

The Biologist (Lima), 2017, 15(1), jan-jun: 85-97.



The Biologist (Lima)



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

ACUTE AND CHRONIC TOXIC EFFECT OF *TAGETES MINUTA* "BLACK MINT" (ASTERACEAE) AND CARBARIL ON SIX IMPORTANT ENTOMOPHAGES IN BIOLOGICAL CONTROL

EFFECTO TÓXICO AGUDO Y CRÓNICO DE *TAGETES MINUTA* "HUACATAY" (ASTERACEAE) Y CARBARIL SOBRE SEIS ENTOMÓFAGOS DE IMPORTANCIA EN CONTROL BIOLÓGICO

José Iannacone^{1,2}; Lorena Alvarino¹; Angélica Guabloche¹; Karen Ventura¹; María Isabel La Torre¹; Mario Carhuapoma³ & Luz Castañeda¹

¹ Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA). Facultad de Ciencias Naturales y Matemática (FCNNM). Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV). El Agustino, Lima, Perú.

² Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma (URP). Santiago de Surco, Lima, Perú.

³ Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Lima, Perú.

ABSTRACT

Tagetes minuta L., commonly known in Peru as Black Mint (Asteraceae), is a nematicidal and insecticidal plant to which is attributed medicinal properties such as digestive, carminative and antiproductive. Carbaryl is a chemical compound belonging to the family of carbamates, used primarily as an insecticide. The objective of the present work was to evaluate the toxic effect of *T. minuta* and carbaryl on six entomophages of importance in biological control. Toxicity tests were performed for *Chrysoperla asoralis*, *Orius insidiosus*, *Geocoris callosulus*, *Trichogramma pretiosum*, *T. exiguum* and *T. pintoii*. Carbaryl showed a higher toxic effect on the six entomophages than *T. minuta*. An increased susceptibility to carbaryl was observed in larval mortality and non-hatching of *C. asoralis* eggs, and in the mortality of first instar nymphs and in adults of *O. insidiosus*. In contrast, for *T. minuta*, a higher mortality of first-stage and adult nymphs of *O. insidiosus*, and non-hatching of *C. asoralis* eggs was observed. The results in these six entomophages show a greater toxicity of carbaryl and *T. minuta* to the predators than to the parasitoids.

Keywords: biological control – botanical pesticides – parasitoids – predator

RESUMEN

Tagetes minuta, conocido comúnmente en Perú como Huacatay (Asteraceae), es una planta nematocida, insecticida y se le atribuyen propiedades medicinales como digestivo, carminativo y antiabortivo. El carbaril es un compuesto químico perteneciente a la familia de los carbamatos, empleado fundamentalmente como insecticida. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto tóxico de *T. minuta* y carbaril sobre seis entomófagos de importancia en control biológico. Las pruebas de toxicidad se realizaron para *Chrysoperla asoralis*, *Orius insidiosus*, *Geocoris callosulus*, *Trichogramma pretiosum*, *T. exiguum* y *T. pintoi*. El carbaril mostró un mayor efecto tóxico en los seis entomófagos que *T. minuta*. Se observó una mayor sensibilidad al carbaril en la mortandad larvaria y en la no eclosión de huevos de *C. asoralis*, y en la mortandad de ninfas de primer instar y en adultos de *O. insidiosus*. En cambio para *T. minuta*, se observó una mayor mortandad de ninfas de primer instar y en adultos de *O. insidiosus*, y en la no eclosión de huevos de *C. asoralis*. Los resultados en estos seis entomófagos evidencian una mayor toxicidad del carbaril y de *T. minuta* a los depredadores que a los parasitoides.

Palabras clave: control biológico – depredador – parasitoides – plaguicidas botánicos

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Tagetes* son plantas herbáceas que pertenecen a la familia Asteraceae, nativas de América, y de las cuales nueve pertenecen al Perú (Carhuapoma, 2011). Estas plantas tienen gran importancia industrial y biomédica, como ornamentales y en el rubro agrícola. Lo cual se debe a que presentan compuestos bioactivos con actividad bactericida, fungicida, nematocida e insecticida (Oduor-Owino & Waudo, 1994; Perich *et al.*, 1995; Pineda *et al.*, 2007; Roca *et al.*, 2009; Cofre, 2011; Politi *et al.*, 2012).

Tagetes minuta L., conocido comúnmente en Perú como Huacatay (quechua), es una hierba anual, de constitución erecta que puede alcanzar hasta 50 cm de alto; tiene hojas lanceoladas, dentadas y un olor fuerte. Es cultivada en la Costa, Sierra y en la Amazonía del Perú. Se utiliza como condimento e ingrediente indispensable en la preparación de muchas comidas de la gastronomía peruana. También se emplean sus hojas para extraer un aceite esencial utilizado en perfumería (Carhuapoma, 2011).

El huacatay puede ser usado como plaguicida, y se le atribuyen propiedades medicinales como digestivo, carminativo y antiabortivo (Vidal *et al.*, 2009; Grados & Peláez, 2012; Murga-Gutierrez *et al.*, 2012). La infusión de sus hojas se usa para aliviar los dolores gástricos, y la decocción de sus flores y hojas frescas para aliviar los catarros y bronquitis. Se han identificado compuestos principales bioactivos en el aceite esencial (Carhuapoma, 2011; Diaz-Cedillo *et al.*, 2013).

El carbaril es un compuesto químico perteneciente a la familia de los carbamatos, es usado fundamentalmente como insecticida, tiene acción de contacto e ingestión, y es recomendado en el control de insectos masticadores, minadores y chupadores (Milam *et al.*, 2005). Actúa al ser ingerido vía estómago o al ser absorbido por contacto directo por la plaga (Bhavan & Geraldine, 2009). El carbaril es uno de los tres insecticidas más utilizados en Estados Unidos, es un inhibidor de la colinesterasa y es muy tóxico para los humanos al ser clasificado como un potencial carcinógeno para los seres humanos por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) (Sanagoudra & Bhat, 2013). La estructura química del carbaril (1-naftilmetilcarbamato) es la indicada en la Figura 1:

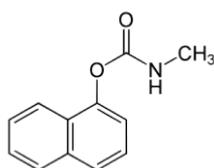


Figura 1. Estructura química del carbaril.

Es fundamental calcular el nivel de riesgo ambiental de *T. minuta* y del carbaril sobre insectos entomófagos del ambiente aéreo-terrestre usando bioensayos ecotoxicológicos (Brun *et al.*, 1983; Ahmed *et al.*, 2004; González-Zamora *et al.*, 2004; Bakolia *et al.*, 2008; Aly *et al.*, 2011). Con este objetivo fueron seleccionadas seis especies de entomófagos para llevar a cabo ensayos ecotoxicológicos:

Chrysoperla asoralis (Banks, 1915) (Neuroptera: Chrysopidae) es una especie depredadora perteneciente a la región Neotropical de importancia en el cultivo de espárrago (Gonzales & Reguillón, 2002; González *et al.*, 2009). En Perú, Colombia, México, Norteamérica y Europa ha sido utilizada para el control de plagas en hortalizas y frutales tanto en campo abierto como en invernadero. Actualmente se le considera como un agente biológico de importancia en el control de plagas agrícolas. Las condiciones climáticas del Perú, especialmente la costa (donde hay ausencia de lluvias y temperaturas favorables para las crisopas durante todo el año), hacen que este depredador tenga especial éxito (Iannacone *et al.*, 2009; Iannacone & Alvariano, 2010; Iannacone *et al.* 2014, 2015).

Orius insidiosus Say, 1832 (Hemiptera: Anthocoridae), es un depredador naturalizado importante de diferentes plagas económicas en algodón, en invernadero y en plantas ornamentales en el Perú. Se ha evaluado la toxicidad de varios plaguicidas sobre este chinche benéfico (Iannacone & Alvariano, 2010; Iannacone *et al.* 2014, 2015).

Geocoris callosulus Berg, 1878 (Hemiptera: Geocoridae), es un insecto omnívoro generalista. *Geocoris* spp. depreda en una amplia gama de insectos presa, que incluyen varias plagas de importancia económica en la agricultura (Schuman *et al.*, 2013; Iannacone *et al.*, 2014, 2015).

Trichogramma pretiosum Riley, 1879, *Trichogramma exiguum* Pinto & Platner, 1978 y *Trichogramma pintoii* Voegelé, 1982 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) son avispas microhimenópteras que se encuentran entre las especies más empleadas como parasitoides de huevos de plagas agrícolas en los programas de control biológico (García-González *et al.*, 2005;

Pratissoli *et al.*, 2005; España-Luna *et al.*, 2006; Sumer *et al.*, 2009; Buchori *et al.*, 2010) y se encuentran presentes en diversas zonas agroecológicas del Perú (Iannacone & Lamas, 2003a; Virgala & Botto, 2010).

Por ende, esta investigación pretende resolver la siguiente pregunta: ¿Existirá un efecto tóxico agudo y crónico de *T. minuta* “Huacatay” (Asteraceae) y del carbaril sobre seis entomófagos de importancia en control biológico?. De esta forma el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto tóxico agudo y crónico de *T. minuta* “Huacatay” (Asteraceae) y del carbaril sobre seis entomófagos de importancia en control biológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los bioensayos toxicológicos con *T. minuta* “huacatay” (Asteraceae) y carbaril sobre seis entomófagos de importancia en control biológico, se realizaron en el Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA), Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad Nacional Federico Villarreal, Distrito del Agustino, Lima, Perú.

Diseño experimental

Las pruebas de toxicidad aguda para *C. asoralis*, *O. insidiosus*, *G. callosulus*, *T. pretiosum*, *T. exiguum* y *T. pintoii* se emplearon para *T. minuta* y carbaril en un diseño factorial en bloque completamente aleatorizado (DBCA) de seis (concentraciones) x seis (especies) x cuatro (repeticiones). *C. asoralis* presentó también pruebas con la eclosión de los huevos, a las mismas concentraciones que las pruebas agudas. *T. pretiosum*, *T. exiguum* y *T. pintoii* presentaron ensayos crónicos de emergencia de adultos a las mismas concentraciones que las pruebas de mortandad aguda. Los criterios de selección de las concentraciones empleadas siguieron a Iannacone & Lamas (2003b).

Material químico

Carbaril. (CAS = 63-25-2). La formulación de Polvo mojable (WP) del carbaril (C₁₂H₁₁NO₂, PM = 201,23) empleada fue representativa del mercado Nacional Peruano (Carvadin 85, 485-96-AG-SENASA). El carbaril o 1-naftilo-metilcarbamato, presenta una toxicidad aguda oral en ratas de DL₅₀ =

650 mg·Kg⁻¹, Categoría III, Ligeramente Peligroso. DL₅₀ dermal aguda (conejos): > 2000 mg·Kg⁻¹, Categoría III, Ligeramente Peligroso. Densidad: 1,23 Kg·L⁻¹ (20 °C). Solubilidad en agua: 120 mg·L⁻¹ (a 20 °C). Presión de vapor: 4,1 x 10⁻⁵ Pa (a 23,5 °C). Coeficiente de Log K_{ow} 1,85. El carbaril es tóxico para las abejas. Se prepararon mezclas del insecticida carbaril en agua, en las siguientes concentraciones: 531,25; 1062,5; 2125; 4250 y 8500 mg·L⁻¹.

Material biológico

Tagetes minuta. La especie se seleccionó debido a los antecedentes del género para el control de plagas (Russo *et al.*, 2005; Camarillo *et al.*, 2009; Vidal *et al.*, 2009; Barajas *et al.*, 2011; Espitia, 2011). Las hojas de huacatay se emplearon para la preparación de los extractos acuosos crudos. Las muestras botánicas se obtuvieron de Mercados de Lima Metropolitana, Perú. Luego, las hojas fueron secadas en estufa a 40°C durante 48 h, hasta obtener un peso seco constante. Posteriormente las hojas fueron trituradas en un mortero. La preparación de los extractos crudos se realizaron con agua embotellada (Cielo®). Se obtuvieron extractos acuosos crudos al 20%, en una proporción de 20 g por 100 mL de agua embotellada, macerando por 24 h para la extracción de los compuestos hidrosolubles (Iannacone & Lamas, 2003b), y se filtraron a través de un papel filtro (Whatman® N°1). Finalmente se prepararon las siguientes cinco concentraciones en orden creciente (12500, 25000, 50000, 100000 y 200000 mg PS·L⁻¹ de *T. minuta*) más el control, mezclando con agua embotellada (Iannacone & Lamas, 2003b).

Chrysoperla asoralis: Las condiciones de cría para los crisópidos para la obtención de huevos y larvas siguió lo descrito por Iannacone & Lamas (2002). Para los bioensayos, fueron empleados huevos de menos de 48 h y larvas de primer instar de menos de 24 h. Las larvas fueron criadas y alimentadas *ad libitum* con huevos de *Sitotroga cerealella* (Olivier, 1819), pegados en cartulinas de 6 x 6 mm. Las larvas fueron criadas hasta el primer instar de desarrollo y se emplearon cohortes de especímenes de menos de 24 h. Se escogió este instar debido a que en bioensayos ecotoxicológicos previos se observó que era el estado más sensible (Iannacone & Lamas, 2002; Iannacone *et al.* 2014, 2015). Ecotoxicidad por inmersión (ensayo de eclosión de huevos)- Se realizaron las aplicaciones en huevos

de *Chrysoperla* por inmersión durante 5 s, en las mezclas seleccionadas de huacatay y carbaril y en agua embotellada (grupo control). Después de la inmersión, los huevos fueron colocados en papel Tissue® por 10 min para absorber lo restante de las soluciones acuosas y permitir el secado a temperatura ambiente. Se trataron 20 huevos por cada concentración (5 especímenes por cada una de las cuatro repeticiones). Los huevos fueron individualizados en envases de plástico de 8 mL de capacidad. Después de las aplicaciones tópicas, los envases de plástico se mantuvieron en oscuridad bajo condiciones de cría, realizándose las lecturas hasta la eclosión de los huevos (~120 h) (Iannacone *et al.*, 2014, 2015).

Ecotoxicidad por contacto-residual (ensayo de mortandad larvaria)- Estos ensayos se llevaron a cabo para las larvas de primer instar de menos de 24 h. Las sustancias químicas se mezclaron en agua embotellada y se aplicaron en envases de plástico (500 L por cada envase de plástico de 12 mL de capacidad). En cada envase de plástico se esparció homogéneamente en sus paredes y base, con la ayuda de un hisopo de base de madera, los µL determinados de la sustancia química colocada en su interior y posteriormente se permitió el secado de los envases a temperatura ambiente durante 2 h. Posteriormente, en el interior de cada uno de los envases ya secos, se depositó una larva de primer instar. Se consideraron un total de 40 larvas por concentración. Los envases de plástico se mantuvieron en condiciones de cría y oscuridad y se observó la mortandad acumulada a 48 h de exposición (Iannacone *et al.*, 2014, 2015).

Mortandad de *C. asoralis*: se consideraron muertos los individuos que no realizaron ningún movimiento coordinado en el envase durante 15 s de observación al microscopio estereoscópico a 10 x de aumento, con la ayuda de un alfiler entomológico. Las pruebas de sensibilidad se realizaron bajo condiciones de oscuridad, para evitar el efecto de la fotólisis.

Orius insidiosus, *Geocoris callosulus*, *Trichogramma pretiosum*, *T. exiguum* y *T. pintoi*: fueron obtenidos de colonias mantenidas por el Programa Nacional de Control Biológico-Servicio Nacional de Sanidad Agraria (PNCB-SENASA), Lima, Perú. Las dos especies de chinches y los tres Trichogrammatidos fueron criados en el

laboratorio con huevos de *S. cerealella*. Las condiciones de temperatura para estas especies fueron de 22 ± 3 °C (Iannacone *et al.*, 2011). Los ensayos de contacto residual se llevaron a cabo para las ninfas y adultos de *O. insidiosus* y *G. callosulus*, y solo para los adultos de *T. pretiosum*, *T. exiguum* y *T. pintoii*. Los envases de plástico de 8 mL fueron cubiertos con una tapa de algodón, a los que se les agregó 250 L de cada una de las concentraciones acuosas con la ayuda de una pipeta automática y luego con un hisopo se esparcieron homogéneamente sobre la superficie interna del envase. Posteriormente se permitió el secado de los viales a temperatura ambiente durante 2 h con sus respectivos tapones de algodón. Los experimentos se realizaron con cohortes de ninfas de primer instar y con adultos según especie con menos de 24 h de emergidos y no alimentados antes del bioensayo. Se emplearon individuos machos y hembras al azar, tomados de los frascos de emergencia de adultos de *O. insidiosus*, *G. callosulus*, *T. pretiosum*, *T. exiguum* y *T. pintoii*.

Para cada una de las pruebas se utilizaron 240 individuos, empleando 40 organismos por cada una de las seis concentraciones y 10 por repetición, los cuales se consideraron muertos cuando no se posaron sobre el vial de vidrio y se encuentran con las patas dirigidas hacia arriba, durante 10 s de observación al microscopio estereoscópico (Iannacone *et al.*, 2003a). El tratamiento control consistió en agua embotellada. Se utilizaron cuatro repeticiones (1 envase = 1 repetición) por tratamiento. Se condujeron ensayos de toxicidad aguda estáticos de residuos bajo oscuridad. Los envases se mantuvieron en condiciones de cría y oscuridad y se observó la mortandad acumulada a diferentes h de exposición, hasta 48 h. Las lecturas se continuaron siempre y cuando la mortandad en el control no fue mayor al 10 % y éstas se corrigieron con la fórmula de Abbott. Este bioensayo siguió lo señalado por Iannacone & Lamas (2003a).

Los ensayos de aplicaciones tópicas para los huevos parasitados de *S. cerealella* con los trichogrammatidos se realizaron según lo indicado por Iannacone *et al.* (2011). Las aplicaciones de los insecticidas y agua embotellada, se hicieron usando huevos de *S. cerealella* parasitados por *T. pretiosum*, *T. exiguum* y *T. pintoii*, adheridos a pequeños cuadrados de cartulina de 6 x 6 mm y

durante 5 s se sumergieron con las sustancias acuosas en placas Petri de plástico. Después de la inmersión, los huevos parasitados se colocaron en papel Tissue® durante 10 min para absorber el exceso de las soluciones acuosas y se dejaron secar a temperatura ambiente por 2 h. Los porcentajes de emergencia de *T. pretiosum*, *T. exiguum* y *T. pintoii* se calcularon contando el número de huevos adheridos a una cartulina de *S. cerealella*, dividiéndolo entre el número de huevos parasitados (Iannacone *et al.*, 2014, 2015).

Tratamiento de datos

En todos los casos, la eficacia de los tratamientos y las repeticiones se evaluaron a través de un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías con prueba complementaria de significancia de Tukey. Los datos fueron previamente normalizados (transformación de los datos a raíz cuadrada del arcoseno). La Concentración letal media (CL_{50}) y la Concentración Efectiva media (CE_{50}) se calcularon usando el programa computarizado Probit versión 1,5.

El modelo de regresión fue verificado usando el estadístico Chi-cuadrado (X^2) y el coeficiente de determinación (r^2). Se calculó el cociente comparativo (CC) mediante la siguiente fórmula: $CC = \text{Cociente comparativo} = CL(E)_{50} \text{ Tagetes minuta} / CL(E)_{50} \text{ carbaril}$. Este índice fue empleado para determinar la toxicidad relativa del extracto de planta biocida *T. minuta* versus el químico sintético carbaril en ensayos agudos y crónicos para los seis entomófagos. Se empleó el paquete estadístico SPSS, versión 21 para Windows XP para el cálculo de los estadísticos descriptivos e inferenciales a un nivel de significancia de $p \leq 0,05$.

Aspectos éticos

Los procedimientos experimentales con los seis entomófagos siguieron las pautas de la "Institutional Animal Care and Use Committee" (IACUC) (APA, 2012), minimizando el número de los organismos empleados, repeticiones y empleando las tres Rs "Rs-reemplazamiento, reducción, y refinamiento" (Mukerjee, 1997).

RESULTADOS

La Tabla 1 muestra el efecto del carbaril y de *T. minuta* sobre la mortandad de larvas de primer

instar a 48 h de exposición y de no eclosión de huevos a 144 h de exposición de *C. asoralis*. El carbaril mostró un mayor efecto que *T. minuta* sobre *C. asoralis*. En el caso del carbaril se observó un mayor efecto tóxico en la mortandad larvaria que en la no eclosión de huevos de *C. asoralis*. En cambio *T. minuta* resultó ser más tóxica en la no

eclosión de huevos que en la mortandad larvaria de *C. asoralis*.

La Tabla 2 muestra el efecto del carbaril y de *T. minuta* sobre la mortandad de ninfas de primer instar y de adultos de *O. insidiosus* a 48 h de exposición. El carbaril mostró un mayor efecto que

Tabla 1. Toxicidad del carbaril y *Tagetes minuta* sobre la mortandad de larvas de primer instar (%) a 48h de exposición y de no eclosión de huevos (%) a 144h de exposición en *Chrysoperla asoralis*.

mg IA L ⁻¹ carbaril	<i>Chrysoperla</i> <i>asoralis</i> larvas mortandad	<i>Chrysoperla</i> <i>asoralis</i> huevos no eclosión	mg PS L ⁻¹ <i>Tagetes minuta</i>	<i>Chrysoperla</i> <i>asoralis</i> larvas mortandad	<i>Chrysoperla</i> <i>asoralis</i> huevos no eclosión
Control	0a	0a	Control	0a	0a
531,25	65b	47,1b	12500	0a	17,7b
1062,5	75b	70,6c	25000	0a	29,4bc
2125	100c	88,2c	50000	0a	41,1c
4250	100c	100d	100000	10ab	52,9cd
8500	100c	100d	200000	15b	64,7d
CL(E) ₅₀	617,1	869,4		ND	77161
CL(E) ₅₀ inferior	191,3	217,6		ND	25688
CL(E) ₅₀ superior	1122	1705,6		ND	ND
X ²	415,5	375		16,37	40,84
p	0,0001	0,0001		0,011	0,0001
r ²	0,40	0,46		0,01	0,06

PS = peso seco. IA = Ingrediente activo. CL₅₀ = Concentración letal media. CE₅₀ = Concentración efectiva media. X² = Valor de la prueba de Chi-cuadrado. p = significancia. r² = coeficiente de determinación de la ecuación de regresión. Letras iguales en una misma columna indican que los promedios son estadísticamente iguales según la prueba de tukey (P>0,05). ND = No determinado.

Tabla 2. Toxicidad del carbaril y *Tagetes minuta* sobre la mortandad de ninfas de primer instar y de adultos (%) a 48h de exposición en *Orius insidiosus*.

mg IA L ⁻¹ carbaril	<i>Orius</i> <i>insidiosus</i> ninfas mortandad	<i>Orius</i> <i>insidiosus</i> adultos mortandad	mg PS L ⁻¹ <i>Tagetes minuta</i>	<i>Orius</i> <i>insidiosus</i> ninfas mortandad	<i>Orius</i> <i>insidiosus</i> adultos mortandad
Control	0a	0a	Control	0a	0a
531,25	61,3b	54,8b	12500	81,25b	75b
1062,5	67,7b	54,8b	25000	87,5bc	81,25b
2125	80,6bc	67,7b	50000	93,75bc	87,5bc
4250	93,6c	100c	100000	93,75bc	93,75bc
8500	100c	100c	200000	100c	100c
CL ₅₀	921,6	1154		8290	12525
CL ₅₀ inferior	659	971		ND	9093
CL ₅₀ superior	1359	7652		23487	27139
X ²	251,1	319,3		208	216
p	0,0001	0,0001		0,0001	0,0001
r ²	0,34	0,41		0,29	0,37

PS = peso seco. IA = Ingrediente activo. CL₅₀ = Concentración letal media. CE₅₀ = Concentración efectiva media. X² = Valor de la prueba de Chi-cuadrado. p = significancia. r² = coeficiente de determinación de la ecuación de regresión. Letras iguales en una misma columna indican que los promedios son estadísticamente iguales según la prueba de tukey (P>0,05). ND = No determinado.

T. minuta sobre *O. insidiosus*. En el caso del carbaril y de *T. minuta* se observó un mayor efecto tóxico en la mortandad de ninfas de primer instar que en adultos de *O. insidiosus*.

La Tabla 3 muestra el efecto del carbaril y de *T. minuta* sobre la mortandad de ninfas de primer instar y de adultos a 48 h de exposición de *G. callosulus*. El carbaril mostró un mayor efecto que *T. minuta* sobre *G. callosulus*. En el caso del carbaril y de *T. minuta* se observó un mayor efecto

tóxico en la mortandad de ninfas de primer instar que en adultos de *O. insidiosus*.

La Tabla 4 muestra el efecto del carbaril sobre la mortandad de adultos a 48h de exposición y de no emergencia de adultos (%) a 144h de exposición de *T. pretiosum*, *T. exiguum* y *T. pintoii*. El carbaril mostró un mayor efecto sobre la mortandad de adultos de *T. pintoii* y de no emergencia de adultos de *T. pretiosum*.

Tabla 3. Toxicidad del carbaril y *Tagetes minuta* sobre la mortandad de ninfas de primer instar y de adultos (%) a 48h de exposición en *Geocoris callosulus*.

mg IA L ⁻¹ carbaril	<i>Geocoris callosulus</i> ninfas mortandad	<i>Geocoris callosulus</i> adultos mortandad	mg PS L ⁻¹ <i>Tagetes minuta</i>	<i>Geocoris callosulus</i> ninfas mortandad	<i>Geocoris callosulus</i> adultos mortandad
Control	0a	0a	Control	0a	0a
531,25	20b	20b	12500	0a	20b
1062,5	40bc	20bc	25000	20b	20b
2125	60c	40c	50000	40bc	40bc
4250	100d	60cd	100000	40bc	40bc
8500	100d	80d	200000	60c	60c
CL ₅₀	1616	1969		146260	144562
CL ₅₀ inferior	1174	1330		74942	82076
CL ₅₀ superior	2316	3107		ND	695463
X ²	436	439		117,5	83,4
p	0,0001	0,0001		0,0001	0,0001
r ²	0,52	0,51		0,17	0,12

PS = peso seco. IA = Ingrediente activo. CL₅₀ = Concentración letal media. CE₅₀ = Concentración efectiva media. X² = Valor de la prueba de Chi-cuadrado. p = significancia. r² = coeficiente de determinación de la ecuación de regresión. Letras iguales en una misma columna indican que los promedios son estadísticamente iguales según la prueba de tukey (P>0,05).

La Tabla 4 muestra el efecto del carbaril sobre la mortandad de adultos a 48h de exposición y de no emergencia de adultos (%) a 144h de exposición de *T. pretiosum*, *T. exiguum* y *T. pintoii*. El carbaril mostró un mayor efecto sobre la mortandad de adultos de *T. pintoii* y de no emergencia de adultos de *T. pretiosum*.

La Tabla 5 muestra el efecto de *T. minuta* sobre la mortandad de adultos a 48h de exposición y de no emergencia de adultos (%) a 144h de exposición de *T. pretiosum*, *T. exiguum* y *T. pintoii*. *T. minuta* mostró un mayor efecto sobre la mortandad de adultos de *T. exiguum* y de no emergencia de adultos de *T. pintoii*.

Tabla 5. Toxicidad de *Tagetes minuta* sobre la mortandad de adultos (%) a 48h de exposición y de no emergencia de adultos (%) a 144h de exposición en *Trichogramma pretiosum*, *Trichogramma exiguum* y *Trichogramma pintoii*.

mg PS L ⁻¹ <i>Tagetes minuta</i>	<i>T. pretiosum</i> adulto	<i>T. exiguum</i> adulto	<i>T. pintoii</i> adulto	<i>T. pretiosum</i> no emergidos	<i>T. exiguum</i> no emergidos	<i>T. pintoii</i> no emergidos
Control	0a	0a	0a	0a	0a	0a
6250	0a	0a	20b	0a	1,8a	8,9a
12500	0a	0a	25b	6,1ab	10,7ab	20,9b
25000	0a	0a	25b	15,3b	23,5b	29,6b
50000	0a	0a	30bc	18,4b	36,2bc	36,4bc
100000	11,1a	0a	35c	35,7c	28,6b	38,1bc
200000	33,3b	20b	40c	45,9c	46,4c	50,2c
CL(E) ₅₀	228255	214823	229052	185710	186080	179470
CL(E) ₅₀ inferior	207725	199999	122634	156210	163540	138520
CL(E) ₅₀ superior	257094	ND	ND	215210	208630	220430
X ²	121	81,5	28,6	145	139	152
p	0,0001	0,0001	0,0001	0,001	0,001	0,001
r ²	0,51	0,11	0,04	0,58	0,89	0,84

PS = peso seco. IA = Ingrediente activo. CL₅₀ = Concentración letal media. CE₅₀ = Concentración efectiva media. X² = Valor de la prueba de Chi-cuadrado. p = significancia. r² = coeficiente de determinación de la ecuación de regresión. Letras iguales en una misma columna indican que los promedios son estadísticamente iguales según la prueba de tukey (P>0,05).

La Tabla 6 nos señala los valores del Cociente Comparativo (CC) de la toxicidad de *T. minuta* y del carbaril sobre seis entomófagos de importancia en control biológico. Los tres valores más altos del

CC fueron para *C. asoralis* para la mortandad larvaria y no eclosión de huevos, y para mortandad de las ninfas de *G. callosulus*.

Tabla 6. Cociente comparativo de la toxicidad de *Tagetes minuta* y del carbaril sobre seis entomófagos de importancia en control biológico. CC= Cociente comparativo = CL(E)₅₀ *Tagetes minuta* / CL(E)₅₀ carbaril.

Entomófago	Estado de desarrollo	Parámetro	CC
<i>Chrysoperla asoralis</i>	Larva	Mortandad	324,1
<i>Chrysoperla asoralis</i>	Huevo	no eclosión	88,75
<i>Orius insidiosus</i>	Ninfa	Mortandad	8,99
<i>Orius insidiosus</i>	Adulto	Mortandad	10,85
<i>Geocoris callosulus</i>	Ninfa	Mortandad	90,50
<i>Geocoris callosulus</i>	Adulto	Mortandad	73,41
<i>Trichogramma pretiosum</i>	Adulto	Mortandad	27,28
<i>Trichogramma pretiosum</i>	Huevo	no emergencia	47,83
<i>Trichogramma exiguum</i>	Adulto	Mortandad	32,14
<i>Trichogramma exiguum</i>	Huevo	no emergencia	45,56
<i>Trichogramma pintoii</i>	Adulto	Mortandad	67,72
<i>Trichogramma pintoii</i>	Huevo	no emergencia	25,99

Se observó una mayor sensibilidad al carbaril en la mortandad larvaria y en la no eclosión de huevos de *C. asoralis*, y en la mortandad de ninfas de primer instar y en adultos de *O. insidiosus* (Tablas 1 al 5).

En cambio para *T. minuta*, se vio una mayor mortandad de ninfas de primer instar y en adultos de *O. insidiosus*, y en la no eclosión de huevos de *C. asoralis* (Tablas 1 al 5).

DISCUSIÓN

Se observó en general que el carbaril mostró una mayor toxicidad sobre los seis entomófagos de importancia en el control biológico en comparación al insecticida botánico *T. minuta*. Grdiša & Gršić (2013) señalan que los insecticidas botánicos como *T. minuta* presentan una rápida degradación a la luz solar, carencia de persistencia, selectividad a organismos no destinatarios, carencia de bioacumulación en el ambiente, y modos de acción alternativos por los diferentes metabolitos secundarios (Sarkar & Kshirsagar, 2014; Arnason *et al.*, 2016; Pavela, 2016). Sin embargo, no son ampliamente usados como agentes de control de plagas, pero son reconocidos por los productores de cultivos orgánicos en los países industrializados, y pueden jugar un rol importante la protección postcosecha de cultivos alimenticios en los países en desarrollo (El-Wakeil, 2013). Por ende, es concordante que el insecticida botánico *T. minuta* presentó valores según los CC entre 8,99 a 324,1 veces menos sensible al carbaril. *T. minuta* sigue siendo una opción en la protección de cultivos y en el manejo de plagas agrícolas insectiles (Grdiša & Gršić, 2013).

El carbaril resultó ser más tóxico en la mortandad larvaria y en la no eclosión de huevos de *C. asoralis*, y en la mortandad de ninfas de primer instar y en adultos de *O. insidiosus*. Los resultados en estos entomófagos evidencian una mayor toxicidad del carbaril a los depredadores que a los parasitoides. El carbaril es un potente plaguicida y es conocido por ser una toxina nerviosa y por presentar un mecanismo de acción sobre la AChE (Acetilcolinesterasa) (Boran *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2010).

Michaud & Grant (2003) han encontrado una alta toxicidad al carbaril sobre varias especies de controladores biológicos depredadores como los coccinélidos *Curinus coeruleus* Mulsant, 1850, *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus, 1763), *Harmonia axyridis* (Pallas, 1772), *Olla v-nigrum* (Mulsant, 1866) y sobre el neuróptero *Chrysoperla rufilabris* (Burmeister, 1839) inclusive a 1/100 de la dosis de uso de este insecticida en el cultivo de cítricos. En el caso del segundo instar ninfal del depredador *O. insidiosus* se observó a la dosis de uso y a 1/100 de la dosis de uso del carbaril, 95,6% y 28,6% de

mortandad, respectivamente. Para el parasitoide *Aphytis melinus* DeBach, 1959, se observó a la dosis de uso y a 1/100 de la dosis de uso del carbaril, 100% y 0% de mortandad. Estos últimos resultados corroboran lo encontrado en esta investigación que los entomófagos depredadores son más sensibles que los parasitoides al carbaril.

En el abejorro polinizador *Bombus terrestris* Linnaeus, 1758 se ha observado que el carbaril en productos formulados ocasiona altas mortandades en el ensayo de toxicidad oral aguda, pero no fue significativo en la mortandad para el ensayo de contacto agudo (Marletto *et al.*, 2003). Lima *et al.* (2010) encontraron un aumento en los efectos deletéreos del carbaril sobre la lombriz de tierra *Eisenia andrei* Bouché, 1972 (Oligochaeta). Yasmin & D'Souza (2010) han encontrado efectos en la reproducción de *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). En contraste al presente estudio que mostró alta toxicidad del carbaril a diferentes entomófagos del control biológico; en las larvas y en las obreras del polinizador *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 se ha observado un bajo riesgo por acción del carbaril (Sánchez-Bayo & Goka, 2014).

Tagetes minuta ocasionó una mayor mortandad de ninfas de primer instar y en adultos de *O. insidiosus*, y en la no eclosión de huevos de *C. asoralis*. Los resultados en estos tres entomófagos evidencian una mayor toxicidad de *T. minuta* a los depredadores que a los parasitoides. A la fecha, no se tiene información publicada sobre el efecto tóxico de *T. minuta* sobre organismos no objetivos del control de plagas. Desde punto de vista fitoquímico, *T. minuta* es rica en metabolitos secundarios, incluyendo monoterpenos, sesquiterpeno, flavonoides y compuestos tiofenoles responsables de la bioactividad mostrada sobre diferentes organismos (Lovatto *et al.*, 2013).

Se tienen trabajos sobre el efecto de los aceites esenciales de *T. minuta* en el gorgojo *Sitophilus zeamais*, atribuyendo sus efectos tóxicos a las cetonas como la *cis-B-Ocimene* y a la (E)-*Ocimene* que son sus principales constituyentes (Iannacone *et al.*, 2008; Herrera *et al.*, 2014). Posiblemente estos mismos compuestos tengan efecto sobre *O. insidiosus*, y *C. asoralis*. Efectos de toxicidad de los extractos *T. minuta* y *Tagetes* spp. se han realizado sobre las especies de pulgones *Aphis*

gossypii Glover, 1877, *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758), *Hyperomyzus lactucae* (Linnaeus, 1758) y *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas, 1878) (Russo et al., 2005; Lovatto et al., 2013; Solis-Aguilar et al., 2015). Murga-Gutiérrez et al. (2012) señalan que el follaje de *T. minuta* adicionado como enmienda orgánica al suelo de cultivo de *Capsicum annum* Linnaeus disminuye la nodulación radicular por *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, sugiriendo un uso potencial en el control de este nematodo.

Lovatto et al. (2013) argumentan que las investigaciones han demostrado que hay variaciones en la composición química de *T. minuta*, de acuerdo con el lugar de colección de la planta, fase fenológica, diferentes partes de la planta, y quimiobiotipos de la especie, por lo que la bioactividad de *T. minuta* es de acuerdo a las particularidades ambientales de cada región.

Se requieren realizar ensayos ecotoxicológicos con carbaril y *T. minuta* en escarabajos controladores de la familia Coccinellidae. También se deben efectuar ensayos ecotoxicológicos con carbaril y *T. minuta* en polinizadores de la familia Apidae. Es importante llevar a cabo bioensayos con carbaril y *T. minuta* en dípteros de la familia Syrphidae.

El carbaril mostró un mayor efecto tóxico en los seis entomófagos que *T. minuta*. Se observó una mayor sensibilidad al carbaril en la mortandad larvaria y en la no eclosión de huevos de *C. asoralis*, y en la mortandad de ninfas de primer instar y en adultos de *O. insidiosus*. Para *T. minuta*, se vio una mayor mortandad de ninfas de primer instar y en adultos de *O. insidiosus*, y en la no eclosión de huevos de *C. asoralis*. Los seis entomófagos evidencian una mayor toxicidad del carbaril y de *T. minuta* a los depredadores que a los parasitoides. El presente trabajo constituye la primera investigación que evalúa el efecto tóxico agudo y crónico de *T. minuta* “Huacatay” (Asteraceae) y carbaril sobre seis entomófagos de importancia en control biológico en el Perú: *C. asoralis*, *O. insidiosus*, *G. callosulus*, *T. pretiosum*, *T. exiguum* y *T. pintoii*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, S.; Rasool, M.R. & Rauf, I.I. 2004. Comparative efficacy of some insecticides against *Helicoverpa armigera* Hub. And *Spodoptera* spp. on tobacco. International Journal of Agriculture & Biology, 6: 93-95.
- Aly, M.Z.Y.; Soliman, M.M.M.; Mohamed, E.E.E.; Dahi, H.F. & Salem, S.A.R. 2011. Assessments the toxic effects of entomopathogenic bacterium, *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, and methomyl insecticide on larval of the greater sugarcane borer; *Sesamia cretica* (Lederer). Egyptian Academia Journal of Biological Sciences, 3: 1-9.
- APA (American Psychological Association). 2012. *Guidelines for ethical conduct in the care and use of nonhuman animals in research*. July 2012. Washington. 14 p.
- Arnason, J.T.; Sims, S.R. & Scott, I.M. 2016. *Natural products from plants as insecticides. Phytochemistry and Pharmacognosy*. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). En: <http://www.eolss.net/sample-chapters/c06/e6-151-13.pdf> leído el 8 de octubre del 2016.
- Bakolia, P.; Karadima, C.; Rouvalis, A. & Iliopoulou-Georgudaki, J. 2008. Acute toxicity evaluation of insecticides used in potato cultures with the use of bioassays. Fresenius Environmental Research, 17: 1002-1006.
- Barajas, P.J.S.; Montes-Belmont, R.; Castrejón, A.F.; Flores-Moctezuma, H.E. & Serrato, C.M.A. 2011. Propiedades antifúngicas em espécies del género *Tagetes*. Revista Mexicana de Micología, 34: 85-91.
- Bhavan, P.S. & Geraldine, P. 2009. Manifestation of carbaryl toxicity on soluble protein and histopathology in the hepatopancreas and gills of the prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*. Journal of Environmental Biology, 30: 533-538.
- Boran, M.; Altinok, U.; Çapkin, E.; Karaçam, H. & Biçer, V. 2007. Acute toxicity of carbaryl, methiocarb, and carbosulfan to the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and guppy (*Poecilia reticulata*). The Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 31: 39-45.

- Brun, L.O.; Chazeau, J. & Edge, V.E. 1983. Toxicity of four insecticides to *Phytoseiulus macropilis* (Banks) and *P. persimilis* Athias-Henriot (Acarina: Phytoseidae). Journal of Australian Entomology Society, 22: 303-305.
- Buchori, D.; Meilin, A.; Hidayat, P. & Sahari, B. 2010. Species distribution of *Trichogramma* and *Trichogrammatoidea* genus (Trichogrammatidae: Hymenoptera) in Java. Journal of International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences, 16: 83-96.
- Camarillo, R.G.; Ortega, A.L.D.; Serrato, C.M.A. & Rodríguez, H.C. 2009. Actividad biológica de *Tagetes filifolia* (Asteraceae) en *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). Revista Colombiana de Entomología, 35: 177-184.
- Carhuapoma, Y.M. 2011. *Plantas aromáticas nativas del Perú. Biocomercio de fragancias, sabores y fitocosméticos*. Editorial CONCYTEC. Lima - Perú. 238 p.
- Cofre, S.D.C. *Determinación de la actividad insecticida y/o anti alimentaria del aceite esencial de Tzinsu Tagetes minuta en Drosophila melanogaster*. Tesis de Grado previa la obtención del Título de Bioquímico Farmacéutico. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Ribamba-Ecuador.
- Díaz-Cedillo, F.; Serrato-Cruz, M.A.; Cruz-Marcial, J.; Sánchez-Alonso, M.G. & López-Morales, V. 2013. Compuestos mayoritarios del aceite esencial en órganos de una población de *Tagetes coronopifolia* Willd. Revista Fitotecnia Mexicana, 36: 405-411.
- El-Wakeil, N.E. 2013. Botanical pesticides and their mode of action. Gesunde Pflanzen, 65: 125-149.
- España-Luna, M.P.; Alvarado-Gómez, O.G.; González-Hernández, A.; Favela-Lara, S.; Lozano-Gutierrez, J. & García-González, F. 2006. Diferenciación genética de especies crípticas de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Folia Entomologica Mexicana, 45: 283-290.
- Espitia, Y.C.R. 2011. Evaluación de la actividad repelente e insecticida de aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas (*Cymbopogon citratus* y *Tagetes lucida*) utilizados contra *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). Tesis presentada para optar el Título de Magister en Toxicología. Universidad Nacional de Colombia.
- García-González, F.; González-Hernández, A. & España-Luna, M.P. 2005. Especies de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) presentes en centros de reproductores de México. Acta Zoológica Mexicana, 21: 125-135.
- González, O.E.V. & Reguillón, C. 2002. A new species of *Chrysoperla* (Neuroptera: Chrysopidae) from Argentina. Revista de la Sociedad Entomologica Argentina, 61: 47-50.
- González, O.E.V.; Lanati, S.J. & Heredia, J.F. 2009. Morfología y datos biológicos de los estados preimaginales de *Chrysoperla asoralis* (Neuroptera: Chrysopidae). Acta Zoológica Lilloana, 53: 21-28.
- González-Zamora, J.E.; Leira, D.; Bellido, M.J. & Avilla, C. 2004. Evaluation of the effect of different insecticides on the survival and capacity of *Eretmocerus mundus* Mercet to control *Bemisia tabaci* (Gennadius) populations. Crop Protection, 23: 611-618.
- Grados, M.V. & Peláez, F.P. 2012. Especies vegetales utilizadas por pobladores de Berlín, Bagua Grande (Amazonas, Perú) 2011-2012. Rebiolest, 2: e36.
- Grdiša, M. & Gršić, K. 2013. Botanical insecticide in plant protection. Agriculturae Conspectus Scientificus, 78: 85-93.
- Herrera, J.M.; Zunino, M.P.; Massuh, Y.; Pizzollito, R.P.; Dambolena, J.S.; Gañan, N.A. & Zygadlo, J.A. 2014. Fumigant toxicity of five essential oils rich in ketones against *Sitophilus zeamais* (Motschulsky). Agriscientia, 31: 35-41.
- Iannacone, J. & Lamas, G. 2002. Efecto de dos extractos botánicos y de un insecticida convencional sobre el depredador *Chrysoperla externa*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica), 65: 92-101.
- Iannacone, J. & Lamas, G. 2003a. Efectos toxicológicos de extractos de molle (*Schinus molle*) y lantana (*Lantana camara*) sobre *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae), *Trichogramma pintoii*

- (Hymenoptera: Trichogrammatidae) y *Copidosoma koehleri* (Hymenoptera: Encyrtidae). Agricultura Técnica (Chile), 63: 347-360.
- Iannacone, J. & Lamas, G. 2003b. Efecto insecticida de cuatro extractos botánicos y del cartap sobre la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae), en el Perú. Entomotropica, 18: 95-105.
- Iannacone, J.; Wong, Y.S.; Alcantara, P. & Rodriguez, R. 2008. Actividad Insecticida y repelente de plantas en el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais*. Revista Scientia, 146-154.
- Iannacone, J.; Alvariano, L. & Paredes, C. 2009. Evaluación del riesgo ambiental del arseniato de plomo en bioensayos con ocho organismos no destinatarios. Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, 4: 73-82.
- Iannacone, J. & Alvariano, L. 2010. Toxicidad de *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) a cuatro controladores biológicos de palgas agrícolas en el Perú. Acta Zoológica Mexicana, 26: 603-615.
- Iannacone, J.; Alvariano, L.; Paredes, C.; Alayo, M.; Mamani, N.; Bonifacio, J.; Mariano, M. & Miglio, M.C. 2011. Evaluación del riesgo ambiental de carbofurano en bioensayos con organismos no blanco. Acta Toxicologica Argentina, 19: 19-31.
- Iannacone, J.; Ayala, H.; alvariano, L.; Paredes, C.; Villegas, W.; Alomia, J.; Santos, S.; Nolazco, N. & Cruces, L. 2014. Riesgo ecotoxicológico acuático y terrestre del bioplaguicida catahua, *Hura crepitans* (Euphorbiaceae). Revista de Toxicología, 30: 50-62.
- Iannacone, J.; Alvariano, L.; La Torre, M.I.; Guabloche, A.; Ventura, K.; Chero, J.; Cruces, C.; Romero, S.; Tuesta, E.; Saez, G.; MacDonald, D.; Tueros, G.; Argota, G.; Fimia, R. & Carhuapoma, M. 2015. Acute and chronic toxicity of *Tagetes elliptica* (Asteraceae) and dimethoate on predators and parasitoids of agricultural pests of importance in Peru. The Biologist (Lima), 13: 329-347.
- Lima, M.P.R.; Soares, A.M.V.M. & Loureiro, S. 2010. Combined effects of soil moisture and carbaryl on earthworms and plants. En: *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry — Biological Responses to Contaminants*. Hamamura, N.; Suzuki, S.; Mendo, S.; Barroso, C.M.; Iwata, H. & Tanabe, S. (Eds.), pp. 243-247.
- Lovatto, P.B.; Schiedeck, G. & Mauch, C.R. 2013. Extratos aquosos de *Tagetes minuta* (Asteraceae) como alternativa ao manejo agro-ecológico de afídeos em hortaliças. Interciencia, 38: 676-680.
- Marletto, F.; Patetta, A. & Manino, A. 2003. Laboratory assessment of pesticide toxicity to bumblebees. Bulletin of Insectology, 56: 155-158.
- Michaud, J.P. & Grant, A.K. 2003. IPM-compatibility of foliar insecticides for citrus: Indices derived from toxicity to beneficial insects from four orders. Journal of Insect Science, 3:18: 1-10. Available online: insectscience.org/3.18
- Milam, C.D.; Farris, J.L.; Dwyer, F.J. & Hardesty, D. K. 2005. Acute toxicity of six freshwater mussel species (Glochidia) to six chemicals: Implications for Daphnids and *Utterbackia imbecillis* as surrogates for protection of freshwater mussels (Unionidae). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 48: 166-173.
- Mukerjee, M. 1997. Trends in animal research. Scientific American, 276: 86-93.
- Murga-Gutiérrez, S.N.; Alvarado-Ibáñez, J.C. & Vera-Obando, N.Y. 2012. Efecto del follaje de *Tagetes minuta* sobre la nodulación radicular de *Meloidogyne incognita* en *Capsicum annuum*, en invernadero. Revista Peruana de Biología, 19: 257-260.
- Oduor-Owino, P. & Waudu, S.W. 1994. Comparative efficacy of nematicides and nematicidal plants on root-knot nematodes. Tropical agriculture, 71: 272-274.
- Pavela, R. 2016. History, Presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against Insects – A Review. Plant Protection Science, 52: 229-241.
- Perich, M.J.; Wells, C.; Bertsch, W. & Tredway, K.E. 1995. Isolation of the insecticidal components of *Tagetes minuta* (Compositae) against mosquito larvae and adults. Journal of the American Mosquito Control Association, 11: 307-311.
- Pineda, C.C.A.; Camiloaga, E.S.C. & Zuñiga, S.M.

2007. Actividad antimicrobiana del extracto de hojas de chincho (*Tagetes elliptica* L.) contra *Salmonella typhimurium* en cobayos (*Cavia porcellus* L.). Investigación Valdizana, 1: 10-13.
- Politi, S.F.A.; Mara, F.G.; Mendez, A.A.; Rodriguez, S.B.; Camargo, M.M.I.; Szabo, J.M.P.; Bechara, G.H.; dos Santos, L.C.; Villegas, W. & Rodrigues, P.R.C.L. 2012. Acaricidal activity of ethanolic extract from aerial parts of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) against larvae and engorged adult females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). Parasites & Vectors, 5: 295.
- Pratissoli, D.; Zanuncio, J.C.; Vianna, U.R.; Andrade, J.S.; Zanotti, L.C.M. & da Silva, A.F. 2005. Biological characteristics of *Trichogramma pretiosum* and *Trichogramma acacioi* (Hym.; Trichogrammatidae), parasitoids of the avocado defoliator *Niperia panacea* (Lep.: Geometridae), on eggs of *Anagasta kuehniella* (Lep.: Pyralidae). Brazilian Archives of Biology and Technology, 48: 7-13.
- Roca, L.B.; Hung, G.Z.; Botta, G.A.M.; Hernández, E.S.; González, P.M. & Aguilar, N.B. 2009. Caracterización física y tamizaje fitoquímico de la especie *Tagetes erecta* Lin. Revista Cubana de Química, 21: 10-15.
- Russo, S.; Rodriguez, S.M.; Delfino, S. & Badiola, M. 2005. Efecto de *Tagetes* spp. sobre dos áfidos plagas de *Lactuca sativa* (L). Revista FCAUNCuyo, 37: 55-59.
- Sanagoudra, S.N. & Bhat, U.G. 2013. Carbaryl induced changes in the protein and cholesterol contents in the liver and muscle of marine benthic fish, *Mugil cephalus*. American Journal of Biochemistry, 3: 29-33.
- Sanchez-Bayo, F. & Goka, K. 2014. Pesticide residues and bees –A risk assessment. PLoS ONE, 9: e94482.
- Sarkar, M. & Kshirsagar, R. 2014. Botanical Pesticides: Current challenges and reverse pharmacological approach for future discoveries. Journal of Biofertilizers & Biopesticides, 5: 2 En : <http://dx.doi.org/10.4172/2155-6202.1000e125>
- Schuman, M.C.; Kessler, D. & Baldwin, I.T. 2013. Ecological observations of native *Geocoris pallens* and *G. punctipes* populations in the Great basin desert Southwestern Utah. Psyche, ID 165108, 11 p.
- Singh, V.; Singh, V.K. & Singh, D.K. 2010. Seasonal variation in the toxicity of carbaryl to the snail *Lymnaea acuminata*: implications for dosing regimes. Australasian journal of Ecotoxicology, 16: 1-8.
- Solis-Aguilar, J.F.; Flores-Moreno, D.E.; Díaz-Nájera, J.F.; Tejada-Reyes, M.A. & Marroquín-Pérez, T.S. 2015. Extracto de *Tagetes* spp. en el control de *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) en pepino, en ciudad Ayala, Morelos. Entomología Mexicana, 2: 451-455.
- Sumer, F.; Tuncbilek, A.S.; Oztemiz, S.; Pintureau, B.; Rugman-Jones, P. & Stouthamer, R. 2009. A molecular key to the common species of *Trichogramma* of the Mediterranean region. Biocontrol, 54: 617-624.
- Vidal, J.; Carbajal, A.; Sisniegas, M. & Bobadilla, M. 2009. Efecto tóxico de *Argemone subfusiformis* Ownb. y *Tagetes patula* Link sobre larvas del IV estadio y pupas de *Aedes aegypti* L. Revista Peruana de Biología, 15: 103-109.
- Virgala, M.B.R. & Botto, E.N. 2010. Estudios biológicos de *Trichogrammatoidea bactrae* N a g a r a j a (H y m e n o p t e r a : Trichogrammatidae), parasitoide de huevos de *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae). Neotropical Entomology, 39: 612-617.
- Yasmin, S. & D'Souza, D. 2010. Effects of pesticides on the growth and reproduction of earthworm: A review. Applied and Environmental Soil Science, ID 678360, 1-9.

Received February 26, 2017.
Accepted March 18, 2017.