b	0.128 b	0.018 a
Agua	16.63 b	31.71 a	0.135 a	0.066 a	0.0140 c	0.0049 a	0.201 a	0.019 a

*Medias con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales, según la prueba de Duncan ($\alpha<0.05$)

Cuadro 27. Relación tallo/raíz para diferentes variables de plántulas de chile sometidas a diferentes tratamientos de insecticidas.

Tratamiento	LT/ LR	PFR / PFA	PSR / PSA
Azinfos	0.79 b*	0.17 c	0.18 b
Metamidofos	0.93 a	0.15 c	0.17 b
Bioneem	0.72 b	0.16 c	0.22 b
Imidacloprid	0.66 c	0.23 b	0.22 b
Agua	0.52 c	0.48 a	0.35 a

LT= Longitud de tallo, LR= Longitud de raíz, PFA= Peso Fresco Parte aérea, PFR= Peso Fresco Raíz, PSA= Peso Seco Parte aérea, PSR= Peso Seco Raíz. *Medias con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales, según la prueba de Duncan ($\alpha < 0.05$)

Los insecticidas Bioneem e imidacloprid presentaron valores más cercanos al testigo, siendo el Bioneem el que mostró los valores estadísticamente similares al control, aunque una relación tallo/raíz menos favorable que el imidacloprid. En lo que se refiere a las variables de peso, en el Cuadro 26 se observa que para estas variables, el control manifestó valores diferentes estadísticamente a los tratamientos, y que entre los insecticidas hubo poca diferencia, sin embargo, en todas las variables se manifestó una misma tendencia, en la que los valores más alejados del control fueron los de los insecticidas metamidofos y azinfos, mientras que Bioneem e imidacloprid tuvieron efectos similares a los del control.

Por otra parte, con la finalidad de analizar los resultados desde otro punto de vista se presenta una serie de figuras que muestran el comportamiento de estas variables con respecto a las interrelaciones de los factores insecticidas x tiempo de exposición e insecticidas x dosis (Figuras 12 y 13). En la primera, se observa, la longitud, tanto de tallo como de raíz y el índice vástago/raíz o índice tallo/raíz, obtenido precisamente al dividir la longitud del tallo entre la de la raíz en mm. Los incisos *a* y *c* de la Fig 12 muestran estos valores con respecto a la correlación insecticida-tiempo de exposición, mientras que los incisos *b* y *d* muestran las tendencias con respecto a la correlación insecticida-dosis.

El inciso *a* muestra que el metamidofos fue el insecticida que provocó la mayor elongación del tallo, reflejado como la respuesta al estrés sufrido por la planta, esto se puede observar en los incisos *e* y *f*, que presentan los índices vástago/raíz y donde se observa que el metamidofos mostró los valores más alejados de la relación obtenida por el control y además la correlación con el tiempo de exposición y la dosis una tendencia marcada.

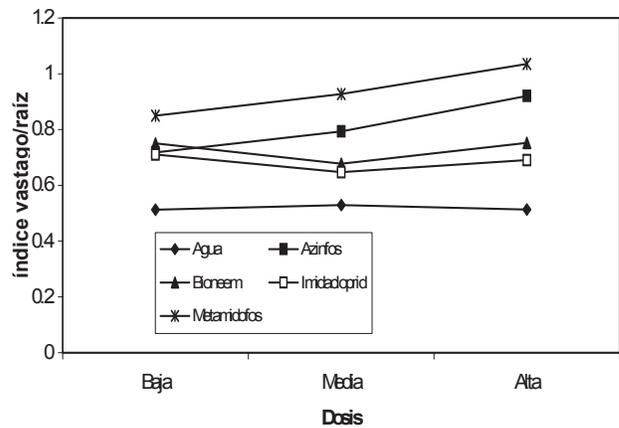
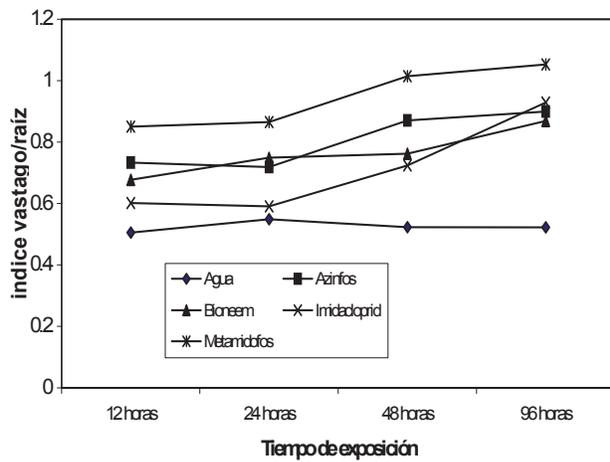
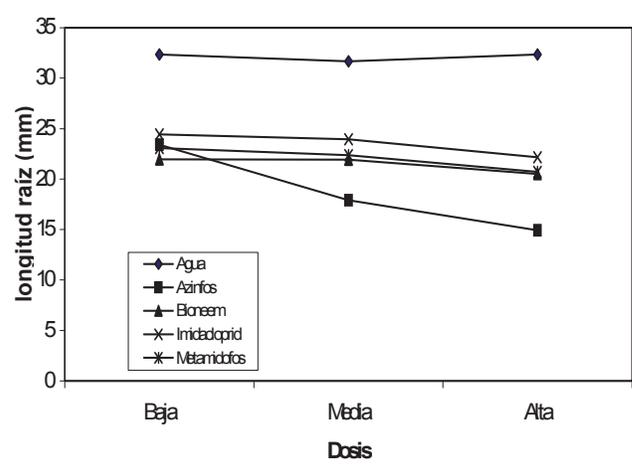
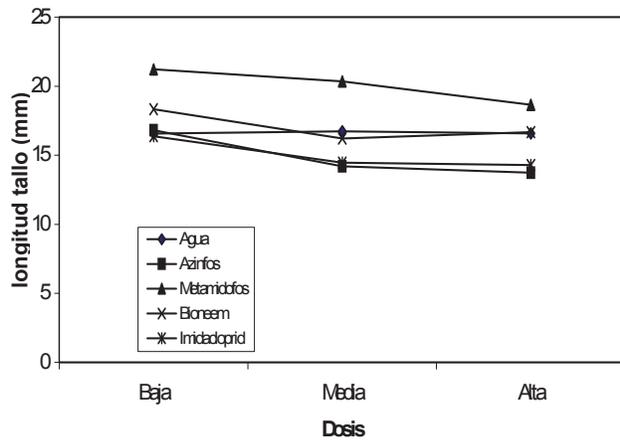
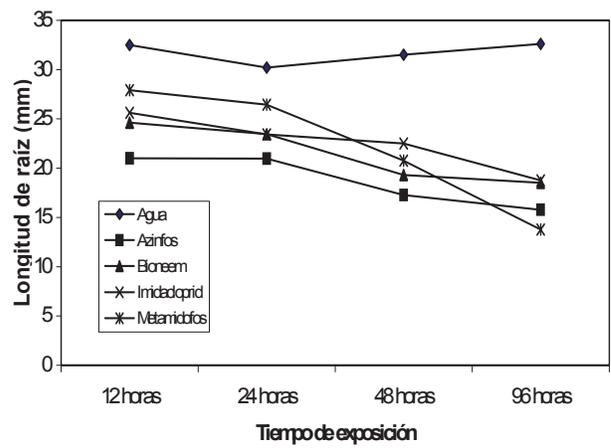
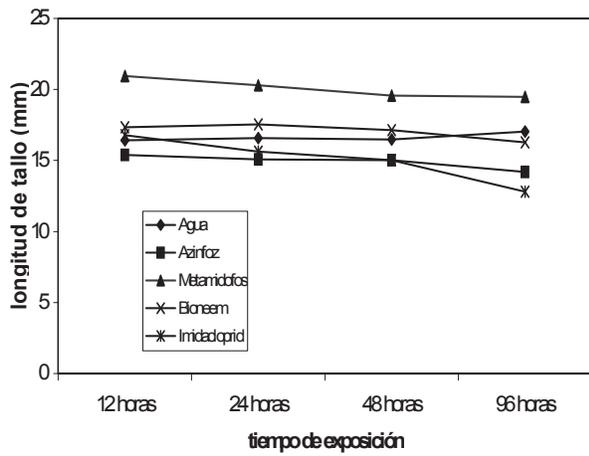


Fig 12. Comportamiento de la longitud de tallo y raíz en plántulas de chile sometidas a diferentes dosis y tiempos de exposición de insecticidas

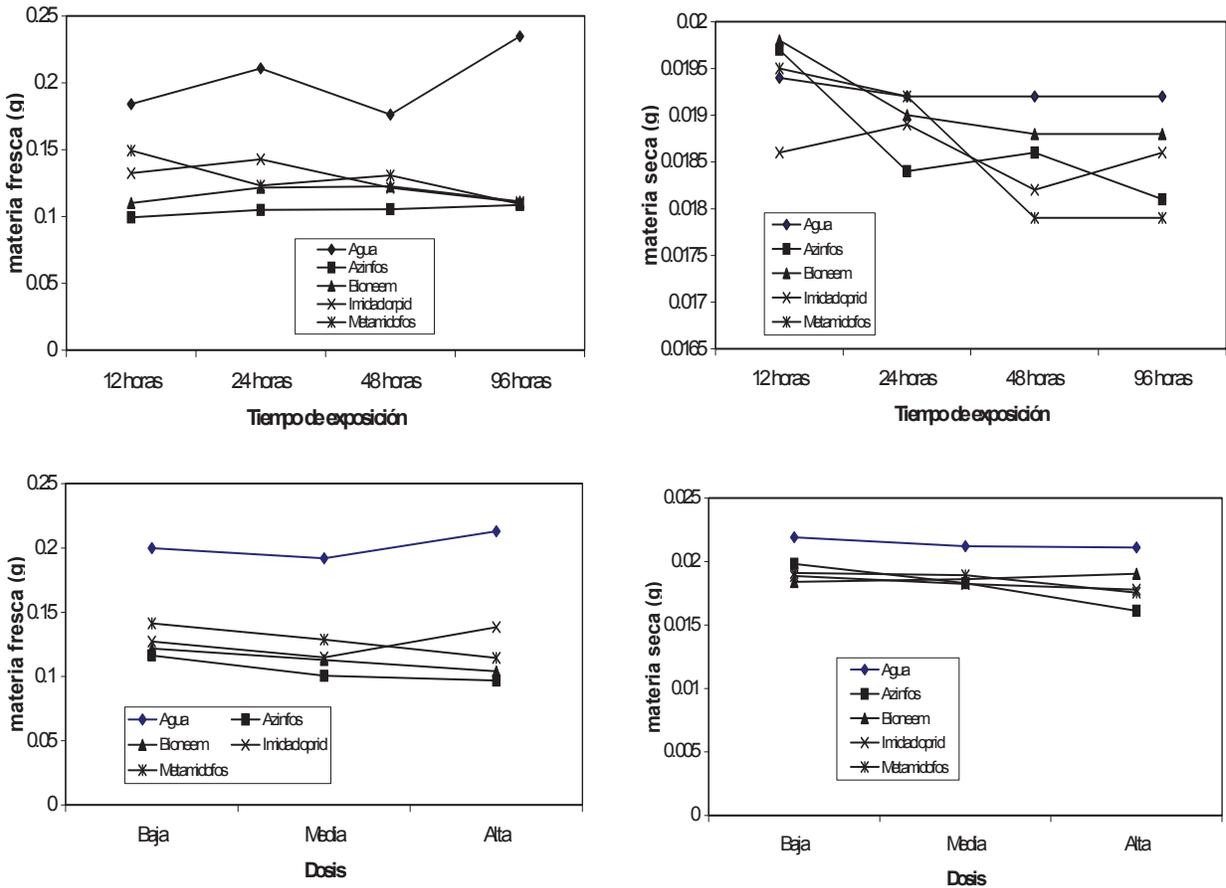


Fig 13. Comportamiento de la materia fresca y materia seca en plántulas de chile sometidas a diferentes dosis y tiempos de exposición

Por su parte, en las líneas que muestran las plantas control, no existen diferencias importantes entre los diferentes tiempos y dosis, sin embargo la diferencia en la longitud de raíz (incisos *c* y *d*) y los índices vastago/raíz (índice *e* y *f*), con respecto a los tratamientos es muy clara. En los incisos *c* y *d* se observa que el control superó ampliamente los tratamientos en la longitud de raíz, muestra de un mejor estado fisiológico que se reflejó en los índices vastago/raíz, al encontrar valores cercanos al 0.5, es decir una relación tallo/raíz de 1:2.

De igual manera, se observa que el azinfos mostró los siguientes valores más alejados del control, en todos los aspectos. Con respecto a los demás insecticidas no se

observaron diferencias significativas entre ellos, ello confirmó los resultados analizados en el primer experimento, en los cuales se discutió que el metamidofos mostró menor toxicidad que el Paratión y que el Tamarón.

Con respecto a los valores de peso fresco y seco, de manera similar que en la figura anterior, en la fig 13, se observa que el control tuvo valores más altos que el resto de los tratamientos, el control, además no muestra diferencias con respecto a los diferentes niveles de dosis y tiempos de exposición. Las diferencias resultaron más marcadas en la materia fresca, es decir, la planta tenía condiciones muy diferentes en cuanto a la hidratación, sin embargo, en el peso seco, las diferencias fueron menores, es decir, a pesar del estrés, la actividad metabólica de las plántulas les permitió desarrollar prácticamente la misma cantidad de materia seca, con algunas diferencias entre los tratamientos, respecto al tiempo de exposición. Esto habla de la capacidad o plasticidad inherente a esta especie, la cual ha demostrado tener la capacidad de soportar ciertos niveles de estrés.

6.4 Susceptibilidad de barrenillo del chile a los insecticidas

6.4.1. Bioensayos

Para comparar los resultados de la evaluación de la fitotoxicidad con el efecto de los insecticidas, se realizó también el estudio de susceptibilidad del insecto plaga hacia el que van dirigidas las aplicaciones en el campo. Como se ha mencionado, realizar un estudio detallado del efecto en la toxicología de una plaga amerita un estudio independiente. Los estudios que hemos realizado indican los siguientes resultados.

Los insecticidas pueden mostrar varios y diferentes modos de acción sobre los insectos, pudiendo ser envenenamiento físico, protoplasmático, respiratorio o del sistema nervioso. Es este último el modo de acción de los organofosforados y carbamatos. La susceptibilidad entre insectos y otro tipo de animales radica en el tipo de sistema nervioso, ya que los insectos poseen varios puntos terminales, mientras animales como los mamíferos tienen relativamente pocos de estos sitios vulnerables (Alonso, 1994).

Con la finalidad de comparar el efecto de las dosis utilizadas en los experimentos con las plantas, primero se realizaron bioensayos con las concentraciones correspondientes a las dosis utilizadas en dichos experimentos. En los Cuadros 28, 29, 30, 31 y 32, se presentan los resultados con las concentraciones 0.12, 0.25, 0.5 y 0.75% correspondientes a las dosis 0.5 veces la dosis recomendada, dosis media recomendada, 2 veces esta dosis media y 3 veces la dosis, respectivamente. En el Cuadro 20 se presentan los resultados obtenidos con el azinfos, el cual manifestó un alto porcentaje de mortalidad con todas las concentraciones, aunque se observó una tendencia a mayor mortalidad con mayor concentración. En el Cuadro 28 se presentan los resultados obtenidos con el metamidofos, el cual provocó la mortalidad del 100% de los insectos en todas las concentraciones, asimismo ocurrió para el paratión metílico.

Cuadro 28. Bioensayos toxicológicos de picudo del chile con azinfos metílico en dosis similares a las usadas en los experimentos con las plantas de chile cv. Ancho San Luis

Dosis (%)	No. de insectos tratados	No. de insectos muertos	% de mortalidad
0.75	50	49	98
0.5	50	49	98
0.25	50	48	96
0.12	50	47	94
Testigo sin insecticida	50	0	0

Los resultados obtenidos indican que el insecto puede ser controlado con cualquiera de las dosis recomendadas para aplicación en campo, sin necesidad de aplicar sobredosis, ello, con respecto a los insecticidas utilizados en los experimentos con las plantas.

Cuadro 29. Bioensayos toxicológicos de picudo del chile con metamidofos en dosis similares a las usadas en los experimentos con las plantas de chile cv. Ancho San Luis

Dosis (%)	No. de insectos tratados	No. de insectos muertos	% de mortalidad
0.75	50	50	100
0.5	50	50	100
0.25	50	50	100
0.12	50	50	100
Testigo sin insecticida	50	0	0

Cuadro 30. Bioensayos toxicológicos de picudo del chile con paratión metílico en dosis similares a las usadas en los experimentos con las plantas de chile cv. Ancho San Luis

Dosis (%)	No. de insectos tratados	No. de insectos muertos	% de mortalidad
0.75	50	50	100
0.5	50	50	100
0.25	50	50	100
0.12	50	50	100
Testigo sin insecticida	50	2	4

Cuadro 31. Bioensayos toxicológicos de picudo del chile con endosulfan en dosis similares a las usadas en los experimentos con las plantas de chile cv. Ancho San Luis

Dosis (%)	No. de insectos tratados	No. de insectos muertos	% de mortalidad
0.75	25	23	95
0.5	25	21	84
0.25	25	20	80
0.12	25	20	80
Testigo sin insecticida	25	0	0

Cuadro 32. Bioensayos toxicológicos de picudo del chile con oxamyl en dosis similares a las usadas en los experimentos con las plantas de chile cv. Ancho San Luis

Dosis (%)	No. de insectos tratados	No. de insectos muertos	% de mortalidad
0.75	50	50	100
0.5	50	50	100
0.25	50	50	100
0.12	50	50	100
Testigo sin insecticida	50	0	0

Con las mismas concentraciones señaladas se desarrollaron bioensayos empleando otros insecticidas, como se puede observar en los Cuadros 31 y 32 con los productos endosulfan y oxamyl, que también son recomendados contra esta plaga, la cual presentó una menor mortalidad con endosulfan; en este caso puede inferirse que la plaga ha desarrollado mayor resistencia a este producto.

Debido a que las concentraciones usadas resultaron altamente efectivas contra los insectos, se realizaron bioensayos tratando de encontrar la ventana biológica, esto es, la tasa de mortalidad en concentraciones logarítmicas. Dichos resultados se presentan en los siguientes Cuadros (33, 34, 35, 36 y 37) para los insecticidas usados en los estudios con las plantas. En el Cuadro 37 se observa el efecto de oxamyl, el cual presentó la menor mortalidad (60%) a una concentración de 0.0001%, lo que indica que dosis bajas pueden controlar este insecto. De hecho, prácticamente todos los productos presentaron alta mortalidad aún a esta concentración (60-100%), esto indica que la utilización de sobredosis en campo es de poca utilidad. Desafortunadamente, en campo no se obtiene un control efectivo, debido a fallas y malos hábitos en la aplicación de los productos, especialmente en el muestreo para detectar las primeras generaciones de adultos, ya que cuando estos ovipositan, la siguiente generación esta protegida de los insecticidas (Eller *et al.* 1994, Riley 1997).

Cuadro 33. Bioensayos toxicológicos de picudo del chile con azinfos metilico en dosis para encontrar ventana biológica

Dosis (%)	No. de insectos tratados	No. de insectos muertos	% de mortalidad
0.1	75	73	97
0.01	75	73	97
0.001	75	60	80
0.0001	75	56	74
Testigo sin insecticida	75	2	1.5

Cuadro 34. Bioensayos toxicológicos de picudo del chile con metamidofos en dosis para encontrar ventana biológica

Dosis (%)	No. de insectos tratados	No. de insectos muertos	% de mortalidad
0.1	100	96	96
0.01	100	90	90
0.001	100	63	63
0.0001	100	63	63
Testigo sin insecticida	100	0	0

Cuadro 35. Bioensayos toxicológicos de picudo del chile con paratión metílico en dosis para encontrar ventana biológica

Dosis (%)	No. de insectos tratados	No. de insectos muertos	% de mortalidad
0.1	25	25	100
0.01	25	25	100
0.001	25	25	100
0.0001	25	25	100
Testigo sin insecticida	25	0	0

Cuadro 36. Bioensayos toxicológicos de picudo del chile con endosulfan en dosis para encontrar ventana biológica

Dosis (%)	No. de insectos tratados	No. de insectos muertos	% de mortalidad
0.1	50	50	100
0.01	50	50	100
0.001	50	49	98
0.0001	50	48	96
Testigo sin insecticida	50	0	0

Cuadro 37. Bioensayos toxicológicos de picudo del chile con oxamyl en dosis para encontrar ventana biológica

Dosis (%)	No. de insectos tratados	No. de insectos muertos	% de mortalidad
0.1	25	25	100
0.01	25	25	96
0.001	25	24	96
0.0001	25	14	60
Testigo sin insecticida	25	0	0

Posteriormente y de acuerdo a la mortalidad observada en la respuesta a las dosis primarias aplicadas como ventana biológica (VB), se procedió a incluir nuevas dosis, partiendo de la mortalidad inferior para así obtener el rango de mortalidades de un 10 a un 100%. De esta manera se presentan los siguientes Cuadros (38, 39 y 40) con los resultados más sobresalientes. En consecuencia podemos concluir que los insecticidas utilizados y que presentaron fitotoxicidad en dosis mayores a las recomendadas en las etiquetas, pueden ser utilizados en dosis bajas, dado que la toxicidad sobre la plaga es alta. Solamente es necesario que las aplicaciones se realicen después de muestreos concienzudos y racionales, esto es, la decisión de aplicar insecticidas debe estar basada en un muestreo meticuloso y utilizando las herramientas disponibles, tales como el uso de enemigos naturales antes del control químico, el cual debería ser recomendado para aquellos casos de infestaciones fuera de control. En este sentido, las aplicaciones deben ser de manera uniforme sobre todas las plantas del cultivo para evitar sobredosis en manchones y recordar que en muchos países

utilizar sobredosis y productos no recomendados en los cultivos es ilegal y por tanto constituye un delito.

Cuadro 38. Bioensayos toxicológicos de picudo del chile con azinfos metilico en base a los resultados de ventana biológica

Dosis (%)	No. de insectos tratados	No. de insectos muertos	% de mortalidad
0.001	50	41	82
0.0005	50	39	78
0.0001	50	33	66
0.00001	50	26	52
0.000001	50	25	50
Testigo sin insecticida	50	0	0

Cuadro 39. Bioensayos toxicológicos de picudo del chile con metamidofos en base a los resultados de ventana biológica

Dosis (%)	No. de insectos tratados	No. de insectos muertos	% de mortalidad
0.0008	25	17	68
0.0005	25	15	60
0.0003	25	13	56
0.0001	25	11	44
0.00001	25	7	28
Testigo sin insecticida	25	0	0

Cuadro 40. Bioensayos toxicológicos de picudo del chile con endosulfan en base a los resultados de ventana biológica

Dosis (%)	No. de insectos tratados	No. de insectos muertos	% de mortalidad
0.0001	75	66	88
0.00005	75	40	53
0.00001	75	25	33
0.000001	75	16	21
0.0000001	75	11	14
Testigo sin insecticida	75	0	0

6.4.2 Avances en la técnica para cría masiva de picudo del chile bajo condiciones de laboratorio

Es importante dar un seguimiento a los niveles de resistencia que la plaga va adquiriendo, para lo cual es necesario efectuar bioensayos constantes con poblaciones de la plaga expuestas a los insecticidas y compararlo con una población susceptible, sin embargo, existe el inconveniente de mantener en laboratorio a una colonia libre de presión de

selección, la cual sirva como referencia o comparación con las poblaciones de campo (Lopez Terrones 1996).

Sin embargo, a pesar de que existen antecedentes de crías masivas del picudo del chile bajo condiciones de laboratorio en dieta artificial como la realizada por Toba *et al.* (1969) y posteriormente por Coudriet y Kishava (1988), el lograr la oviposición por las hembras es una tarea difícil (Reyes Barraza 1984), ya que no se ha logrado obtener en sustratos artificiales. Por esta razón, en el presente trabajo se pretendió establecer una técnica semi-artificial que permita la oviposición y obtención de una mayor cantidad de huevecillos y que el costo sea reducido. Se lograron establecer algunas bases para instalar una técnica que permita obtener colonias de picudos y poder mantenerlas durante al menos 10 generaciones en cautiverio y libres del contacto con insecticidas. En seguida de que se colocaban los "chiles trampa" en las jaulas, tanto hembras como los machos se hacinaban sobre este sustrato. Al retirar el Parafilm se constató que los picudos se alimentaron de las hojas haciendo las perforaciones características de su modo de alimentación y oviposición, confirmándolo con la presencia de los huevecillos, éstos generalmente se encontraban en las capas más internas de los "chiles trampa", aunque se registró la presencia de uno en la capa de Parafilm, además, se observó una larva de primer ínstar entre las hojas de uno de los "chiles trampa". En el cuadro 41 puede apreciarse en forma resumida los resultados de dichas observaciones.

Cuadro 41. Resumen de las oviposiciones observadas en los "chiles trampa" para picudo

No. de chiles artificiales	No. de huevecillos	Fecha de recolección	No. de eclosiones	Tiempo de exposición (días)
1	2	28/6/00	2	1
1	4	30/6/00	1	2
2	2	5/7/00	0	5
3	0	6/7/00	0	1
3	19	10/7/00	8	3
3	57	13/7/00	20	2
2	34	15/7/00	20	2
Total 15	116	-----	51	-----

El promedio de días de exposición fue de 2 días. Dentro de las observaciones realizadas fue el hecho de que el huevecillo puede tolerar un período de refrigeración, ya que durante este experimento se expusieron 34 huevecillos a dos días de refrigeración a 4°

C. Se obtuvo un promedio de 7.6 huevecillos por cada uno de los "chiles trampa". Del total de huevecillos, el 16.3% llegaron al primer estadio (L₁), el 9.4 % llegaron hasta el tercer estadio (L₃), el 8.6% llegó a adulto, por lo tanto un 36.72% del total de huevecillos llegó a eclosionar.

Cuadro 42. Total de huevecillos que lograron eclosionar

Estadio alcanzado	No. de huevecillos eclosionados	% de huevecillos eclosionados
Primer estadio (L ₁)	19	16.3
Tercer estadio (L ₃)	11	9.4
Adultos	1	0.86
Total	31	26.72

Cabe señalar que de los 34 huevecillos sometidos a previa refrigeración para retardar su eclosión y evitar su desecación, de los cuales se logró casi un 30 % de eclosiones. Por otra parte, los 50 insectos introducidos a la jaula fueron mantenidos hasta que murieron, dando un rango de aproximadamente 35 días desde que fueron colocados hasta que murió el último. En este experimento observamos que la edad en que se observaron mas cantidad de huevecillos fue cuando las hembras tenían una edad proximada de 15 a 20 días en las condiciones descritas previamente; posteriormente se observó un descenso considerable en el número de oviposiciones, por lo cual inferimos que la colocación de un mayor número de "chiles trampa" durante ese lapso de edad puede conducir a la recolección de un mayor número de huevecillos.

Con los resultados anteriores podemos sugerir que ésta metodología puede constituir una eficiente herramienta para efectuar una cría masiva en laboratorio del picudo del chile, esto, a pesar de que solamente se logró obtener un 30% de eclosión de los huevecillos, el hecho de que no se lograra un desarrollo conveniente de la mayoría lo adjudicamos al hecho de que no poseiamos la dieta artificial específica para éste insecto, tanto la sugerida por Toba et al (1969) o la mencionada por Reyes Barraza (1984), lo cual complementa en forma total a esta nueva técnica y con ello lograr la oviposición y cría masiva del picudo del chile en laboratorio.

6.5 Evaluación de la fitotoxicidad en un cultivar de tomate

Los resultados obtenidos relativos a las variables fisiológicas de este estudio se muestran en la Figura 14. En dicha figura se observa que el comportamiento de las plantas sometidas a diferentes tratamientos mostró diferencias significativas en las variables estudiadas, con respecto a las dosis de aplicación utilizadas para los tratamientos de agroquímicos. La gráfica de la parte superior presenta el comportamiento de las plantas en cuanto al contenido de clorofila. Dado que el control no recibió tratamientos químicos, las plantas mostraron un comportamiento estable en todas las muestras tomadas. Sin embargo, se observa que el contenido de clorofila por planta fue afectado por la dosis del producto químico aplicado en los datos que corresponden a la última semana de tratamientos, es decir, cuando las plantas tenían seis semanas de aplicaciones de las diferentes dosis.

El comportamiento de esta variable al igual que la resistencia estomática y la temperatura de la hoja fue lineal. A pesar de esta respuesta, las ecuaciones de regresión y los valores de r^2 muestran que no todos los tratamientos provocaron significancia estadística para tales valores. En este sentido, es posible aseverar que los agroquímicos ocasionaron diferentes grados de respuesta interaccionando significativamente con los demás factores; las dosis y la aplicación de l fitorregulador (Biozyme).

Cuadro 43. Análisis de Varianza para tamaño y peso del fruto y rendimiento.

Fuente de variación	GL	Valores de F calculada para las Variables		
		Tamaño (largo) del fruto (cm)	Peso del fruto (g)	Rendimiento por planta (g)
Agroquímicos	3	24.8 **	22.46**	12.32 **
Dosis	2	23.16 **	15.55**	6.17 **
Biozyme (con o sin)	1	54.28 **	27.67**	23.5 **
Agroquím x Dosis	6	2.71 *	3.24 *	3.81 *
Dosis x Biozyme	2	1.2 ns	2.02 ns	2.28 ns
Agroquím x Dosis x Biozyme	6	0.96 ns	0.97 ns	0.68 ns

GL= grados de libertad, *= diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos ($\alpha=0.05$); **= diferencia estadística altamente significativa entre los tratamientos ($\alpha= 0.01$); ns= diferencia no significativa estadísticamente.

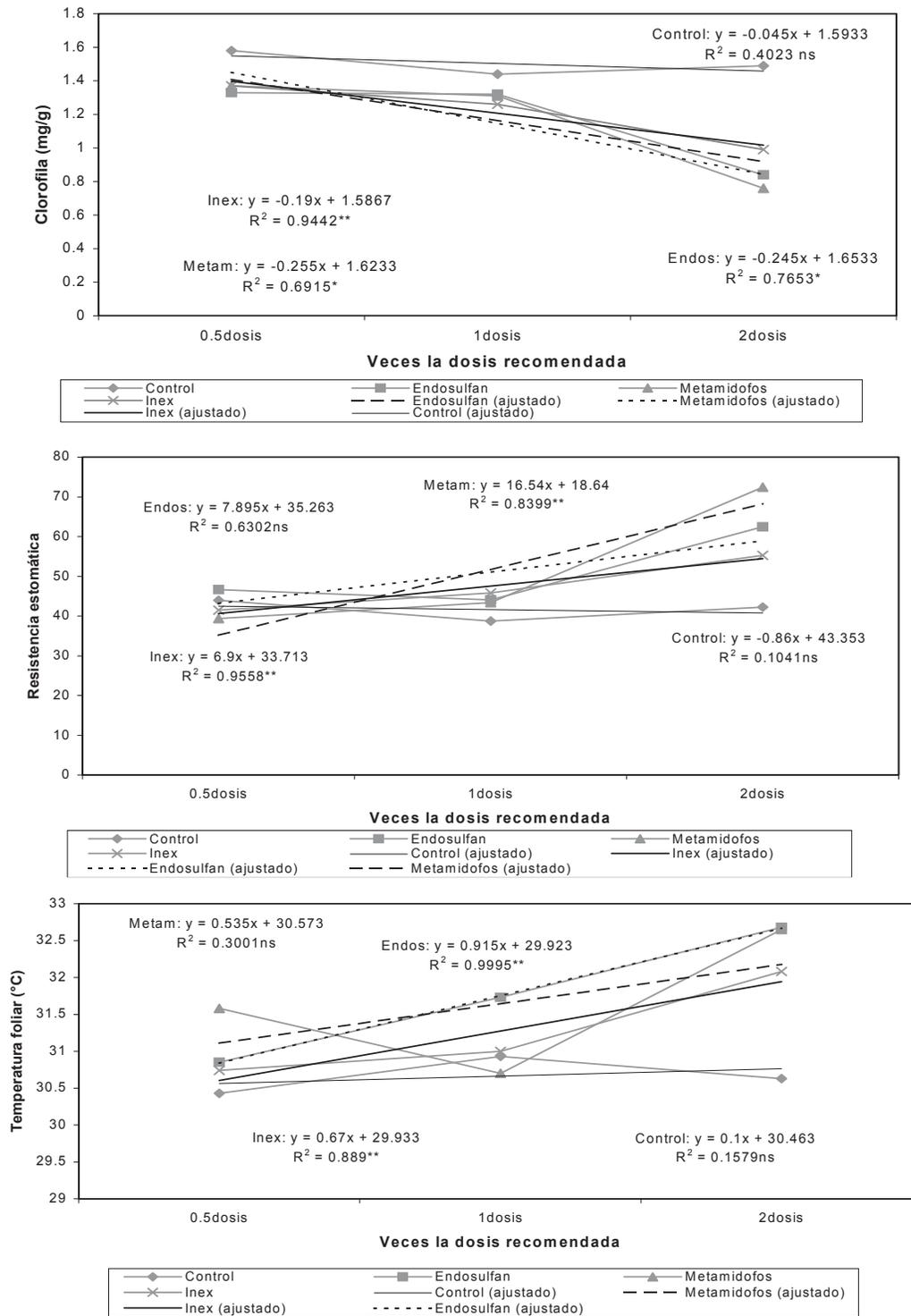


Fig 14. Comportamiento de la clorofila, temperatura foliar y resistencia estomática de plantas del cv. Río Grande de tomate sometidas a diferentes dosis de insecticidas

El mencionado producto (Biozyme), es un promotor de crecimiento altamente recomendado para mejorar el comportamiento fisiológico de este cultivo. Se observó que el contenido de clorofila fue la variable fisiológica más afectada, ya que todos los tratamientos excepto el control mostraron valores de r^2 significativamente altos. En cierta manera, se podría esperar que esta situación afecte directamente el rendimiento, debido a que la clorofila tiene un papel decisivo en la fotosíntesis y por tanto en la producción de frutos y de materia seca en general.

En lo que respecta a las variables que componen el rendimiento, en el Cuadro 43 se presentan los resultados del Análisis de Varianza, donde se observa que todos los factores involucrados en el diseño experimental muestran diferencias estadísticamente significativas. En este caso, las interacciones no mostraron significancia, exceptuando la correlación entre los agroquímicos y las diferentes dosis utilizadas. Cada factor fue analizado independientemente en los Cuadros 44, 45 y 46. En el Cuadro 44, se observa la respuesta con respecto a los agroquímicos. Resulta evidente, que los productos utilizados mostraron respuestas estadísticamente similares, tanto los insecticidas como el surfactante, sin embargo, la respuesta con respecto al Inex (surfactante) fue similar al control, a diferencia de los insecticidas; en este caso los efectos del surfactante fueron menos evidentes que los mostrados por los insecticidas sobre la planta.

Cuadro 44. Efecto de agroquímicos sobre el tamaño y peso de fruto, así como el rendimiento del tomate cv. Río Grande.

Tratamiento	Tamaño de fruto (largo en cm)	Peso de fruto (g)	Rendimiento por planta (g)
Endosulfan	4.58 b*	43.5 b	937.9 b
Metamidofos	4.62 b	43.6 b	951.5 b
Inex	5.43 ab	67.3 ab	1246.3 ab
Agua (control)	6.07 a	84.0 a	1483.0 a

*Medias con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales, según la prueba de Duncan ($\alpha < 0.05$)

Los datos obtenidos coinciden con otros estudios similares relacionados con la fitotoxicidad por insecticidas (Atale *et al.* 1995, Amer and Ali 1983, Lakshmi *et al.* 1988). Generalmente, la dosis recomendada por el fabricante que se lee sobre las etiquetas de los productos, no origina ningún tipo de efectos negativos sobre las plantas.

Cuadro 45. Efecto a diferentes dosis de agroquímicos sobre el tamaño y peso de fruto, así como del rendimiento de tomate cv. Río Grande.

Tratamiento	Tamaño de fruto (largo en cm)	Peso de fruto (g)	Rendimiento por planta (g)
0.5 dosis r	5.76 a*	81.1 a	1322.5 a
1 dosis recomendada (r)	5.19 ab	78.7 ab	1139.1 b
2 dosis r	4.87 b	59.0 b	1077.5 b

*Medias con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales, según la prueba de Duncan ($\alpha < 0.05$)

En el Cuadro 45 se observa que las plantas respondieron también a las dosis utilizadas; es decir que cuando se aplicaron dosis bajas la respuesta fue no significativa, ya que en este caso, la dosis recomendada mostró un valor estadísticamente igual a la dosis más baja, pero la dosis más alta mostró un valor diferente a la dosis más baja. Resulta sobresaliente que en el rendimiento final las dosis no provocaron diferencias significativas, aunque los valores si mostraron una correlación inversa entre la dosis y el rendimiento. Para el caso del otro producto utilizado, en el Cuadro 38, se muestra que la aplicación de este promotor de crecimiento ayudó a contrarrestar los efectos negativos de los demás agroquímicos utilizados.

Cuadro 46. Efecto de la aplicación de un promotor de crecimiento (Biozyme) en el rendimiento, peso y tamaño de fruto en el cultivo de tomate cv. Río Grande.

Tratamiento	Tamaño de fruto (largo en cm)	Peso de fruto (g)	Rendimiento por planta (g)
Con aplicación	5.67 a*	87.4 a	1396.3 a
Sin aplicación	4.88 b	61.8 b	963.0 b

*Medias con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales, según la prueba de Duncan ($\alpha < 0.05$)

Las plantas de tomate sometidas a altas dosis de insecticidas evidenciaron efectos negativos, tanto en las variables fisiológicas como en el peso y tamaño de fruto, así como en el rendimiento. En lo que se refiere a las dosis, se observó una correlación inversa entre las dosis y los componentes del rendimiento. Las plantas rociadas con agua y con Inex mostraron resultados similares en todos los aspectos considerados. Las variables clorofila, resistencia estomática y temperatura foliar fueron afectadas por los insecticidas, pero los efectos fueron contrarrestados por las aplicaciones de Biozyme.

Reddy y Rao (1981), llevaron a cabo un estudio con hexaclorobenceno (BHC) y monocrotofos (Nuvacron), en el cual observaron que la germinación y sobrevivencia fue afectada por las dosis superiores a las recomendadas en la etiqueta. En dicho estudio Nuvacron provocó mayor fitotoxicidad que BHC. Devadas *et al.* (1986) realizaron un trabajo para determinar los efectos de cuatro insecticidas organofosforados (protiofos, diclorvos, fosfamidon, and monocrotofos) en la germinación, sobrevivencia y comportamiento de la meiosis en chile (*Capsicum annum*). En este trabajo se encontraron efectos negativos para todas la variables observándose siempre una correlación directa con las dosis mayores. Lakshmi *et al.* (1988) evaluaron los efectos de dos insecticidas organofosforados (Ekalux EC 25 y Metasixtos) en chile; en este caso, las variables medidas, incluyendo el rendimiento, resultaron afectados. Nuestros resultados, confirman que los insecticidas aplicados a dosis mayores de las recomendadas afectan la fisiología y la calidad del tomate, además de que la utilización de productos fitorreguladores como el Biozyme, ayudan a contrarrestar los efectos nocivos.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Todos las plantas de chile y tomate que recibieron aplicaciones de insecticidas en dosis mayores a la recomendada en la etiqueta de los productos mostraron un comportamiento fisiológico diferente al control y un menor rendimiento. El Paratión 720CE ocasionó la mayor toxicidad en plantas de chile y el Tamarón 600LM en tomate.

El uso del Paratión 720CE a la dosis recomendada (R) y las dosis superiores (1.5R y 2R) ocasionó también efectos negativos en el peso y tamaño de fruto de las plantas de chile, así como sobre la dinámica de fructificación con respecto al control, el resto de los insecticidas afectaron estas variables solo en las dosis mayores (1.5R y 2R).

Solo el metamidofos a la dosis más baja (0.5R) mostró un rendimiento estadísticamente similar al control en las plantas de chile.

Los insecticidas interaccionan de manera significativa con las dosis. Después de la dosis recomendada, el aumento en la dosis aumenta la toxicidad de manera directa, tanto a las plantas de chile como a las de tomate.

El Paratión 720CE causó toxicidad en las plantas de chile, aún a la dosis recomendada sobre el contenido de clorofila, temperatura, peso de fruto y rendimiento en los diferentes experimentos realizados.

El metamidofos como ingrediente activo sin mezclas fue el insecticida que causó la menor toxicidad en los parámetros de la hoja que fueron evaluados. La clorofila y la temperatura foliar fueron las variables más sensibles a la toxicidad de todos los productos.

En el cultivo del chile se manifestó un efecto acumulativo en la fitotoxicidad después de la tercera semana de tratamientos, en las primeras dos semanas, los insecticidas metamidofos y Tamarón mostraron valores similares al control.

El efecto del metamidofos sobre las plantas de Chile fue estadísticamente similar al del Tamarón 600CE, pero ambos diferentes al Gusatión 35PH y al Paratión 720CE.

Las enzimas peroxidasa y superóxido dismutasa aumentaron significativamente su actividad con las dosis superiores a la recomendada (R). Se recomienda continuar estudiando la actividad de diferentes enzimas para indicar el estrés por insecticidas incluyendo deshidrogenasas que participan en la respiración y carboxilasas que participan en la fotosíntesis. Ambas enzimas resultaron ser buenos indicadores de estado fisiológico de las plantas bajo estrés por insecticidas.

En el experimento de análisis enzimáticos, la respuesta de peroxidasa y superóxido dismutasa al Tamarón fue más evidente que para metamidofos, otra vez, la diferencia del mismo ingrediente activo, solo y en mezcla comercial fue de una mayor respuesta en el producto comercial.

Se logró obtener una oviposición del 26.72% con adultos de picudo bajo condiciones de laboratorio, logrando así establecer las bases de una nueva técnica que permite la reproducción masiva de picudo del Chile en dichas condiciones.

El picudo del Chile resultó ser suficientemente susceptible a todos los insecticidas a la dosis recomendada (R) e incluso a la dosis 0.5 R. Es decir que las dificultades para controlar esta plaga no se debe a la resistencia de este insecto a los insecticidas.

El paratión metílico fue el insecticida más tóxico para el picudo, pero no puede ser recomendado para su uso por el efecto tóxico mostrado en la planta del Chile.

Se recomienda utilizar Bioneem, imidacloprid y metamidofos a la dosis más baja recomendada en la etiqueta para controlar picudo, cuando la aplicación de químicos sea necesaria.

Es necesario que los investigadores, profesionistas y productores se enfoquen al estudio de los hábitos biológicos de la plaga para encontrar el momento preciso para realizar aplicaciones de insecticida oportunas.

A pesar de la susceptibilidad del insecto a los insecticidas, probablemente la utilización de insecticidas químicos no sea la herramienta más adecuada para tratar de controlar esta plaga. Se sugieren nuevos proyectos de investigación, en busca de alternativas más eficientes para controlar esta plaga, enfocando la búsqueda hacia enemigos naturales y productos compatibles con la naturaleza, tal como los extractos de neem, el cual, en el experimento realizado en este estudio, no mostró diferencias significativas con respecto al control, comprobándose así su baja toxicidad para organismos no insectos.

Es necesario investigar a fondo los hábitos de la plaga en esta y otras regiones, considerando con la importancia que amerita, el estudio de los refugios naturales y hospederos donde este insecto sobrevive en la época en la que no se encuentran cultivos comerciales en etapa de floración o fructificación.

Se deben efectuar estudios de fitotoxicidad de productos agroquímicos y estudiar los efectos sobre la fisiología y crecimiento de las plantas de hábitat natural y cultivadas, para aportar mayor información acerca del impacto que el uso inadecuado de dichos productos pueden causar sobre los cultivos en lo particular, así como sobre los ecosistemas en general.

8. BIBLIOGRAFIA

Abou-Donia, M.B., K.R. Wimarth, A.A. Abdel, K.F. Jensen, T.L. Kurt. 1996. Increased neurotoxicity following concurrent exposure to pyridostigmine bromide, DEET, and chlorpirifos. In: Fundamentals of Applied Toxicology. Orlando, Fla.: Academic Press. Dec 1996 V. 34 (2) 201-222.

Albert, L.A., L. Alpuche, E. Aranda, F. Badillo, C. Bárcena, R.Chediack, R. Loera, G.L. Pomares, J. Rendón, A.D. Viveros. 1990. Los plaguicidas, el ambiente y la salud. Primera edición. Centro de ecodesarrollo. 331 pág.

Alonso E. J. 1994. Manejo Integrado de Plagas, En: Memorias del 'Evento Regional de Evaluación de Aspirantes a Aprobación en Manejo Fitosanitario del Algodonero' llevado a cabo en abril de 1994, en Torreón, Coah.

Alonso E. J. 1995. Manejo Integrado de Plagas en el cultivo de chile. En: Memorias del Evento Regional de Evaluación de Aspirantes a Aprobación en Manejo Fitosanitario del chile' llevado a cabo en abril de 1995, en Delicias, Chih.

Amer, S. M. y E.M. Ali. 1983. Cytological effects of pesticides XIV. Effect of the insecticide dipterex 'trichlorphon' on *Vicia faba* plant. Cytologia 48:761-770.

Amer, S.M. y O.R. Farah. 1983. Cytological effects of pesticides XIII. Meiotics effects of the insecticide "Dursban". Cytologia 48: 557-563.

Antonious, G. F. 1995. Analysis an fate of acephate and its metabolite, methamidophos, in pepper and cucumber. Journal of Environmental Science and Helath. Part B. Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes 30 (3): 377-399.

Aranda, Enrique., 1990. El manejo integrado de plagas: origen, conceptos, herramientas y su aplicación en México. Los plaguicidas,el ambiente y la salud. Centro de Ecodesarrollo de México. 275-283.

Atale, A.S., M.N. Narkhede, S.B. Atale. 1995. Effects of some agrochemicals on meiotic cell division in chilli. Journal of Maharashtra Agricultural Universities 20 (2): 195-197.

BANCOMEXT. 1999. <http://www.bancomext.com.mx>.

Barman, T.E. 1985. Enzime Handbook. Springler – Verlag. 2: 234-235.

Bassam A. O., S. C. Flores, J. McCord. 1992. Superoxide Dismutase: Phases, Developments and Applications. Advances in Pharmacology, Volume 23:109-161
Bassam A. O., S. C. Flores, J. McCord. 1992. Superoxide Dismutase: Phases, Developments and Applications. Advances in Pharmacology, Volume 23:109-161

Bhunia, A.K., D. Roy, S.K. Banerjee. 1993. Carbaryl-induced effects on glutathione content, glutathione reductase and superoxido dismutase activity of the cyanobacterium

Nostoc muscorum. *Letters in Applied Microbiology*, 16, 10-13.

Bidwell, R.G.S. 1979. Metabolismo energético. En: *Fisiología Vegetal*. A.G.T. Editor, S.A. México, D.F. p 114.

Boehringer. 1973 *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, 2nd enlarged edition.

Bolhar, H.R., Nordenkamp y G. Oquist. 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. Chapter 12. *Photosynthesis and Production in a Changing environment: a field and laboratory manual*. Chapman and Hall, London. pp. 193-205.

Bowles, R.G. y J.P. Webster. 1995. Some problems associated with the analysis of the costs and benefits of pesticides. *Crop Protection* 14: 593-600.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein -dye binding. *Analyt Biochem.* 72:248-254.

Bringas Luis. 1999. Ventanas del año 2000, la Guerra del empaque. *Productores de Hortalizas*. Octubre 1999.

Brown, J.S. 1993. Chlorophyll absorption and fluorescence in photosynthetic membranes. Chapter 4. *Models in Plant Physiology and Biochemistry*. Volume 1: 13-15.

Brown, J. K. Frohlich y R.C. Rosell. 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex. *Annu. Rev. Entomol.* 40: 511-534.

Butler, W.L. 1987. Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiology.* 29: 345-378.

Cartwright, B., T. G. Teague, L.D. Chandler, J.V. Edelson, G. Bensten, G. 1990. An Action Threshold for Management of the Pepper Weevil (Coleoptera: Curculionidae) on Bell Peppers. *J. Econom Entomol.* 83 (5):2003-2007.

Castillo, F.J. 1985. Active peroxidase et Pollution Atmospherique. These No. 2115. Faculte des Sciences, Universite de Genove.

Chibbar, R. N., R. Cella, D. Albany, y R. B. Van Huystee. 1984. The growth and preoxidase síntesis by two carrot cell lines. *J. Exp. Bot.* 35: 1846-1852.

Combs, J., D.O. Hall, S.P. Long, J.M. Scurlok. 1988. Técnicas en fotosíntesis y productividad. Colegio de Postgraduados. Chapingo, Edo de México, México.

Cortez M.E. 1994. La mosca blanca en el Valle de Santo Domingo, B.C.S. y la estrategia para su manejo. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. 40 pág.

Cortez Mondaca, E., Sánchez Valdéz, V. y Byerly Murphy, K.B.. 1993. Ciclo biológico del barrenillo del chile *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera:Curculionidae) en chile serrano y la relación fenológica cultivo-plaga. XXVIII. Cong.Nac. Ent.

Cottam, C. 1965. The ecologists role in problems of pesticide pollution. Biol. Sci. 15: 457-463.

Coudriet, D.L. y N. Kishaba. 1988. Bioassay procedure for an attractant of the pepper weevil (Coleoptera:Curculionidae). J.Econ.Entomol. 81(5): 1488-1502.

Curtis, C.R. y R. K. Howell. 1971. Increases in peroxidase isoenzyme activity in bean leaves exposed to low doses of ozone. Phytopatol. 61: 1306-1307.

Curtis, C.R., R. K. Howell y D.F. Kremer. 1976. Soybean peroxidases from ozone injury (pollution). Environ Pollut. 11:189-194.

Dass, H. C. y G.M. Weaver. 1986. Modification of ozone damage to *Phaseolus vulgaris* by antioxidants, thiols and sulfhydryl. Can. J. Plant Science. 48: 569-574.

David, P.M. 1987. Influence of insecticidal sprays on the resurgence of yellow mite *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) on chilies. Resurgence of Sucking Pests Proceedings of the National Symposium. M Jayaraj. 1987. 65-72.

Devadas, N., M.V. Rajam, K. Subhash. 1986. Comparative mutagenicity of four organophosphorous insecticides in meiotic system of red pepper. CYTOLOGIA. Vol. 51. No. 4. 645- 653.

Devlin, R. M. 1980. Enzimas. En: Fisiología Vegetal. Devlin, R. M. (Ed) Editorial Omega. Barcelona, España. 103-114.

Deby, C. 1991. La Bioquímica del Oxígeno. Mundo Científico No. 111. Volumen 11. pp. 287- 294.

Eller, F.J., R.J. Bartlet, B.S. Shasha, D.J. Schuster, D.G.Riley, P.A. Stansly, T.f. Mueller, K. Schuler, B. Jhonson, J.H. Davis, y C.A. Sutherland. 1994. Aggregation pheromone for the pepper weevil, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae): identification and field activity. J. Chem. Ecol. 20: 1537-1555.

Endress, A.G. y S. J. Suárez. 1980. Peroxidase activity in plant leaves exposed to gaseous HCl hydrochloric acid or ozone. Environ Pollut. 22: 47-58.

EPA (Environmental Protection Agency USA). 1999. Reconocimiento y Manejo de los Envenenamientos por Pesticidas. Quinta edición. 252 pág

Epstein, S.S. y M. Legator. 1971. The mutagenicity of pesticides. M.I.T. Press, Massachusetts. 220 pág.

Easterbrook, M.A. 1996. A field assessment of the effects of insecticides on the beneficial

fauna of strawberry. *Crop Protection* 16 (2): 147-152.

Ezaki B.; S. Tsugita; H. Matsumoto. 1996. Expresión of a moderately anionic peroxidase is induced by aluminum treatment in tobacco callus: Possible involvement of peroxidase enzymes in aluminum ion stress. *Physiol. Plant.* 96: 21-28.

Fang W.Ch., Ch. H. Kao. 2000 Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. *Plant Sci.* 158: 71-76.

Fanjul, L., V. Barradas. 1987. Diurnal and seasonal variation in the water relations of some deciduous and evergreen trees of deciduous dry forest of the western coast of México. *Journal of Applied Ecology.* 24:289-303.

FAO. 1999. Year Book.

Fletcher, J. S. y F.L. Jonson. 1988. database assessment of phytotoxicity data published on terrestrial vascular plants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 7:615-622.

Fletcher, J.S., T.G. Pflieger, H. C. H.C. Ratsch. 1993. Potential environmental risks associated with the new herbicides. *Environmental Science and Technology* 27:2250-2252.

Foster R.E. y G.E. Brust. 1995. Effects of insecticides applied to control cucumber beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) on watermelon yields. *Crop Protection* 14: 619-624.

Fridovich, J. 1975. Superoxide dismutases (Fungi, bacteria) *Ann. Rev. Biochem.* 44: 147-160.

Fry, S.C. 1980. Gibberelin-controlled pectinic acid and protein secretion in growing cells spinach. *Photochemistry.* 19: 735-740.

García, J.L. 1998. Evaluación de variedades transgénicas de algodónero resistentes a lepidópteros. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” – Unidad Laguna.

Gaspar, Th., U. Penel, T. Thorpe, y H. Greppin. 1982. A survey of their biochemical and physiological Roles in Higher Plants. En: *Peroxidases.* 1970. – 1980. Edit. Université de Genève Centre de Botanique. 5-127.

Gilreath, P.R., J. A. Cornel. 1987. Phytotoxicity of foliar application of cinmethylin to pepper. Resurgence of Sucking Pests Proceedings of the National Symposium. M Jayaraj. 1987. 73-77.

Gliessman, Stephen R. 1997. *Agroecology: ecological processes in sustainable agriculture.* Sleeping Bear Press. 351 pág.

Gore Albert. Rachel Carson. Sin fecha.

<http://www1.whitehouse.gov/WH/EOP/OVP/24hours/carson.html>.

Horsman, D.C. y A.R. Wellburn. 1975. Sinergistic effect of SO₂ (sulfur dioxide) and NO₂ (nitrogen dioxide) polluted air upon enzyme activity in pea seedlings. *Environ Pollut.* 8:123-133.

Hassan, H. M., H.E. Schellhorn. 1988. Oxy- Radicals in Molecular Biology and Pathology. Alan R. Liss, Inc. pages 183-193.

Imbamba, S. K. y D.N. Moss. 1971. Effect of atrazine on physiological process in leaves. *Crop. Sci.* 11: 844-848.

Ishaaya, I., M. Austerweil y H. Frankel. 1986. Effect of the petroleum oil virol on toxicity and chemical residue of fenprothrin applied against adults of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) as high- an low- volume sprays. *Journ Econ, Entomol.* 79: 596-599.

Kim, S.S., Wender, S.H. y Smith, E.C. 1980. Isolation and characterization of two isoperoxidases from tobacco tissue cultures. *Phytochem.* 19:169-171.

Klivanov, A.M., Tu, T.M. y Scott, K.P. 1983. Peroxidase- catalyzed removal of phenols from coal conversion waste waters. *Science.* 221: 259-261.

Koike, S.T., R. F. Smith, K. F. Schulbach y W. E. Chaney. 1997. Association of the insecticide naled with celery petiole lesion damage. *Crop Protection.* 16 (8): 753-758.

Kramer, P.J. 1983. Water relations of plants. Academic Press, Inc. London. 489 pág.

Krause, GH y E. Weis. 1991. Chlorophyll fluorescence and Phtosynthesis: The basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:313-49.

Lakshmi, N., N. S. Prakash, I. Harini. 1988. Cytological effects of agricultural chemicals. I Effects of insecticides "Ekalux and metasixtos" on chili (*Capsicum annum*). *CYTOLOGIA.* Vol. 53. No. 4. pp. 703-708.

Lagunes, A. y J. C. Rodríguez. 1990. Temas selectos de manejo de insecticidas agrícolas. CONACYT, Colegio de Postgraduados y Sociedad Mexicana de Entomología Sección Chapingo. 187 pág.

Lagunes, A. y J.C. Rodríguez. 1990. Grupos toxicológicos de insecticidas y acaricidas. Centro de Entomología y Acarología. México. 228 pág.

Lagrimini L.M., V. Gingas, F. Finger, S. Rothstein, T.T.Y. Liu. 1997. Characterization of antisense transformed plant deficient in the tobacco anionic peroxidase. *Plant Physiol.* 1187-1196.

Largimini L.M., R.J. Joly, J.R. Dunlap', T.T.Y. Liu. 1997. The consequence of peroxidase overexpresion in transgenic plants on root growth and development, *Plant Mol. Biol.* 33: 887-895.

Lin C.C., C.H. Kao. 1999. NaClO induced changes in ionically bound peroxidase activity in roots of rice seedlings, *Plant Soil*. 216: 147-153.

Lobarzawsky J.H., H. Greppin, C. Penel, T. Gaspar (Eds.) 1991 Biochemical, Molecular, and Physiological Aspects of Plant Peroxidases, University of Geneva, Geneva, 50 pág.

Lobotskaya, L., Byekko, Y.A., Palchenko, L.A. y Bormotov, V. Y 1968. Dokl. Akad. Nauk. B. SSR. 12: 563-565.

López Terrones, M.E. 1996. Susceptibilidad a insecticidas en dos poblaciones de campo de adultos del barrenillo del Chile *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera:Curculionidae) procedentes de San Luis Potosí. M. Sc. Tesis. Colegio de Postgraduados. 110 pág.

Lowry, O.H., N.I. Rosenbrough, A.L. Farr, y R.N. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Maheshwari, D.K., S.P. Singh. 1989. Inhibitory effects of two organocarbamates nematicides on growth and yield of *Capsicum annum*. *Biochemical Physiology Pflanz B.P.P. Gena. E. Germany.*: Gustav Fisher. Vol: 184 (1/2) 137-143.

Maier, R. 1978. Activity and multiple forms of peroxidase in *Zea mays* maize and *Medicago sativa* alfalfa treated and non treated with lead. *Phyton (Austria)*. 19: 83-96.

Mansouri I.E., J.A. Mercado, N. Santiago-Domenech, F. Pliego-Alfaro, V. Alpuesta, M.A. Quesada. 1999 Biochemical and phenotypical characterization of transgenic tomato plants overexpressing a basic peroxidase. *Physiol Plant* 106: 355-362.

McCord J.M., I. Fridovich. J. 1969. Superoxide Dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244:6049-6055.

Metckalf, R.L. y W.H. Luckman. 1990. Introducción al manejo integrado de plagas de insectos. J. Wiley & Sons. Inc. 710 pág.

Mohan R., A.M. Bajar, P.E. Kolettukudy. 1993 Introduction of a tomato anionic peroxidase gene (*tap 1*) by wounding in transgenic tobacco and cultivation of *tap 1*/GUS and *tap 2*/GUS chimeric gene fusions in transgenic tobacco by wounding and pathogen attack. *Plant Mol. Biol.* 21: 341-354.

Moreno O. A., R. Vázquez-Dahult, H. Nolasco. 1990. Extracellular accumulation of high specific-activity peroxidase by cell suspension cultures of cowpea. *Plant Cell Reports*. 9:147-150.

Niemtur, S. 1979. Influence of zinc smelter emissions on peroxidase activity in Scots pine *Pinus sylvestris* needles of various families air pollution injury, Poland. *Eur. J. For Path.* 9: 142-147.

Nieto Garibay A. 2000. Relaciones Suelo-Planta-Atmosfera de una línea semidomesticada

de chile (*Capsicum frutescens*) bajo tratamientos de abono orgánico y fertilizante químico. Tesis de Maestría en Ciencias. UNAM. 103 pág.

Orcutt D., E.T. Nilsen. 2000. Physiology of Plants Under Stress. Jhon Wiley & Sons, Inc.

Ortega, L.D. 1996. Resistencia a insecticidas en adultos de mosquita blanca *Trialeurodes vaporariorum* west. (homoptera: aleyrodidae) procedentes de Tepoztlan, Morelos. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México. 85 pág.

Otter T., A. Polle. 1997. Characterization of acidic and basic apoplastic peroxidases from needles of Norway spruce (*Picea abies*, L., Karsten) with respect to lignifying substrates. *Plant Cell Physiol.* 38: 595-602

Peveling, R., J. J. Rafanomezantsoa, R. Razafinirina, R. Tovonkery y G. Zafimaniry. 1999. Environmental impact of the locust control agents fenitrothion, fenitrothion-esfenvalerate and triflumuron on terrestrial arthropods in Madagascar. *Crop Protection* 18: 659-676.

Picanço M., G.L.D. Leite, R.N.C. Guedes and E.A. Silva. 1998. Yield loss in trellised tomato affected by insecticidal sprays and plant spacing. *Crop Prot.* 17(5): 447-452.

Pimentel, D., L. McLaughlin, A. Zepp, B. Latikan, T. Kraus, P. Kleinman, F. Vancini, W. Roach, E. Graap, W. Keeton, and G. Selig. 1991. Environmental and economic effects of reducing pesticide use. *BioScience.* 41:402-409.

Raman A., R. Beiderbeck. Aseptic dual culture of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hom., Aleyrodidae) and its hosts, *Stellaria media* (L.) Vill. (Caryophyllaceae). *J. Appl. Ent.* 113: 252-257. (1992)

Ramírez, Ch. J.L. 1991. Informe Anual del Programa Entomología. INIFAP-CEZOME. Mérida, Yucatán.

Rao, D.M., K. Ahmed. 1986. Effect of syntetic pyrethroid and other insecticides on the resurgence of chilli yellow mite, *Polyphagotarsonemus latus* (Banks). Chromosome abnormality, Toxicology, Horticulture, Cell Biology. Symposium on Resurgence of Sucking Pests Coimbatore (India).

Rawsthorne, S. 1992. Towards an understanding of C3-C4 photosynthesis. *Essays Biochem.* 27:135-146.

Reddy, S.S., G.M. Rao. 1981. Cytogenetic effects of Agricultural chemicals. I. Effects of insecticides "BHC and Nuvacron" on chromosomal mechanism in to yield and yield components in chili. *CYTOLOGIA.* Vol. 46. No. 4. pp. 699-707.

Restrepo, Ivan. 1992. Los plaguicidas en México. Comisión Nacional de Derechos Humanos. Segunda edición. 295 pág.

Retig, N. y J. Rudich. 1972. Peroxidase and IAA (indole acetic acid) oxidase activity and

isoenzyme patterns in cucumber plants, as affected by sex expression and ethephon. *Physiol. Plant.* 27: 156-160.

Reyes Barraza, E. 1984. Estudio bioecológico, hospederas alternantes y cría masiva del barrenillo del chile, *Anthonomus eugenii* Cano. Tesis de Maestría en Ciencias. ITESM. 115 pág.

Ricard, J. y J. Nari. 1966. Les réactions d' oxygenation catalysées par la peroxidase. *Bull. Soc. Franc. Vég.* 12:29.

Riley, G.,D. 1997. The pepper weevil and its management. Texas Agricultural Extension Service. The Texas A&M University System.

Roychowdhury, P., P. Sukul. 1997. Residue behavior of fluvinate in chili (*Capsicum annum*) under Indian climatic condition. *Bull. Environmental Contamination Toxicology.* New York: Springer-Verlag, 1966- Nov 1997. Vol. 59 (5) 723-727.

Salisbury, F.B. y C.W. Ross. 1992. *Plant Physiology.* Wadsworth Publ.Co., Inc. Belmont, California. 422 pp.

Sato Y., M. Sugiyama, R.J. Gorecki, H. Fukuda, A. Komamine. 1993 Interrelationship between lignin deposition and the activities of preoxidase isoenzymes in differentiating treachery elements of *Zinnia*. Analysis using L- α -aminooxy- β -phenylpropionic acid and 2-aminoindan-2-phosphonic acid. *Plant Sci.* 141: 165-171.

Scandalios, J. G. 1979. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25: 225-258.

Scheunert, I. 1992. Fate of pesticides in plants and in soil fauna. Pp. 77-103 en W. Ebing (ed.), *Chemistry of Plant Protection*, Springer-Verlag, New York..

Schmutterer, H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica* *Annu. Rev. Entomol.* 271-297.

Scott, J.G. 1991. Insecticide resistance in insect. En: *Resistance to pesticides.* D. Pimentel (ed) Press. Inc. New York. 663-677.

Servin, R. 1996. La mosquita blanca *Bemisia argentifolii* Bellows y Perring, sus hospederos y resistencia a insecticidas utilizados en Baja California Sur, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

Sitbon F., S. Hennion, C.H.A. Little, B. Sundberg. 1999 Enhanced ethylene production and peroxidase activity in IAA-overproducing transgenic tobacco plants is associated with increased lignin content and altered lignin composition. *Plant Sci.* 141: 165-171

Soriano, J.D. Herbicide-induced chromosomal aberrations and inheritance of a digenic seedling mutation in sorghum. *Cytologia* 49: 201-207.

Stevens H., M. Calvan, K. Lee, and B. Siegel. 1978. Peroxidase activity as a screening parameter for salt stress in *Brasica* species. *Photochem.* 17: 1521-1522

Straw, N. A., N.J. Fielding y A. Waters. 1996. Phytotoxicity of insecticides used to control aphids on *Sitka spruce*, *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. *Plant Protection* 15: 451-459.

Troyo, D. 1994. Biología, ecología y agroecología del frijol gandul (*Cajanus cajan*) en la región del Cabo. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias (Biología). Universidad Nacional Autónoma de México.

Vig, E, J. Nemcsón. 1989. The effects of hipoxia and paraquat on the superoxide dismutase activity in different organs of carp, *Cyprinus carpio*. *J. Fish. Biol.* 35, 23-25.

Wallace G., S.C. Fry. (1994) Phenolic components of the cell wall: Dynamic aspects, *Int. Rev. Cytol.* 151: 229-267

Walker J.L., K.M. McLellan, D.S. Robinson, 1991. Isolation and purification of Superoxide Dismutase purified from Brussels Sprouts (*Brassica oleracea* L. var *bullata* sub var. *gemmifera*). *Food Chemistry* 41:1-9

Worthington Biochemical Corporation. 1972. Worthington enzyme. Manual. p 43.