

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**RESPUESTA ALIMENTARIA DE *Hylastinus obscurus* Marsham HACIA EXTRACTOS
RADICALES DE DOS CULTIVARES Y UNA LÍNEA EXPERIMENTAL DE *Trifolium
pratense* L. SUMINISTRADOS EN DIETA ARTIFICIAL**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias
Agropecuarias y Forestales de la
Universidad de La Frontera, como parte de
los requisitos para optar al título de
Ingeniero Agrónomo.

**KAREN PAOLA HUAQUIL LLAUPE
TEMUCO-CHILE**

2014

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**RESPUESTA ALIMENTARIA DE *Hylastinus obscurus* Marsham HACIA EXTRACTOS
RADICALES DE DOS CULTIVARES Y UNA LÍNEA EXPERIMENTAL DE *Trifolium
pratense* L. SUMINISTRADOS EN DIETA ARTIFICIAL**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias
Agropecuarias y Forestales de la
Universidad de La Frontera, como parte de
los requisitos para optar al título de
Ingeniero Agrónomo.

**KAREN PAOLA HUAIQUIL LLAUPE
PROFESOR GUÍA: ANDRÉS EDUARDO QUIROZ CORTEZ
TEMUCO-CHILE**

2014

**“RESPUESTA ALIMENTARIA DE *Hylastinus obscurus* Marsham
HACIA EXTRACTOS RADICALES DE DOS CULTIVARES Y UNA
LÍNEA EXPERIMENTAL DE *Trifolium pratense* L. SUMINISTRADOS
EN DIETA ARTIFICIAL”**

PROFESOR GUÍA : _____

Andrés Eduardo Quiroz Cortez
Dr. en Química
Departamento de Ciencias Químicas y
Recursos Naturales
Universidad de La Frontera

PROFESOR CONSEJERO : _____

Leonardo Javier Parra Bardehle
Dr. en Ciencias de Recursos Naturales
Departamento de Ciencias Químicas y
Recursos Naturales
Universidad de La Frontera

CALIFICACIÓN PROMEDIO TESIS :

ÍNDICE

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis.	3
1.2 Objetivo general.	3
1.3 Objetivos específicos.....	4
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Antecedentes generales de <i>Trifolium pratense</i>	5
2.1.1 Origen de <i>T. pratense</i>	5
2.2 Clasificación botánica.....	5
2.3 Descripción y características botánicas	6
2.3.1. Follaje	6
2.3.2 Flores	7
2.3.3 Semilla	8
2.3.4 Sistema radicular	8
2.4 Adaptación y establecimiento de trébol rosado	9
2.5 Cultivares de trébol rosado creados por INIA.	10
2.5.1 Cultivar Quiñequeli INIA.....	10
2.5.2 Cultivar Redqueli INIA.	10
2.5.3 Cultivar Superqueli INIA	11
2.6 Distribución geográfica de <i>T. pratense</i>	12
2.6.1 Distribución mundial	12
2.6.2. Distribución nacional.....	12
2.6.3 Distribución regional	14
2.7 Utilización, importación y exportación de trébol rosado.	17
2.8 Principales problemas fitosanitarios que afectan al trébol rosado.....	19

2.9 Compuestos fagoestimulantes, antialimentarios y dietas artificiales	20
2.10 Dieta Artificial.....	21
2.11 Extractos vegetales.	21
2.12 Planteamiento del problema.	23
3. MATERIALES Y METODOS.....	25
3.1 Obtención de <i>Hylastinus obscurus</i>	25
3.2 Componentes de las dietas artificiales.....	25
3.3 Preparación de dietas artificiales.	26
3.4 Elección de la dieta artificial.	27
3.5 Obtención de extractos radicales de <i>T. pratense</i>	28
3.5.1 Obtención del extracto apolar.....	28
3.5.2 Obtención del extracto polar.....	31
3.6 Ensayos de consumo.....	31
3.7 Sexaje de <i>H. obscurus</i>	32
3.8 Caracterización química de los extractos polares y apolares.	32
3.8.1 Caracterización química de extractos polares.	32
3.8.1.1 Determinación de los solventes para CC.....	33
3.8.1.2 Cromatografía en Columna.	33
3.8.1.3 Cromatografía Capa Fina.....	37
3.8.1.4 Pruebas Colorimétricas.....	40
3.8.2 Caracterización química presente en extractos apolares.	41
3.9 Análisis estadístico y diseño experimental.....	42
4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	43
4.1 Respuesta de <i>Hylastinus obscurus</i> hacia dos tipos de dietas artificiales	43
4.2 Respuesta alimentaria de <i>H. obscurus</i> hacia extractos radicales polares y apolares de cultivares y línea experimental de <i>T. pratense</i> , suministradas en dieta artificial.....	46

4.3 Caracterización química del extracto radical polar de Superqueli INIA.....	57
4.3.1 Obtención de fracciones totales.....	57
4.3.2. Reacciones colorimétricas.....	58
4.4 Identificación química de los extractos radicales apolares de cultivares y línea experimental.....	62
5. CONCLUSIONES.....	65
6. RESUMEN	67
7. SUMMARY.....	69
8. AGRADECIMIENTOS.....	71
9. LITERATURA CITADA.....	72
10. ANEXOS	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Follaje trébol rosado. A) aspecto del tallo. B) aspecto de foliolos.	7
Figura 2. Flor de <i>Trifolium pratense</i>	7
Figura 3. Semillas de trébol rosado.	8
Figura 4. Aspecto de la raíz de <i>Trifolium pratense</i>	9
Figura 5. Dieta artificial con insecto. A) Dieta descrita por Faccoli & Schlyter (2007), B) Dieta descrita por Sallé & Raffa (2007).	27
Figura 6. Formula de incremento de peso (%) del insecto.	28
Figura 7. Esquema de obtención de extracto apolar de raíces de <i>T. pratense</i> . A) Parcelas experimentales de trébol rosado (INIA Carillanca), B) Lavado y separación de raíces, C) Pesaje de raíces, D) Raíces pesadas y rotuladas en Tubos Falcón, E) Freezer -80°C, F) Liofilización de raíces, G) Raíces en diclorometano, H) Mantención de las muestras en oscuridad, I) Filtrado de la muestra, J) 1° y 2° extracción, K) Pesaje balón, L) Concentración total (1° y 2°), M) Balón de 100 mL con muestra llevada a sequedad, N) Peso de la muestra más balón, Ñ) Reconstitución de la muestra, O) Extracto crudo.....	30
Figura 8. Proceso elaboración ensayos de consumo, A) Llenado de campanas con dieta artificial, B) Incorporación 10 µL de extracto correspondiente, C) Homogeneización de mezcla más extracto, D) Bloque correspondiente a Syn II Pre III, diclorometano, 100 ppm E) Balanza de precisión utilizada para obtener Pi y Pf de los insectos, F) Ensayo de consumo.	32
Figura 9. Proceso secado muestra para columna. A) homogenización muestra, B) silica gel 60 (70-230 Mesch 0,063-0,200 mm), C) Muestra sobre agitador magnético digital con calefacción a 45°C.	35
Figura 10. Extracto de trébol rosado fraccionado eluidos en diferentes solventes. A) Muestra aplicándole primera mezcla de solventes, B) Muestra descendiendo por la columna provocado por la polaridad de solventes, C) Columna finalizada.....	36

Figura 11. Aspecto de CCF y muestras en UV, A) Placa cromatográfica en cubeta de vidrio con solvente, B) Vista placa CCF bajo luz UV.	39
Figura 12. Proceso revelado fracciones; A) Grupo de una fracción eluidas en solvente, utilizando cubetas grandes, B) Revelado con reactivo de Dragendorff, en todas las fracciones y control.	41
Figura 13. Análisis de regresión para la dieta compuesta propuesta por Faccoli & Schlyter (2007).	44
Figura 14. Análisis de regresión para la dieta propuesta por Sallé & Raffa (2007).	45
Figura 15. Incremento de peso (%) de <i>H. obscurus</i> al evaluar extractos radicales apolares de los cultivares (Quiñequeli INIA y Superqueli INIA) y línea experimental (Syn II Pre III) a distintas concentraciones. A) 10 ppm, B) 100 ppm, C) 1000 ppm.	49
Figura 16. Incremento de peso (%) de <i>H. obscurus</i> al evaluar extractos radicales polares de los cultivares (Quiñequeli INIA y Superqueli INIA) y línea experimental (Syn II Pre III) a distintas concentraciones. A) 10 ppm, B) 100 ppm, C) 1000 ppm.	50
Figura 17. Incremento de peso (%) de hembras de <i>H. obscurus</i> al evaluar extractos radicales apolares de dos cultivares y una línea experimental de trébol rosado. A) 10 ppm, B) 100 ppm, C) 1000 ppm.	53
Figura 18. Incremento de peso (%) de hembras de <i>H. obscurus</i> al evaluar extractos radicales polares de dos cultivares y una línea experimental de trébol rosado. A) 10 ppm, B) 100 ppm, C) 1000 ppm.	54
Figura 19. Incremento de peso (%) de machos de <i>H. obscurus</i> al evaluar extractos radicales apolares de dos cultivares y una línea experimental de trébol rosado. A) 10 ppm, B) 100 ppm, C) 1000 ppm.	55
Figura 20. Incremento de peso (%) de machos de <i>H. obscurus</i> al evaluar extractos radicales polares de dos cultivares y una línea experimental de trébol rosado. A) 10 ppm, B) 100 ppm, C) 1000 ppm.	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica <i>Trifolium pratense</i> L.	6
Tabla 2. Principales descriptores morfológicos de Superqueli INIA y de cultivares testigos nacionales.....	11
Tabla 3. Regiones con mayor superficie agrícola y explotaciones en forrajeras permanentes.	13
Tabla 4. Regiones con mayor superficie de trébol rosado en condiciones de riego y seco.	14
Tabla 5. Superficie de trébol rosado para las comunas de la Provincia de Cautín.....	16
Tabla 6. Superficie de trébol rosado para las comunas de la Provincia de Malleco.	17
Tabla 7. Superficie de los semilleros en las comunas de la Provincia de Cautín.	18
Tabla 8. Ingredientes utilizados en dietas artificiales.	26
Tabla 9. Solventes utilizados con la proporción correspondiente para CC.	34
Tabla 10. Fracciones extraídas de CC con su solvente y proporción correspondiente.....	36
Tabla 11. Fracciones utilizadas en CCF, con su solvente de extracción en CC y solvente de dilución en CCF.....	38
Tabla 12. Fracciones obtenidas del extracto etanólico de <i>Trifolium pratense</i> (cultivar Superqueli INIA).....	57
Tabla 13. Análisis fitoquímico cualitativo del extracto etanólico de <i>Trifolium pratense</i> (cultivar Superqueli INIA).	60
Tabla 14. Valores RF para los spots que reaccionaron positivamente con cada uno de los reveladores de familias de compuestos químicos.	61
Tabla 15. Compuestos identificados en el extracto de diclorometano de la parte radical de plantas de trébol rosado (<i>Trifolium pratense</i>).	64

1. INTRODUCCIÓN

Trébol rosado (*Trifolium pratense* L.) (Fabaceae) es una de las especies forrajeras más importantes en las zonas templadas del mundo, y es reconocida por su capacidad de producir gran cantidad de forraje de alta calidad (Demanet, 2008). En Chile, su importancia radica tanto por la superficie sembrada, cercana a las 100.000 ha (alrededor de 20% de las praderas sembradas), así como por las exportaciones de semilla, que oscilan entre 700 y 1.700 toneladas al año. En la última década ha representado más del 70% del total de semillas forrajeras exportadas, y la mayor parte de los semilleros se encuentran en la Región de La Araucanía (Ortega, 2009).

Históricamente *T. pratense* se ha utilizado solo o asociado a ballicas bianuales o cereales (avena o triticale), constituyéndose en uno de los principales forrajes suplementarios de alta producción de verano. Dentro de sus usos se encuentra el pastoreo invernal y elaboración de ensilaje en primavera y ocasionalmente heno en verano. Es de fácil establecimiento y con rendimiento superiores a 12 ton ms/ha. Con el incremento de la elaboración de ensilajes premarchitos y el uso de aditivos biológicos, el ensilaje de trébol rosado es cada día más común en la zona sur del país. Además, constituye una fuente de proteína de excelente calidad para los sistemas ganaderos y se complementa bien con los sistemas de rotación que incluyen el establecimiento de cereales de grano pequeño (Demanet, 2008).

El Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) Carillanca desde la década del 60, inició el desarrollo nacional del trébol rosado y las exportaciones de semilla se han basado en gran medida en cultivares creados por esta institución (Ortega, 2009). A la fecha, INIA cuenta con cultivares tales como Quiñequeli INIA, Redqueli INIA y recientemente Superqueli INIA. Estos dos últimos han demostrado superar en algunos aspectos agronómicos a Quiñequeli INIA, como son sobrevivencia de plantas, rendimiento de materia seca y persistencia productiva. Todo lo

anterior como resultado del mejoramiento genético que ha llevado a cabo INIA Carillanca (Ortega *et al.*, 2012).

Uno de los factores bióticos que se ha visto involucrado en la disminución del rendimiento y persistencia de *T. pratense* es la presencia de *Hylastinus obscurus* Marsham (Coleoptera: Curculionidae). Según diversos autores este insecto ataca generalmente al segundo año de establecimiento del trébol rosado y puede dañar entre un 70 a 100 % de las plantas (Ortega *et al.*, 1991; Aguilera *et al.*, 1996).

Es por ello que se han utilizado distintos métodos para disminuir o controlar esta plaga, tales como el control químico y cultural. El método químico no ha sido efectivo debido a que el mayor daño en la pradera es producido en la raíz por el estado larval del insecto. Para el control cultural se aconseja no realizar siembras adyacentes a potreros que tengan un mayor tiempo de establecimiento.

Una alternativa para disminuir las poblaciones de *H. obscurus* en trébol rosado, es escoger cultivares que presenten mayor resistencia al ataque de este insecto, por sobre aquellas que tienen mayor susceptibilidad. En este sentido, Granados & Paliwal (2001) definen **resistencia** al ataque de insectos como *la cantidad relativa de elementos heredables de la planta que influyen sobre el daño realizado por los insectos*. El grado de resistencia de un cultivar a un insecto específico, tal como ocurre en el campo, puede ser evaluado comparándolo a otras variedades usualmente más susceptibles. Los mismos autores definen **susceptibilidad** como *aquellas plantas que muestran un daño superior al promedio a causa del ataque de los insectos*.

Las dietas artificiales son una herramienta útil a la hora de evaluar el efecto de distintas sustancias como extractos vegetales-radicales, sustancias disuasivas o estimulantes de la alimentación, así mismo, sustancias que actúan como insecticidas aplicadas al insecto. Con ello, se podría determinar el comportamiento de vida, hábitos de alimentación, susceptibilidad y resistencia a pesticidas químicos y biológicos (Ahmed, 1983).

Es por ello que se ha planteado que extractos radicales de líneas experimentales de trébol rosado incorporados en dieta artificial podrían ayudar a determinar mayor o menor preferencia o consumo de *H. obscurus* hacia diferentes cultivares y líneas experimentales de trébol rosado, evaluando la respuesta fagoestimulante o antialimentaria que presente el insecto hacia estos extractos. Al respecto, Fernández & Cabrera–La Rosa (1999) definen fagoestimulante como aquellas sustancias que estimulan los receptores gustativos de los insectos. Por otro lado un compuesto antialimentario provoca que un insecto consuma poco o nada del alimento o sustancia mientras vive, lo cual es importante ya que limitaría el daño a la planta (Vázquez, 1992). Lo anterior aplicado en diferentes dietas artificiales ha tomado importancia ya que han llegado a ser una herramienta valiosa para el control de insectos, debido a que se puede evaluar material genético vegetal en búsqueda de resistencia varietal (Villacorta, 1971), y con ello se podría conseguir una menor pérdida en el rendimiento.

Por lo tanto, para implementar un método de control que involucre la preferencia o disuasión del consumo de *H. obscurus*, se requieren estudios que proporcionen información sobre la respuesta fagoestimulante y/o antialimentaria de este curculiónido hacia extractos radicales de diversos cultivares y líneas experimentales de *T. pratense*. Los compuestos químicos con actividad fagoestimulante o antialimentaria, que se logren identificar podrían conducir, en el futuro, al desarrollo de un método de control contra *H. obscurus*, inserto dentro de las estrategias de Manejo Integrado de Plagas (MIP).

1.1 Hipótesis. Extractos radicales polares y apolares de dos cultivares y una línea experimental de *Trifolium pratense* incorporados en una dieta artificial provocan una respuesta fagoestimulante o antialimentaria sobre *H. obscurus*.

1.2 Objetivo general. Evaluar el efecto fagoestimulante o antialimentario provocado por extractos radicales de cultivares y una línea experimental de *T. pratense*, suministrados en una dieta artificial sobre *H. obscurus*.

1.3 Objetivos específicos

1. Determinar la respuesta alimentaria de *H. obscurus* hacia diferentes dietas artificiales.
2. Analizar el efecto fagoestimulante o antialimentario de extractos radicales de *T. pratense* incorporados en una dieta artificial sobre la conducta alimentaria de *H. obscurus*.
3. Identificar los componentes químicos de los extractos radicales de los cultivares y línea experimental de *T. pratense*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antecedentes generales de *Trifolium pratense*.

2.1.1 Origen de *T. pratense*. Ortega *et al.* (1991) mencionan que esta leguminosa se originó probablemente en el Asia menor o en el Sureste Europeo. Wilsie (1966) señaló que además de tener ese origen, esta especie fue cultivada en Europa hace tres o cuatro siglos. Se conoció en España y Holanda en 1500 y 1550 respectivamente; tiempo después esta especie llegó a Alemania, país del cual se llevó la semilla hacia Inglaterra en 1650. Se cree que probablemente colonos ingleses introdujeron la semilla a América. Actualmente su distribución es amplia, lo que ha significado ser un importante recurso forrajero en Europa, Centro Oeste de Asia, Estados Unidos y Nueva Zelanda, entre otros.

En cuanto a su introducción en Chile, Aguila (1992) menciona que la especie fue introducida al país en 1869, por Don Guillermo Délano, quien la sembraría por primera vez en la provincia del Maule. Debido a que esta especie presenta una gran adaptabilidad a distintos suelos, su distribución al resto del país se realizó rápidamente.

2.2 Clasificación botánica.

La descripción taxonómica para el trébol rosado realizado por el USDA (Departamento de Agricultura de USA), se muestra en Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica *Trifolium pratense* L.

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta (plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (Plantas con semillas)
División	Magnoliophyta (Plantas con flor)
Clase	Magnoliopsida (Dicotiledóneas)
Subclase	Rosidae
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Género	<i>Trifolium</i>
Especie	<i>Trifolium pratense</i> L.

Fuente: USDA (S/A).

2.3 Descripción y características botánicas.

El trébol rosado, es una planta herbácea, perenne de vida corta, de crecimiento erecto o semiprostrado. Aguila (1962) describe a los órganos de la planta botánicamente como follaje, flores, semilla y raíz.

2.3.1. Follaje. Compuesto por numerosos tallos (Fig. 1A) que nacen de una corona gruesa, con abundante número de hojas, trifoliadas, grandes, alternadas. Cada foliolo de forma ovada, con una descoloración característica en forma de mancha se encuentra unido a un gran peciolo. Las hojas y pecíolos se encuentran cubiertos de abundantes y finas vellosidades (Fig. 1B).

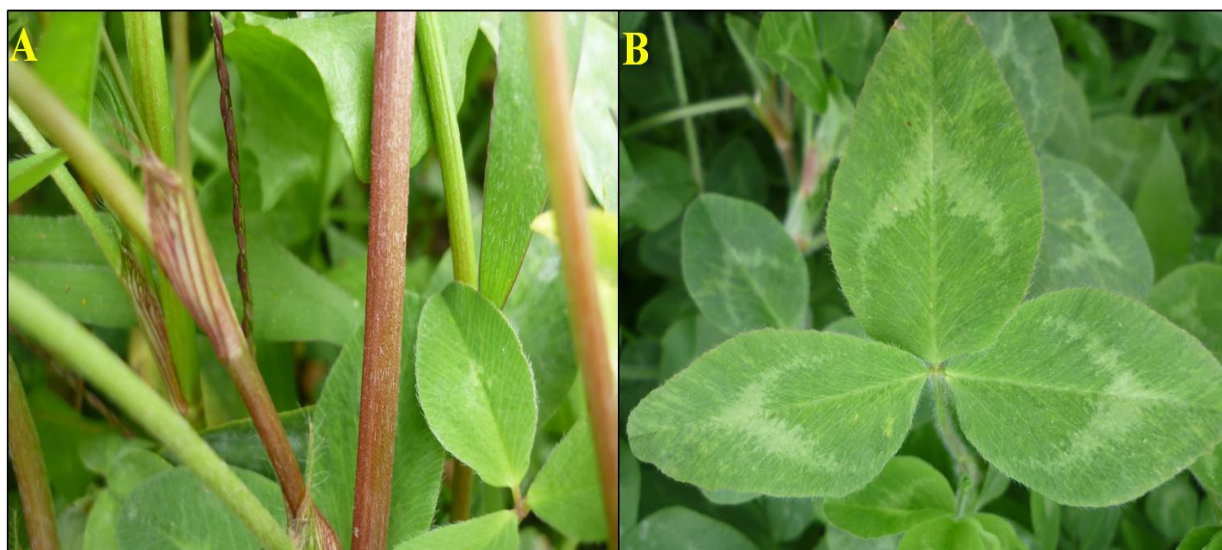


Figura 1. Follaje trébol rosado. **A)** aspecto del tallo. **B)** aspecto de foliolos.

2.3.2 Flores. Las flores son papilionadas, dispuestas en racimos densos de forma ovoide, con hasta 200 flores (promedio 100-120), ubicadas al extremo de pedúnculos axilares, de color rosado-violáceo (Fig. 2). Las vainas son pequeñas y cortas, con una o dos semillas, que se abren transversalmente.



Figura 2. Flor de *Trifolium pratense*.

2.3.3 Semilla. Estas son pequeñas, ligeramente aplastadas, con una característica proyección que es formada por la radícula que varía en colores amarillo-verdoso al violeta cuando estas son nuevas, y un tono café claro cuando son más longevas (Fig. 3). La longitud varía de 1,5 a 2 mm, con un ancho, en su parte más amplia, entre 1 a 1,5 mm. El porcentaje que se estima de semillas duras varía entre un 3 a 10% del total. El número de semillas por kilogramo fluctúa entre 500 a 600 mil.



Figura 3. Semillas de trébol rosado.

2.3.4 Sistema radicular. Está formado por una raíz vigorosa, pivotante (Fig. 4), que puede alcanzar hasta 1 m de longitud, concentrándose la mayor parte de las raíces en los primeros 10 cm del suelo. Sin embargo, Demanet (2008) señala que las raíces principales se concentran en los primeros 15 cm de profundidad de suelo y en ella se encuentran nódulos con rizobios (*Rhizobium leguminosarum* BV. trifolii (Frank)). Los nódulos que encierran las bacterias de la nitrificación se hallan en su gran proporción sobre estas raicillas, y son de forma ovoide y de color blanco-rojizo (Aguila, 1962). Dentro de las leguminosas esta especie es la que presenta menos nodulación (Torres & Dumont, 1991).



Figura 4. Aspecto de la raíz de *Trifolium pratense*.

2.4 Adaptación y establecimiento de trébol rosado.

Demaret (2008) caracteriza a esta forrajera de hábito de crecimiento erecto, con una raíz pivotante y profunda. Además, posee muchas ramificaciones laterales, que le confiere resistencia a los periodos de déficit hídrico; se adapta a una amplia gama de suelos y climas, siendo óptimos los suelos fértiles, bien drenados pero con buena retención de agua y pH entre 5,8 y 6,7. Sin embargo, prospera relativamente bien en suelos ácidos (pH 5,2 a 5,8) y en situaciones de exceso de humedad invernal. Esta especie se desarrolla bien en climas templados con riego y mediterráneo húmedo.

El mismo autor señala que la época de establecimiento es entre febrero-marzo y septiembre-octubre. Su emergencia es relativamente rápida variando entre 3-4 días con temperaturas de suelo de 10°C. Se puede establecer sola o asociada junto con ballica bianual o

híbridas o también con avena. Según Torres & Dumont (1991), la dosis de semilla varía entre 8-12 k/ha, dependiendo de la otra especie con la que se mezcle. Demanet (2008) menciona algunas dosis de trébol con otras especies asociadas, como por ejemplo para trébol rosado más ballica de rotación se requieren entre 10 y 15 k/ha respectivamente; en el caso de trébol rosado más ballica y avena, las dosis serían de 10, 15 y 80 k/ha respectivamente.

2.5 Cultivares de trébol rosado creados por INIA.

2.5.1 Cultivar Quiñequeli INIA. Este cultivar diploide fue liberado al mercado en 1962 por INIA (Ortega *et al.*, 2003). Demanet (2008), caracteriza a este cultivar como poseedor de floración intermedia de alta heterogeneidad de plantas, de crecimiento erecto, y sus flores son altamente variables en tamaño y coloración. Las marcas en sus hojas igualmente presentan variabilidad (Tabla 2). En cuanto a persistencia, este se ve afectado por distintos factores tales como: 1) baja tolerancia al oídio del trébol (*Erysiphe trifolii* Grev), y 2) al ataque de *H. obscurus*, el cual disminuye considerablemente la población de plantas al tercer año de establecidas.

2.5.2 Cultivar Redqueli INIA. Este cultivar es sintético diploide proveniente de plantas seleccionadas de Quiñequeli INIA a fines de la década de los 90. Se creó por medio de un policruzamiento de siete plantas madres: 3 plantas seleccionadas de Quiñequeli INIA, dos de cultivares introducidos de Estados Unidos (Prosper I y Tristan) y dos de colectas de la Región de La Araucanía (Demanet, 2008). Este segundo cultivar creado por INIA, destacó por presentar mayor producción de forraje, persistencia y mayor producción de semillas, además de presentar moderada resistencia a oídio del trébol (*Erysiphe trifolii* Grev.). En cuanto a sus características morfológicas, estas se describen en Tabla 2. Estas descripciones están realizadas en base a directrices realizadas en 2001 por la Unión Internacional para La Protección De Las Obtenciones Vegetales (UPOV).

2.5.3 Cultivar Superqueli INIA. Es un cultivar sintético, que hasta la fecha no posee semilla comercial. Fue creado con la finalidad de mejorar el rendimiento de forraje y persistencia en relación con Quiñequeli INIA y Redqueli INIA. Este cultivar fue reportado por Ortega & Levío (2011a) quienes mencionan su origen y descripción morfológica, además del comportamiento agronómico en la Región de La Araucanía. Para la obtención de este cultivar se cruzaron 7 plantas madres (genotipos), provenientes de cuatro familias. Según lo reportado por los autores, este cultivar se caracteriza morfológicamente por presentar un marcado foliar mayor (Tabla 2) pero de menor intensidad, semillas más claras y cotiledones de mayor tamaño. En cuanto a sobrevivencia de plantas, rendimientos de forraje y persistencia productiva, es superior a los otros cultivares (Ortega & Levío, 2011b).

Tabla 2. Principales descriptores morfológicos de Superqueli INIA y de cultivares testigos nacionales.

	Redqueli INIA	Quiñequeli INIA	Superqueli INIA
Ploidia	Diploide	Diploide	-
Inicio floración	Mediana	Mediana	Mediana
Largo tallo	Mediano	Mediano	Mediano
Largo hoja	Mediana	Media-larga	Mediana
Ancho hoja	Mediana	Media-larga	Mediana
Forma hoja	Ovalada	Ovalada	Ovalada
Densidad vello en tallos	Mediana	Baja	Mediana
Longitud cotiledón	Media	Media	Larga
Ancho del cotiledón	Media	Media	Ancha
Frecuencia de marcas en hojas	75-85%	85-95%	95-100%
Intensidad marca	Mediana	Mediana	Débil
Color semilla	Multicolor	Multicolor	Multicolor
% semillas amarillas	24-27	32-40	48-51

Fuente: Ortega & Levío (2011a).

2.6 Distribución geográfica de *T. pratense*.

2.6.1 Distribución mundial. El trébol rosado, se adapta a una gran variedad de climas y suelos, lo que permite que su distribución geográfica mundial sea diversa. Se ha extendido a regiones más templadas del mundo, desde el Mediterráneo al norte de Escandinavia, la antigua URSS en Eurasia, a América del Norte desde el sur de Florida y Texas a Canadá y Alaska. También se encuentra en Nueva Zelanda y Australia, además del norte de China y Japón. En el Centro y Sur de América se puede encontrar esta especie en México, Perú, Argentina y Chile (Taylor & Quesenberry, 1996).

2.6.2. Distribución nacional. Torres & Dumont (1991) mencionan que esta forrajera se encuentra desde Santiago hasta Llanquihue, distribución que ha variado con el tiempo. Según lo señalado por el VII Censo Nacional Agropecuario y Forestal (I-CET, 2007), la superficie agrícola con forrajeras permanentes a nivel nacional corresponde a 18.053.104,35 ha, siendo la superficie explotada de 51.695.732,45 ha, la que corresponde a 301.376 explotaciones. Las regiones con mayor superficie agrícola se muestran en Tabla 3. Cabe señalar que en los resultados del VII Censo Nacional Agropecuario y Forestal se define explotación agropecuaria como, todo terreno con actividad agrícola, ganadera y/o forestal explotada por un productor(a), sin consideración de tenencia o tamaño. La explotación puede comprender parte de un predio, así como uno o varios predios colindantes o separados, ubicados en una misma comuna y siempre que en conjunto formen la misma unidad técnica (I-CET, 2007).

Tabla 3. Regiones con mayor superficie agrícola y explotaciones en forrajeras permanentes.

Región	Superficie Agrícola (ha)	%	Número de explotaciones (ha)	%
Región de Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo	4.484.578,97	24,8	4.002	1,3
Región de Los Lagos	2.881.888,46	16,0	35.717	11,9
Región de Magallanes y de la Antártica Chilena	2.479.130,90	13,7	1.392	0,5
Región del Biobío	2.049.942,98	11,4	62.797	20,8
Región de La Araucanía	1.667.658,22	9,2	58.069	19,3

Fuente: I-CET (2007).

La misma fuente señala que la superficie nacional para trébol rosado, se ha dividido en riego y seco, la que comprende 15.657,34 y 17.748,15 ha respectivamente, dando un total nacional de 33.405,49 ha. Las regiones que poseen mayor superficie de trébol rosado se indican en tabla 4.

Tabla 4. Regiones con mayor superficie de trébol rosado en condiciones de riego y seco.

Región	Total (ha)	Riego (ha)	Secano (ha)	% total
Región de La Araucanía	12.786,80	850,90	11.935,90	38,3
Región del Biobío	9.870,70	7.342,95	2.527,75	29,5
Región del Maule	6.411,29	6.371,69	39,60	19,2
Región de Los Ríos	2.354,70	2,50	2.352,20	7,0
Región del Libertador General Bernardo O'Higgins	1.195,60	807,70	387,90	3,6
Resto de Regiones (excluyendo Región de Magallanes y la Antártica Chilena, Región de Arica y Parinacota, Región de Tarapacá y Región de Antofagasta)	786,40	281,60	504,80	2,4

Fuente: I-CET (2007).

2.6.3 Distribución regional. En 2007 la Región de La Araucanía contaba con 1.667.658,22 ha, de superficie agrícola en forrajes permanente (9,2 % nacional). En cuanto a superficie explotable se estimó en 2.899.691,57 ha y 58.069 explotaciones (Tabla 3). En el VI Censo Nacional Agropecuario de 1997 se menciona que el número de explotaciones agrícolas correspondía a 63.036 con una superficie explotable de 2.993.828,30 ha, siendo la superficie agrícola de 1.849.569,50 ha. Al comparar estos datos con el último censo, claramente se muestra que entre el periodo 1997 al 2007, la superficie y explotaciones del trébol rosado han disminuido.

En cuanto a la superficie con trébol rosado como se muestra en Tabla 4, la región posee la mayor superficie a nivel nacional, y ésta se presenta principalmente en condición de seco. En el Censo Agropecuario de 1997, se informa que la Región de La Araucanía es la que cuenta con mayor superficie con trébol rosado con un total de 22.154,20 ha, seguidas por las regiones del Biobío y del Maule. Esto indica que en 10 años hubo una disminución de un 42,3% de superficie

sembrada con esta leguminosa. En cuanto a la comparación entre condiciones de riego y seco, para 1997 se indica que hubo 1.549,40 ha y 20.604,80 ha respectivamente, lo cual comparado con el 2007 (Tabla 4) indica un aumento en la superficie con riego y una disminución en la condición de seco.

A nivel provincial, Cautín lidera la superficie agrícola de forrajeras permanentes con 890.263,71 ha, su número de explotaciones corresponde a 44.077 y su superficie explotable es de 1.609.801,13 ha. En cuanto a la Provincia de Malleco esta posee una superficie agrícola con forrajes permanentes de 777.394,51 ha, su número de explotaciones es de 13.992, con una superficie explotable de 1.289.890,44 ha.

En cuanto a la superficie con trébol rosado, la Provincia de Cautín comprende 10.921,40 ha, (415,50 ha de riego y 10.505,90 ha de seco). En Malleco, la superficie total con trébol rosado corresponde a 1.865,40 ha, la que se divide en riego (435,40 ha) y seco (1.430,00 ha). En Tabla 5 se indica la superficie con trébol rosado por comuna para la Provincia de Cautín (riego y seco). Se puede observar que existen sectores tales como Galvarino, Gorbea, Teodoro Schmidt, Toltén y Cholchol, en los cuales no se registra el uso de riego. Además, en todos los sectores, es mayor la superficie sembrada en condiciones de seco que en riego. Por el contrario, las comunas de la Provincia de Malleco presentan algunos sectores en que la superficie que cuenta con riego es mayor que la de seco. Entre estas se encuentran Angol, Purén y Renaico (Tabla 6).

Tabla 5. Superficie de trébol rosado para las comunas de la Provincia de Cautín.

Comuna	Riego (ha)	Secano (ha)	Total (ha)
Temuco	2,00	94,60	96,60
Carahue	12,30	1.186,70	1.199,00
Cunco	42,10	379,60	421,70
Curarrehue	24,30	226,70	251,00
Freire	78,80	891,00	969,80
Galvarino	-	43,80	43,80
Gorbea	-	973,10	973,10
Lautaro	4,00	877,70	881,70
Loncoche	1,00	180,90	181,90
Melipeuco	91,80	143,60	235,40
Nueva Imperial	20,20	448,10	468,30
Padre las Casas	32,40	810,20	842,60
Perquenco	21,00	68,10	89,10
Pitrufquén	15,00	930,10	945,10
Pucón	3,50	138,70	142,20
Saavedra	2,50	329,30	331,80
Teodoro Schmidt	-	1.603,10	1.603,10
Toltén	-	135,40	135,40
Vilcún	21,60	690,40	712,00
Villarrica	43,00	337,60	380,60
Cholchol	-	17,20	17,20
Total	415,50	10.505,90	10.921,40

Fuente: I-CET (2007).

Tabla 6. Superficie de trébol rosado para las comunas de la Provincia de Malleco.

Comuna	Riego (ha)	Secano (ha)	Total (ha)
Angol	163,50	11,70	175,20
Collipulli	14,00	7,40	21,40
Curacautín	6,80	481,30	488,10
Ercilla	10,10	95,20	105,30
Lonquimay	20,20	6,00	26,20
Los Sauces	41,90	107,00	148,90
Lumaco	3,60	51,20	54,80
Purén	55,20	8,50	63,70
Renaico	67,10	3,70	70,80
Traiguén	43,00	56,00	99,00
Victoria	10,00	602,00	612,00
Total	435,40	1.430,00	1.865,40

Fuente: I-CET (2007).

2.7 Utilización, importación y exportación de trébol rosado.

Demagnet (2011) señala que el uso que se puede dar al trébol rosado es variado. Debido a su concentración en el periodo de primavera-verano que abarca cerca del 70% y a su crecimiento erecto, permiten que su utilización sea destinado principalmente a la conservación de forraje en forma de ensilaje, henilaje y heno. Squella (2002) coincide con el autor anterior, pero además menciona que es utilizado en forma secundaria en pastoreo rotativo solo o asociado a ballica.

La importación de semillas de trébol rosado para el 2012, según lo informado por el servicio de aduanas del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), no alcanza valores significativos y no representan importancia a nivel nacional como otras especies. Caso contrario, corresponde a la exportación de semillas la que ha tomado fuerza en los últimos años, es así como en las especies

forrajeras, el trébol rosado en la temporada 2011, representó un 55,3%, seguido por la alfalfa con un 25,3% y la avena forrajera con un 14,5%, lo que demuestra la importancia comercial que ha adquirido esta leguminosa. Si bien es cierto, no se encuentra entre las especies más relevantes para el mercado nacional, si lo es para la exportación (ODEPA, 2012).

En el I-CET (2007), se indica que el número de explotaciones nacional de semilleros para forraje permanente alcanza los 301.376, con una superficie de explotaciones de 51.695.732,45 ha.

En el caso del trébol rosado para el 2007, según lo señalado en el mismo censo, la Región de La Araucanía es la única a nivel nacional que presenta semilleros para trébol rosado, falaris y trébol ladino. El número de explotaciones con semilleros de forraje a nivel regional es de 58.069 ha, con una superficie de explotaciones de 2.899.691,57 ha, y superficie agrícola de 1.667.658,22 ha. De esta superficie 114,00 ha, son de trébol rosado. A nivel de provincia la superficie con semillero de trébol rosado se encuentra principalmente en Cautín con 112 ha, y Malleco solo posee 2 ha. En Tabla 7 se observa en detalle la superficie con que cuenta los semilleros con trébol rosado para las comunas de la Provincia de Cautín entre las que destacan Cunco y Gorbea. En el caso de la Provincia de Malleco la comuna de Traiguén es la única con registro de superficie de semillero de trébol rosado.

Tabla 7. Superficie de los semilleros en las comunas de la Provincia de Cautín.

Comuna	Superficie (ha)	% Regional
Cunco	46,00	40,4
Gorbea	35,00	30,7
Nueva Imperial	25,00	21,9
Pitrufquén	1,00	0,9
Teodoro Schmidt	5,00	4,4

Fuente: I-CET (2007).

2.8 Principales problemas fitosanitarios que afectan al trébol rosado.

Tanto fitopatógenos como plagas pueden resultar en una disminución en la producción y calidad del forraje. En el caso de los fitopatógenos, Galdames (1991) menciona que la mayoría de los organismos causales de enfermedades corresponden a hongos, los que pueden atacar cualquier órgano de la planta tales como raíces, tallos, hojas, flores y semillas. Entre estos hongos se encuentran *Fusarium* spp. y *Septoria compta* Sacc.

En cuanto a plagas Cisternas & Norambuena (1991), señalan que el trébol rosado es hospedero de más de una docena de especies de insectos fitófagos, entre los cuales se destacan *Dalaca pallens* Blanchard (Lepidoptera: Hepialidae) junto con *Hylastinus obscurus* Marsham. Carrillo y Mundaca (1974), mencionan que este último insecto es una plaga introducida específica, de origen paleártico (Europa) que fue reportado por primera vez en Chile en 1971.

El largo periodo de vuelo de *H. obscurus* y su ubicación en el interior de las raíces representa una limitante a la hora de realizar un control, ya que según lo señalado por Aguilera *et al.* (1996), se han probado diversos insecticidas, formulaciones y épocas de aplicación que no han sido eficaces en el control de este insecto. Como manera preventiva se recomienda el uso del control cultural tal como evitar sembrar en lugares adyacentes a plantaciones antiguas de trébol; también se menciona la rotación de cultivos como un método de control cultural.

En el último tiempo se ha estado investigando métodos alternativos de control de *H. obscurus*, tales como el uso de semioquímicos (señales químicas) que modifican la conducta del insecto. Es así como se ha propuesto el uso de atractantes y repelentes de esta plaga para ser incorporados en estrategias de control integrado (Tapia *et al.*, 2007; Quiroz *et al.*, 2005).

Otra alternativa es la identificación de cultivares o líneas experimentales de trébol rosado resistentes al ataque de *H. obscurus*. Alarcón *et al.*, (2010) sugirieron la existencia de líneas

resistentes y susceptibles de trébol rosado al ataque de *H. obscurus*. Debido a que el insecto se alimenta y vive la mayor parte de su ciclo de vida al interior de las raíces del trébol rosado, el estudio de las características fagoestimulantes o antialimentarias de extractos radicales de trébol rosado es una herramienta rápida y de bajo costo para determinar resistencia y susceptibilidad. Estos extractos pueden ser incorporados en dietas artificiales para su estudio y evaluación.

2.9 Compuestos fagoestimulantes, antialimentarios y dietas artificiales.

Se entiende por fagoestimulante a sustancias que estimulan los receptores gustativos del insecto (Fernández & Cabrera–La Rosa, 1999). Estos compuestos por lo general son nutrientes, y especialmente azúcares (sacarosa y fructosa). También actúan como fagoestimulantes algunos aminoácidos pero en menor grado en relación a los azúcares (Bernays & Chapman, 1994).

La célula vegetal contiene un gran número de diferentes productos químicos, muchos de los cuales tienen la capacidad de estimular los quimiorreceptores de contacto ubicados en el aparato bucal del insecto. Algunos de estos podrían actuar como fagoestimulantes y otros como disuasivos o antialimentarios. Estos últimos tienen como función inhibir o impedir la alimentación del insecto; se estima que muchos compuestos químicos de las plantas se encuentran involucrados en la disuasión, siendo algunos de ellos alcaloides, fenoles o flavonoides los cuales han sido reportados en ordenes tales como Orthoptera, Hemiptera y Lepidoptera (Bernays & Chapman, 1994). Es conveniente y necesario considerar que la respuesta de los insectos depende de los receptores gustativos y que estos reciban la mezcla total de los compuestos químicos (Chapman, 2003) las que pueden ser medida a través de dietas artificiales.

Las dietas artificiales se utilizan para proveer una fuente de alimento fácil de manejar, eliminándose de esta manera el problema de trabajar con la planta huésped o con partes de la misma, dejando de lado los riesgos de contaminación de la dieta Etzel & Legner (1999).

2.10 Dieta Artificial.

Se entiende por dieta artificial a cualquier alimento que no es natural para el insecto. Estas dietas se han utilizado como: 1) técnica de cría para insectos entomófagos utilizados como agentes de control biológico y tecnologías estériles, 2) alimento para otros animales, 3) bioreactor para la elaboración de productos farmacéuticos y otras proteínas recombinantes y, 4) alimento para las personas. Sin embargo, uno de sus usos más importantes es la investigación en todas las áreas de Entomología y otras ciencias biológicas (Cohen, 2003).

Las dietas artificiales son proporcionadas a los insectos para buscar una alternativa a su alimentación natural, por ausencia o por razones de comodidad para su manejo en laboratorio. Mantener colonias de insectos en dietas artificiales presentan ventajas porque su uso posibilita la cría continúa de los insectos aun cuando el alimento natural no se encuentra disponible considerando la estacionalidad de los cultivos; así mismo permite uniformidad nutricional y biológica (Gomez *et al.*, 2009).

Es así como las dietas artificiales facilitan los estudios masivos de insectos, ya sea en el área de crianza del insecto o probar diferentes compuestos químicos o naturales sobre una alta población, en que se requiere tener un alimento homogéneo como ya se mencionó anteriormente. Si bien las dietas artificiales poseen como ventajas la utilización de un mayor número de insectos y la utilización de menor espacio físico, también posee desventajas las que se basan principalmente en que estas dietas exigen altas condiciones higiénicas, para evitar la contaminación, e infraestructura y equipo apto para el desarrollo del estudio (Lagos, 2009).

2.11 Extractos vegetales. Son productos obtenidos por concentración de una disolución de algunas sustancias vegetales, que es utilizada para aprovechar las sustancias activas de una planta. Esto se logra a través de la incorporación del órgano vegetal a estudiar, al que se le agrega

un solvente (frío o caliente) y el producto resultante puede ser una solución concentrada o espesa en función de la sustancia de origen, o espesarse por propio interés en base a la aplicación que se le vaya a dar (Gonzales, 2004).

Tradicionalmente el uso de extractos vegetales se encuentra relacionado al área de plantas medicinales, sin embargo, últimamente el uso de extractos naturales para el control de enfermedades y plagas de importancia agrícola es cada vez más aceptado debido a la necesidad de emplear compuestos eficaces que no provoquen efectos negativos para la salud y el ambiente (Chirinos, 2009).

La revalorización de la planta como fuente de sustancias con propiedades insecticidas data de los últimos 35 años. Estas se encuentran constituidas de diferentes sustancias químicas, algunas provocan diferentes interrelaciones entre organismos, tal como, planta-insecto. Es así como estas sustancias que intervienen en la comunicación química entre organismos se denominan semioquímicos (del griego *semeon*, que significa señal) los cuales son metabolitos secundarios derivados de la planta y pueden tener diferentes actividades biológicas frente al insecto tales como fagoestimulantes o fagodisuasión, regulación del crecimiento, inhibición de la oviposición e insecticida (Mareggiani, 2001).

Para evaluar la actividad biológica que tienen los extractos vegetales sobre insectos, se han utilizados métodos en que estos extractos son aplicados en dietas artificiales, utilizando esto último en plagas, hospederos y control biológico (Do nacimiento *et al.*, 2008).

Para conocer los compuestos presentes en la planta, la fitoquímica se ha encargado de desarrollar una serie de métodos para la detección preliminar de los constituyentes químicos de las plantas, que han sido basados en la extracción de estos, con solventes apropiados de distinta polaridad y en la aplicación de pruebas colorimétricas (Lock de Ugaz, 1994).

2.12 Planteamiento del problema.

T. pratense es una forrajera de gran importancia, ya sea por la exportación de semillas o por la capacidad de producir forraje de calidad. Si bien es una especie perenne, la persistencia de esta leguminosa se ha visto perjudicada por diversos factores, siendo uno de ellos *H. obscurus*, el cual se alimenta de la raíz de esta especie forrajera, ocasionando con esta acción mermas en la producción de forraje y semilla. Este insecto fitófago causa los mayores daños a la planta en su estado larval.

Actualmente los métodos de control utilizados (químico-cultural) no han sido efectivos, debido a que el insecto se encuentra al interior de las raíces durante la mayor parte de su vida. Por otra parte el control cultural solo da recomendaciones preventivas, que se basan en rotación de cultivos, las que no son aplicables para la producción de semilleros de trébol rosado.

Es por ello que se hace necesario idear nuevas estrategias para controlar al barrenador del trébol rosado, que sean parte de un Manejo Integrado de Plagas (MIP). Entre estas tácticas se encuentra el Control Etológico, el cual se basa principalmente en estudiar el comportamiento de un individuo, en este caso *H. obscurus*. El uso de extractos vegetales aplicados en dietas artificiales ha sido una herramienta útil para determinar la actividad biológica de estos extractos sobre los organismos plaga tal como insectos, siendo ésta, una alternativa de menor riesgo y costo económico.

Evaluar la respuesta alimentaria de *H. obscurus* hacia extractos radicales polares y apolares de cultivares y líneas experimentales de *T. pratense*, creados por INIA Carrillanca, permitiría obtener información relevante sobre la conducta y preferencia de este insecto.

Además, los compuestos identificados en los extractos ya mencionados, podrían conducir en el futuro al desarrollo de métodos de control etológicos contra *H. obscurus*.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Obtención de *Hylastinus obscurus*.

Los insectos fueron obtenidos de plantas de trébol rosado que se colectaron desde parcelas experimentales ubicadas en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA Carillanca. Con ayuda de una pala metálica (32 x 18 cm) se realizaron perforaciones en el suelo para extraer cuidadosamente las plantas y evitar el daño de sus raíces. Luego, las plantas fueron almacenadas en bolsas de papel para posteriormente ser trasladadas al Laboratorio de Química Ecológica de la Universidad de La Frontera para su procesamiento. Una vez identificadas las raíces con presencia de insectos, estos se extrajeron con ayuda de pinzas punta roma y se depositaron en discos de Petri (1,5 cm x 6 cm) en cuyo interior se colocó un trozo de papel absorbente humedecido. Los insectos fueron mantenidos durante 24 horas privados de alimentación, previos a los ensayos de consumo.

3.2 Componentes de las dietas artificiales.

Se evaluaron dos dietas artificiales. La primera descrita por Faccoli & Schlyter (2007), para *Ips typographus* L. (Coleoptera: Curculionidae) y la segunda para *Ips pini* Say (Coleoptera: Curculionidae), propuesta por Sallé & Raffa (2007). La primera dieta denominada también como dieta compuesta, posee un 87,6% de agua, 2% de celulosa, 2,6% de glucosa, 4,3% de almidón y 3,5% de agar. Por su parte, la dieta descrita por Sallé & Raffa (2007) o también señalada más adelante como dieta agar, consistió solo de agar (3,5%) y agua (96,5 %).

3.3 Preparación de dietas artificiales.

La elaboración de las dietas para ambos casos fue de manera similar. El proceso comenzó con el pesaje de los componentes de las dietas en una balanza analítica de precisión (marca Radwag, modelo AS 220/C/2). Luego, los ingredientes se vertieron en frascos Shott de 100 mL de capacidad, para preparar 20 mL de dieta, en cuyo interior contenían el volumen de agua destilada correspondiente a cada dieta a evaluar (Tabla 8). Estos frascos se depositaron dentro del autoclave (Marca All American, modelo 25x-2) para su esterilización. Una vez finalizado el proceso se dejó enfriar los frascos con las dietas durante 15-20 min.

Tabla 8. Ingredientes utilizados en dietas artificiales.

Ingredientes	Faccoli & Schlyter (2007)	Sallé & Raffa (2007)
Agua (mL)	17,52	19,3
Agar (g)	0,7	0,7
Celulosa (g)	0,4	-
Glucosa (g)	0,52	-
Almidón (g)	0,86	-

El siguiente paso consistió en el llenado de campanas de vidrio transparentes (6 mm de diámetro x 25 mm de longitud) con las dietas bajo una cámara de flujo laminar (marca Zhicheng, modelo ZHJH1112C). Cada campana fue llenada con 400 μ L de dieta.

3.4 Elección de la dieta artificial.

Para esta actividad se realizaron ensayos de consumo con ejemplares adultos de *H. obscurus*. Para ello, los curculiónidos fueron pesados (peso inicial = P_i) en una microbalanza Sartorius (modelo CP2P). Luego, fueron incorporados individualmente a cada campana con los diferentes tratamientos (dieta compuesta y dieta agar) ($n=30$). Finalmente, cada campana fue sellada con un trozo de teflón y parafilm dejando un pequeño orificio para permitir el intercambio gaseoso. Ambos tratamientos fueron mantenidos a temperatura ambiente y en oscuridad. Como controles se utilizaron campanas solo con dieta ($n=10$) y con insectos ($n=10$). Estos ensayos se evaluaron diariamente, hasta llegar al día 9 de montado el experimento (Fig. 5). Al finalizar este periodo se pesaron nuevamente los insectos (peso final = P_f). Estos pesos fueron utilizados para evaluar el porcentaje de incremento de peso según la metodología reportada por Hernández-Lopez (2002) (Fig. 6).

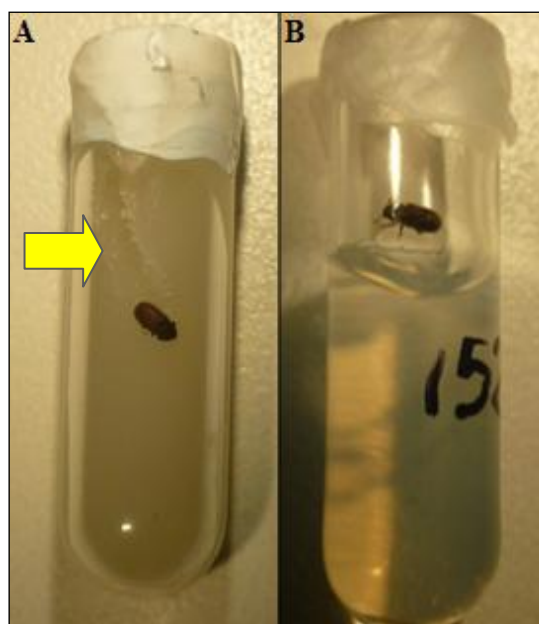


Figura 5. Dieta artificial con insecto. A) Dieta descrita por Faccoli & Schlyter (2007), flecha indica presencia galería en dieta, B) Dieta descrita por Sallé & Raffa (2007).

$$\text{Incremento peso (\%)} = \frac{Pf - Pi}{Pf} \times 100$$

Figura 6. Formula de incremento de peso (%) del insecto.

3.5 Obtención de extractos radicales de *T. pratense*.

3.5.1 Obtención del extracto apolar. Para esta actividad, se colectaron plantas de trébol rosado de los cultivares Quiñequeli INIA, Superqueli INIA y una línea experimental (Syn II Pre III) de 1,5 años de edad a fines de marzo de 2013, desde parcelas experimentales ubicadas en INIA Carillanca (Fig. 7A). Luego, estas plantas fueron trasladadas al Laboratorio de Química Ecológica para su procesamiento. Los extractos radicales se prepararon de acuerdo a la metodología descrita por Tapia *et al.* (2005) y Manosalva *et al.* (2011) con algunas modificaciones. El proceso comenzó con el lavado de las plantas para luego separar la parte radical de la foliar a nivel de corona (Fig. 7B). Posteriormente se pesaron 70 g de raíz de cada cultivar y línea experimental en una balanza digital (marca Belltronic, modelo ES-300HA) (Fig. 7C), las que fueron depositadas en Tubos Falcón (Fig. 7D), y se dejaron durante 24 h en un freezer a -80°C (Fig. 7E). Posteriormente, las muestras congeladas fueron llevadas a un liofilizador (marca Christ, modelo Alpha 1-2), y se mantuvieron durante 48 h (Fig. 7F).

La extracción se realizó agregando 400 mL de diclorometano (CH₂Cl₂, 99% de pureza) a los 70 g de raíces liofilizadas contenidas en un frasco Shott de 500 mL de capacidad (Fig. 7G). Estos frascos fueron cubiertos con papel aluminio y mantenidos durante 24 h a 18°C (Fig. 7H). Para obtener la primera extracción se filtró el contenido del frasco Shott y se depositó en un nuevo frasco de 500 mL (Fig. 7I). Este frasco fue nuevamente cubierto con papel aluminio para evitar que la luz influyera en la composición de la muestra. La segunda extracción consistió en agregar 400 mL de diclorometano al frasco Shott que contenía las raíces de trébol rosado (Fig. 7J) siguiendo la misma metodología utilizada para la primera extracción. Finalizado este proceso,

ambas extracciones se mezclaron y llevaron a sequedad en un evaporador giratorio (Marca Heidolph, modelo VV2000) a 40°C para así obtener un extracto crudo.

Este proceso de sequedad comenzó depositando la muestra (= mezcla de las dos extracciones) en un balón Shott de 1 L de capacidad (marca Duran) el cual se colocó en el evaporador giratorio a 40°C. Cuando el volumen original llegó aproximadamente a 50 mL, este contenido se traspasó a otro balón Shott de 100 mL, previamente pesado, para facilitar el manejo de la muestra (Fig. 7k). Para evitar que quedara muestra del extracto adherida a las paredes del balón se agregó 5 mL de diclorometano, los cuales fueron extraídos con una pipeta de 10 mL y depositadas en el balón de 100 mL. Este balón fue llevado al evaporador giratorio a la misma temperatura (Fig. 7L). Una vez seca la muestra (Fig. 7M), esta se pesó (peso balón + muestra) (Fig. 7N), y se reconstituyó con 4 mL de diclorometano. Este volumen fue depositado en frascos ámbar de 8 mL de capacidad (Fig. 7Ñ), y se almacenó a -10°C (Fig. 7O).

El peso final de la muestra se obtuvo al calcular la diferencia de peso entre ambos balones (balón vacío y balón con muestra). Este procedimiento fue realizado para los dos cultivos y línea experimental de trébol rosado.



Figura 7. Esquema de obtención de extracto apolar de raíces de *T. pratense*. **A)** Parcelas experimentales de trébol rosado (INIA Carillanca), **B)** Lavado y separación de raíces, **C)** Pesaje de raíces, **D)** Raíces pesadas y rotuladas en Tubos Falcón, **E)** Freezer -80°C , **F)** Liofilización de raíces, **G)** Raíces en diclorometano, **H)** Mantenimiento de las muestras en oscuridad, **I)** Filtrado de la muestra, **J)** 1° y 2° extracción, **K)** Pesaje balón 100 mL, **L)** Concentración total (1° y 2°) en balón de 1 L, **M)** Balón de 100 mL con muestra llevada a sequedad, **N)** Peso de la muestra más balón, **Ñ)** Reconstitución de la muestra, **O)** Extracto crudo almacenado en frasco ámbar.

3.5.2 Obtención del extracto polar. Las mismas raíces con las que se extrajo la fase apolar, se utilizaron para extraer la fase polar. Para ello, se agregó 400 mL de etanol (EtOH, 99% de pureza), a las raíces y se dejó reposar por 24 h a 18°C. Se utilizó el mismo procedimiento tanto en filtrado, sequedad y almacenamiento de la muestra que fue usado para la extracción con diclorometano. Este procedimiento fue repetido para los dos cultivares y la línea experimental de trébol rosado.

3.6 Ensayos de consumo.

Para estos bioensayos se utilizó la dieta compuesta y una variación de la metodología propuesta por Faccoli & Schlyter (2007).

La preparación de la dieta fue similar a los descrito en 3.4 con la diferencia que a cada campana con dieta (Fig. 8A) se agregó 10 µL del extracto apolar o polar (Fig. 8B). Este extracto fue homogeneizado en la dieta con la ayuda de una pipeta Pasteur (Fig. 8C). Luego, estas campanas se dejaron sin sellar en posición vertical durante 1 h a 21°C para permitir la evaporación de los solventes (Fig. 8D). Pasado este periodo, se colocó un adulto de *H. obscurus* previamente pesado (Pi) (Fig. 8E) en cada campana las que fueron selladas con teflón y parafilm dejando un pequeño orificio para permitir el intercambio gaseoso (Fig. 8F).

Se utilizaron tres concentraciones para ambos extractos de cada cultivar y línea experimental, los que correspondieron a 1000, 100 y 10 ppm. Se realizaron 20 repeticiones por cada tratamiento. Como controles se utilizaron: 1) campanas con dieta + diclorometano + *H. obscurus* (n=10), 2) campanas con dieta + etanol + *H. obscurus* (n=10) y, 3) campanas con dieta + *H. obscurus* (n=10).

La evaluación de todos los ensayos fue realizado a los 5 días para lo cual cada insecto fue extraído de su campana con ayuda de una pinza metálica y fue pesado nuevamente (Pf).

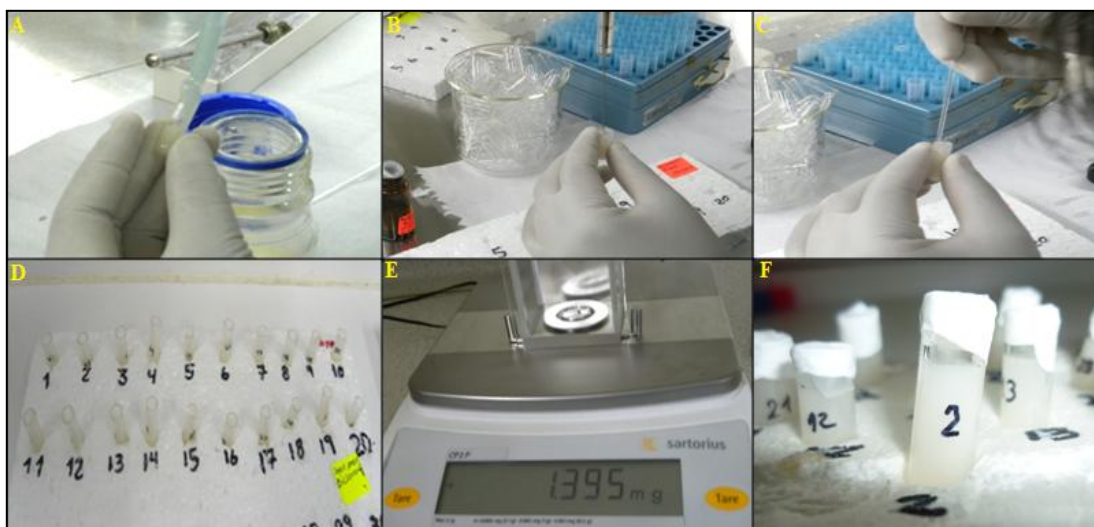


Figura 8. Proceso elaboración ensayos de consumo, **A)** Llenado de campanas con dieta artificial, **B)** Incorporación 10 μ L de extracto correspondiente, **C)** Homogeneización de mezcla más extracto, **D)** Bloque correspondiente a Syn II Pre III, diclorometano, 100 ppm **E)** Balanza de precisión utilizada para obtener Pi y Pf de los insectos, **F)** Ensayo montado para evaluar a los 5 días.

3.7 Sexaje de *H. obscurus*. Una vez finalizado los ensayos de consumo, cada insecto fue almacenado y conservado en Tubos Eppendorf de 1 mL en cuyo interior contenía 0,5 mL de solución Kahle. El sexaje fue realizado de acuerdo a la metodología propuesta por Carrillo *et al.* (1978), la cual consistió en ubicar un insecto bajo una lupa binocular (Olympus, SD30), y con ayuda de puntas metálicas se removió el exoesqueleto mediante un corte transversal para el reconocimiento de los órganos reproductivos femeninos y masculinos.

3.8 Caracterización química de los extractos polares y apolares.

3.8.1 Caracterización química de extractos polares. Para determinar las familias de compuestos orgánicos presentes en los extractos polares, se utilizaron las técnicas de Cromatografía en Capa Fina (CCF), Cromatografía en Columna (CC) y Pruebas Colorimétricas.

3.8.1.1 Determinación de los solventes para CC. El objetivo de esta etapa, fue separar el extracto de acuerdo a su polaridad. Para ello, primero se realizó una prueba de CCF, la que consistió en “sembrar” o depositar el extracto etanólico crudo de los dos cultivares y línea experimental, sobre una lámina de gel de sílice (60 F₂₅₄, Merck) con distintos solventes y en distintas proporciones. Para el caso de la línea experimental Syn II Pre III se utilizó hexano (Merck, 99% pureza); para Quiñequeli INIA se usó hexano-acetato de etilo (Merck, 99,5% pureza) (75:25) al igual que para el cultivar Superqueli INIA pero en diferente proporción (50:50).

Los solventes que tuvieron mayor poder eluyente sobre la muestra, fueron los utilizados en Quiñequeli INIA y Superqueli INIA. Estas mezclas de solventes, en conjunto con la serie eluotrópica universal de solvente, fueron utilizados en CC.

3.8.1.2 Cromatografía en Columna. En esta etapa se utilizó la muestra de extracto etanólico crudo del cultivar Superqueli INIA, debido a que se ha reportado que posee una mayor sobrevivencia de plantas y persistencia productiva en comparación a otros cultivares de INIA (Ortega y Levío, 2011b).

De acuerdo al solvente determinado anteriormente, la serie eluotrópica para ser usada en la elución de compuestos en CC fue formada por los siguientes solventes (para análisis); hexano, acetato de etilo, acetona y metanol, en diferentes proporciones (Tabla 9).

La cantidad de mezcla o solvente utilizado correspondió a 100 mL de acuerdo a la proporción designada, es así como para la mezcla hexano-acetato de etilo 50:50, se utilizó 50 mL de hexano y 50 mL de acetato de etilo. Lo mismo ocurrió para las otras mezclas o solventes de acuerdo a la proporción señalada.

Tabla 9. Solventes utilizados con la proporción correspondiente para CC.


Solvente	Proporción
Hexano-acetato de etilo	50:50
Hexano-acetato de etilo	25:75
Acetato de etilo	100
Acetato de etilo-acetona	75:25
Acetato de etilo-acetona	50:50
Acetato de etilo-acetona	25:75
Acetona	100
Acetona-metanol	75:25
Acetona-metanol	50:50
Acetona-metanol	25:75
Metanol	100

Como primera etapa para la CC, se debió preparar una columna cromatográfica. Para ello, se comenzó con una reducción del volumen original de la muestra desde 4 a 2 mL aproximadamente mediante concentración con corriente de nitrógeno (20 mL /min durante 30 min). Luego, se adicionó 2 mL de hexano a la muestra y se homogenizó en un vortex (Scilogex, modelo MX-S) (Fig. 9A), para posteriormente ser depositada en un vaso precipitado de 50 mL cuyo interior contenía 20 g de gel de sílice 60 (70-230 Mesch 0,063-0,200 mm) (Fig. 9B). El vaso precipitado se colocó sobre un agitador magnético digital (Scilogex, modelo MS-H-PRO) a 45°C con el objetivo de secar la muestra (Fig. 9C). Sin embargo, la muestra no quedó completamente seca, por lo que se agregó 2 mL de acetona y se repitió el proceso de secado dejando la muestra en condiciones de ser agregada a la columna.



Figura 9. Proceso secado muestra para columna. **A)** homogenización muestra más solvente volátil, **B)** silica gel 60 (70-230 Mesh 0,063-0,200 mm) en vaso precipitado **C)** Muestra sobre agitador magnético digital con calefacción a 45°C.

La columna de vidrio (2,5 mm de diámetro y 31,5 cm de longitud) con llave de paso de teflón, se armó de la siguiente manera: se fijó a un soporte metálico con una pinza y nuez, dejando esta columna a una altura que permitiera colocar un vaso precipitado para recoger solvente y luego colocar un matraz, que en su interior contenía un tubo de ensayo para recoger fracciones. Posterior a ello, se colocó en el interior de la columna, lana de vidrio en los primeros 5 cm desde la base. Luego se agregó 5mL de hexano para compactar la lana de vidrio. Posteriormente se agregó 60 g de gel de sílice y nuevamente 10 mL de hexano, a la vez que se abrió la llave de teflón para que cayera solvente sobre el vaso precipitado. Posterior a esto, se realizó un corte circular a un papel filtro n° 1 (Whatman) y se depositó al interior de la columna. Cuando el solvente se eliminó totalmente se cerró la llave y se aplicó la muestra de la forma más homogénea posible, proporcionando pequeños golpes a la columna para que esta se compactara.

Finalmente, se comenzó a agregar, a través de un embudo, la primera mezcla de solvente que correspondió a hexano-acetato de etilo (50:50) (Tabla 9) 100 mL, hasta la capacidad límite de la columna abriendo de inmediato la llave de teflón y llenando los tubos de ensayo hasta 10 mL con el eluato (Fig. 10A).

Al terminar de agregar los 100 mL de la primera mezcla, se esperó hasta que el volumen de la última mezcla, llegase a 2 mm por sobre la muestra, para agregar la segunda mezcla de solvente el cual correspondió a hexano-acetato de etilo (25:75), extrayendo nuevas fracciones (Tabla 10), con ayuda de un embudo se completó hasta la capacidad límite de la columna y se prosiguió con la misma metodología (Fig 10B y C). En los casos en que el o los tubos de ensayos no se hayan completado (10 mL) y se debía cambiar de solvente, se mantuvo el tubo de ensayo hasta completar este volumen, independiente de que las mezclas de distintas proporciones se hayan juntado.

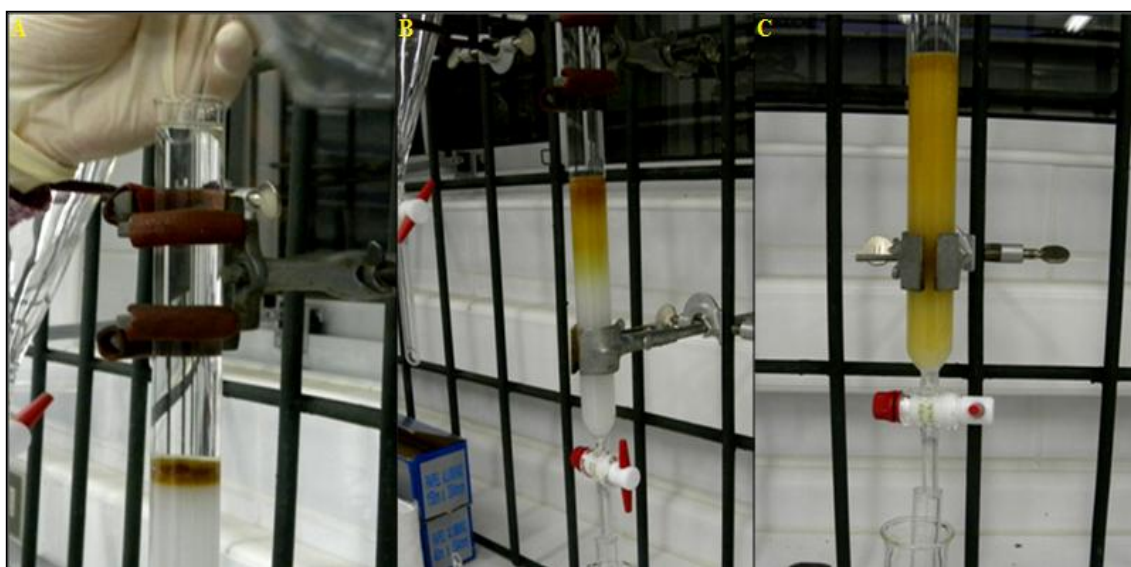


Figura 10. Extracto de trébol rosado fraccionado eluidos en diferentes solventes. **A)** Muestra aplicándole primera mezcla de solventes, **B)** Muestra descendiendo por la columna provocado por la polaridad de solventes, **C)** Columna finalizada.

Los tubos de ensayos fraccionados fueron rotulados, colocados en gradillas a temperatura ambiente y se almacenaron en oscuridad con el objetivo de que la luz no afectara a los compuestos químicos presentes en dichas fracciones.

Tabla 10. Fracciones extraídas de CC con su solvente y proporción correspondiente.

Solvente	Proporción	Nº tubo de ensayo
Hexano-acetato de etilo	50:50	1-9
Hexano-acetato de etilo	25:75	9-19
Acetato de etilo	100	20-28
Acetato de etilo-acetona	75:25	29-36
Acetato de etilo-acetona	50:50	37-47
Acetato de etilo-acetona	25:75	47-56
Acetona	100	57-65
Acetona-metanol	75:25	66-75
Acetona-metanol	50:50	75-93*
Acetona-metanol	25:75	93-101
Metanol	100	102-110

*Se realizó doble extracción con la misma mezcla solvente, lo que no repercute en el ensayo debido a que se extraería los mismos compuestos de la misma polaridad.

3.8.1.3 Cromatografía Capa Fina. Obtenidas las fracciones se procedió a agruparlas, a través de CCF. Para ello se utilizaron láminas de gel de sílice (60 F₂₅₄, Merck) (10x10 cm). A 1,5 cm de la base de la lámina se trazó una línea horizontal con lápiz grafito, sobre la cual se sembraron las muestras. Las muestras fueron escogidas por intervalos de 3 tubos de ensayos; es así como se sembró el tubo de ensayo o fracción N°1, N°3, N°6, y así sucesivamente. Las muestras se sembraron con capilares de vidrios en los puntos marcados, asegurándose que esta quedara bien concentrada.

Una vez sembradas las muestras, se utilizaron dos cubetas de vidrio (largo: 7,8 cm; alto: 15 cm, ancho: 5 cm) a las cuales se les agregó con ayuda de una pipeta Pasteur, solvente hasta llegar a la altura indicada en la cubeta (1,5 cm de la base). En cada cubeta de vidrio se depositó el respectivo solvente o mezcla de ellos correspondiente a la elución realizada en la columna cromatográfica respectiva. Es así como en una cubeta se depositó la placa de sílice gel, sembrada con las fracciones 1, 3, 6 y 9, y el solvente para este caso se colocó en los recipientes de vidrio, hexano-acetato de etilo (75:25) que es de menor polaridad. Una vez colocada la placa sembrada,

en las cubetas o frascos de vidrio con el solvente designado se procedió a tapar con placas de vidrio para evitar que los solventes se volatilicen (Fig. 11A). Este procedimiento se realizó para las fracciones escogidas con su solvente o mezcla de ellos correspondiente (Tabla 11).

Tabla 11. Fracciones utilizadas en CCF, con su solvente de extracción en CC y solvente de dilución en CCF.

Solvente de dilución en CC	Proporción	Fracciones utilizadas	Solvente dilución CCF	Proporción
Hexano-acetato de etilo	50:50	1-3-6-9	Hexano-acetato de etilo	75:25
Hexano-acetato de etilo	25:75	12-15-18-	Hexano-acetato de etilo	50:50
Acetato de etilo	100	21-24-27	Hexano-acetato de etilo	25:75
Acetato de etilo-acetona	75:25	30-33-36	Acetato de etilo	100
Acetato de etilo-acetona	50:50	39-42-45	Acetato de etilo-acetona	75:25
Acetato de etilo-acetona	25:75	48-51-54	Acetato de etilo-acetona	50:50
Acetona	100	57-60-63	Acetato de etilo-acetona	25:75
Acetona-metanol	75:25	66-69-72-75	Acetona	100
Acetona-metanol	50:50	78-81-84-87-90-93	Acetona-metanol	75:25
Acetona-metanol	25:75	96-99	Acetona-metanol	50:50
Metanol	100	102-105-108	Acetona-metanol	25:75

Al sellar las cubetas de vidrio que contenían las placas cromatografías con el solvente, se procuró que el eluyente alcanzara sólo hasta 2 cm del tope de la placa, para ello se trazó una línea horizontal con lápiz grafito. Esto se realizó para posteriormente calcular el factor de retención (RF), mediante la división de la distancia recorrida por el compuesto y la distancia recorrida por el eluyente (cm).

Luego de marcar las zonas para calcular el RF, se observaron las placas en una cámara UV (Fig. 11B), la que consiste en una caja en que una de las caras posee una cortina de plástico

color negra (para evitar la entrada de luz) y en cuya tapa se coloca una lámpara UV (marca Heraus, modelo 5301). La función de esta lámpara es la detección de compuestos que absorben energía lumínica a 254 y 310 nm. De esta forma es posible detectar manchas (“spot” en inglés) correspondientes a compuestos puros o mezclas de compuestos. El objetivo de sembrar la mayor cantidad de fracciones es llevar a cabo su posterior agrupación por medio de los valores de RF obtenidos bajo las mismas condiciones de elución. En algunos casos fue necesario sembrar fracciones que no habían sido analizadas, con el objetivo de incluirla en algún grupo de fracciones con valores de RF similares.

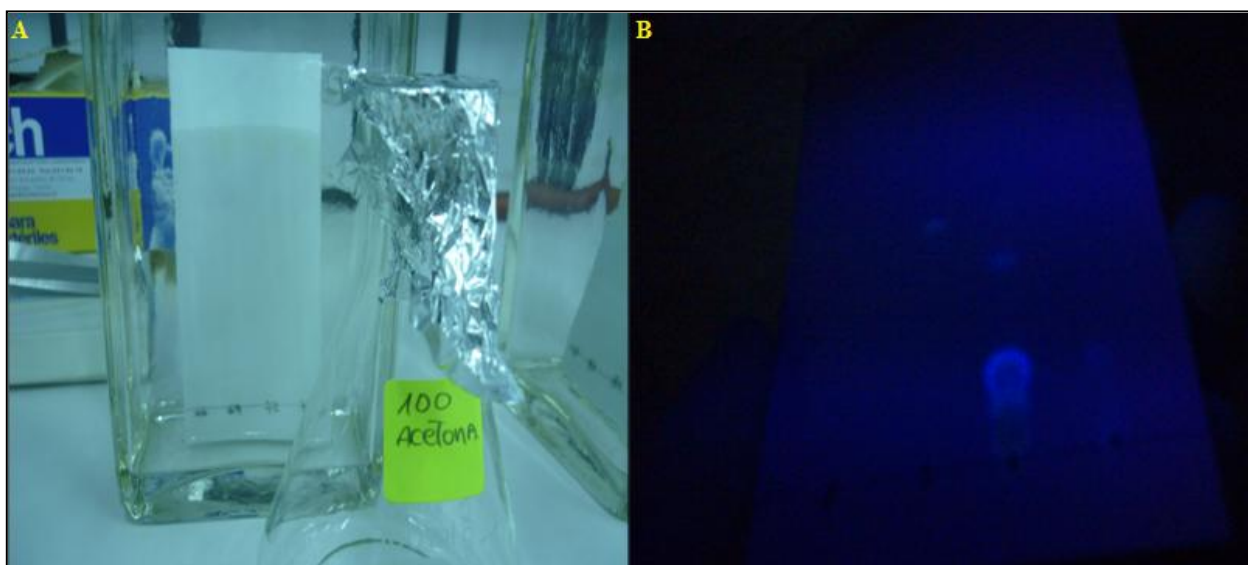


Figura 11. Aspecto de CCF y muestras en UV, **A)** Placa cromatográfica en cubeta de vidrio con solvente, **B)** Vista placa CCF bajo luz UV.

3.8.1.4 Pruebas Colorimétricas. Se sembraron las fracciones obtenidas en 3.8.1.2 de la misma forma ya mencionada, en placas de gel de sílice, utilizando cuatro cubetas de mayor tamaño (8,5 cm ancho, 27 cm alto, 29 cm largo) con solvente de menor polaridad siguiendo la metodología presentada en Tabla 10. Cada fracción total obtenida se sembró 11 veces en la placa de gel de sílice a una distancia de 2 cm cada una.

Todas las placas de la fracción 1 fueron depositadas en la cubeta con el solvente correspondiente (Fig. 12A) de acuerdo a Tabla 10. Cada fracción fue recortada verticalmente a lo largo de la placa; este corte se realizó en el punto medio de separación entre cada fracción sembrada para poder aplicar los diferentes reveladores químicos.

Los reactivos utilizados fueron acetato de plomo básico, ácido fosfórico, ácido nítrico, cloruro de aluminio, cloruro de hierro, Folin-Ciocalteu, hidróxido de potasio, ninhidrina, permanganato de potasio, timol y Dragendorff (Fig. 12B). La metodología para revelar se llevó a cabo siguiendo el manual de reactivos de Merck (1972) con algunas modificaciones de Lock de Ugaz (1994) (Anexo 1).

Además, se realizó un control de azúcares, alcaloides y flavonoides. Estos son conocidos por ser grupos bastante comunes dentro de los metabolitos secundarios. Con ello se comparó las fracciones con los controles para distinguir la intensidad y similitud de los colores (Anexo 1).

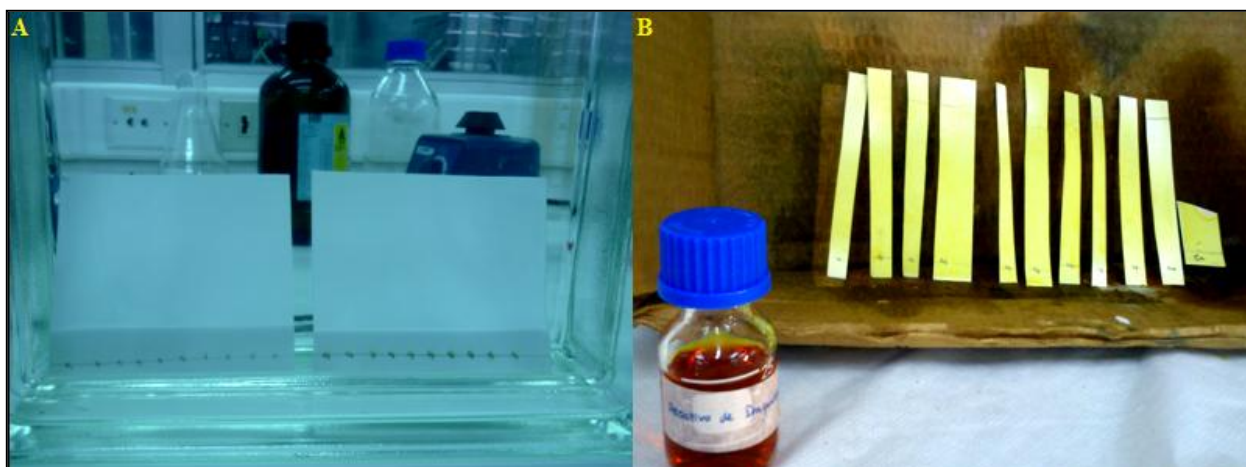


Figura 12. Proceso revelado fracciones; **A)** Grupo de una fracción eluidas en solvente, utilizando cubetas grandes, **B)** Revelado con reactivo de Dragendorff, en todas las fracciones y control.

3.8.2 Caracterización química presente en extractos apolares. Los extractos de diclorometano de los cultivares Quiñequeli INIA, Superqueli INIA y Syn II Pre III utilizados en 3.5.1 fueron inyectados en un cromatógrafo de gases (Focus GC; Thermo Electron Corporation) acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS) (DSQ; Thermo Electron Corporation). Las separaciones fueron realizadas utilizando una columna capilar BP-1 (30 mm x 0.22 mm x 0,25 μ m). El Helio fue utilizado como gas de arrastre (1,5 mL/minuto). La temperatura inicial del horno fue programada a 40° C, la cual aumentó en un gradiente de 5° C/min hasta llegar a los 250° C, permaneciendo a esta temperatura por 5 min. Las temperaturas del inyector y de la interface fueron de 250° C, la temperatura del detector fue fijada a 200° C y la energía del haz de electrones en 70 eV. Se inyectaron alícuotas de 1 μ L de soluciones de diclorometano de los extractos a una concentración entre 45.000 y 77.000 ppm. La identificación de los principales componentes de cada uno de los extractos se llevó a cabo mediante la búsqueda en una biblioteca de espectros de masas usando un algoritmo de comparación con una técnica de búsqueda reversa que verifica que los picos principales de los compuestos de referencia estén presentes en el espectro de masas problema.

3.9 Análisis estadístico y diseño experimental.

Para determinar la dieta artificial idónea para *H. obscurus*, se utilizó la prueba regresión lineal simple. En cuanto a la respuesta alimentaria de *H. obscurus*, hacia los extractos radicales polares y apolares de los cultivares y línea experimental de *T. pratense*, se utilizó el análisis estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Conover-Inman, con un nivel de significancia de $P \geq 0,05$. Por otra parte, para establecer diferencias entre ambos sexos del insecto, se utilizó el análisis no paramétrico de *U* de Mann-Whitney. En cuanto al diseño experimental este correspondió a bloques completamente al azar.

Para determinar los grupos químicos del extracto radical etanólico se realizó un análisis cualitativo, cuyo criterio fue la observación de la intensidad del spot (mancha), y la cantidad de estas distribuida en las placas reveladas. De acuerdo a lo mencionado anteriormente se determinó una escala de abundancia de compuestos: a) (+++) significa spot muy intensa; b) (++) spot medianamente intensa; c) (+) escasa presencia del spot; (-) Nula presencia del spot. Los spot observados en cada placa fueron señalizados con las letras a, b, c, d, etc.

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Respuesta de *Hylastinus obscurus* hacia dos tipos de dietas artificiales.

El análisis de las dietas artificiales fue realizado a través de la prueba de regresión lineal simple (Figs. 13 y 14). La dieta descrita por Faccoli & Schlyter (2007) arrojó un valor $r = 0,335896$ (Fig. 13). A pesar del bajo valor de r , la gráfica indica que los insectos mantienen estable su peso. Por el contrario, la dieta descrita por Sallé & Raffa (2007) obtuvo un valor $r = -0,976341$ (Fig. 14) donde se observó una disminución significativa del peso del insecto desde el inicio del bioensayo. Si bien, el valor de la dieta compuesta está alejado de ser positivo perfecto (Fernández & Díaz, 1997), la finalidad del bioensayo fue seleccionar una dieta idónea a través de la cual se pueda evaluar el efecto fagoestimulante y/o antialimentario de extractos radicales de trébol rosado aplicados en ella

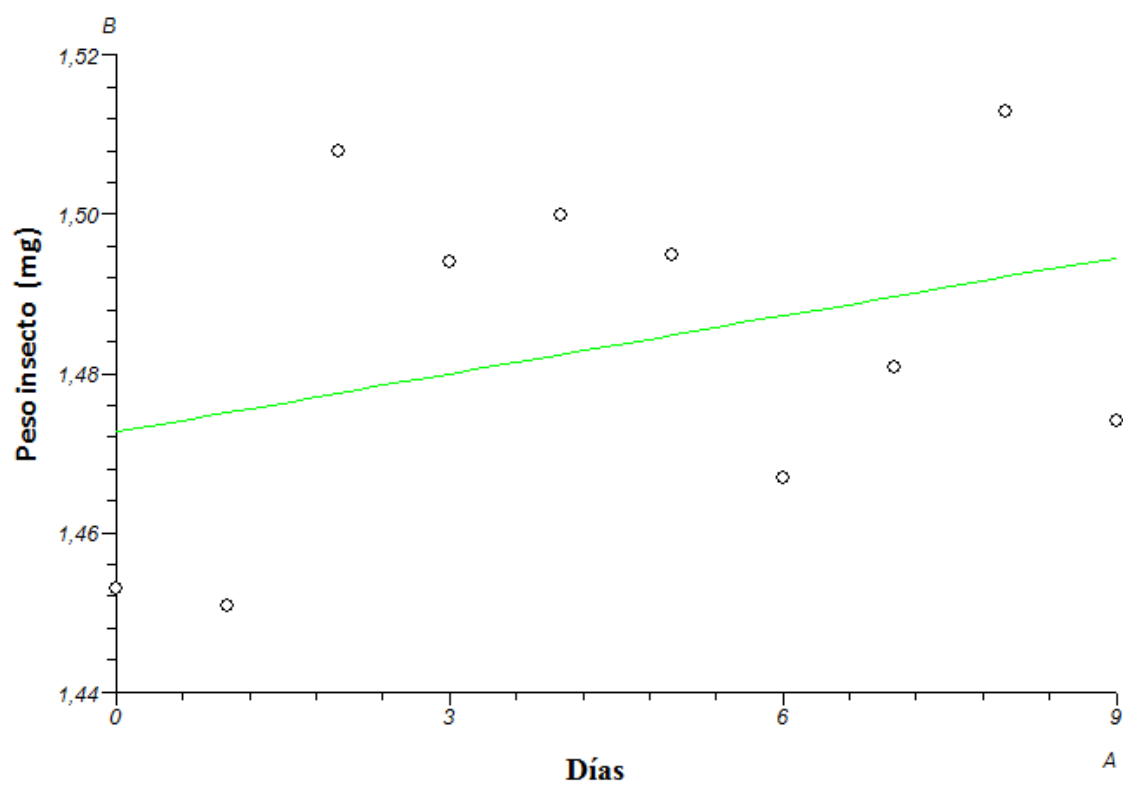


Figura 13. Análisis de regresión para la dieta compuesta propuesta por Faccoli & Schlyter (2007). Valor $r = 0,335896$ ($n=10$).

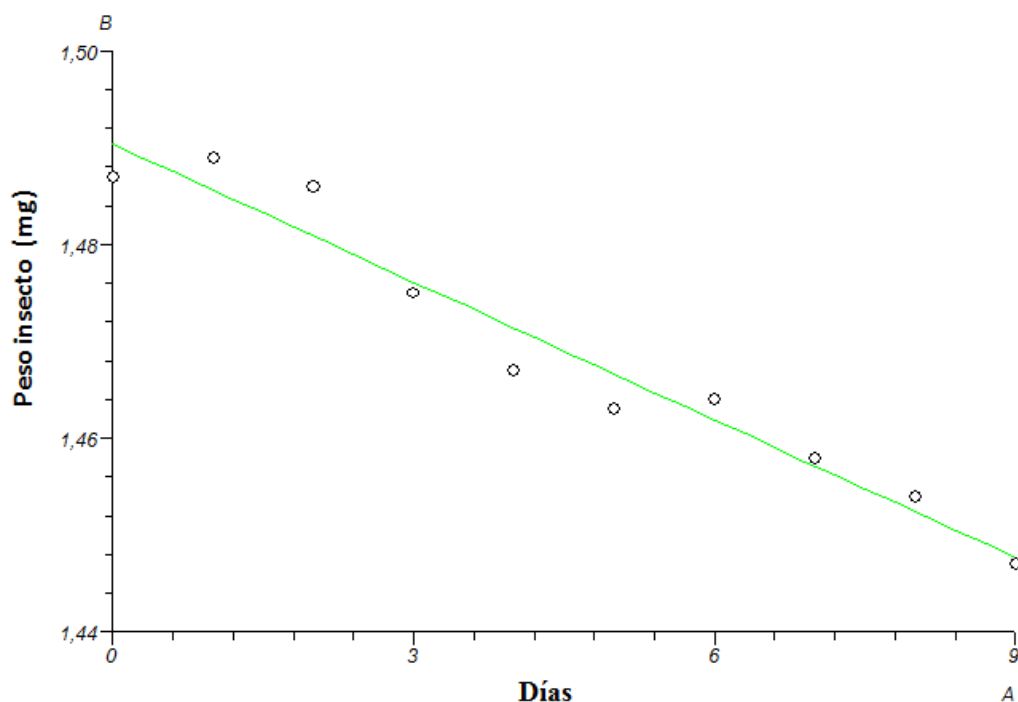


Figura 14. Análisis de regresión para la dieta propuesta por Sallé & Raffa (2007). Valor $r = -0,976341$ ($n=10$).

Los resultados obtenidos se encuentran directamente relacionados con los componentes de cada dieta. De acuerdo a Villacorta (1971) y Toledo (1999), los carbohidratos (CHO) (almidón y glucosa) proporcionan la energía necesaria para el adecuado crecimiento y desarrollo metabólico del insecto. Cohen (2003), señala que los insectos fitófagos no se desarrollan bien en dietas que sean bajas en CHO (menor a un 50%) variando de acuerdo a cada herbívoro. La importancia de los CHO en la dieta radica más allá del desarrollo y crecimiento debido a que estos son componentes de glucoproteínas que poseen diversas funciones dentro del insecto tales como, 1) reconocimiento de proteínas que sirven como canales y receptores de movimiento intra e inter celular y 2) proporcionar la estabilidad estructural tal como ocurre con la quitina (Cohen, 2003).

Si bien la celulosa también es un CHO, no puede ser metabolizado por los insectos. Sin embargo, es utilizado para proporcionar textura a las dietas artificiales. Caso similar ocurre con el

agar, el cual no posee funciones nutritivas, pero es de gran importancia para insectos masticadores, ya que es una sustancia que retiene agua y permite que la formación de galerías por parte de los insectos sea realizada con mayor éxito dentro de las dietas artificiales (Villacorta, 1971).

Debido a lo anterior, la dieta que produjo una respuesta alimenticia por parte de *H. obscurus* correspondió a la compuesta. Byers (1974) probó diferentes dietas para la mantención de *H. obscurus*, las cuales correspondieron a: 1) dieta Vanderzant (lecitina de soya, inositol y ác. ascórbico, entre otros), 2) dieta compuesta maíz-soya-leche (MSL) y 3) dieta control a base de alphacel (celulosa pura). Estas dietas contenían los mismos aditivos pero en diferentes proporciones de CHO, celulosa, vitaminas y conservantes. Este autor determinó que ambas dietas proporcionan una respuestas significativa sobre *H. obscurus* comparado con el control. Cabe destacar que estas dietas no presentaron diferencias significativas entre sí, lo que concluye que las dietas enriquecidas nutricionalmente poseen mayores efectos para la mantención de insectos comparadas con dietas basadas solo en agar, llegando incluso a mantener insectos vivos por sobre 200 días, contra 70 días promedio de la dieta control.

4.2 Respuesta alimentaria de *H. obscurus* hacia extractos radicales polares y apolares de cultivares y línea experimental de *T. pratense*, suministradas en dieta artificial.

Los resultados de la respuesta alimentaria de *H. obscurus*, muestran que al comparar de forma separada los extractos polares y apolares con los respectivos controles, se observó que los extractos radicales apolares (Fig. 15) presentaron diferencias significativas en las distintas concentraciones evaluadas. La concentración de 10 ppm (Fig. 15A) muestra que a excepción del control solo dieta, existe una disminución del peso del insecto, destacándose el cultivar Superqueli INIA que presenta diferencias significativas por sobre los demás tratamientos. En la concentración de 100 ppm (Fig. 15B) la línea experimental Syn II Pre III y los controles CH₂CL₂ y dieta sola, fueron los únicos que incrementaron el peso del insecto por sobre los demás

tratamientos. En cuanto a la concentración de 1000 ppm (Fig. 15C) se observó una disminución del peso de los insectos con los dos cultivares y línea experimental, a diferencia de sucedido con los controles que incrementaron el peso de *H. obscurus*.

En cuanto a los extractos polares (Fig. 16), estos también presentaron diferencias significativas, pero solo en concentraciones de 10 y 100 ppm (Fig. 16A, B). Se destaca, para ambos casos, una disminución en el peso del insecto en todos los tratamientos, a excepción del control dieta. Contrariamente, a pesar de no obtener diferencias estadísticamente significativas, las concentraciones de 1000 ppm, presenta una tendencia positiva en cuanto al incremento de peso del insecto en todos los tratamientos evaluados.

Chapman (2003) menciona que los receptores gustativos de los insectos se encuentran relacionados con la respuesta alimentaria de estos, categorizándolos como alimentos fagoestimulantes o disuasivos. Las estructuras encargadas de reconocer estos compuestos presentes en los alimentos se denominan sensillas, y se ubican en el aparato bucal y antenas de los individuos. Cuando un insecto se alimenta, la sensillas de las piezas bucales se impregnan en el líquido que sale del alimento alcanzando a las dendritas y obteniendo respuesta por parte de las neuronas, quienes clasificaran al alimento como estimulante o disuasivo de la alimentación. Estas respuestas dependen de la proporción en que se encuentren presentes estos compuestos químicos. Es así como en todos los ensayos con extractos radicales a distintas concentraciones hubo respuesta por parte de *H. obscurus*, lo que concuerda en parte con lo reportado por Novo *et al.* (1998) quienes evaluaron el efecto antialimentario de extractos de cuatro plantas sobre *Anticarsia gemmatilis* Hub. (Lepidoptera: Noctuidae), utilizando extractos de etanol, cloroformo y hexano. Cabe destacar que las familias de las plantas utilizadas por estos autores no correspondieron a la familia Fabaceae, sin embargo, la respuesta alimentaria de este nóctuido al extracto etanólico a mayor concentración (5% p/v) fue antialimentaria. Lo anterior no concuerda con los resultados obtenidos ya que con el extracto etanólico a mayor concentración (1000 ppm), que si bien no presento diferencias significativas tiene una tendencia a provocar una respuesta fagoestimulantes

tanto en los cultivares como línea experimental. Sin embargo, a menores concentraciones (10 y 100 ppm) se observó la respuesta antialimentaria descrita por el autor.

En cuanto a los cultivares y línea experimental, no existen reportes de respuestas alimentarias del insecto a estos, sin embargo, esta respuesta se encuentra estrechamente relacionado con la persistencia de las plantas de trébol rosado que pueden verse afectadas en parte por el ataque de *H. obscurus*. Es así como Ortega & Levío (2011b) reportaron a Superqueli INIA, como un cultivar creado para mejorar la persistencia en relación a otros cultivares provenientes de INIA. Las figuras 15 y 16, no concuerdan con lo anteriormente expuesto ya que Superqueli INIA tendió a una respuesta antialimentaria por parte del insecto estadísticamente igual que Quiñequeli INIA. Sin embargo, el extracto radical apolar de la línea experimental Syn II Pre III, en concentraciones de 100 ppm, presentó una respuesta fagoestimulante superior a los cultivares, lo cual indicaría que esta línea podría ser susceptible al ataque del insecto.

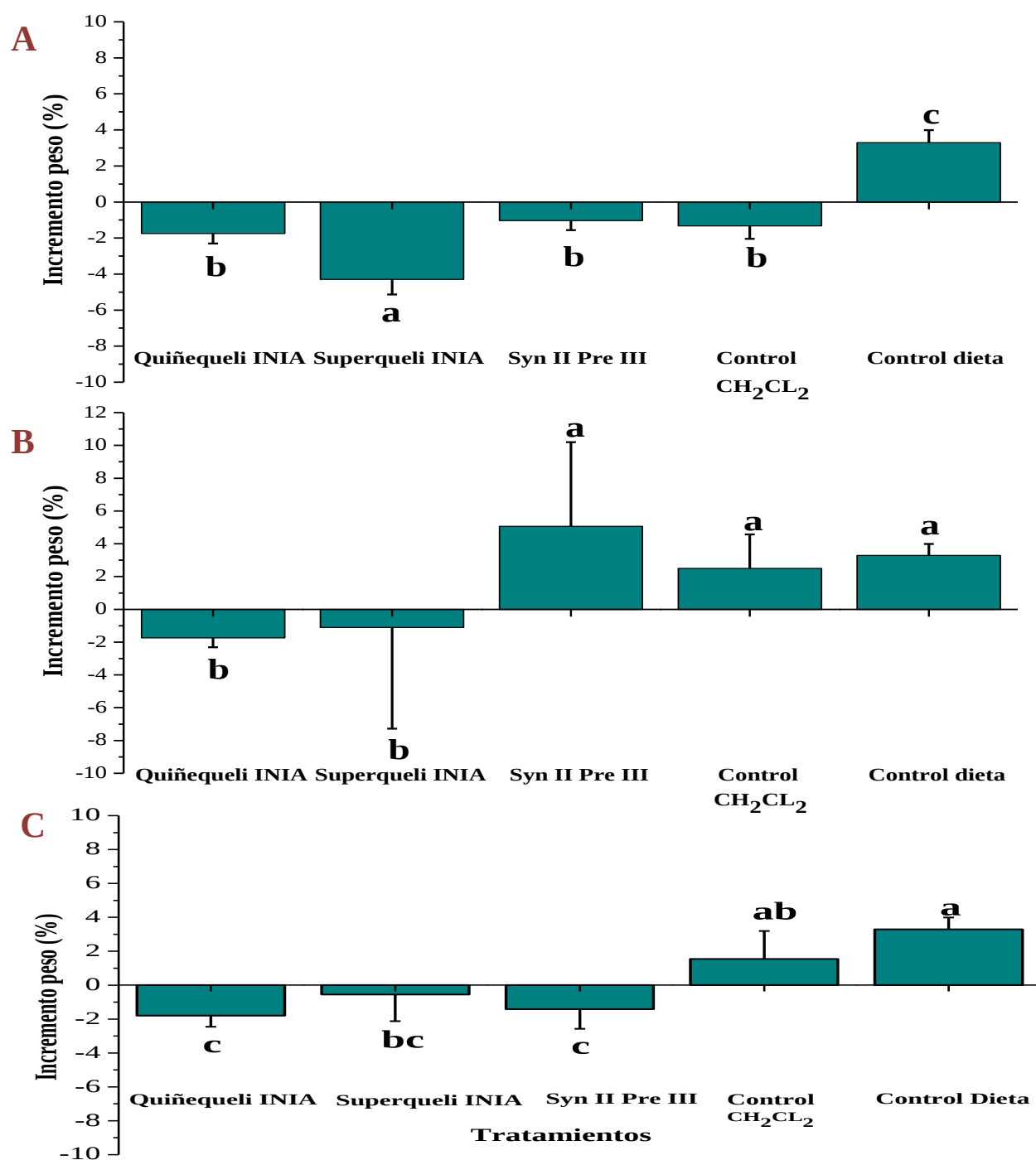


Figura 15. Incremento de peso (%) de *H. obscurus* al evaluar extractos radicales apolares de los cultivares (Quiñequeli INIA y Superqueli INIA) y línea experimental (Syn II Pre III) a distintas concentraciones. **A)** 10 ppm, **B)** 100 ppm, **C)** 1000 ppm. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Conover-Inman ($P \geq 0,05$).

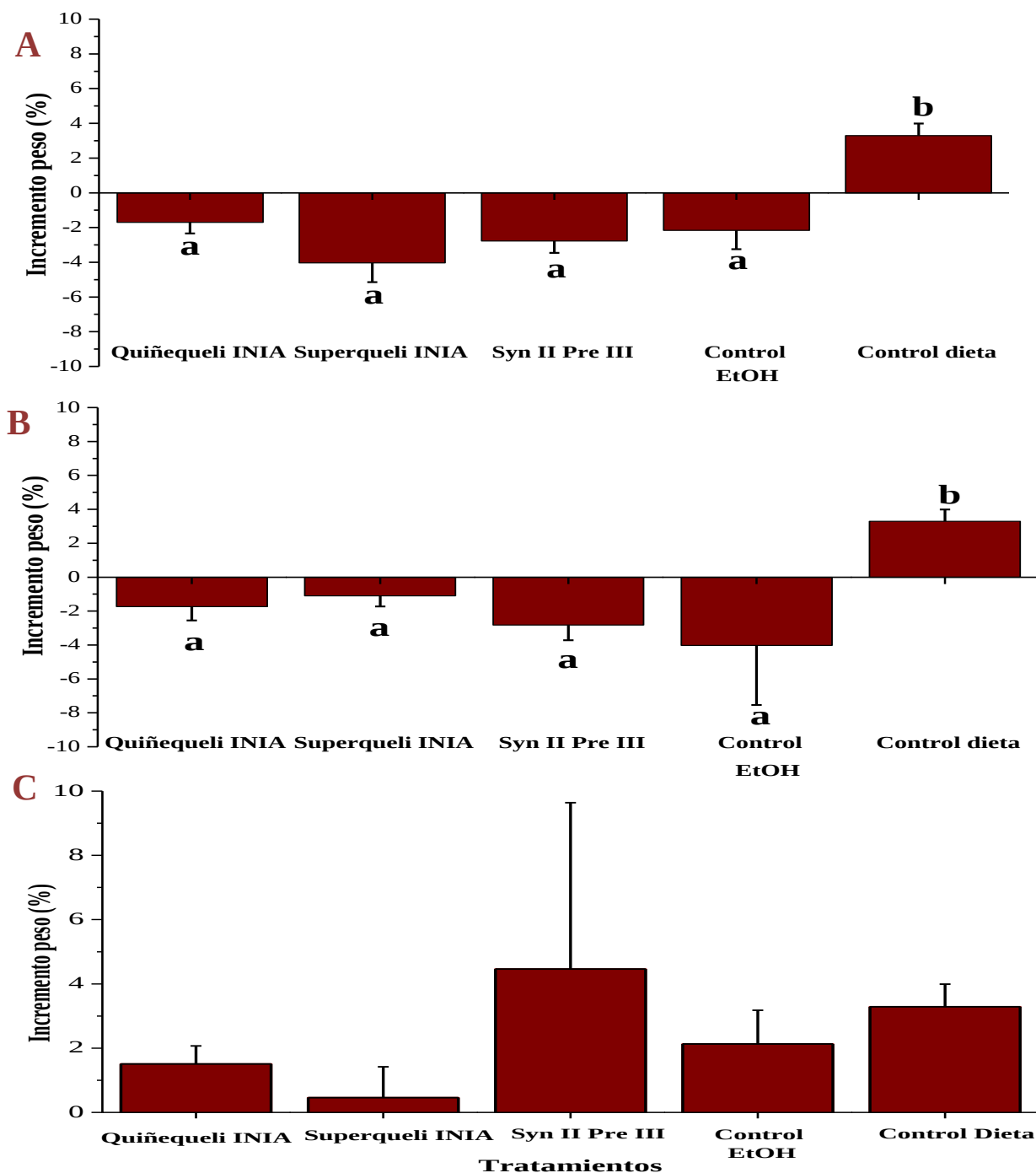


Figura 16. Incremento de peso (%) de *H. obscurus* al evaluar extractos radicales polares de los cultivares (Quiñequeli INIA y Superqueli INIA) y línea experimental (Syn II Pre III) a distintas concentraciones. **A)** 10 ppm, **B)** 100 ppm, **C)** 1000 ppm. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Conover-Inman ($P \geq 0,05$).

De acuerdo a los resultados anteriores, se determinó la conducta alimentaria por sexo. Las hembras mostraron diferencias significativas hacia los extractos apolares (Fig. 17) de los cultivares y línea experimental en las diferentes concentraciones evaluadas. Se puede observar una tendencia antialimentaria similar a la presentada en el análisis por especie (Fig. 15) para las concentraciones de 10 y 100 ppm. Por el contrario, a 1000 ppm, ocurre un cambio en la respuesta antialimentaria del insecto, cambiando de antialimentaria a fagoestimulante cuando se alimento con el extracto apolar de la línea experimental. Los machos de *H. obscurus* no presentaron diferencias significativas hacia los extractos radicales apolares de los cultivares y línea experimental a concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm (Fig. 18). Sin embargo, se destaca un cambio en la respuesta del insecto al cultivar Superqueli INIA a 100 y 1000 ppm, donde presenta una tendencia fagoestimulante lo cual no coincide con la respuesta antialimentaria de este extracto a nivel de especie (Fig. 15).

En cuanto a la respuesta alimentaria de hembras de *H. obscurus*, hacia extractos radicales polares de los cultivares y línea experimental (Fig. 19), estas presentaron diferencias significativas en las concentraciones de 10 y 100 ppm, lo cual coincide con la conducta de este insecto a nivel de especie (Fig. 16). Al igual que las hembras, los machos presentaron similares significancias en ambas concentraciones a excepción del control etanólico (Fig. 20B).

De acuerdo a lo señalado, los resultados no concuerdan con lo informado por Faccoli *et al.* (2005) quienes mencionan que el consumo de la dieta se encuentra relacionado con tres factores: sexo, concentración y composición química. Esto fue concluido al evaluar compuestos de diferentes plantas hospederas y no hospederas en función del sexo del curculionido *Ips typographus*, a diferentes concentraciones en la misma dieta compuesta que fue utilizada para los ensayos con *H. obscurus*. Si bien, los últimos factores mencionados por estos autores, fueron una determinante para los ensayos realizados en este trabajo, no lo fue el sexo del insecto ya que no se encontraron diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, el hecho de que la respuesta alimentaria presentada para machos de *H. obscurus*, no haya sido significativa hacia extractos radicales apolares a 10 ppm, puede ser atribuible a la proporción de sexo del insecto que pudo

existir en los ensayos realizados, ya que, no existió una uniformidad en cuanto a la proporción de hembras y machos de *H. obscurus*. La diferencia en cuanto a la proporción de machos y hembras evaluados fue significativa en Quiñequeli INIA y línea experimental Syn II Pre III a concentraciones de 10 ppm, y Quiñequeli INIA a 100 ppm.

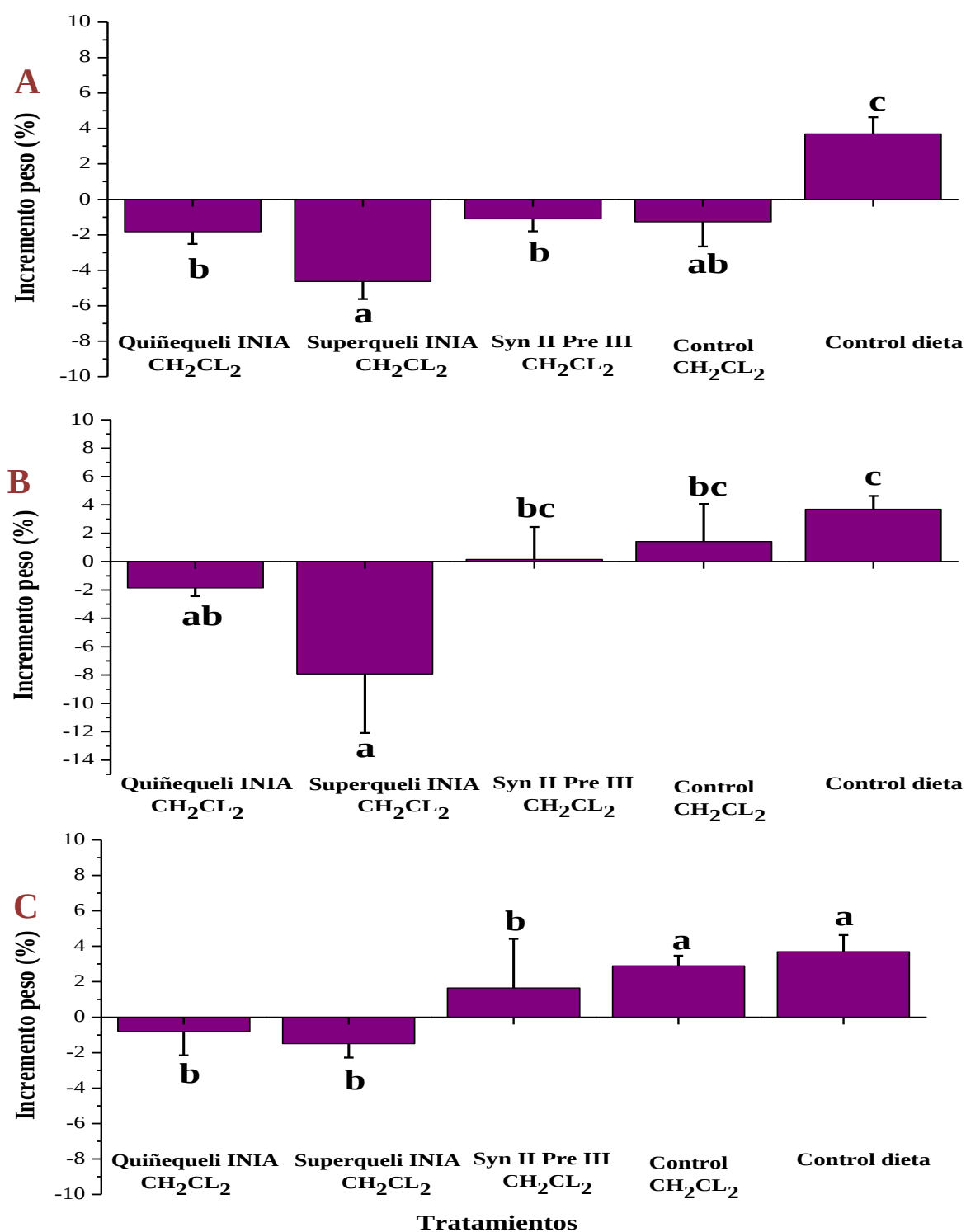


Figura 17. Incremento de peso (%) de hembras de *H. obscurus* al evaluar extractos radicales apolares de dos cultivares y una línea experimental de trébol rosado. **A)** 10 ppm, **B)** 100 ppm, **C)** 1000 ppm. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Conover-Inman ($P \geq 0,05$).

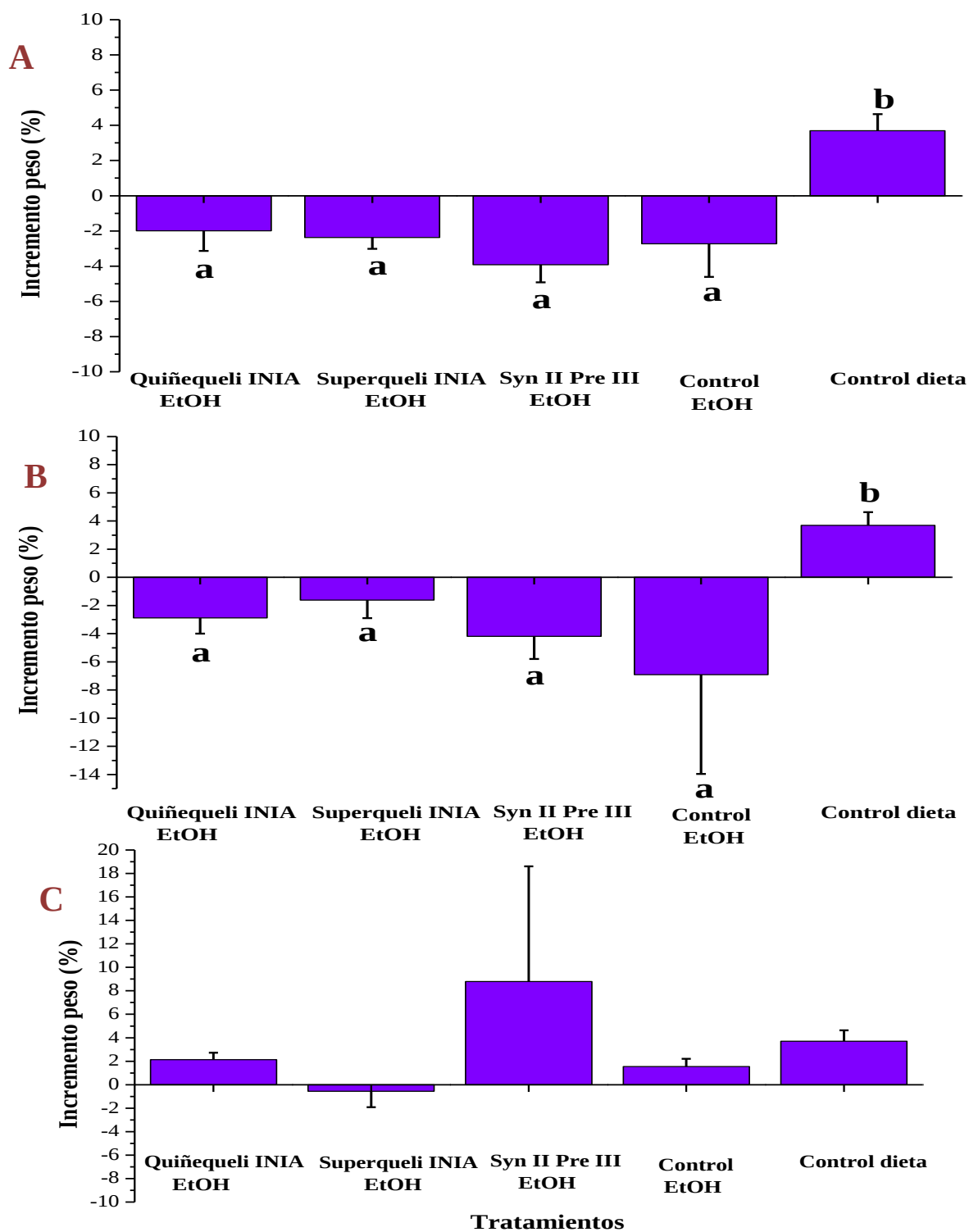


Figura 18. Incremento de peso (%) de hembras de *H. obscurus* al evaluar extractos radicales polares de dos cultivares y una línea experimental de trébol rosado. **A)** 10 ppm, **B)** 100 ppm, **C)** 1000 ppm. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Conover-Inman ($P \geq 0,05$).

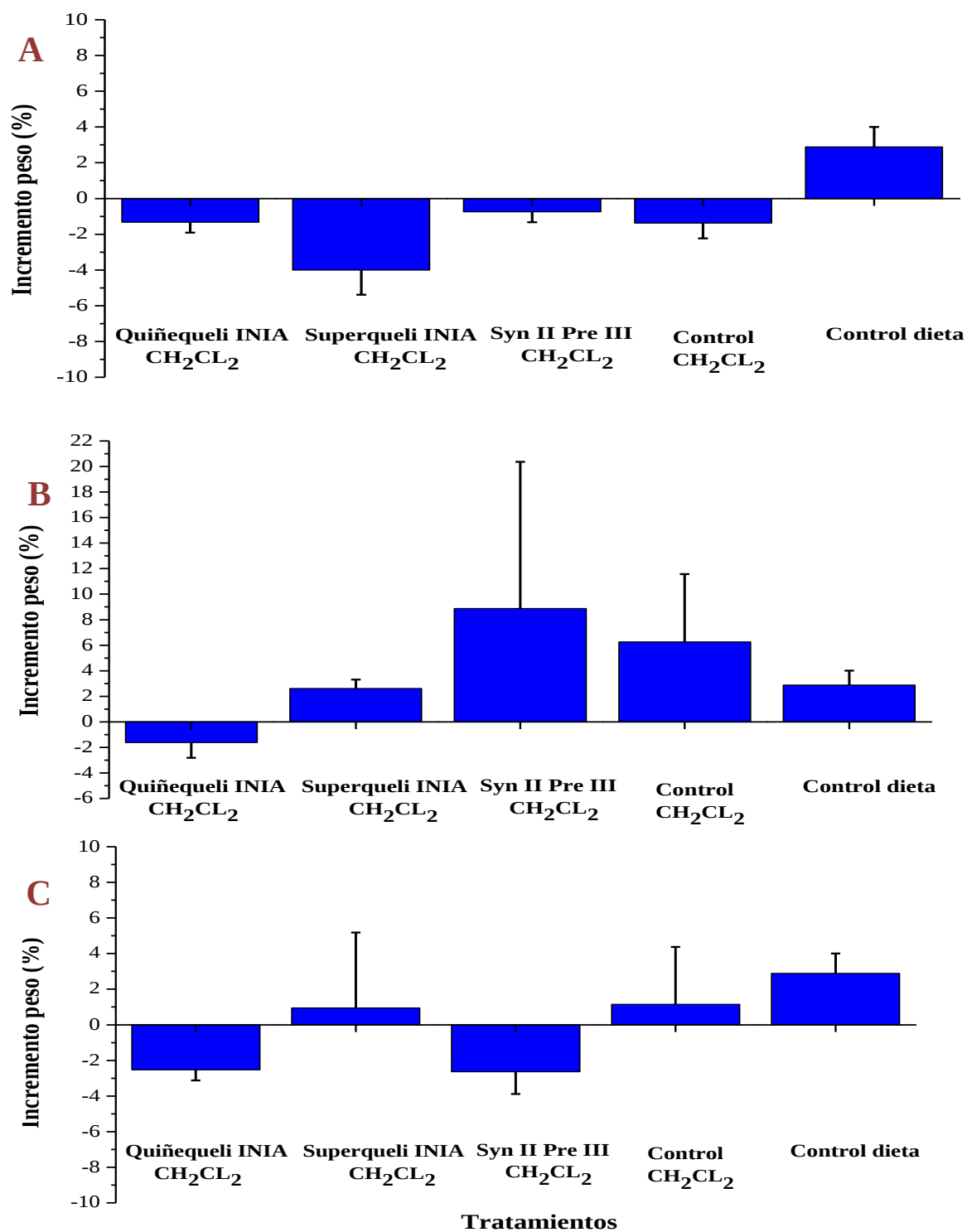


Figura 19. Incremento de peso (%) de machos de *H. obscurus* al evaluar extractos radicales apolares de dos cultivares y una línea experimental de trébol rosado. **A)** 10 ppm, **B)** 100 ppm, **C)** 1000 ppm. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Conover-Inman ($P \geq 0,05$).

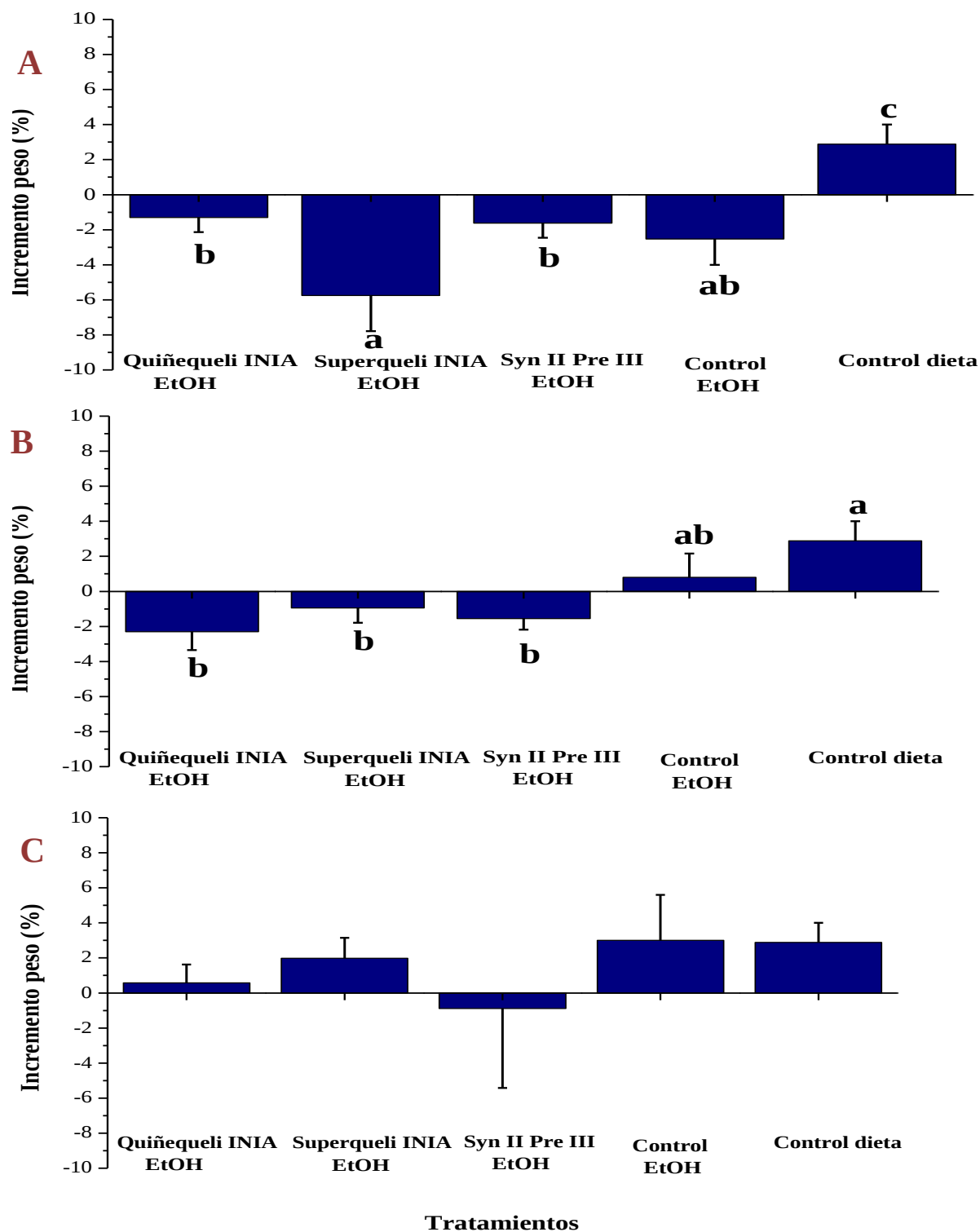


Figura 20. Incremento de peso (%) de machos de *H. obscurus* al evaluar extractos radicales polares de dos cultivares y una línea experimental de trébol rosado. **A)** 10 ppm, **B)** 100 ppm, **C)** 1000 ppm. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Conover-Inman ($P \geq 0,05$).

4.3 Caracterización química del extracto radical polar de Superqueli INIA.

4.3.1 Obtención de fracciones totales.

El extracto etanólico purificado mediante cromatografía en columna dio un total de 110 fracciones. Las fracciones con perfiles similares de spots visualizados bajo la luz UV se combinaron. Así, al agrupar las fracciones mencionadas en la sección 3.7.1.2, se obtuvieron 10 fracciones finales (Tabla 12).

Tabla 12. Fracciones obtenidas del extracto etanólico de *Trifolium pratense* (cultivar Superqueli INIA).

Fracción	Tubos de ensayo	Solvente dilución CCF	Proporción
1	1-3	Hexano-acetato de etilo	75:25
2	4-8	Hexano-acetato de etilo	75:25
3	9-19	Hexano-acetato de etilo	25:75
4	20-31	Hexano-acetato de etilo	25:75
5	32-39	Acetato de etilo	100
6	40-47	Acetato de etilo-acetona	75:25
7	48-56	Acetato de etilo-acetona	50:50
8	57-63	Acetato de etilo-acetona	25:73
9	64-85	Acetona	100
10	86-110	Acetona-metanol	75:25

4.3.2. Reacciones colorimétricas.

Las fracciones finales obtenidas fueron sometidas a diferentes reacciones con reveladores colorimétricos, con la finalidad de determinar la presencia de las principales familias de compuestos químicos orgánicos. Los resultados muestran que el extracto etanólico presenta una abundancia de flavonoides, lo que fue revelado con acetato plomo básico y cloruro de aluminio. Otras familias químicas identificadas correspondieron a esterinas y esteroides, cumarinas, glucósidos de antraquinona, alcaloides y ácidos carboxílicos aromáticos. Por el contrario, hubo grupos químicos que no se encontraron en todas las fracciones tales como fenoles, ácidos hidroxámicos y azúcares (Tabla 13).

Para el caso de los alcaloides, se observaron variaciones en su presencia de acuerdo al revelador utilizado. Sólo en la fracción 10 se determinó la presencia de aminas. En cuanto a la abundancia, las fracciones 2, 7 y 9 presentaron la mayor cantidad de grupos químicos. Por el contrario, la fracción 1 fue la que presentó una menor abundancia de estos grupos, destacando la presencia de ácidos carboxílicos aromáticos (Tabla 13).

Posterior a la determinación de familias de compuestos químicos, se calculó el factor de retención (RF) para cada mancha (“spot”) localizada (Tabla 14). Se observó que los mayores valores de RF lo presentan las fracciones 2, 7 y 9, lo cual significaría que presentan un mayor número de grupos químicos.

Caso contrario sucede con la fracción 1, la cual presentó un bajo número de grupos químicos y un valor RF sobre 0,5, lo que significa que existe una mayor afinidad por el eluyente, mencionado en tabla 13.

La importancia de los valores RF radica en que entregan información importante para la selección de disolventes y su polaridad, para así separar grupos químicos (Ganatra *et al.*, 2013).

En un estudio realizado por Ganatra *et al.* (2013), se determinó una gran presencia de flavonoides, terpenoides, quinonas y fenoles en plantas Fabaceae mediante el uso de CCF, lo que concuerda en parte con los resultados obtenidos en este estudio. De acuerdo a estos autores, los grupos químicos mencionados fueron localizados en los extractos de acetona y acetato de etilo. Mientras que en los resultados informados en esta investigación los flavonoides, ácidos carboxílicos aromáticos, quinonas y esteroides, fueron identificados en todas las fracciones evaluadas. Por el contrario, los fenoles solo se observaron en las fracciones 2, 5, 6, 7 y 9, las cuales contenían mezcla de hexano: acetato de etilo, acetato de etilo: acetona y acetona: metanol (Tabla 12). Lo anterior se debe principalmente a la polaridad de los grupos químicos y de los solventes utilizados. Lock de Ugaz (1994) menciona que los compuestos fenólicos son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua, lo que explicaría su mayor presencia en las fracciones que contienen solventes de mayor polaridad. Dentro de los fenoles, las isoflavonas, son constituyentes importante del trébol rosado según lo señalado por Saviranta *et al.* (2010), cuya principal función es la protección de la planta.

La determinación de alcaloides fue realizada con los reveladores ácido nítrico y reactivo de Dragendorff. Los resultados fueron opuestos, es decir, la reacción fue positiva utilizando el primer revelador y negativa cuando se aplicó la segunda prueba. Esto podría ser explicado debido a la gran heterogeneidad de los alcaloides, resultando en que la prueba colorimétrica sea positiva frente a ciertos grupos de estos metabolitos secundarios (Dominguez, 1973). El mismo autor reporta que la función de los alcaloides podría estar relacionada a la regulación del crecimiento y a la repelencia o atracción de insectos.

La determinación de aminas, aminoácidos y aminoazúcares fue positiva para la fracción 10, correspondiente a la fracción más polar. Se puede señalar que el revelador ninhidrina ha sido reportado como específico para aminas primarias, las cuales son altamente polares (Moliner, 2005; Novo *et al.* (S/A)). Así mismo, carbohidratos como azúcares, son solubles en agua (Domínguez, 1973), lo que explicaría la presencia de azúcares sólo en las fracciones más polares.

Tabla 13. Análisis fitoquímico cualitativo del extracto etanólico de *Trifolium pratense* (cultivar Superqueli INIA).

Fracción	Prueba										
	Ácidos carboxílicos aromáticos (Permanganato de potasio alcalino)	Alcaloides y aminas (Ácido nítrico)	Alcaloides (Dragendorff)	Amina Aminoácidos Aminoazúcares (Ninhidrina)	Azúcares (Timol-ácido sulfúrico)	Cumarinas, glucósidos de antraquinona (Hidróxido de potasio)	Esterinas y esteroides (Ácido fosfórico)	Fenoles y ácidos hidroxámicos (Cloruro de hierro)	Fenoles (Folin-Ciocalteu)	Flavonoides (Acetato plomo básico)	Flavonoides (Cloruro de aluminio)
1	+++	+	-	-	-	+	++	-	-	+	+
2	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+	+++	+++	+++
3	+++	+++	-	-	-	++	+++	-	-	+++	++
4	+++	++	-	-	+	+	++	-	-	++	++
5	+++	++	-	-	-	++	+++	-	+	++	++
6	+++	++	-	-	++	++	+++	-	+	+++	+++
7	++	++	-	-	++	++	++	+	+	+++	++
8	++	+	-	-	+++	++	++	-	-	+++	++
9	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	-	++	+++	+++
10	+++	+	-	+	++	+++	++	-	-	++	+

Simbología:

Spot muy intensa (+++); spot medianamente intensa (++); escasa presencia del spot (+) y spot no presente (-).

Tabla 14. Valores RF para los spots que reaccionaron positivamente con cada uno de los reveladores de familias de compuestos químicos.

Revelador	Fracción									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Acetato plomo básico	0,64	A:0,04 B:0,11 C:0,23 D:0,37 E:0,52 F:0,68	A:0,19 B:0,44 C:0,62	0,49	0,71	0,98	A:0,28 B:0,46 C:0,61 D:0,96	A:0,23 B:0,83 C:1	0,95	A:0,06 B:0,90
Acido fosfórico	A:0,58 B:0,68 C:1	A:0,10 B:0,25 C:0,47 D:0,53 E:0,70 F:0,84 G:1	A:0,19 B:0,90 C:1	A:0,47 B:0,96	A:0,22 B:0,37 C:0,46	0,35	A:0,19 B:0,59 C:1	A:0,23 B:0,35 C:0,66 D:1	A:0,44 B:0,86 C:0,94	A:0,21 B:0,99
Ácido Nítrico	0,65	A:0,22 B:0,34 C: 0,49 D: 0,61	A:0,18 B:0,29 C:0,91 D:0,96	A:0,50 B:0,95	A:0,18 B:0,65	A:0,26 B:0,84 C:1	A:0,23 B:0,38 C:1	A:0,13 B:1	A:0,78 B:0,95	A:0,80 B:0,90
Cloruro de aluminio	0,59	A:0,21 B:0,28 C:0,44 D:0,59	A:0,19 B:0,76	0,32	A:0,61 B:1	A:0,28 B:0,85 C:0,96	A:0,36 B:0,96	A:0,23 B:0,61	A:0,73 B:0,96	A:0,07 B:0,86 C:-1
Cloruro de hierro	-	A:0,09 B:0,18	-	-	-	-	0,29	-	0,04	-
Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Folin-Ciocalteu	-	A:0,28 B:0,45	-	-	0,2	0,5	0,6	-	A:0,4 B:0,9	-
Hidróxido de potasio	0,58	A:0,08 B:0,21 C:0,47 D:0,63	A:0,13 B:0,50 C:0,79	0,47	A:0,12 B:1	A:0,18 B:0,35	A:0,17 B:0,27 C:0,39	A:0,20 B:0,78	A:0,26 B:0,96	A:0,39 B:0,81
Ninhidrina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A:0,06 B:0,23
Permanganato de potasio alcalino	A:0,39 B:0,70 C:0,84 D:0,99	A:0,30 B:0,38 C:0,46 D:0,97	A:0,28 B:0,99	A:0,43 B:0,97	A:0,26 B:0,42 C:0,92 D:0,97	A:0,27 B:0,44 C:0,94	A:0,61 B:0,99	A:0,35 B:0,99	A:0,61 B:0,98	A:0,25 B:0,99
Timol-ácido sulfúrico	-	-	-	0,04	-	0,25	A:0,36 B:0,47	0,40	A:0,01 B:0,86	0,26

4.4 Identificación química de los extractos radicales apolares de cultivares y línea experimental.

Los compuestos químicos presentes en los extractos de diclorometano de los cultivares Quiñequeli INIA, Superqueli INIA y línea experimental Syn II Pre III, muestran que para los tres extractos se identificaron con un alto porcentaje de área, en los tiempos de retención 34,69 minutos el ácido 9,12-Octadecadienoico (ácido linoleico) (2,66 - 6,98%) seguido por el compuesto Maackiaina (67,89 - 81,47%) con un tiempo de retención de 43,59 min. Otros compuestos identificados pero en menor proporción correspondieron a tetradecano (0,03 - 0,04%) identificado a los 19,34 minutos y a hexadecano (0,04 - 0,05%) identificado a los 24,11 min (Tabla 15).

Para el caso de Quiñequeli INIA se identificó con mayor porcentaje de área el compuesto Maackiaina (81,47%), un isómero del compuesto anterior (5,02%), aflatoxicol (5,01%) y ácido linoleico (2,66%). Por el contrario, se encontró en bajo porcentaje el ácido mirístico y tetradecano (0,03%) (Tabla 15).

En Superqueli INIA, se destacó la presencia del compuesto Maackiaina (67,89%), un isómero del compuesto anterior (7,13%) y el ácido linoleico (6,98%) que presenta mayor porcentaje de área que en los demás tratamientos. Por el contrario, se identificó tetradecanal (0,7%) y hexadecano (0,05%) en bajos porcentajes (Tabla 15).

Para la línea experimental Syn II Pre III, los compuestos identificados en mayor proporción fueron Maackiaina (69,8%), un isómero de Maackiaina (12,33%) y pterocarpina (5,88%). Otros compuestos en menor proporción fueron el tetradecano (0,03%) y hexadecano (0,04%) (Tabla 15).

Manosalva *et al.* (2011) analizaron químicamente extractos radicales de cultivares y líneas experimentales de plantas de *T. pratense*, entre ellos Quiñequeli INIA y la línea experimental Syn II Pre III, utilizando cromatografía de gases (GC-MS). Estos autores observaron que la composición química no difirió entre cultivares y línea experimental. Entre los principales grupos químicos identificados se encontraron ácidos grasos (ác. palmítico, oleico y esteárico o octadecanoico), terpenos (limoneno y longipineno) y alcoholes (carveol, eucaliptol y 3-octanol). La única similitud en los resultados de ese estudio con los obtenidos en esta investigación, fue la presencia del ácido esteárico en los cultivares Quiñequeli INIA, Superqueli INIA y línea experimental Syn II Pre III. La edad fisiológica de las plantas puede ser un factor determinante en esta diferencia debido a que los autores identificaron estos compuestos en extractos radicales de 3, 12 y 13 meses de edad, mientras que en el presente estudio se utilizaron plantas de 1,5 años de edad. Lo anterior es confirmado por De Moraes *et al.* (1998), quienes mencionan que mezclas de volátiles liberados por plantas pueden ser específicas para algunas interacciones planta-herbívoro. Además, factores como edad fisiológica de la planta, especie, tejido vegetal, y las especies de herbívoros, pueden afectar a la composición de la mezcla de volátiles.

Kadam *et al.* (1989) mencionan que las leguminas contienen entre 1-7% de lípidos. Los principales ácidos grasos que forman parte de esta estructura, son del tipo insaturado, destacando los ácidos oleico y linolenico, lo que concuerda con lo informado ya que el ácido linoleico se encontró en los tres extractos radicales. En menor cantidad se puede encontrar también ácidos grasos saturados como el hexadecanoico (palmítico) o el octadecanoico (esteárico). La importancia de estos ácidos grasos en insectos, es el requerimiento alimenticio que tienen hacia los ácidos poli insaturados, donde se ha demostrado que el ácido linoleico satisface esta necesidad nutricional (Canavoso *et al.*, 2001).

Con respecto al alto porcentaje del compuesto maackiain encontrado en los dos cultivares y línea experimental de trébol rosado, Dewick (1974) lo menciona que como una fitoalexina del tipo pterocarpanos, que es producida por *Trifolium pratense*, cuando esta es sometida al ataque de fitopatógenos.

En cuanto a la preferencia que tienen los insectos hacia los ácidos grasos presentes en raíces de plantas, Bernklau & Bjostad (2008), mediante bioensayos conductuales, evaluaron una mezcla de compuestos aislados de raíces de *Zea maíz*, que se han identificado como fagoestimulantes para larvas neonatas de *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). Estos autores reportaron que el ácido linoleico provocó un incremento del consumo de larvas desde un 40% hasta un 92%, al adicionar este ácido.

La presencia de ácido linoleico (fagoestimulante) podría ser contrarrestada o enmascarado por la presencia de otros compuestos que se encuentran en mayor proporción de Superqueli INIA o que solo se encuentra en este cultivar por ejemplo; metil eugenol o heptadecanol reportado por Ishaaya *et al* (1991) como repelente hacia varios insectos.

Tabla 15. Compuestos identificados en el extracto de diclorometano de la parte radical de plantas de trébol rosado (*Trifolium pratense*).

Tiempo de retención (min)	Nombre	Quiñequeli INIA	Syn II Pre III	Superqueli INIA
% Area				
6,26	1,2,3,4,5-Pentametil-ciclopentano	0,39	0,51	0,36
6,96	3,7-Dimetil-1-octeno	0,49	0,6	0,44
18,64	Metil eugenol	0,05	0,06	0,45
19,34	Tetradecano	0,03	0,03	0,04
23,96	Tetradecanal	0,1	0,09	0,17
24,11	Hexadecano	0,05	0,04	0,05
26,22	Pentadecanal	0,95	0,94	1,65
27,52	Acido tetradecanoico	0,03	0,09	0,15
28,43	Hexadecanal	0,08	0,11	0,19
29,69	9,17-Octadienal	0,06	0,1	0,75
31,65	Acido hexadecanoico	0,93	1,62	2,7
33,35	Acido heptanoico		0,08	0,2
34,69	Acido 9,12-octadecadienoico	2,66	3,96	6,98
35,22	Acido octadecanoico	0,32	0,55	0,74
39,86	Homopterocarpina			0,3
40,45	Heptadecanol			0,72
41,02	Medicarpina	2,37	1,46	4,64
41,7	Pterocarpina		5,88	1,07
43,59	Maackiaina	81,47	69,08	67,89
44,14	Isómero de compuesto en 43,59 min	5,02	12,33	7,13
46,43	Aflatoxicol	5,01	2,47	3,38

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación y según los objetivos planteados, se puede concluir:

1. La dieta idónea para *H. obscurus*, correspondió a la compuesta debido a que cumplió con la finalidad de mantener constante el peso del insecto durante el periodo de evaluación.
2. La composición de la dieta es determinante al momento de evaluar cualquier actividad conductual o alimentaria en insectos, ya que es necesario que sea nutricionalmente equilibrada, y que sus componentes se encuentren relacionadas en función de la actividad estudiar.
3. Se observó diferencias significativas en la respuesta alimentaria de *H. obscurus*, hacia los extractos radicales apolares de los cultivares Quiñequeli INIA, Superqueli INIA y la línea experimental Syn II Pre III en las tres concentraciones evaluadas (10, 100 y 1000 ppm).
4. Se observó diferencias significativas en la respuesta alimentaria de *H. obscurus*, hacia los extractos radicales polares de los cultivares Quiñequeli INIA, Superqueli INIA y la línea experimental Syn II Pre III, solo en concentraciones de 10 y 100 ppm.
5. A concentraciones de 10 ppm, tanto los extractos polares y apolares de los cultivares como la línea experimental, provocaron una disminución en el peso de *H. obscurus*, actuando como antialimentario para este insecto.
6. A concentraciones de 100 ppm, los extractos polares y apolares de los cultivares Quiñequeli INIA, Superqueli INIA y el extracto polar de la línea experimental, provocaron una respuesta

antialimentaria en *H. obscurus*. A diferencia del extracto apolar de la línea experimental la cual actuó como fagoestimulante para el insecto.

7. A una concentración de 1000 ppm, los extractos apolares de los cultivares y línea experimental disminuyeron el peso de *H. obscurus*, contrario a lo sucedido con los extractos polares, que si bien, no presentaron diferencias significativas tendieron a aumentar el peso del insecto.
8. Las hembras de *H. obscurus*, mostraron respuestas significativas hacia concentraciones de 10 y 100 ppm en los extractos radicales polares y apolares de los cultivares Quiñequeli INIA y Superqueli INIA, siendo en ambos casos la respuesta similar a la descrita a nivel de especie. Por otro lado, en machos solo el extracto polar de los cultivares y línea experimental evaluados a 10 y 100 ppm, actuaron como antialimentario.
9. De acuerdo a la caracterización química realizada para el extracto polar del cultivar Superqueli INIA, este presentó una abundancia de flavonoides, esterinas y esteroides, cumarinas, glucósidos de antraquinona, alcaloides y ácidos carboxílicos aromáticos.
10. El análisis cromatográfico en GC-MS de los extractos apolares de Quiñequeli INIA, Superqueli INIA y línea experimental Syn II Pre III, muestra que los principales compuestos identificados correspondieron a maackiaina y ácido linoleico.
11. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, se acepta la hipótesis planteada: “extractos radicales polares y apolares de dos cultivares y una línea experimental de *Trifolium pratense* incorporados en una dieta artificial provocan una respuesta fagoestimulante y/o antialimentario sobre *H. obscurus*”.

6. RESUMEN

Trifolium pratense o trébol rosado, es una leguminosa forrajera que tiene diversos usos como pastoreo, producción de forraje y producción de semilla para exportación. Debido a esto, el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA-Carillanca) ha desarrollado un programa de mejoramiento forrajero. Actualmente, INIA-Carillanca ha desarrollado tres cultivares Quiñequeli INIA, Redqueli INIA y el más reciente Superqueli INIA, estos dos últimos han mostrado mejor persistencia productiva y sobrevivencia de plantas que Quiñequeli INIA. Sin embargo, esta planta se ve afectada por diversos factores, tales como hongo e insectos. No obstante, el barrenador de trébol rosado, *H. obscurus*, es el principal agente causal de la disminución de la persistencia de *T. pratense*. Este insecto causa un daño importante, atacando al segundo año de establecida la pradera y puede causar entre un 70 a 100% de daño en praderas. Debido a que no existe un control efectivo para esta plaga, se han desarrollado nuevas estrategias. Una de ellos es el control etológico, que está basado en el estudio del comportamiento del insecto. Otro enfoque es la búsqueda de nuevos cultivares con resistencia o rasgos tolerantes contra *H. obscurus*. El estudio de las características fagoestimulantes y antialimentaria de un nuevo material vegetal es una poderosa herramienta para el descubrimiento de cultivares resistentes. *H. obscurus* se alimenta de las raíces de trébol rosado, por lo tanto, el estudio de la conducta alimentaria cuando los insectos adultos son alimentados con una dieta suplementaria con extractos radicales es un enfoque habitual para la selección de materiales vegetales resistentes. Debido a estos antecedentes, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto fagoestimulante o antialimentario de los extractos radicales de dos cultivares y una línea experimental de *T. pratense*, proporcionados en una dieta artificial sobre *H. obscurus*. En este trabajo los extractos radicales polares y apolares de *T. pratense* (cv. Quiñequeli INIA, Superqueli INIA y línea experimental Syn II Pre III) fueron probados, en concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm. Los principales resultados sugeridos indicaron que el extracto polar a altas concentraciones (100 ppm) provocó una respuesta fagoestimulante en *H. obscurus*. Por el contrario, tanto los extractos apolares y polares a bajas concentraciones (10 ppm) actuaron como antialimentarios. La caracterización química del extracto polar de Superqueli INIA, mostro una abundancia de flavonoides, ésteres y alcaloides. El

análisis GC-MS, de los extractos apolares mostro la presencia maackiaina y ácido linoleico como los compuestos principales encontrados en los cultivares y línea experimental. Finalmente, este estudio entrega los primeros resultados respecto a la utilización de extractos radicales de trébol rosado para el control de *H. obscurus*.

7. SUMMARY

Trifolium pratense or red clover is a legume that has various uses like grazing, forage and seed production for export. Because of this, the Agricultural Research Institute (Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA-Carillanca) has developed a breeding program of this forage. Currently, INIA-Carillanca has developed three cultivars Quiñequeli INIA, Redqueli INIA and most recently Superqueli INIA, the last two have shown better productive and persistence than Quiñequeli INIA. However, this plant is affected by several factors such as fungi and insects. However, the clover borer, *Hylastinus obscurus*, is the main causative agent of the decreasing of the *T. pratense* persistence. This insect cause an important damage, attacking the second year of established the pasture and can cause between 70-100% of damage on pasture. Because there is no effective control for this pest, new strategies have been developed. One of them is the ethological control, which is based on the study of the insect behaviour. Another approach is searching new cultivars with resistance or tolerant features against *H. obscurus*. The study of the antifeedant and phagostimulant characteristic of the new plant material is a powerful tool for the discovering of resistant cultivars. *H. obscurus* feeds on red clover roots, therefore the study of the feeding behaviour when adult insect are fed with a diet supplemented with root extract is a usual approach for selecting resistant vegetal materials. Because of this background, the objective of this research was to evaluate the antifeedant or phagostimulant effect of root extracts of two cultivars and one experimental line of *T. pratense*, provided in an artificial diet on *H. obscurus*. In this work polar and unpolar root extracts of *T. pratense* (cv. Quiñequeli INIA, Superqueli INIA and experimental line Syn II Pre III) were tested, in concentrations of 10, 100 and 1000 ppm. The main results suggested indicated that the polar extracts at high concentration (100 ppm) caused a phagostimulant response in *H. obscurus*. On the contrary, both polar and unpolar extract at low concentration (10 ppm) acted as antifeedants. The chemical characterization of the polar extract from Superqueli INIA showed an abundance of flavonoids, esters and alkaloids. GC-MS analysis of the unpolar extract showed the presence of maackiain and linoleic acid as the main compounds found in cultivars and experimental line. Finally, this

study provided the first results about the use of red clover root extracts for controlling *H. obscurus*.

8. AGRADECIMIENTOS

La autora de este trabajo de investigación agradece el apoyo recibido por todo el Laboratorio de Química Ecología - UFRO, al Ing., Agrónomo Fitomejorador de Praderas, Fernando Ortega K, INIA Carillanca. Yurima Cortes, Estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias de Recursos Naturales, y al apoyo financiero otorgado por el Proyecto FONDECYT N° 1100812.

9. LITERATURA CITADA

- Aguila, H. 1962.** Patos y empastadas. Editorial Universitaria. Santiago, Chile.
- Aguilera, A., E. Cisternas, M. Gerding & H. Norambuena. 1996.** Plagas de las praderas, pp: 309-339. *En:* Ruiz (ed.). Praderas para Chile. Santiago, Chile.
- Ahmed, K. 1983.** Development of artificial diets for mass breeding of Lepidopterous insects. Thesis Doctoral. University of Karachi. Pakistan.
- Alarcón, D., F. Ortega, F. Perich, P. Fernando, L. Parra, & A. Quiroz. 2010.** Relationship between radical infestation of *Hylastinus obscurus* (Marsham) and the yield of cultivars and experimental lines of red clover (*Trifolium pratense* L.). R.C. Suelo Nutr. Veg. 10: 115-125.
- Bernays, E. A., & R. F. Chapman. 1994.** Host-plant selection by phytophagous insects. Hall, New York.
- Bernklau, E., & L. Bjostad. 2008.** Identification of Feeding Stimulants in Corn Roots for Western Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) Larvae. J. Econ. Entomol. 101:341-351.
- Byers. R. 1974.** Artificial diets for maintaining the adult clover root borer. J. Econ. Entomol. 67 : 6.
- Canavoso, L., Z. E Jouni, K. Joy Karnas, J. Pennington & M. Wells. 2001.** Fat metabolism in insects. Annu. Rev. Nutr. 21: 23-46.
- Carrillo, R., & N. Mundaca. 1974.** Biología de *Hylastinus obscurus* (Marsham) (Coleoptera: Scolytidae). Agric. Téc. 34: 29-35.
- Carrillo, R. J. Matamala & N. Mundaca. 1978.** Descripción de los órganos reproductores y determinación del número de generaciones anuales de *Hylastinus obscurus* (Marsham) (Coleoptera: Scolytidae). Agro Sur 6: 79-89.
- Cisternas, E., & H. Norambuena. 1991.** Plagas insectiles, pp: 35-44. *En* A. Torres & J. Dumont (eds.). Producción y utilización de trébol rosado (*Trifolium pratense* L.). Serie Remehue. Osorno, Chile.
- Cohen, A. C. 2003.** Insect diets science and technology. CRC Press, Florida, USA.

- Chapman, R. 2003.** Contact chemoreception in feeding by phytophagous insects. *Annual Review* 8: 455–484.
- Chirinos, J. 2009.** Uso de extractos naturales como una alternativa ecológica para el control de enfermedades en plantas. *INIA Divulga*. 14: 40-42.
- De Moraes, C., W. Lewis, P. Pare, H. Alborn & J. Tumlinson. 1998.** Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature* 393: 570-573.
- Demagnet, R. 2008.** Manual de especies forrajeras y manejo pastoreo. Imprenta Americana, Valdivia, Chile.
- Demagnet, R. 2011.** Pasturas de Rotación para Producción de Carne Bovina. Disponible en <http://www.engormix.com>. Conectado el 12 de diciembre de 2012.
- Dewick, P. 1975.** Pterocarpan biosynthesis: Chalone and isoflavone precursors of demethylhomopterocarpan and maackiain in *Trifolium pratense*. *Phytochemistry*. 14: 979-982.
- Do Nascimento, F. J., E. T. Diniz Filho & A. M. de Oliveira. 2008.** Extractos Vegetales en el Control De Plagas. *Revista verde*. 3: 1-5.
- Domínguez, X. 1973.** Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa, Mexico.
- Etzel, L. K., & E. F. Legner. 1999.** Culture and Colonization, pp 125-127. *En*: T. S. Bellows & T. W. Fischer (eds.), *Hanbook of Biological Control*. Academic Press. San Diego, EE.UU.
- Faccoli, M., M. Blazenec & F. Schlyter. 2005.** Feeding response to host and non host compounds by males and females of the spruce bark beetle *Ips typographus* in a tunneling microassay. *J. Chem. Ecol.* 31: 745-759.
- Faccoli, M., & F. Schlyter. 2007.** Conifer phenolic resistance markers are bark beetle antifeedant semiochemicals. *Agric. For. Entomol.* 9: 237-245.
- Fernández, J. & J. Cabrera–La Rosa. 1999.** Evaluación de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) y un fagoestimulante sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) y *S. eridania* (Stoll) (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Peruana Ent.* 41: 87- 90.
- Fernández, P., & P. Díaz. 1997.** Relación entre variables cuantitativas. *Cad. Aten. Primaria* 4: 1-8.

- Galdames, R. 1991.** Enfermedades fungosas, pp: 45-51. *En:* A. Torres & J. Dumont (eds.). Producción y utilización de trébol rosado (*Trifolium pratense* L.). Serie Remehue. Osorno, Chile.
- Ganatra, H., A. Ramteke, S. Durge & S. Patil. 2013.** Phytochemicals investigation and TLC profiling of *Cyamopsis tetragonoloba* L. Seeds (Fabaceae) - pea family. IJPSR. 4: 1551-1555.
- Granados, G., & R. Paliwal. 2001.** Mejoramiento para resistencia a los insectos, pp: 179-196. *En:* El maíz en los trópicos mejoramiento y producción. Paliwal, R., G. Granados, H. Lafitte & A. D. Violic (eds.). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Producción y Protección Vegetal. Roma, Italia.
- Gómez, V., C. Cabral & M. Ramirez de Lopez. 2009.** Aspectos Biológicos de *Spodoptera eridania* (Lepidoptera; Noctuidae) criadas en dieta artificial, pp: 31-43. *En:* V. Gómez (ed.), Plaga del cultivo de soja. Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Agropecuarias. San Lorenzo, Paraguay.
- Gonzales, A. 2004.** Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del amazonas. Tesis Tecnología en Alimentos. Universidad Nacional de Colombia, Manizales, Colombia.
- Hernández-López, M. 2002.** Uso potencial del quitosano y extractos vegetales en el control de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium digitatum*, y *Fusarium oxysporum* de la papaya (*Carica papaya*). Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, Morelos, México.
- I-CET, 2007.** Estadísticas de explotaciones forrajeras. Disponible en <http://icet.odepa.cl/>. Conectado el 10 de marzo de 2013.
- Ishaaya, I., & A. Rafaeli. 2007.** Essential oil as biorational insecticides-potency and mode of action, pp: 251-252. *En:* Ishaaya, I., R. Nauen & A. Horowitz (eds.). Insecticides design using advanced technologies. Springer, Berlin, Netherlands.
- Kadam S., S. Deshpande & N. Jambhale. 1989.** Seed structure and composition, pp: 23-55. *En:* D. K., Kadam, S.S. (ed.). Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology, and Utilitation. CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU.

- Lagos, A. 2009.** Normalización de la dieta artificial y evaluación de actividad insecticida contra la broca del café (*Hypothenemus hampei*) de extractos vegetales de plantas recolectadas en la ecorregión cafetera. Tesis Tecnólogo en Química. Universidad Tecnológica De Pereira, Pereira, Colombia.
- Lock de Ugaz, O. 1994.** Investigación Fotoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú.
- Manosalva, L., F. Pardo, F. Perich, A. Mutis, L. Parra, F. Ortega, R. Isaacs & A. Quiroz. 2011.** Behavioral responses of clover root borer to long-chain fatty acids from young red clover (*Trifolium pratense*) roots. Environ. Entomol. 40: 399-404.
- Mareggiani, G. 2001.** Manejo de insectos plaga mediante sustancias semioquímicas de origen vegetal. Manejo Integrado de Plagas 60: 22-30.
- Merck, E. 1972.** Reactivos Merck, reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel. Darmstandt, Alemania.
- Moliner, Y. 2005.** Aportaciones de la química analítica a la resolución de diversos problemas medioambientales. Tesis doctoral. Universidad de Valencia, Valencia, España.
- Novo, J. M. Nieves, & J. Bárcena. S/A.** Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina y detección mediante reacción con ninhidrina. Departamento de Bioquímica y Biología molecular, Universidad de Rabanales, Córdoba, Argentina.
- Novo, R., A. Viglianco, & M. Nassetta. 1998.** Efecto antialimentario de extractos de cuatro plantas sobre *Anticarsia gemmatalis* Hub. (Lepidoptera: Noctuidae). Bol. Sanidad Vegetal. 24: 525-530.
- ODEPA, 2012.** Semillas: el cierre de las exportaciones 2011 y la temporada 2011/12. Disponible en <http://www.ODEPA.cl>. Conectado el 15 de marzo de 2013.
- Ortega, F., O. Romero & R. Galdámes. 1991.** Evaluación de cultivares de trébol rosado (*Trifolium pratense* L.) en la IX región. Agric. Téc. 51: 138-44.
- Ortega, F., R. Galdames, A. Aguilera, O. Romero, I. Ruiz, P. Soto, & A. Torres. 2003.** Redqueli INIA, nuevo cultivar sintético de trébol rosado. Agric. Téc. 63: 207-211.

Ortega, F. 2009. Fitomejoramiento de trébol rosado: Variedades para el mercado nacional y de exportación. Tierra Adentro 85: 21.

Ortega, F., & J. Levío. 2011a. Superqueli INIA, Nuevo cultivar chileno de trébol rosado (*Trifolium pratense* L.). Origen y descripción morfológica. XXXVI Congreso Sociedad Chilena Producción Animal, Punta Arenas, Chile. p. 195.

Ortega, F., & J. Levío. 2011b. Superqueli INIA, Nuevo cultivar chileno de trébol rosado (*Trifolium pratense* L.). II- Comportamiento Agronómicos en La Araucanía, Chile. XXXVI Congreso Sociedad Chilena Producción Animal, Punta Arenas, Chile. p. 196.

Ortega, F., R. Galdames, P. Soto, N. Teuber, A. Torres & J. Levío. 2012. Avances en mejoramiento genético del trébol rosado (*Trifolium pratense* L.) en Chile. 63° Congreso Agronómico, Temuco, Chile. p 318.

Quiroz, A., F. Ortega, C. Ramírez, L. Whadams & K. Pinilla. 2005. Response of the beetle *Hylastinus obscurus* Marsham (Coleoptera: Scolytidae) to red clover (*Trifolium pratense* L.) volatiles in a laboratory olfactometer. Environ. Entomol. 34: 690–695.

Sallé, R., & K. Raffa. 2007. Interactions among intraspecific competition, mergence patterns, and host selection behavior in *Ips pini* (Coleoptera: Scolytinae). Ecol. Entomol. 32: 162–171.

Saviranta, N., R. Julkunen, E. Oksanen & R. O Karjalainen. 2010. Red clover (*Trifolium pratense* L.) isoflavones: root phenolic compounds affected by biotic and abiotic stress factors. J. Sci. Food Agric. 90: 418-423.

Squella, F. 2002. Praderas de siembra, establecimiento y manejo, pp: 83. En: C. Rojas, R. Novoa, F. Squella, J. Carrasco & C. Sierra (eds.). Tecnologías y prácticas en el manejo de los recursos naturales para la recuperación de los suelos degradados. INIA, Santiago, Chile.

Tapia, S., F. Pardo, F. Perich & A. Quiroz. 2005. Clover root borer *Hylastinus obscurus* (Marsham) (Coleoptera: Scolytidae) has no preference for volatiles from root extracts of disease infected red clover. Acta Agr. Scand. 55: 158-160.

Tapia, T., F. Perich, F. Pardo, G. Palma, & A. Quiroz. 2007. Identification of volatiles from differently aged red clover (*Trifolium pratense*) root extracts and behavioural responses of clover

root borer (*Hylastinus obscurus*)(Marsham)(Coleoptera: Scolytidae) to them. Biochem. Syst. Ecol. 35: 61-67.

Taylor, N., & K. Quesenberry. 1996. Red Clover Science. Springer. USA.

Toledo, C. 1999. Evaluación de cinco dietas artificiales para la crianza en laboratorio del barrenador de la caña de azúcar *Diatraea crambidoides* Grote. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Torres, A., & J. Dumont. 1991. Producción y utilización de trébol rosado (*Trifolium pratense* L.). Serie Remehue. Osorno, Chile.

USDA. S/A. Plants profile, *Trifolium pratense* L. Disponible en <http://plants.usda.gov>. Conectado el 15 diciembre de 2012.

Vázquez, M. 1992. Bioreguladores de origen vegetal, una alternativa para el control de plagas agrícolas, pp: 141. En: A. C. Praxis (eds.). Memorias del II Simposio y I Reunión Nacional Agricultura Sostenible: un enfoque ecológico, socioeconómico y de desarrollo tecnológico. Colegio de Postgraduados, Guadalajara, México.

Villacorta, A. 1971. Fundamentos en la preparación de dietas para insectos. CIAT, Cali, Colombia.

Wilsie, C. 1996. Trébol rojo y trébol híbrido, pp: 163-173. En: Hughes. H., M. Heath, & D. Metcalfe (eds.), Forrajes. Compañía Editorial Continental. México.

10. ANEXOS

Anexo 1. Resumen reactivos utilizados para pruebas colorimétricas.

Revelador	Determina	Contenido solución reveladora	Observación
Acetato plomo básico	Flavonoides	Solución de acetato de plomo básico (25% en agua destilada).	Manchas fluorescentes a la luz UV de onda larga.
Ácido fosfórico	Esterinas y esteroides	Se diluye 1 vol. de ácido fosfórico (85%) con 1 vol. de agua.	Luego de pulverizar, se debe calentar la placa por 15-30 min (120°C). Se observa manchas fluorescentes a onda larga de UV.
Ácido Nítrico	Alcaloides y aminas	100 mL de etanol con 50 gotas de ácido nítrico (65%).	Calentar la placa 20 min (120°C). Se observa manchas fluorescentes a UV onda larga.
Cloruro Aluminio	Flavonoides	Cloruro aluminio (1% en etanol).	Fluorescencia amarilla a la luz UV onda larga.
Cloruro de hierro	Fenoles y Ácidos hidroxámicos	Cloruro de hierro (1,5% en ácido clorhídrico 0,5%).	Manchas visibles color: rojo (Ácido hidroxámicos) y azul o verde (Fenoles).
Folin-Ciocalteu	Fenoless	Solución I: carbonato de sodio (20% en agua). Solución II: solución reserva en 3 vol. agua.	Pulverizar sobre la placa solución I y luego II, se observa manchas negras visibles.
Hidróxido de potasio	Cumarinas Glucósidos de antraquinona	Hidróxido de potasio (5% en metanol).	Manchas visibles y a luz natural o luz UV onda larga.
Ninhidrina	Aminas Aminoácidos Aminoazucars	0,2 gr de Ninhidrina en 100 ml de etanol.	Calentar a 110°C y se observa manchas rojas visibles a luz natural.
Permanganato de potasio alcalino	Ácidos carboxílicos aromáticos	Solución a: permanganato potasio (1% en agua). Solución b: Carbonato de sodio (5% en agua). Mezclar ambos en vol. iguales.	Manchas fluorescentes en luz UV de onda larga.
Timol – ácido sulfúrico	Azúcares	Timol 0,5 gr en 95 mL de etanol + 5 ml de ácido sulfúrico concentrado.	Calentar placa por 15-20 min (120°C). Manchas rosadas visibles.
Dragendorff según Thies y Reuther modificada por Vágúfalvi	Alcaloides	Mezclar solución de reserva con 100 ml de ácido acético glacial y 240 mL de acetato de etilo.	Volver a pulverizar con ácido sulfúrico, se tornan manchas con fondo oscuro con manchas rojo - anaranjadas intenso.