



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO EN BOTÁNICA

**ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H. Rob.
& Brettell Y SU ACTIVIDAD INSECTICIDA EN *Epilachna varivestis*
Mulsant**

GABRIEL GARCÍA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

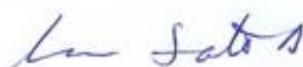
2014

La presente tesis titulada: **ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H. Rob. & Brettell Y SU ACTIVIDAD INSECTICIDA EN *Epilachna varivestis* Mulsant**, realizada por el alumno **Gabriel García**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
BOTÁNICA

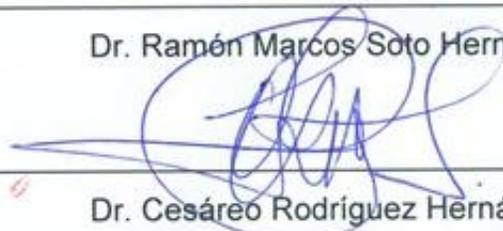
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



Dr. Ramón Marcos Soto Hernández

ASESOR:



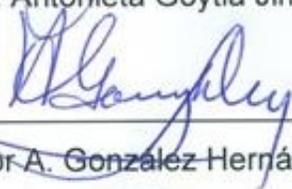
Dr. Cesáreo Rodríguez Hernández

ASESOR:



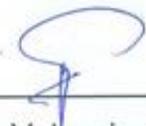
Dra. Ma. Antonieta Goytia Jiménez

ASESOR:



Dr. Víctor A. González Hernández

ASESOR:



Dr. Gustavo Valencia del Toro

Montecillo, Texcoco, Estado de México, diciembre del 2014

AGRADECIMIENTOS

A los profesores, Dr. R. Marcos Soto Hernández, Dr. Cesáreo Rodríguez Hernández, Dra. Ma. Antonieta Goytia Jiménez, Dr. Víctor A. González Hernández y Gustavo Valencia del Toro, por su tiempo, dedicación, orientación y consejos brindados en la realización de la presente investigación y escritura de tesis.

Al M.C. Rubén San Miguel Chávez y Sr. Domingo González Meraz por su apoyo y asesoría brindada en la fase de laboratorio.

Al Dr. Daniel Ángel Nieto y M.C. Victoria Ayala Escobar, responsable del Laboratorio de Patología de Frutos en Postcosecha del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados, por las facilidades prestadas en la realización de la investigación.

Al C. Oscar Moreno Cernas y C. Oscar Arnoldo Vega Ortiz, encargados del Insectario del programa de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados por el apoyo brindado en la realización de la investigación.

Al Dr. Josué Kohashi Shibata, M.C. Antonio García Esteva y M.C. Petra Yañez Jiménez, por las facilidades prestadas en la utilización de equipos y espacio que se utilizó en la investigación.

A todos mis amigos, familiares y personas que me brindaron su apoyo durante mi proceso de formación en el Colegio de Postgraduados.

Gabriel García

DEDICATORIA

A Dios, por estar conmigo a cada paso que doy.

A mi esposa, Aída Juárez Cruz por ser el motivo de superación, por el valioso apoyo, orientaciones, consejos y sugerencias en la realización de la investigación y redacción de tesis.

A mi abuelita, Laura García[†], por tu amor y cariño incondicional.

A mis padrinos, Zenaida Ángel Jiménez y Francisco García, por el cariño y educación que me brindaron y por abrir las puertas de su corazón y apreciarme como a un hijo.

A mi mamá, Maximina García y hermanos: Juana, Víctor y Ma. Luisa por su apoyo y cariño.

A la Dra. Ma. Antonieta Goytia Jiménez, por ser una gran persona y profesora que creyó y me orientó desde un inicio en mis inquietudes de investigación.

A todos aquellos familiares, amigos de escuela y trabajo, productores y demás personas que creyeron en mí...

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
RESUMEN GENERAL	XII
GENERAL SUMMARY	XIII
SECCIÓN 1: INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS GENERALES.....	XIV-5
1.3. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.4. OBJETIVO GENERAL	4
1.4.1. Objetivo general	4
1.4.2. Objetivos particulares.....	4
1.5. HIPÓTESIS GENERALES	5
SECCIÓN 2. HABITAT DE CRECIMIENTO, FENOLOGIA Y DISTRIBUCIÓN POTENCIAL DE LA HIERBA DEL PERRO <i>Roldana ehrenbergiana</i>.....	6-31
2.1. RESUMEN	7
2.2. INTRODUCCIÓN	8
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	9
2.2.1. Área de estudio	9
2.2.2. Información climática y ambiental	9
2.2.3. Fuentes de información etnobotánica	10
2.2.4. Caracterización de material vegetal	10
2.2.5. Modelado de la distribución potencial	11
2.2.6. Análisis estadístico.....	12
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
2.3.1. Características ambientales de las áreas de colecta.	12
2.3.2. Vegetación asociada a <i>R. ehrenbergiana</i>	13
2.3.3. Nombres comunes y usos de <i>R. ehrenbergiana</i> en México.....	14

2.3.4. Etnobotánica de <i>R. ehrenbergiana</i> en San Miguel Tulancingo, Oaxaca.....	15
2.3.5. Hábitat y desarrollo de <i>R. ehrenbergiana</i> en San Miguel Tulancingo ...	17
2.3.6. Fenología y reproducción de <i>R. ehrenbergiana</i> en San Miguel Tulancingo	24
2.3.7. Distribución potencial de <i>R. ehrenbergiana</i>	27
2.4. CONCLUSIONES	29
2.5. LITERATURA CITADA.....	30
 SECCIÓN 3. ACTIVIDAD INSECTICIDA E INHIBICIÓN DE LA ALIMENTACIÓN CAUSADO POR LA HIERBA DEL PERRO <i>Roldana ehrenbergiana</i> EN LARVAS DE <i>Epilachna varivestis</i> Y PROTECCIÓN FOLIAR EN FRIJOL	
3.1. RESUMEN	33
3.2. INTRODUCCIÓN	34
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
3.3.1. Material vegetal	36
3.3.2. Cría y manejo de <i>E. varivestis</i>	36
3.3.3. Obtención del extracto y preparación de concentraciones	37
3.3.4. Caracterización fitoquímica del extracto	38
3.3.5. Bioensayos	38
3.3.6. Análisis estadístico	39
3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
3.4.1. Efecto insecticida e insectistático de <i>R. ehrenbergiana</i> en <i>E. varivestis</i>	40
3.4.2. Protección foliar en la mitad de la hoja de <i>P. vulgaris</i>	44
3.4.3. Caracterización fitoquímica del extracto de <i>R. ehrenbergiana</i>	46
3.4.4. Mortalidad, inhibición de la alimentación, protección foliar y área foliar protegida de la raíz de <i>R. ehrenbergiana</i>	47
3.5. CONCLUSIONES	49
3.6. LITERATURA CITADA.....	49

**SECCIÓN 4: ACTIVIDAD INSECTICIDA DEL MACERADO, EXTRACTO Y
FRACCIONES DE LA HIERBA DEL PERRO *Roldana
ehrenbergiana* EN LARVAS DE *Aedes aegypti*53-78**

4.1. RESUMEN	54
4.2. INTRODUCCIÓN	55
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS	56
4.3.1. Material vegetal	56
4.3.2. Cría y manejo de <i>A. aegypti</i>	57
4.3.3. Elaboración del macerado y extracto de <i>R. ehrenbergiana</i>	57
4.3.4. Caracterización fitoquímica del extracto	58
4.3.5. Fraccionamiento del extracto por Cromatografía en Capa Fina (CCF)...	58
4.3.6. Caracterización fitoquímica de las fracciones de <i>R. ehrenbergiana</i>	59
4.3.5. Preparación de concentraciones del macerado, extracto y fracciones ...	59
4.3.6. Bioensayos	60
4.3.7. Análisis estadístico	60
4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
4.4.1. Actividad biológica del macerado, extracto y fracciones de <i>R. ehrenbergiana</i>	61
4.4.2. Análisis fitoquímico del extracto de <i>R. ehrenbergiana</i>	67
4.4.3. Efectividad de macerado, extracto y fracciones de raíz de <i>R. ehrenbergiana</i>	71
4.5. CONCLUSIONES	73
4.6. LITERATURA CITADA.....	74

SECCIÓN 5: DISCUSIÓN, CONCLUSIÓN Y LITERATURA CITADA GENERAL 78

5.1. DISCUSIÓN GENERAL	79
5.2. CONCLUSIÓN GENERAL	82
5.3. LITERATURA CITADA GENERAL.....	83

ÍNDICE DE CUADROS

SECCIÓN 2. HABITAT DE CRECIMIENTO, FENOLOGIA Y DISTRIBUCIÓN POTENCIAL DE LA HIERBA DEL PERRO *Roldana ehrenbergiana*

- Cuadro 1.** Variables descriptivas de *R. ehrenbergiana*, en cada hábitat de desarrollo, realizado el 15 de agosto del 2012..... **20**
- Cuadro 2.** Variables descriptivas de *R. ehrenbergiana*, en cada hábitat de desarrollo, realizado el 2 de septiembre del 2012..... **21**
- Cuadro 3.** Peso seco en los órganos de *R. ehrenbergiana* en la Mixteca Alta Oaxaqueña..... **22**
- Cuadro 4.** Estimación del área foliar, utilizando parámetros a nivel de planta, en *R. ehrenbergiana*. **23**
- Cuadro 5.** Estimación del área foliar utilizando parámetros a nivel de hoja de *R. ehrenbergiana*..... **23**

SECCIÓN 3. ACTIVIDAD INSECTICIDA E INHIBICIÓN DE LA ALIMENTACIÓN CAUSADO POR LA HIERBA DEL PERRO *Roldana ehrenbergiana* EN LARVAS DE *Epilachna varivestis* Y PROTECCIÓN FOLIAR EN FRIJOL

- Cuadro 1.** Mortalidad e inhibición de la alimentación en larvas de *E. varivestis* y protección foliar en *P. vulgaris* ocasionados por el extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* en la primera serie de concentraciones. **41**
- Cuadro 2.** Mortalidad e inhibición de la alimentación en larvas de *E. varivestis* y protección foliar en *P. vulgaris* provocados por el extracto en etanol

de la raíz de *R. ehrenbergiana* en la segunda serie de concentraciones 42

Cuadro 3. Mortalidad, peso de larva y área foliar protegida de *E. varivestis* en *P. vulgaris* ocasionados por extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* a 5,000 ppm. 45

SECCIÓN 4: ACTIVIDAD INSECTICIDA DEL MACERADO, EXTRACTO Y FRACCIONES DE LA HIERBA DEL PERRO *Roldana ehrenbergiana* EN LARVAS DE *Aedes aegypti*

Cuadro 1. Mortalidad ocasionada por el macerado de la raíz de *R. ehrenbergiana* en larvas de cuarto instar de *A. aegypti*..... 62

Cuadro 2. Mortalidad causada por extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* en larvas de cuarto instar de *A. aegypti*..... 63

Cuadro 3. Mortalidad causada por las fracciones C1 y D1 del extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* en larvas de cuarto instar de *A. aegypti* en la primera ventana biológica 65

Cuadro 4. Mortalidad causada por fracciones C1 y D1 del extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* en larvas de cuarto instar de *A. aegypti* en la segunda ventaba biológica..... 66

Cuadro 5. Fracciones, polaridad, R_f y rendimiento de compuestos que integran el extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana*..... 70

ÍNDICE DE FIGURAS

SECCIÓN 2. HABITAT DE CRECIMIENTO, FENOLOGIA Y DISTRIBUCIÓN POTENCIAL DE LA HIERBA DEL PERRO *Roldana ehrenbergiana*

Figura 1. Vegetación de matorral espinoso y bosque de encinos asociado a <i>R. ehrenbergiana</i>	13
Figura 2. Vestigios del muro de piedra levantado en una parte del área de distribución de <i>R. ehrenbergiana</i>	15
Figura 3. Esquema de utilización de <i>R. ehrenbergiana</i> en San Miguel Tulancingo, Oaxaca.	16
Figura 4. Ubicación espacial del área de crecimiento de <i>R. ehrenbergiana</i> : a) línea roja representa la barrera de piedra, y b) línea amarilla el área de distribución.....	17
Figura 5. Crecimiento y formación de macollos de plantas de <i>R. ehrenbergiana</i>	18
Figura 6. Detalle de la flor e insectos polinizadores en <i>R. ehrenbergiana</i>	18
Figura 7. Hábitat de crecimiento de <i>R. ehrenbergiana</i> en San Miguel Tulancingo:a) espino de clavo <i>Acacia</i> sp., b) encino blanco <i>Quercus</i> sp y c) sin sombra.	19
Figura 8. Correlación obtenida al utilizar el producto de L*A de la hoja, y el AF cuantificada con equipo integrador LI-COR LI3100.	24
Figura 9. Fenología de <i>R. ehrenbergiana</i> bajo condiciones ambientales de la Mixteca Alta Oaxaqueña.	26
Figura 10. Puntos de colecta y distribución potencial de <i>R. ehrenbergiana</i> en México.....	27

Figura 11. Contribución e importancia relativa de cada variable vioclimática (índice de Jackknife), en el modelo de distribución potencial de <i>R. ehrenbergiana</i>	28
--	-----------

SECCIÓN 3. ACTIVIDAD INSECTICIDA E INHIBICIÓN DE LA ALIMENTACIÓN CAUSADO POR LA HIERBA DEL PERRO *Roldana ehrenbergiana* EN LARVAS DE *Epilachna varivestis* Y PROTECCIÓN FOLIAR EN FRIJOL

Figura 1. Área protegida (base ó punta, derecha ó izquierda) del daño larval de <i>E. varivestis</i> con el extracto en etanol de raíz de <i>R. ehrenbergiana</i> a 5,000 ppm.	46
--	-----------

Figura 2. Desarrollo de color violeta en extracto en etanol de raíz de <i>R. ehrenbergiana</i> : a) reactivo de Lieberman-Buchard, y b) CCF revelada con vainillina en medio ácido.....	47
--	-----------

SECCIÓN 4. ACTIVIDAD INSECTICIDA DEL MACERADO, EXTRACTO Y FRACCIONES DE LA HIERBA DEL PERRO *Roldana ehrenbergiana* EN LARVAS DE *Aedes aegypti*

Figura 1. Desarrollo diferenciado de color y Rf, de las 13 fracciones obtenidas en la fase de elución hexano:AcOEt (20:0 a 0:20).	68
---	-----------

Figura 2. Desarrollo similar de color azul, pero diferente Rf en las fracciones obtenidas en la fase AcOEt:metanol (10:0 a 0:10.	69
--	-----------

ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H. Rob. & Brettell Y SU ACTIVIDAD INSECTICIDA EN *Epilachna varivestis* Mulsant

Gabriel García, D.C.
Colegio de Postgraduados, 2014

En la búsqueda de alternativas ecológicas para el manejo de plagas se ha utilizado una diversidad de plantas con propiedades tóxicas, entre ellas puede estar la hierba del perro *Roldana ehrenbergiana*, especie tóxica para borregos, caballos, perros y ratas; así mismo, se utiliza en cebos para el control de hormigas, como veneno para perros y ha presentado acción insecticida en mosquito *Culex quinquefasciatus*. Sin embargo, se desconoce el hábitat, fenología y áreas potenciales de distribución, así como su actividad insecticida e insectistática en plagas de importancia agrícola y sanitaria como la conchuela del frijol *Epilachna varivestis* y mosquito doméstico *Aedes aegypti*. Para ello, se realizaron muestreos y visitas de campo, se utilizaron colectas georeferenciadas y variables climáticas de WorldClim para crear un modelo con el algoritmo MaxEnt. En *E. varivestis* se realizaron bioensayos en confinamiento sin elección (CS) y con elección (CC) de alimento, donde se evaluó el extracto en un rango de concentraciones de 0.1 a 20,000 ppm, y de 5,000 ppm, respectivamente. Los tratamientos se asperjaron en hojas cotiledonales de frijol *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo, después del secado se colocaron 10 larvas neonatas, de menos de 24 horas de edad, y se confinaron en recipientes de plástico. A los 7 d se registró mortalidad, peso de larva y consumo foliar, para determinar mediante análisis Probit la Concentración Letal media (CL₅₀), Inhibición media de la Alimentación (IA₅₀) y Protección Foliar media (PF₅₀), así como Área Foliar Protegida (AFP). En *A. aegypti* se evaluó el macerado de 1 a 20%, extracto de 10,000 a 100,000 ppm y las fracciones de 10 a 1,000 ppm; colocando 20 larvas de cuarto instar en un vaso con 100 mL de agua, después se agregó 1 mL de la concentración a evaluar. A las 24 h se registró mortalidad y mediante análisis Probit se determinó la Concentración Letal media (CL₅₀). Los resultados muestran que *R. ehrenbergiana* se distribuye en la zona centro de México a una altitud promedio de 1,874.7 msnm, temperatura media anual de 18.78 °C y precipitación promedio de 876.70 mm, con vegetación asociada de matorral espinoso con *Acacia* sp, bosque de *Quercus* y pastizal inducido; el ciclo fenológico inicia en mayo y termina en agosto; la distribución potencial está determinada por la isothermalidad. *R. ehrenbergiana* presento actividad insecticida e insectistática a través de la inhibición de la alimentación en *E. varivestis*, y protección foliar en frijol; en CS, la mortalidad tuvo una CL₅₀ de 3,233.09 ppm, IA₅₀ de 1,575.22 ppm y PF₅₀ de 459.07 ppm, mientras que en CC se observó un AFP de 91.88 a 98.96%, sin causar mortalidad ni afectar peso de larva. En *A. aegypti*, la acción insecticida del macerado tuvo CL₅₀ de 8.29 a 12.32%, el extracto de 51,268.34 a 61,217.24 ppm, y las fracción de 92.65 a 220.92 ppm, atribuyendo el efecto toxico a las fracciones C1 y D1. La especie *R. ehrenbergiana* representa una alternativa para el manejo ecológico de plagas agrícolas y sanitarias y es fuente para la extracción de dichos compuestos.

PALABRAS CLAVE: Actividad insecticida, Inhibición del crecimiento, Protección foliar, *Aedes aegypti*, MaxEnt, CL₅₀, IA₅₀, PF₅₀.

PHYTOCHEMICAL STUDY OF *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H. Rob. & Brettell AND INSECTICIDAL EFFECT IN *Epilachna varivestis* Mulsant

Gabriel García, D.C.
Colegio de Postgraduados, 2014

In search of ecological alternatives for pest management has use a variety of plants with toxic properties, however there are option such as hierba del perro *Roldana ehrenbergiana*, it's a toxic specie for sheep, horses, dogs and rats, so it's used in baits to control ants, and insecticidal effect on mosquito *Culex quinquefasciatus*. However, insecticidal and antifeedant activity are not known in Mexican bean beetle *Epilachna varivestis* and mosquito *Aedes aegypti*, and the environmental factors is not known for distribution area of the specie. In this paper, was evaluated the maceration, extract and fractions obtained with ethanol on root *R. ehrenbergiana*. In *E. varivestis* in non-choice bioassays (CS) was use extract to concentrations from 0.1 to 20.000 ppm, and choice bioassays (CC) was applied extrac to 5,000 ppm. They was sprayed in cotyledons leaf of bean var. Flor de mayo, after drying was put 10 neonate larvae and were confined in plastic containers. At 7 day, the mortality, larval weight and leaf consumption was determined and were use in PROBIT analysis for determinate Lethal Concentration (LC₅₀) Antifeedant (AF₅₀) and Leaf Protection (LP₅₀). In CC was obtained 91.88 to 98.96% Leaf Protected Area (LPA) without causing mortality or affect larval weigth of *E. varivestis*. In *A. aegypti* was evaluated the maceration to concentrations of 1 to 20%, extract from 10,000 to 100,000 ppm, and fractions from 10 to 1,000 ppm; for bioassay test, 20 larvae were taken in plastic glass which 100 mL of water, then added 1 mL of each concentration. At 24 h was register mortality and determinated Lethal Concentration (LC₅₀). In the potential model distribution of *R. ehrenbergiana* was use M_{AX}Ent algorithm and bioclimatic variables of WorldClim. The results of *R. ehrenbergiana* show insecticide effect on *A. aegypti*, and toxic and antifeedant on larvae *E. varivestis* and leaf protection on beans. The LC₅₀ was 3,233.09 ppm, AF₅₀ of 1,575.22 ppm and LP₅₀ of 459.07 ppm. In *A. aegypti*, the LC₅₀ for maceration was 8.29 to 12.32%, extract of 51,268.34 to 61,217.24 ppm and fraction of 92.65 to 220.92 ppm; attributing to fractions C1 and D1 the toxic effect in roots of *R. ehrenbergiana*. The potential area distribution are located in central Mexico in the states of Oaxaca, Puebla and Tlaxcala, and was determined for bio3, bio19, Bio7, bio8 and bio10 variables of WorldClim. The extract ethanol of root *R. ehrenbergiana* is an alternative for pest management agriculture.

KEYWORDS: Insecticidal activity, Antifeedant, Leaf protection, *Aedes aegypti*, M_{AX}Ent, LC₅₀, IC₅₀, CP₅₀.

SECCIÓN 1: INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS GENERALES

1.3. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.4. OBJETIVO GENERAL	4
1.4.1. Objetivo general	4
1.4.2. Objetivos particulares.....	4
1.5. HIPÓTESIS GENERAL.....	5

1.3. INTRODUCCIÓN GENERAL

Desde tiempos remotos el hombre ha aprovechado las plantas para satisfacer sus necesidades de alimento, colorante, construcción, control de plagas y enfermedades, medicina, veneno y vestimenta. En el control de plagas, éstas se han utilizado en forma de aceite, ceniza, extracto, humo, jugo, polvo y resina, para provocar efecto insecticida e insectistático (Rodríguez *et al.*, 2003); en la última década sobresalen el ajo *Allium sativum* L., anona *Annona* sp, nim *Azadirachta indica* A. Juss., chile *Capsicum* sp, epazote *Chenopodium ambrosioides* L., hierba de la cucaracha *Haplohyton cimicidium* A.D.C., higuera *Ricinus communis* L., paraíso *Melia azedarach* L., tabaco *Nicotina tabacum* L. y sabadilla *Schoenocaulon officinale* (Schltdl. & Cham.) A. Gray ex Benth., entre otras (Rodríguez, 2006 y 2012) en el manejo de diversas plagas que afectan a cultivos o plantas de importancia económica.

Sin embargo, existen otras especies vegetales con propiedades tóxicas como la hierba del perro *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H. Rob. & Brettell, especie endémica de México localizada en los estados de Morelos, Oaxaca, Puebla y Querétaro. En la Mixteca Alta Oaxaqueña ha sobresalido por su toxicidad para borregos, caballos, burros, vacas, etc., y en el municipio de San Miguel Tulancingo, Oaxaca, es utilizada como veneno para perros. El uso como tóxico, se remota desde tiempos la Colonia donde se utilizó para matar conejos, perros y ratas, y como medicina en el tratamiento de la lepra y epilepsia (Martínez, 1959). Así mismo, *R. ehrenbergiana* ha utilizado en cebos para el control de hormigas defoliadoras

(Rodríguez, 1999) y como veneno para perros con rabia en el estado de Puebla (Pérez-Castorena *et al.*, 2006). En estudios fitoquímicos, se han aislado compuestos como rolderenbergiana A, B, C, D y sendarwina I, a partir del extracto en metanol de flores, hojas y raíz de *R. ehrenbergiana*, registrando solamente sendarwina I moderada acción citotóxica (Pérez-Castorena *et al.*, 2005); por otro lado, el macerado de la raíz en etanol mostró acción insecticida a una Dosis Letal media ($DL_{50} = 2.50\%$ p/v) en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (García *et al.*, 2012).

En la agricultura, la conchuela del frijol *Epilachna varivestis* Mulsant es una plaga que afecta a éste cultivo principalmente en zonas templadas, llegando a reducir hasta 25% el área foliar y en 30 a 60% el rendimiento (Yerkes *et al.*, 1959) y en frijol ejotero provoca pérdidas de hasta 50% (Domínguez *et al.*, 2001). Para su control se ha utilizado el método químico, principalmente, que ha conllevado al desarrollo de resistencia, contaminación del ambiente y riesgos de intoxicación en consumidores y productores. Ante dicho panorama, Rodríguez y Lagunes (1992) buscaron alternativas para su manejo mediante plantas con propiedades insecticidas, encontrando a nivel de laboratorio 32 especies cuyos extractos acuosos al 50% provocaron mortalidad superior a 30%, inhibición del crecimiento o disminución del consumo foliar en larvas. No obstante, al probarlas en campo solo seis especies fueron sobresalientes: manzanilla *Arctostaphylos pungens* Kunth, hediondilla *Cestrum anagyris* Dunal, cancerina *Hippocratea excelsa* Kunth, huelle de noche *Cestrum nocturnum* Duss, *R. communis* y cedrillo *Trichilia americana* (Sessé & Moc.) T.D. Penn.

En la salud, el mosquito doméstico *Aedes aegypti* es considerado el principal transmisor del dengue y fiebre amarilla en México y Sudamérica; su control ha sido con productos químicos sintéticos, lo que ha provocado resistencia y contaminación del ambiente. Por tal motivo, se ha buscado alternativas de manejo como la aplicación de extractos vegetales de chirimoya *Annona muricata* L., mata ratón *Gliricidia sepium* Kunth ex Steud. y jaboncillo *Sapindus saponaria* L. (Amariles-Barrera *et al.*, 2013), palo santo *Bulnesia sarmientoi* Lorentz ex Griseb y *M. azederach* (Sanabria *et al.*, 2009), obteniendo una mortalidad superior al 50%.

Con base en la toxicidad, uso tradicional y resultados obtenidos en laboratorio sobre *R. ehrenbergiana*, la presente investigación tuvo como objetivo describir el hábitat, condiciones climáticas, fenología, modelar su distribución potencial; así como evaluar la actividad insecticida e insectistática del extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana*, en una plaga agrícola y sanitaria, *E. varivestis* y *A. aegypti*, y determinar las fracciones responsables de la actividad biológica encontrada en dichos bioensayos.

1.4. OBJETIVO GENERAL

1.4.1. Objetivo general

- Describir el hábitat de crecimiento de *R. ehrenbergiana* en la Mixteca Alta Oaxaqueña, y determinar el efecto tóxico para el control de una plaga de importancia agrícola y sanitaria.

1.4.2. Objetivos particulares

- Caracterizar el hábitat de crecimiento de *R. ehrenbergiana* ubicado en la Mixteca Alta Oaxaqueña.
- Modelar la distribución potencial de *R. ehrenbergiana* en la República Mexicana.
- Evaluar la actividad insecticida e insectistático provocado por el extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* en larvas de *E. varivestis* y protección foliar en frijol.
- Evaluar la actividad insecticida causada por el macerado, extracto y fracciones obtenidas con etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* en larvas de *A. aegypti*.
- Determinar las fracciones responsables de la actividad biológica observada en *A. aegypti*.

1.5. HIPÓTESIS GENERALES

- EL hábitat de *R. ehrenbergiana* está relacionado con la vegetación predominante del sitio de estudio.
- El extracto etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* causa toxicidad en larvas de *E. varivestis* y *A. aegypti*.
- La acción biológica de *E. varivestis* y *A. aegypti* es provocada por compuestos sesquiterpenos roldenbergiana A, B, C, D y serdarwina I.

**SECCIÓN 2. HABITAT DE CRECIMIENTO, FENOLOGIA Y DISTRIBUCIÓN
POTENCIAL DE LA HIERBA DEL PERRO *Roldana ehrenbergiana***

2.1. RESUMEN	7
2.2. INTRODUCCIÓN	8
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	9
2.2.1. Área de estudio	9
2.2.2. Información climática y ambiental	9
2.2.3. Fuentes de información etnobotánica	10
2.2.4. Caracterización de material vegetal	10
2.2.5. Modelado de la distribución potencial	11
2.2.6. Análisis estadístico.....	12
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
2.3.1. Características ambientales de las áreas de colecta.	12
2.3.2. Vegetación asociada a <i>R. ehrenbergiana</i>	13
2.3.3. Nombres comunes y usos de <i>R. ehrenbergiana</i> en México	14
2.3.4. Etnobotánica de <i>R. ehrenbergiana</i> en San Miguel Tulancingo, Oaxaca.....	15
2.3.5. Hábitat y desarrollo de <i>R. ehrenbergiana</i> en San Miguel Tulancingo .	17
2.3.6. Fenología y reproducción de <i>R. ehrenbergiana</i> en San Miguel Tulancingo.....	24
2.3.7. Distribución potencial de <i>R. ehrenbergiana</i>	27
2.4. CONCLUSIONES	29
2.5. LITERATURA CITADA.....	30

2. HABITAT DE CRECIMIENTO, FENOLOGIA Y DISTRIBUCIÓN POTENCIAL DE LA HIERBA DEL PERRO *Roldana ehrenbergiana*

2.1. RESUMEN

La hierba del perro *R. ehrenbergiana* es una especie endémica de México con propiedad toxica en ciertos animales, sin embargo se desconoce las condiciones fisiológicas, ambientales y áreas de distribución; por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue caracterizar el clima, hábitat, fenología y distribución potencial de *R. ehrenbergiana*. Para ello, se realizaron muestreos y visitas en campo, se ubicaron registros georeferenciados, datos de normales climatológicos, variables bioclimáticas y se utilizó el algoritmo MaxEnt. La especie *R. ehrenbergiana* se distribuye en la zona centro de México a una altitud promedio de 1,874.7 msnm, con temperatura media anual de 18.78 °C, y precipitación de 876.70 mm. En la Mixteca Alta Oaxaqueña, se desarrolla en tres hábitats: bajo sombra de *Acacia* sp, *Quercus* sp y al aire libre. El ciclo biológico comienza con la emergencia y crecimiento vegetativo en mayo y mediados de junio, la floración se concentra en la segunda quincena de junio, la formación y maduración de semillas en julio, y la dispersión de ésta y senescencia de la planta en agosto. Las áreas potenciales de distribución se localizan en los estados de Oaxaca, Puebla y Tlaxcala, delimitada principalmente por la isothermalidad, precipitación del trimestre más frío, temperatura media anual, temperatura media del trimestre más lluvioso y temperatura media del trimestre más cálidos.

2.2. INTRODUCCIÓN

El género *Roldana* se distribuye a lo largo de la República Mexicana, encontrando especies en el Distrito Federal y los estados de Aguascalientes, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Durango, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas (Redonda y Villaseñor, 2011).

R. ehrenbergiana, también clasificada como *Senecio acerifolius* Klatt, *Senecio canicidus* Sessé & Moc., *Senecio ehrenbergianus* Klatt, *Senecio semperamatae* T.M. Barkley (Funston, 2008; Redonda-Martínez y Villaseñor-Ríos, 2011), es una especie endémica de México localizada en los estados de Guerrero, Morelos, Nayarit, Puebla y Querétaro, a elevaciones de 2,000 a 2,100 msnm; es una planta herbácea de 60 a 80 cm, con tallos tomentosos, hojas tipo pinnatisectas y tomentosas, cabezuela heterógama, flores liguladas y en disco, fruto tipo aquenio; y está asociada al matorral xerófilo, con un periodo de floración y fructificación de mayo a julio (Redonda-Martínez y Villaseñor-Ríos, 2011). Sin embargo, se conoce poco sobre el hábitat, crecimiento y áreas potenciales de distribución, no obstante que en la actualidad existen algoritmos que modelan el nicho ecológico de una especie mediante la relación entre los puntos de presencia conocidos de la especie y las variables ambientales incluidas en el modelo (Lindermayer et al., 1996). Con base en lo anterior, el objetivo del trabajo fue caracterizar el hábitat, crecimiento y

fenología de *R. ehrenbergiana* en condiciones ambientales de la Mixteca Alta oaxaqueña, y modelar su distribución potencial de la República Mexicana.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Área de estudio

El sitio de estudio y colecta de *R. ehrenbergiana* se ubicó en el municipio de San Miguel Tulancingo, Oaxaca, México. El clima es templado subhúmedo con lluvias en verano y precipitación anual de 600 a 800 mm; se presenta un periodo de canícula entre julio-agosto. La altitud del hábitat de desarrollo es de 2,471 msnm, con vegetación compuesta de pastizal inducido, bosque de encino y chaparral (INEGI, 2008).

2.2.2. Información climática y ambiental

Se conformó una base de 21 puntos de coletas georreferenciados, para el modelado de la distribución potencial de *R. ehrenbergiana*, y las 19 variables bioclimáticas manejadas por WorldClim (Phillips et al., 2006). Se ubicaron las estaciones meteorológicas más cercanas a los puntos de coletas con ayuda del software Google Earth Pro ver. 7.1.2.2, y utilizando los registros del Servicio Meteorológico Nacional, se obtuvieron las normales climatológicas de cada estación, las cuales se utilizaron para describir las variables bioclimática de WorldClim.

2.2.3. Fuentes de información etnobotánica

La información de distribución, vegetación y usos de *R. ehrenbergiana* y sus sinonimias *S. acerifolius*, *S. canicida* y *S. semperamatae*, se recabo utilizando la Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB) y fichas de colecta ubicadas en los herbarios de División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo, CHAPA del Colegio de Postgraduados y Herbario Nacional MEXU del Instituto de Biología de la Universidad Nacional de México. El uso etnobotánico local se obtuvo a través de entrevistas informales con actores claves.

2.2.4. Caracterización de material vegetal

Para la descripción de la fenología *R. ehrenbergiana*, se realizaron visitas de campo de manera mensual durante el 2010, 2011 y 2012, realizando muestreos y registro fotográfico en cada etapa fenológica. La caracterización de la parte aérea de la planta se realizó con el muestreo de 17 individuos al azar en los tres hábitats de crecimiento. Las variables evaluadas fueron: altura de planta, diámetro basal e intermedio, # de ramas secundarias, # hojas en rama principal y secundarias y # de inflorescencia. En la determinación de distribución de Materia Seca Total (MST), se muestrearon 10 plantas al azar, en los tres hábitats, para medir: peso seco de raíz, tallo, hojas e inflorescencia. Para la caracterización del hábitat de crecimiento, se marcaron 12 individuos en etapa vegetativa, en cada sitio, y se registró altura, diámetro basal y # de hojas, en dos fechas diferentes; el estudio se complementó con un muestreo destructivo de 6 individuos a los que se midió altura, diámetro basal, # de hojas, Área Foliar cuantificada (AFc) con un integrador de área LI-COR LI3100, peso seco de hojas y tallos. En la generación de estimación del área foliar,

se tomaron 12 hojas al azar, de cada una de las 6 plantas, y se determinó largo, ancho, AFc y peso seco.

2.2.5. Modelado de la distribución potencial

En la distribución potencial de *R. ehrenbergiana* se empleó el algoritmo MaxEnt (Maximun Entropy) ver. 3.3.3 y las “variables características” (lineal, cuadrática, producto, umbral y tipo “hinge”) incluidas en el programa, mientras que los mapas, la probabilidad de presencia de la especie se representaron en escala acumulativa. Las variables bioclimáticas utilizadas en el modelo fueron: temperatura media anual (bio1), rango de temperatura media (bio2), isothermalidad (bio3), estacionalidad de la temperatura (bio4), temperatura máxima del mes más cálido (bio5), temperatura mínima del mes más frío (bio6), rango de temperatura anual (bio7), temperatura media del trimestre más lluvioso (bio8), temperatura media del trimestre más seco (bio9), temperatura media del trimestre más cálido (bio10), temperatura media del trimestre más frío (bio11), precipitación anual (bio12), precipitación del mes más lluvioso (bio13), precipitación del mes más seco (bio14), estacionalidad de la precipitación (bio15), precipitación del trimestre más lluvioso (bio16), precipitación del trimestre más seco (bio17), precipitación del trimestre más cálido (bio18) y precipitación del trimestre más frío (bio19).

La evaluación de los modelos se realizó con base al área bajo la curva (AUC: Area Under the Curve) cuyo valor varía de 0.0 a 1.0; y entre más cercano sea a 1.0 quiere decir que el modelo tiene buen desempeño. También se utilizó el valor

explicativo de cada variable en el modelo (análisis Jackknife) para determinar el porcentaje en el mismo.

2.2.6. Análisis estadístico

Los datos de cada una de las variables evaluadas, excepto los climáticos, se sometieron a las pruebas de los supuestos de normalidad (Shapiro Wilks modificado) (Royston, 1982) y homogeneidad de varianza (prueba de Bartlett) (Bartlett, 1937), para implementar un ANAVA o Kruskal Wallis, y posteriormente determinar diferencias estadísticas entre tratamientos con la prueba de comparación de medias Tukey ($P \leq 0.05$) o comparaciones múltiples ($P \leq 0.05$), respectivamente, en el programa InfoStat 2013I (Di Rienzo, 2013).

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Características ambientales de las áreas de colecta

La hierba del perro *R. ehrenbergiana* es una especie endémica de México que se distribuye en la zona centro del país; de las 21 colectas registradas en los diferentes herbarios, 12 colectas fueron realizadas en el estado de Puebla, seis en el estado de Morelos, una colecta en cada uno de los estado de Querétaro, San Luis Potosí y Oaxaca. En base a los puntos georeferenciados y a las normales climáticas de las estaciones meteorológicas más cercanas a los puntos de colecta, se determinó que la planta se ubica a una altura promedio de 1,874.7 (2,459.0 – 1,155.0) msnm, en condiciones ambientales de temperatura máxima promedio anual de 29.97 (35.03 – 25.38) °C, temperatura promedio anual 18.78 (21.91 –

15.25) °C, temperatura mínima promedio anual de 7.90 (11.22 – 3.84) °C y precipitación promedio anual de 876.70 (3,183.30 – 383.50) mm (SMN, 2014) .

2.3.2. Vegetación asociada a *R. ehrenbergiana*

En registros en herbarios de *R. ehrenbergiana*, asocia a la especie con: a) matorral espinoso con crasicuales, b) matorral espinoso con bursera *Bursera áptera* Ramírez, copal *Bursera copallifera* (DC.) Bullock, chupiri *Euphorbia calyculata* Kunth, colorín *Erythrina oaxacana* (B.A.Krukoff), chichituna *Polaskia chichipe* Gassetim y *Ferocactus* sp, c) bosque caducifolio con *Prunus* sp, *Ipomoea* sp, *Ficus* sp y *Minosa* sp, d) bosque de pino, encinos y cedros, e) bosques de encino, pino-encino, coníferas, y f) matorrales secundaros, y zonas perturbadas, principalmente pastizales sujetos al pastoreo de ganado. Se encuentra desde lugares húmedos y praderas, terreno volcánico con alto contenido de materia orgánica, hasta suelos someros, tipo migajón-arenoso de color negro (Figura 1).



Figura 1. Vegetación de matorral espinoso y bosque de encinos asociado a *R. ehrenbergiana*.

2.3.3. Nombres comunes y usos de *R. ehrenbergiana* en México

R. ehrenbergiana y sus sinonimias, tiene diversos nombres comunes, por ejemplo, en Morelos se conoce como “hierba de la puebla”, en Puebla como “hierba de la fresca puebla, yerba de la puebla, hierba de perro, falsa árnica ó Itzcuimpatli (itzcuintli = perro, patli = medicina o veneno)” y en Oaxaca como “hierba del perro”.

La información recopilada, a través de fichas de herbario, refieren su uso para curar úlceras, matar perros y peces; como tratamiento de la epilepsia, lepra y tuberculosis, aplicando la planta sobre las superficies sangrantes, razón por la cual, el Dr. E. Castro indica que fue exportada a Centroamérica. Otros autores, como Martínez (2005), recopilaron diversos usos como:

“Hernández indica que el uso de ésta planta espolvoreada en la carne para matar perro y otros animales, y en la medicina contra la lepra. El Dr. M. Río de la Loza estudio la especie como tratamiento para la epilepsia, pero solo en algunos casos se observó disminución pasajera de los ataques. El Dr. Jourdanet cree que esta planta podría servir para la rabia. Los Dres. M. Río de la Loza y Oñate Alfaro y otros han usado esta planta contra la epilepsia. La materia médica aconseja de 10 a 15 centigramos del polvo de la planta, una o dos veces al día, según los efectos observados. La planta debe usarse fresca porque su principio activo se altera pronto.

La acción fisiológica se basa en producir convulsiones y alteraciones de la circulación y la respiración; parece producir alucinaciones auditivas. 20 centigramos del ácido o cuatro gramos del polvo de la hierba matan a un perro de talla mediana, 4 centigramos para las ratas, 8 para los conejos y 12 para

los perros” e indica que la “acción fisiológica se basa en producir convulsiones y alteraciones de la circulación y la respiración; parece producir alucinaciones auditivas. 20 centigramos del ácido o cuatro gramos del polvo de la hierba matan a un perro de talla mediana, 4 centigramos para las ratas, 8 para los conejos y 12 para los perros”.

2.3.4. Etnobotánica de *R. ehrenbergiana* en San Miguel Tulancingo, Oaxaca

La planta tiene importancia local y regional debido al riesgo de intoxicación que representaba en el ganado ovino, caprino, vacuno, equino, asnal, entre otros; razón por la cual, los pobladores implementaron “tequios” para eliminar la planta ubicada en el paraje “Llano de la hierba” ubicado a 3.2 km de la cabecera municipal; sin embargo, no se logró el objetivo, motivo por el cual la comunidad optó por levantar un muro de piedra, para dificultar la entrada del ganado al área de distribución de *R. ehrenbergiana*.

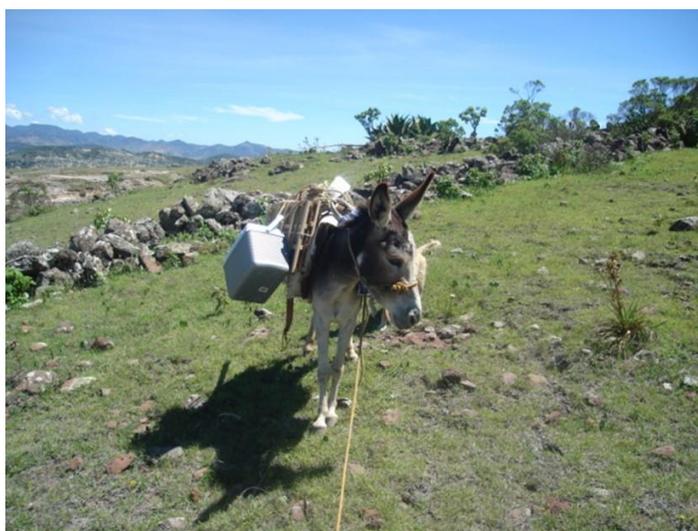


Figura 2. Vestigios del muro de piedra levantado en una parte del área de distribución de *R. ehrenbergiana*.

Otro aprovechamiento local que tiene *R. ehrenbergiana* es como veneno para matar perros, siguiendo el siguiente procedimiento: a) en campo, se colectan de 5 a 10 hojas frescas de la planta, b) en la cocina, se elaboran bolitas de masa (aproximadamente 100 g), se agrega las hojas y se amasa o mezcla, c) se elabora la tortilla o “memela” (tortilla gruesa y ovalada) y pone a cocer en comal de barro a fuego lento, d) terminado la cocción de la tortilla, se deja enfriar y se le ofrece al perro como alimento, y e) el animal muere por envenenamiento, provocando inflamación del estómago, acompañado de emisión de espuma en la boca. En el proceso de manipulación de la plantas, es importante asegurar que ningún animal doméstico, herbívoro, lo consuma ya que existe el riesgo de intoxicación y muerte (Figura 3).

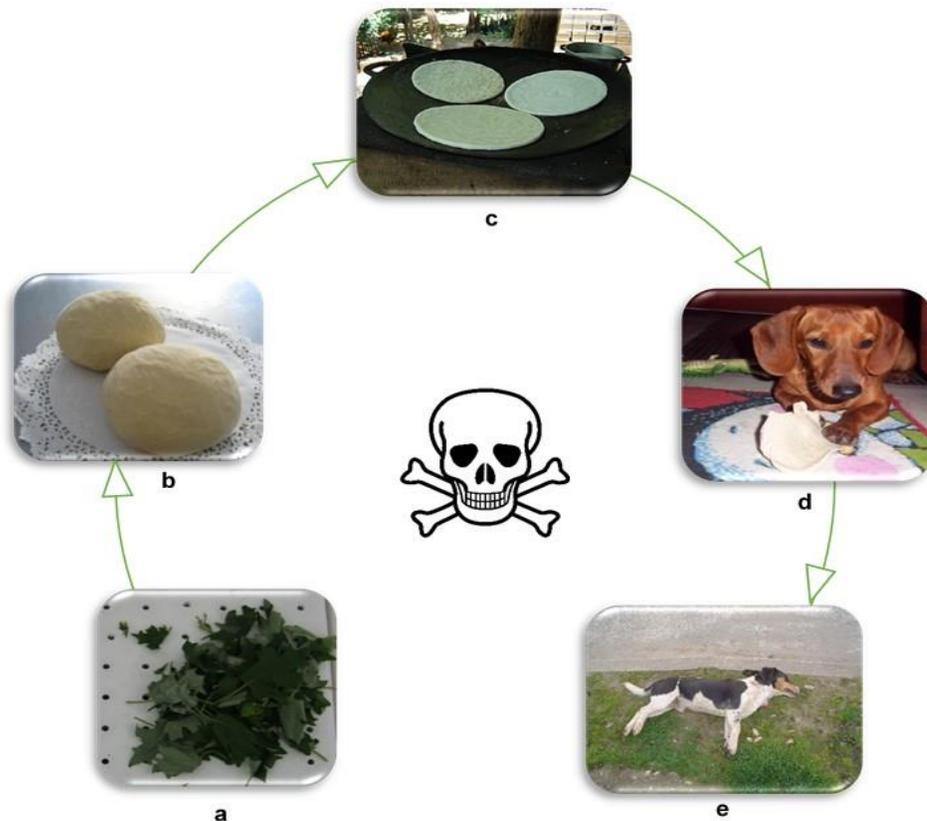


Figura 3. Esquema de utilización de *R. ehrenbergiana* en San Miguel Tulancingo, Oaxaca.

2.3.5. Hábitat y desarrollo de *R. ehrenbergiana* en San Miguel Tulancingo

La especie se localiza en el paraje “Llano de la hierba”, ubicado a 3.2 km de la localidad, abarcado una superficie aproximada de 8.0 hectáreas de matorral espinoso con ejemplares de encino. El área se encuentra localizada en una zona de planicie y cañada con pendientes de 10 a 100%. El suelo es arcilloso, de color negro, pedregoso y con una profundidad no mayor a 40 cm (Figura 4).

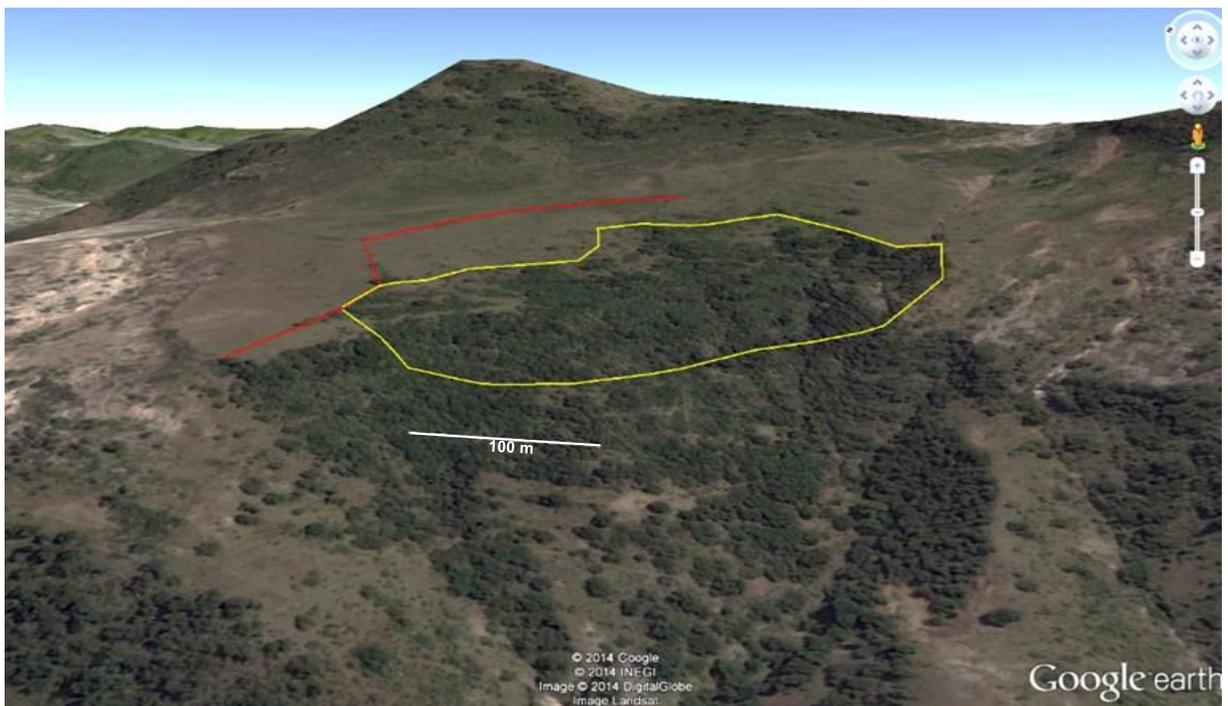


Figura 4. Ubicación espacial del área de crecimiento de *R. ehrenbergiana*: a) línea roja representa la barrera de piedra, y b) línea amarilla el área de distribución.

R. ehrenbergiana es una planta herbácea de ciclo perenne, aunque la parte aérea muere en época de frío y secas. El rizoma forma “macollos” compactos de 3 hasta 15 plantas (Figura 5). Los individuos presentan un tallo principal con altura promedio de 71.31 ± 7.43 cm, diámetro basal de 7.21 ± 0.13 mm y diámetro medio

de 5.25 ± 0.12 mm; el tallo tiene 5.88 ± 1.22 ramificaciones secundarias, 73.71 ± 15.91 hojas y 4.12 ± 2.09 inflorescencia terminales. Las flores son compuestas, de color amarillo y polinizadas por la flora entomológica, principalmente abejas (Figura 6).



Figura 5. Crecimiento y formación de macollos de plantas de *R. ehrenbergiana*.



Figura 6. Detalle de la flor e insectos polinizadores en *R. ehrenbergiana*.

Los individuos de *R. ehrenbergiana* crecen principalmente bajo sombra de árboles como encinos y/o matorral espino, y en menor cantidad, al aire libre a pleno sol (sin sombra). Las principales plantas nodrizas son encino blanco *Quercus* sp y espino de clavo *Acacia* sp, donde *R. ehrenbergiana* se distribuyéndose desde la base del tallo y a todo lo largo de la zona de goteo, lugar con menor incidencia de radiación solar y mayor disponibilidad de humedad (Figura 7).

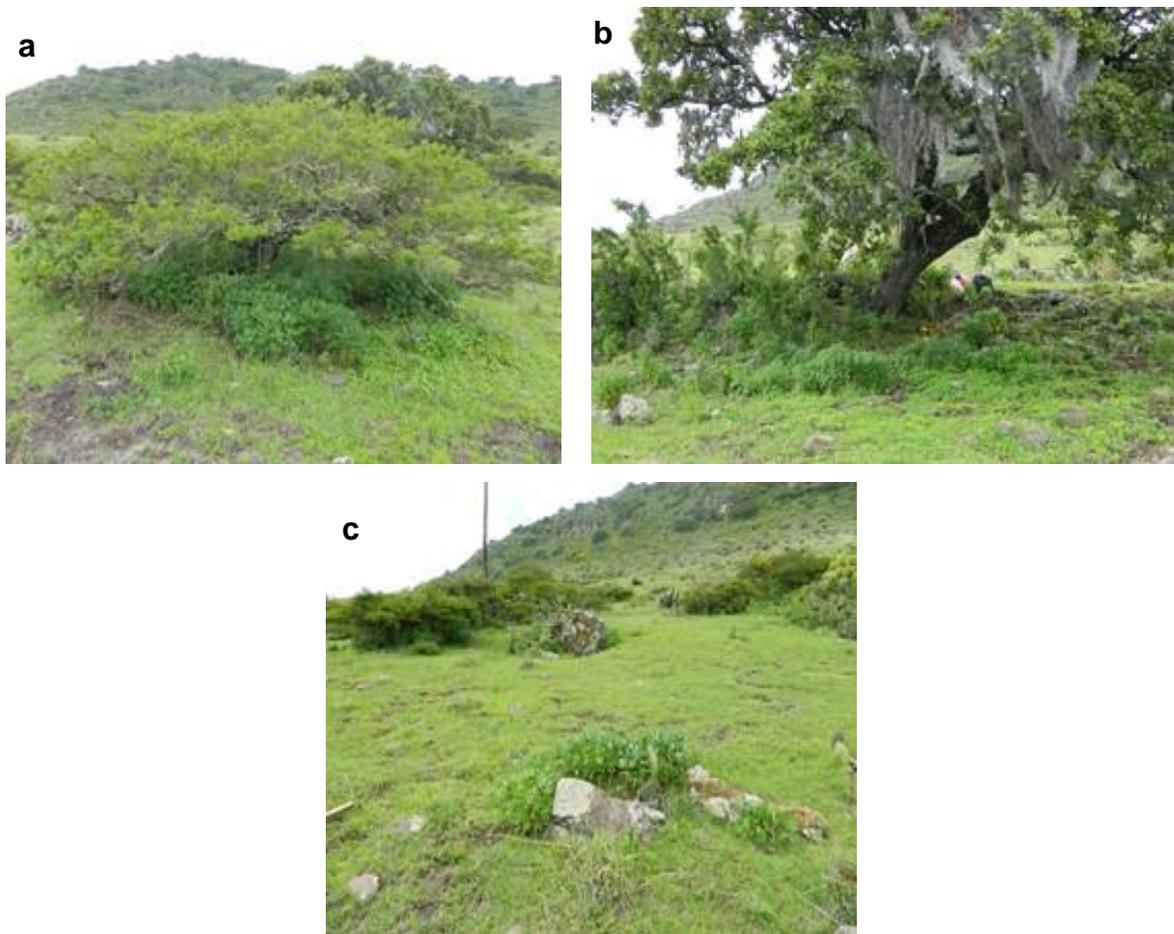


Figura 7. Hábitat de crecimiento de *R. ehrenbergiana* en San Miguel Tulancingo: a) espino de clavo *Acacia* sp., b) encino blanco *Quercus* sp y c) sin sombra.

En el primer muestreo se observó que el hábitat de crecimiento influye en el desarrollo de las plantas, registrando en los individuos bajo sombra de *Acacia* sp., mayor altura (42.29 ± 0.25 cm) de planta, similar diámetro en tallos (5.39 ± 0.20 mm) y menor número de hojas (18.25 ± 0.24); mientras que bajo sombra de *Quercus* sp presentaron igual altura (27.73 ± 0.17 cm) de planta, menor diámetro basal (4.06 ± 0.27 mm) y número de hojas (16.92 ± 0.26), comparado con plantas desarrolladas a pleno sol (Cuadro 1).

Cuadro 1. Variables descriptivas de *R. ehrenbergiana*, en cada hábitat de desarrollo, realizado el 15 de agosto del 2012.

Hábitat	Altura (cm)	Diám. basal (mm)	# de hojas
<i>Quercus</i> sp.	27.73 ± 0.17 b	4.06 ± 0.27 b	16.92 ± 0.26 b
<i>Acacia</i> sp.	42.29 ± 0.25 a	5.39 ± 0.20 a	18.25 ± 0.24 b
Campo abierto	33.42 ± 0.21 b	5.26 ± 0.20 a	23.33 ± 0.21 a

Los valores son promedio de 12 repeticiones \pm desviación estándar. Medias con letra diferente en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

En el segundo muestreo, la principal diferencia en los hábitats fue mayor altura de planta en individuos desarrollados bajo sombra de *Acacia* sp (48.58 ± 0.12 cm), seguido de plantas bajo sombra de *Quercus* sp (39.04 ± 0.24 cm), y finalmente en plantas expuestas a pleno sol (Cuadro 2).

Cuadro 2. Variables descriptivas de *R. ehrenbergiana*, en cada hábitat de desarrollo, realizado el 2 de septiembre del 2012.

Hábitat	Altura (cm)	Diám. basal (mm)	# de hojas
<i>Quercus</i> sp.	39.04 ± 0.24 b	3.77 ± 0.24 a	21.92 ± 0.31 a
<i>Acacia</i> sp.	48.58 ± 0.12 a	4.24 ± 0.20 a	26.42 ± 0.34 a
Campo abierto	30.72 ± 0.26 c	4.24 ± 0.13 a	26.50 ± 0.26 a

Los valores son promedio de 12 repeticiones ± desviación estándar. Medias con letra diferente en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

El mayor desarrollo de planta en altura, ubicadas bajo sombra de *Acacia* sp, sugiere que éste el hábitat más apropiado para el establecimiento de *R. ehrenbergiana*, y no está influenciado por el porcentaje de sombra proporcionado por la planta nodriza, ya que los encinos causan mayor sombreo sobre la plantas ubicadas a su alrededor. La simbiosis *R. ehrenbergiana* y *Acacia* sp, especie dominante en el área, ha permitido mantener una **población abundante** de la *R. ehrenbergiana* a largo de 8.0 hectáreas de matorral espinoso en el “Llano de la hierba”.

En la caracterización fisiológica de *R. ehrenbergiana*, se cuantificó la biomasa y área foliar; con respecto a biomasa, del total de materia seca acumulada, el 70.27% se concentra en la raíz, 16.69% en tallo principal y ramificaciones, 9.08% en hojas y 3.96% en inflorescencia (Cuadro 3).

Cuadro 3. Peso seco en los órganos de *R. ehrenbergiana* en la Mixteca Alta Oaxaqueña.

Parámetro	MS (g) de cada órgano				MST
	raíz	tallo	hoja	Inflorescencia	
1	21.06	4.95	3.27	0.57	29.85
2	19.05	7.10	3.18	0.57	29.91
3	13.63	3.39	2.06	0.81	19.90
4	18.23	3.82	1.93	1.19	25.17
5	16.50	3.51	1.88	1.45	23.34
6	14.33	2.54	1.38	0.97	19.21
7	24.51	5.51	2.98	1.33	34.32
8	18.23	4.40	1.93	1.19	25.75
9	24.51	3.48	2.98	1.33	32.29
10	19.05	2.34	3.18	0.57	25.14
Promedio	18.19	4.40	2.38	0.98	25.96
%	70.27	16.69	9.08	3.96	100.00

Los valores son de individuos colectados al azar, en los tres hábitats de desarrollo.

En área foliar, en las plantas evaluadas fluctuó de 271.53 a 377.43 cm² por planta, con número de 16.67 a 21.50, la cual no fue afectada por el hábitat de crecimiento, sin embargo, se tuvo menor peso seco (0.59 y 0.77 g) foliar en plantas localizadas bajo sombra de *Acacia* sp y *Quercus* sp, en relación a las de campo abierto (Cuadro 4). Mientras tanto, a nivel de hoja, las plantas bajo sombra presentan mayor tamaño (largo y ancho) y esto se refleja en mayor área foliar (37.67 - 38.04 cm²) por hoja, comparado con el área foliar (20.09 cm²) por hoja, de plantas expuestas directamente al sol (Cuadro 5).

Cuadro 4. Estimación del área foliar, utilizando parámetros a nivel de planta, en *R. ehrenbergiana*.

Hábitat	# hojas	AFc (cm ²)	PS de hojas
Encino	18.17 ± 0.16a	341.53 ± 0.32a	0.59 ± 0.24 a
Espino	16.67 ± 0.18a	377.43 ± 0.27a	0.77 ± 0.30 a
Sol	21.50 ± 0.20a	274.53 ± 0.12a	1.24 ± 0.22 b

Los valores son promedio de 12 repeticiones ± desviación estándar. Medias con letra diferente en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05. AFc = área foliar calculada, PS = peso seco.

Cuadro 5. Estimación del área foliar utilizando parámetros a nivel de hoja de *R. ehrenbergiana*.

Hábitat	Largo (mm)	Ancho (mm)	L x A (mm ²)	AFc (cm ²)	PS
Encino	88.13 ± 0.10 a	78.12 ± 0.16ab	6,959.1 ± 0.23b	37.67 ± 0.16a	0.127 ± 0.17 a
Espino	91.62 ± 0.13 a	89.12 ± 0.18 a	8,267.8 ± 0.27b	38.04 ± 0.27a	0.140 ± 0.37 a
Sol	67.23 ± 0.11 b	68.39 ± 0.09 b	4,615.3 ± 0.16a	20.09 ± 0.21b	0.132 ± 0.22 a

Los valores son promedio de 12 repeticiones ± desviación estándar. Medias con letra diferente en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).*Valor cuantificado con equipo LICOR LI3100. AF = área foliar, PS = peso seco.

Como conclusión, se encontró que el mejor estimador para determinar el área foliar de *R. ehrenbergiana* fue utilizando parámetros a nivel de hoja, y se obtiene del producto del largo (L) y ancho (A) de la misma, mediante la ecuación $Y = 30.669 \ln(x) - 236.21$, que brinda una precisión del 85.04% (Figura 8).

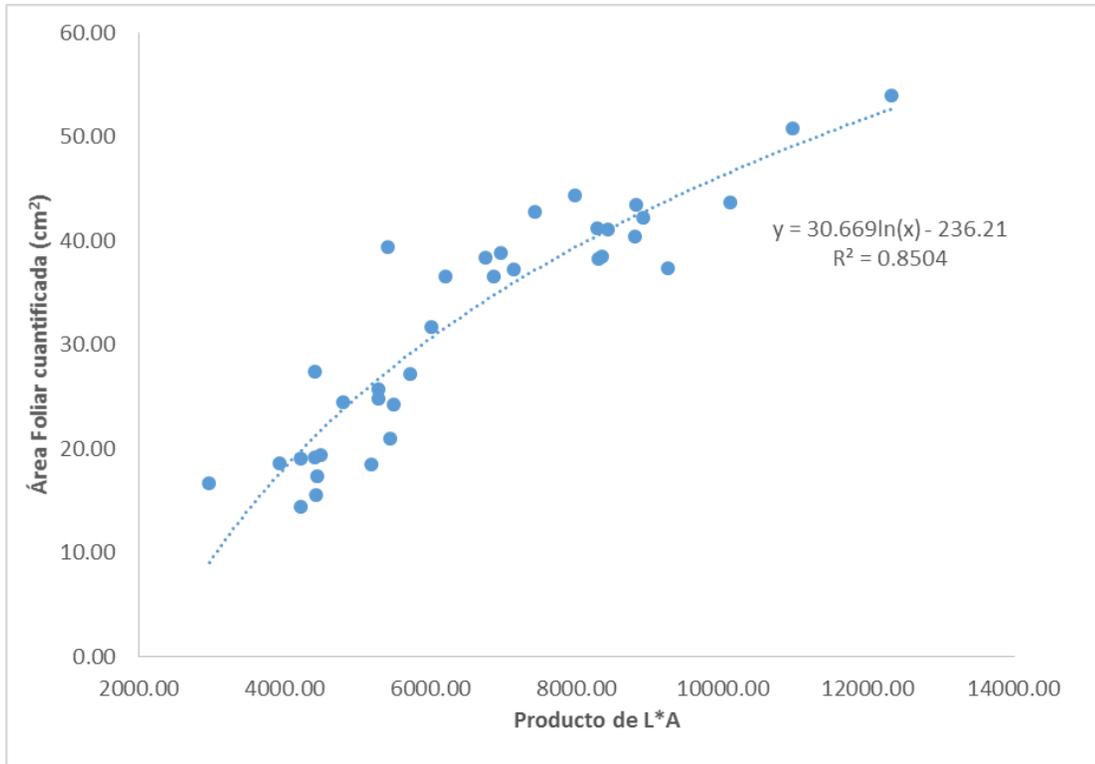


Figura 8. Correlación obtenida al utilizar el producto de L*A de la hoja, y el AF cuantificada con equipo integrador LI-COR LI3100.

2.3.6. Fenología y reproducción de *R. ehrenbergiana* en San Miguel Tulancingo

Otra característica importante fue describir a detalle la fenológico de *R. ehrenbergiana*. Para el caso de la Mixteca Alta Oaxaqueña, el ciclo comienza con la emergencia de yemas vegetativas, distribuidas a lo largo del rizomas, a mediados del mes de mayo, independientemente que haya empezado o no el periodo de lluvias, y el crecimiento vegetativo continua durante el resto del mes y se prolonga hasta mediados de junio. En la segunda quincena de junio se observa más del 50% de la población en floración y ésta se prolonga hasta inicios de próximo mes. En julio se lleva a cabo el crecimiento y maduración de semillas, y en agosto se lleva a

cabo la dispersa de las mismas, coincidiendo con el periodo de canícula (15 de julio-15 de agosto). A finales de agosto y principio de septiembre ocurre la senescencia de la planta; completando así su ciclo biológico. Sin embargo, si hay precipitación en la época de canícula, la planta presenta una segunda emisión de brotes, principalmente del tallo principal, teniendo nuevamente una etapa vegetativa, la cual se prolonga en los próximos meses hasta las primeras heladas. El resto del año, la planta entra en reposo manteniéndose activa la raíz, principal órgano de reserva (Figura 9).

La especie presenta reproducción sexual y asexual, predominado esta última, debido a la emisión de brotes del rizoma, lo que permite incrementar su tamaño al paso del tiempo, razón por la cual es el principal órgano de reserva de materia seca. Sin embargo, la semilla mantiene una viabilidad del 40% hasta un año después de ser cosechada, almacenada en un lugar seco y fresco. La flor genera suficiente semilla por planta, pero solo 50% es semilla de calidad cuyo peso aproximado es de 0.237 g el ciento; el resto es semilla vana. La semilla de calidad, es fácil de germinar, y en bajo condiciones de invernaderos, utilizando charolas de unicel de 200 cavidades con peat most, la emergencia ocurre de 4 a 5 días, con un porcentaje de emergencia superior al 80%. El suministro de agua y manejo de temperaturas por arriba de los 10°C permite mantener el crecimiento vegetativo durante todo el año.

Fenología de la hierba del perro *Roldana ehrenbergiana*

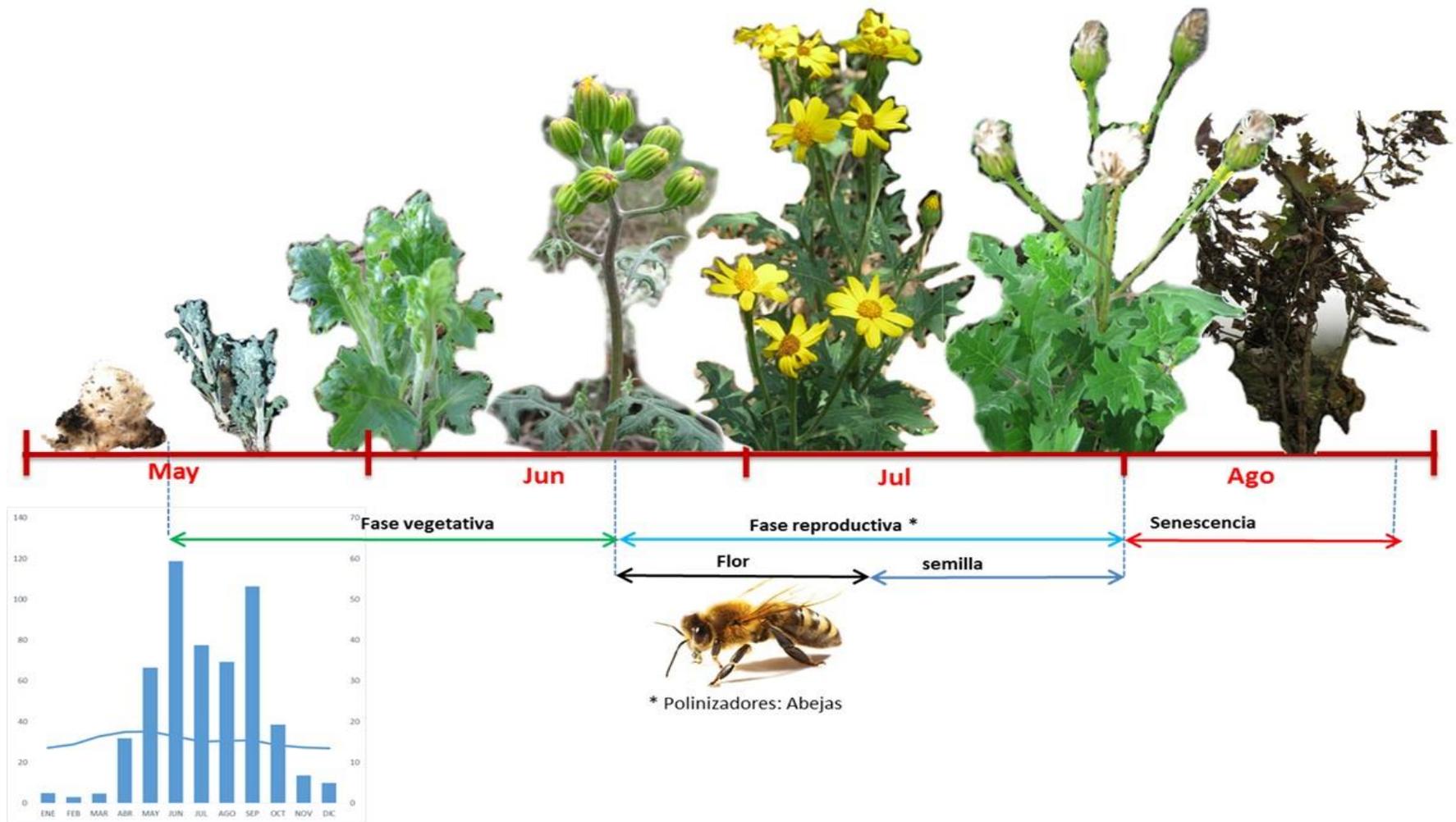


Figura 9. Fenología de *R. ehrenbergiana* bajo condiciones ambientales de la Mixteca Alta Oaxaqueña.

2.3.7. Distribución potencial de *R. ehrenbergiana*

De todos los modelos evaluados, el “tipo umbral” tuvo el mejor desempeño con una AUC de 0.991, lo que indica bajos niveles de errores de comisión e identificando correctamente todas las localidades donde ha sido reportada *R. ehrenbergiana*. El modelo predijo áreas de distribución en los estados de Oaxaca, Puebla y Tlaxcala, con una probabilidad de presencia de la especie mayor a 85% (Figura 10).

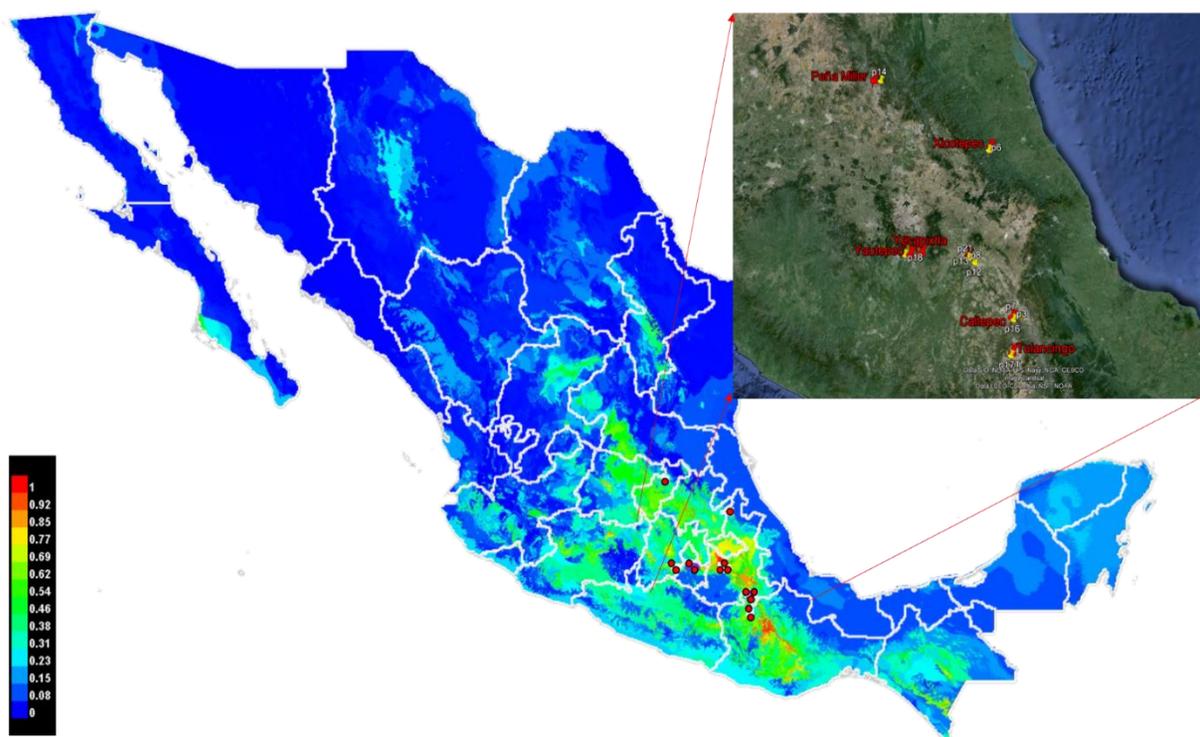


Figura 10. Puntos de colecta y distribución potencial de *R. ehrenbergiana* en México.

Con respecto a las variables bioclimáticas, las que presentaron mayor porcentaje de contribución al modelo fueron: isothermalidad (bio3), precipitación del trimestre más frío (bio19), rango de temperatura anual (bio7), temperatura media del trimestre con mayor precipitación (bio8) y temperatura media del trimestre más cálido (bio10), que en conjunto

explican 81.2% de la distribución de *R. ehrenbergiana*; sobresaliendo la variable isothermalidad, con mayor ganancia cuando se utilizan de forma aislada (análisis Jackknife) y por lo tanto presenta la información más útil en el modelo (Figura 11).

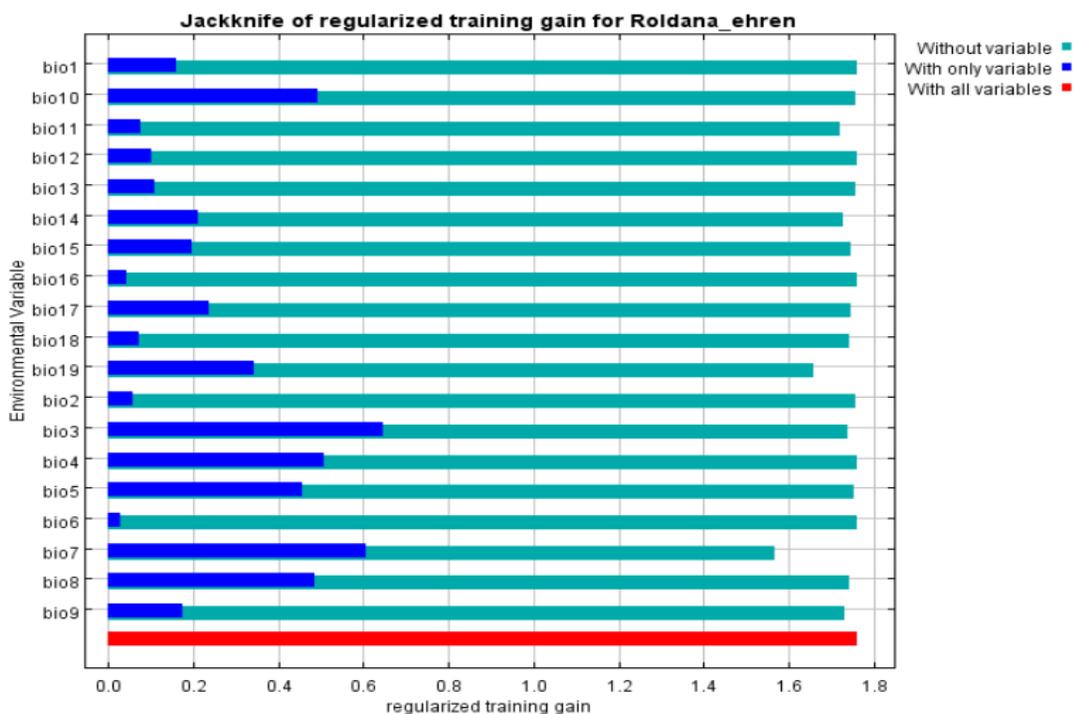


Figura 11. Contribución e importancia relativa de cada variable bioclimática (índice de Jackknife), en el modelo de distribución potencial de *R. ehrenbergiana*.

En términos ambientales, la isothermalidad [(rango de temperatura media diaria / rango de temperatura anual¹) (100)], fue 35.70 (29.81 - 40.63) lo que indica que la variación entre la temperatura diaria y anual debe estar alrededor de 35.70%, con precipitación del trimestre más frío (diciembre, enero y febrero) de 19.44 (21.95 - 16.12)

¹Rango de temperatura anual = Temperatura máxima del mes más cálido – Temperatura mínima del mes más frío.

mm; temperatura anual de 29.42 (25.90 - 34.10) °C, temperatura media del trimestre con mayor precipitación (julio, agosto y septiembre) de 19.92 (13.62 - 24.18) °C, y temperatura media del trimestre más cálido (abril, mayo, junio) de 21.68 (16.32 - 25.73) °C.

El presente estudio confirma que *R. ehrenbergiana* es una especie que se distribuye en la zona centro de México, asociado a matorral xerófilo, con periodo de floración y fructificación de mayor a julio (Redonda-Martínez y Villaseñor-Rios, 2011); y se complementa características como: a) mayor rango de altitud de distribución, b) temperatura media anual, c) precipitación, d) asociación con otras especies y sus efectos en el desarrollo de la especie y e) áreas potenciales de localización. El conocimiento de los parámetros estudiados y la combinación de las variables climáticas que explica su distribución actual y potencial, brinda las herramientas para conocer las condiciones ambientales que requiere *R. ehrenbergiana* para su ciclo de vida; no obstante, es importante considerar parámetros adicionales al clima como, características físicas y químicas de suelo e interacción química-biológica con plantas nodrizas, para obtener modelos más robustos e integrales (Cruz-Cárdenas *et al.*, 2014) y complementar la información ecológica ó agronómica para el establecimiento de áreas de reproducción y de cultivo a gran escala para la producción de raíz, órgano de interés por sus propiedades tóxicas.

2.4. CONCLUSIONES

La hierba del perro *R. ehrenbergiana* es una planta tóxica a herbívoros, que se utilizada como veneno para perros en Oaxaca y Puebla; se distribuye en los estado de

Morelos, Oaxaca, Puebla y Querétaro, a altitud promedio de 1,874.7 msnm, temperatura media anual de 18.78 °C y precipitación de 876.70 mm. En la Mixteca Alta Oaxaqueña, esta asociada a espino de clavo *Acacia* sp y encino blanco *Quercus* sp, lo que favorecido mayor altura de planta, tamaño y área foliar en hojas. El principal órgano de reserva y medio propagación es la raíz. La emergencia y crecimiento vegetativo ocurre en mayo-junio, floración a mediados de junio, crecimiento y maduración de semilla en julio, dispersión de semilla y senescencia de planta en agosto. Las áreas de distribución potencial se ubican en los estados de Oaxaca, Puebla y Tlaxcala, donde las principales variable descriptivas fueron: isothermalidad (bio3), precipitación del trimestre más frío (bio19), temperatura anual (bio7), temperatura media del trimestre más lluvioso (bio8) y temperatura media del trimestre más cálidos (bio10).

2.5. LITERATURA CITADA

- Bartlett M (1937)** Properties of sufficiency and statistical tests. Proceedings of the Royal Society (London), Series A 160:268-282
- Cruz-Cárdenas G, L López-Mata, J L Villaseñor y E Ortiz (2014)** Potential species distribution modeling and the use of principal componet analysis as predictor variables. Revista Mexicana de Biodiversidad 85: 189-199.
- Di Rienzo J A, M Balzarini G, F Casanoves, L Gonzalez, M Tablada and C Walter R (2013)**. Infostat Software Estadístico versión 2013I. Grupo infoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

- INEGI (2008)** Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos de San Miguel Tulancingo, Oaxaca, clave geoestadística 20287. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI): 9 pag.
- Funston A M (2008)** Taxonomic revisión of *Roldana* (Asteraceae:Senecioneae), a genus of the southwestern U.S.A., México and Central América. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 95: 282-337.
- Lindenmayer D B, B G Mackey y H A Nix (1996)** The bioclimatic domains of four species of commercially important eucalypts from south-eastern Australia. *Australian Forestry Journal* 59: 74-89.
- Martínez M (1959)** Las plantas medicinales de México. Ediciones Botas, tomo 1. Quinta edición. México D.F., pag.: 176-178.
- Phillips S J, R P Anderson y R E Schapire (2006)** Maximun entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231-259
- Redonda-Martínez R y J L Villaseñor-Rios (2011)** Flora del valle de Teotihuacán-Cuicatlán. Fascículo 89: 1-64.
- Royston P (1982)** An Extension of Shapiro and Wilk's W Test for Normality to Large Samples. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)* 31:115
- SMN (2014)** Normales Climatológicas. Comisión Nacional de Agua (CONAGUA)-Servicio Meteorológico Nacional (SMN). <http://smn.cna.gob.mx/>. Consultado el 24 de octubre del 2014.

**SECCIÓN 3. ACTIVIDAD INSECTICIDA E INHIBICIÓN DE LA ALIMENTACIÓN
CAUSADO POR LA HIERBA DEL PERRO *Roldana ehrenbergiana* EN
LARVAS DE *Epilachna varivestis* Y PROTECCIÓN FOLIAR EN FRIJOL**

2.1. RESUMEN	33
2.2. INTRODUCCIÓN	34
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS	36
2.3.1. Material vegetal.....	36
2.3.2. Cría y manejo de <i>E. varivestis</i>	36
2.3.3. Obtención del extracto y preparación de concentraciones.....	37
2.3.4. Caracterización fitoquímica del extracto	38
2.3.5. Bioensayos	38
2.3.6. Análisis estadístico.....	39
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
2.4.1. Efecto insecticida e insectistático de <i>R. ehrenbergiana</i> en <i>E. varivestis</i>	40
2.4.2. Protección foliar en la mitad de la hoja de <i>P. vulgaris</i>	44
2.4.3. Caracterización fitoquímica del extracto de <i>R. ehrenbergiana</i>	46
2.4.4. Mortalidad, inhibición de la alimentación, protección foliar y área foliar protegida de la raíz de <i>R. ehrenbergiana</i>	47
2.5. CONCLUSIONES.....	49
2.6. LITERATURA CITADA	49

3. ACTIVIDAD INSECTICIDA E INHIBICIÓN DE LA ALIMENTACIÓN CAUSADO POR LA HIERBA DEL PERRO *Roldana ehrenbergiana* EN LARVAS DE *Epilachna varivestis* Y PROTECCIÓN FOLIAR EN FRIJOL

3.1. RESUMEN

En la nueva visión de manejo de plagas el uso de plantas con propiedades insecticidas e insectistáticas ha mostrado gran potencial, sobresaliendo en la última década *A. indica* y la guanábana *Annona squamosa* L. con acción tóxica, antialimentaria; no obstante, existen otras especies con posible actividad plaguicida, razón por la cual, el objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto insecticida y de inhibición de la alimentación en larvas de *E. varivestis* y de protección foliar en frijol *Phaseolus vulgaris* L., del extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana*. En bioensayos en confinamiento sin elección de alimento (CS) el extracto se asperjó a concentraciones de 0.1 a 20,000 ppm en hojas cotiledonales de *P. vulgaris* var. Flor de mayo, y en bioensayos en confinamiento con elección de alimento (CC) a 5,000 ppm, cubriendo de manera parcial (base-punta, derecha-izquierda) la hoja. Después del secado se colocaron 10 larvas de primer instar de *E. varivestis* de menos de 24 h de edad en el haz y centro de la hoja, conformando cinco repeticiones por concentración y un testigo (etanol 96%). A los 7 d se registró la mortalidad y peso de la larva, así como área dañada, lo cual se utilizó para determinar mediante análisis Probit la Concentración Letal media (CL₅₀), Inhibición media de la Alimentación (IA₅₀) y Protección Foliar media (PF₅₀). La CL₅₀ en CS fue de 3,233.09 ppm con IA₅₀ de 1,575.22 ppm y PF₅₀ de 459.07 ppm, y en CC se obtuvo de 91.88 a 98.96% de Área Foliar Protegida (AFP) sin causar mortalidad ni afectar el peso

de larva, con daño foliar en la parte no tratada de 14.35 a 20.01%. De las acciones de mortalidad, IA, PF y AFP observadas con el extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana*, la PF y AFP deben ser el nuevo enfoque a considerar en la fitoprotección debido que al manejar la plaga se incrementa la presión de selección, se contamina el ecosistema y además se acorta la vida efectiva de esta alternativa, aunado a esto, el extracto en etanol es aceptado en las normas de agricultura orgánica con lo cual se puede proteger al cultivo de manera ecológica y bioracional. A esta estrategia, que promueve una visión de protección de cultivo y no de eliminación o manejo de la plaga, se debe integrar labores culturales y otras medidas orgánicas.

3.2. INTRODUCCIÓN

En la exploración y utilización de los recursos naturales el hombre ha aprovechado las plantas con acción tóxica para el manejo de plagas, aplicándolas de diversas maneras, sobresaliendo los extractos que causaron efecto insecticida. Este enfoque ha cambiado debido a que, por perseguir los mismos resultados que el paradigma organosintético que ha propiciado el desarrollo de resistencia en la plaga, también ha provocado contaminación al ambiente e intoxicación al usuario y consumidor, entre otros efectos perjudiciales.

La inhibición de la alimentación ha empezado a sobresalir en los programas de manejo fitosanitario, no obstante ésta estrategia continua provocando presión de selección a nivel del organismo. Ante ello, la protección foliar surge como alternativa de fitoprotección enfocada a implementar acciones en el cultivo para disminuir el consumo

foliar y evitar la presión de selección sobre la plaga. Varios investigadores han mostrado esta perspectiva; Huerta *et al.* (2010) asperjaron extracto acuoso de hojas de pirul *Schinus molle* L. al 3% (p/v) para proteger el 100% del follaje del olmo *Ulmus* spp., contra adultos de la galeruca *Xanthogaleruca luteola* Müller. Kubo y Klocke (1982) aplicaron sendanina, un limonoide obtenido del fruto de natal-mahogany *Trichilia roka* (Forssk.) Chiov., en discos foliares de maíz *Zea mays* L. y así lograron evitar el 95% (Protección Foliar (PF₉₅) de 6.2 y 37.9 µg/disco) del daño causado por larvas de tercer instar de los gusanos cogollero *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith y elotero *Heliothis zea* Boddie, a las 48 h. Arnason *et al.* (1985) usaron azadiractina, limonoide obtenida de *A. indica*, en discos foliares de *Z. mays* y protegieron un 50% del área foliar (PF₅₀ de 3.5 y 24 ppm) del daño provocado por larvas neonatas y de tercer instar del barrenador del maíz *Ostrinia nubilalis* Hübner. Seffrin *et al.* (2010) asperjaron el extracto en metanol de semillas de atemoya *Annona atemoya* Mabb y *A. squamosa* y protegieron un 50% del área foliar de la col *Brassica oleracea* L. (Concentración Disuasoria media (CD₅₀) de 20.1 y 2.3 ppm) del daño causado por larvas de tercer instar de gusano falso medidor *Trichoplusia ni* Hübner. Gou *et al.* (2014) utilizaron los alcaloides 1, 2 y totales de *Cynanchum komarovii* Ijinsk. para proteger el 50% del área foliar de *B. oleracea* (Concentración Antialimentaria media (CA₅₀) de 1.82, 3.89 y 1.56 mg mL⁻¹) del daño realizado por larvas de tercer instar de la palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella* L. Gao *et al.* (2011) aplicaron los compuestos 1-7 de tipo saponina-triterpenoide de corteza del tallo de la granada de montaña *Catunaream spinosa* para obtener una CA₅₀ de 106.73 hasta 5,467.82 µg mL⁻¹ en larvas de segundo instar de *P. xylostella* en *B. oleracea*.

Especies como *R. ehrenbergiana*, una planta tóxica para bovinos, caninos, equinos y ovinos (Pérez-Castorena *et al.*, 2006), que si bien se ha utilizado en cebos para controlar hormigas defoliadoras (Rodríguez, 1999) y ha mostrado toxicidad a una Dosis Letal media (DL₅₀ de 2.5% p/v) como macerado etanólico de la raíz en larvas de cuarto instar de *C. quinquefasciatus* (García *et al.*, 2012), aún no se ha determinado la acción conjunta insecticida, insectistática y de protección foliar del preparado alcohólico. Por lo que el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto tóxico e insectistático a través de la mortalidad e inhibición de la alimentación, en *E. varivestis* y la protección foliar en aplicación total y parcial a la hoja de *P. vulgaris* del extracto etanólico de la raíz de *R. ehrenbergiana*.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Material vegetal

Se colectó raíz fresca de *R. ehrenbergiana*² el 19 de agosto del 2010 en el municipio de San Miguel Tulancingo, Oaxaca, México; se secó en estufa de aire forzado Riossa® a 45 °C por 72 h, se molió en un molino de grano Corona® y se almacenó en bolsas de papel en lugar fresco, seco y a temperatura ambiente hasta su utilización.

3.3.2. Cría y manejo de *E. varivestis*

La utilizó un cría de *E. varivestis* que se incrementó para obtener todos los estados biológicos; los huevos se colectaron y colocaron en cajas Petri que contenían una torunda

²Material identificado previamente en septiembre de 2009 por el Dr. José Luís Villaseñor, investigador en taxonomía de la familia Asteraceae en el Instituto de Biología de la UNAM, México.

de algodón húmedo; después de la emergencia, las larvas se confinaron en jaulas entomológicas de 1.0 x 1.0 x 0.8 m delimitadas con "tul", donde se alimentaron con plantas de *P. vulgaris* var. Flor de mayo de 30 d de edad, sembradas en bolsas de polietileno negro de 35 x 35 cm, que contenían tierra negra como sustrato. Al terminar su desarrollo puparon en el envés de las hojas, de donde emergieron los adultos; éstos copularon y ovipositaron en la misma jaula y de ahí se colectaron los huevos y se continuó cotidianamente con la cría de este insecto a temperatura de 28 ± 2 °C y humedad relativa de $50 \pm 10\%$. Las larvas de primer instar se tuvieron constantemente para el desarrollo de esta investigación.

3.3.3. Obtención del extracto y preparación de concentraciones

Se pesaron 500 g de polvo de raíz de *R. ehrenbergiana* y se colocaron en un recipiente de vidrio, se agregó 1.0 L de etanol 96% y se dejó reposar por 48 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se filtró con papel Whatman® # 40 y se procedió a evaporar el etanol con un rotaevaporador Buchi R114® a temperatura de 70 °C hasta sequedad, para obtener el extracto. De éste se diluyeron 0.2 g en 10 mL de etanol 96% para conformar la concentración de 20,000 ppm (p/v), y a partir de ésta se efectuaron diluciones subsecuentes con etanol 96% para elaborar dos series de concentraciones; la primera con 10,000, 1,000, 100, 10, 1 y 0.1 ppm y la segunda con 10,000, 6,600, 4,600, 3,200, 2,100, 1,400 y 1,000 ppm. Adicionalmente se preparó la concentración de 5,000 ppm diluyendo 0.05 g del extracto en 10 mL de etanol 96%.

3.3.4. Caracterización fitoquímica del extracto

Se realizó una prueba preeliminar para confirmar la presencia de terpenoides, para ello, se pesó 1.0 g del extracto y se resuspendió en 3 mL de etanol 96%, se adicionó el reactivo de Lieberman-Buchard (tres gotas de CHCl_3 , tres gotas de anhídrido acético (Ac_2O) y tres gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado en frío). El análisis se complementó por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando el medio de elusión acetato de etilo:metanol (8:2), revelado con vainillina 1% - ácido sulfúrico 10% a 110 °C por 5 min.

3.3.5. Bioensayos

Se implementaron bioensayos en confinamiento, sin y con elección de alimento. En la modalidad de sin elección de alimento (CS) se evaluaron las dos series de concentraciones; para ello, los peciolos de las hojas cotiledonales de *P. vulgaris* var. Flor de mayo de 15 d de edad se introdujeron en goteros con 10 mL de agua destilada, se asperjaron con las concentraciones del extracto hasta “punto de goteo” y después del secado se colocaron junto con el gotero dentro de un vaso de plástico # 16 (capacidad de 473 mL) y se depositaron 10 larvas de primer instar de menos de 24 h de edad de *E. varivestis* en el haz y parte central de la hoja, finalmente el vaso se cerró con una tapa acondicionada con un “respiradero”.

En el bioensayo con elección de alimento (CC) se aplicó el procedimiento descrito anteriormente, pero ahora solo con 5,000 ppm y protegiendo de manera parcial (base o punta, derecha o izquierda) la hoja. En ambos casos, cada 12 h se inyectó agua a los goteros con una jeringa para reponer el agua perdida por transpiración. Cada vaso se consideró una unidad experimental, y se tuvieron cinco repeticiones en cada

concentración, con su respectivo testigo (etanol 96%). A los 7 d se retiraron las larvas vivas, se contaron y pesaron, y se midió el área dañada en la hoja.

En el bioensayo en CS, la mortalidad se calculó en porcentaje considerando el número larvas de tratadas como 100%. El peso de larva viva se determinó en porcentaje considerando al peso del testigo como 100% y a la reducción (%) de peso se le denominó Inhibición de la Alimentación (IA). La área dañada se cuantificó mediante imágenes digitales de las hojas, con los programas GIMP® ver. 2.8 (Kimball y Mattis, 2013) e Image Tool ver. 3.0 (Wilcox, 2002), calculando el daño foliar del tratamiento (en píxeles) en porcentaje en relación al área foliar total de la misma hoja (en píxeles), y comparando con el testigo, como 100%; a la reducción se le denominó Protección Foliar (PF). En la modalidad de CC, la mortalidad (%) y peso de larva (mg) se midieron directamente sin hacer referencia a un testigo, ya que la larva pudo elegir alimentarse del área tratada y no tratada, en tanto que al área foliar tratada con el extracto considerada como 100%, se le restó el área dañada (%) y a la diferencia se consideró como Área Foliar Protegida (AFP). Se realizaron cinco repeticiones en cada tratamiento. El experimento se estableció en condiciones de laboratorio a temperatura de 25 ± 3 °C y humedad relativa de $50 \pm 5\%$.

3.3.6. Análisis estadístico

Los datos de los bioensayos de CS y CC se sometieron a las pruebas de los supuestos de normalidad (Shapiro Wilks modificado) (Royston, 1982) y homogeneidad de varianza (prueba de Bartlett) (Bartlett, 1937) para posteriormente aplicar un ANAVA o Kruskal Wallis, y posteriormente determinar diferencias estadísticas entre tratamientos con la prueba de comparación de medias Tukey ($P \leq 0.05$) o comparaciones múltiples (P

≤ 0.05), respectivamente, en el programa InfoStat 2013I (Di Rienzo, 2013). En las **comparaciones múltiples**, éstas se realizaron comparando cada media de rango entre tratamientos para determinar diferencia estadística. Los valores de mortalidad del segundo bioensayo en CS se corrigieron con la ecuación de Abbott (1925) ya que ésta fue menor a 12% en el testigo; y en conjunto con la IA y PF se aplicó el procedimiento Probit con el programa BioStat 5.8.1. (BioStat, 2013) para obtener la Concentración Letal media (CL₅₀), IA 80 y 50 (IA_{80 y 50})³ y PF 80 y 50 (PF_{80 y 50})⁴.

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1. Efecto insecticida e insectistático de *R. ehrenbergiana* en *E. varivestis*

En la primera evaluación de la actividad del extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* la mortalidad fue significativa ($P \leq 0.05$) a 10,000 ppm (Cuadro 1), por lo que el espectro de efectividad se consideró de 1,000 a 10,000 ppm. Esta toxicidad, la cual se tomó como referencia para evaluar el rango de respuesta biológica, se complementó también con IA y PF, las cuales mostraron efecto significativo a partir de 1,000 ppm.

³ Concentración a la cual se inhibe en 80 y 50% la ganancia de peso de la larva, respecto al peso normal.

⁴ Concentración a la cual se inhibe en 80 y 50% el daño foliar, respecto al testigo.

Cuadro 1. Mortalidad e inhibición de la alimentación en larvas de *E. varivestis* y protección foliar en *P. vulgaris* ocasionados por el extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* en la primera serie de concentraciones.

Concentración (ppm)	Mortalidad (%)	IA (%)	PF (%)
20,000	(38.40 ± 0.93 ^{&}) 32.90 ^{a†}	(78.40 ± 0.15) 32.00 a	(93.14 ± 0.07) 34.20 a
10,000	(72.00 ± 0.54) 36.30 a	(92.06 ± 0.08) 37.00 a	(96.76 ± 0.02) 36.20 a
1,000	(18.00 ± 1.38) 24.40 ab	(68.25 ± 0.30) 29.80 a	(84.09 ± 0.06) 28.60 a
100	(2.00 ± 2.24) 16.40 b	(23.04 ± 0.24) 23.20 ab	(14.39 ± 1.07) 23.00 ab
10	(0.00 ± 0.00) 13.50 b	(0.00 ± 0.00) 10.50 b	(0.00 ± 0.00) 10.50 b
1	(0.00 ± 0.00) 13.50 b	(0.00 ± 0.00) 10.50 b	(0.00 ± 0.00) 10.50 b
0.1	(0.00 ± 0.00) 13.50 b	(0.00 ± 0.00) 10.50 b	(0.00 ± 0.00) 10.50 b
0.0 [§]	(0.00 ± 0.00) 13.50 b	—	—

[&]Los valores reales (entre paréntesis) corresponden a 10 individuos y son promedio de cinco repeticiones ± desviación estándar. [†]media de los rangos de los tratamientos con letra diferente en la columna son estadísticamente diferentes (comparaciones múltiples, 0.05). [§]Concentración correspondiente al testigo (etanol 96%).

En el estudio de concentración y efectividad más estrecha (Cuadro 2), el bloque de significancia en los tres parámetros evaluados se constata a partir de 3,200 ppm, indicando que en esta concentración es evidente un efecto insecticida e insectistático en la conchuela del frijol, éste último en la modalidad de inhibición de la alimentación, así como de protección foliar. El rango de toxicidad significativo ($P \leq 0.05$) de 62.00 a 74.00% se presentó de 3,200 a 10,000 ppm, que con las respuestas y concentraciones inferiores permitió calcular la CL_{50} en 3,233.09 (2,687.77 - 3,843.03) ppm. En las variables restantes, el rango de significancia fue de 86.98 – 92.23% y de 77.61 - 90.93% para IA y PF, respectivamente, que en relación con los puntos inferiores permitió estimar la IA_{80} de

2,556.20 ppm con una IA₅₀ de 1,575.22 (1,376.24 - 1,735.22) ppm, y la PF₈₀ de 2,516.68 ppm con PF₅₀ de 459.07 (171.05 – 746.21) ppm.

Cuadro 2. Mortalidad e inhibición de la alimentación en larvas de *E. varivestis* y protección foliar en *P. vulgaris* provocados por el extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* en la segunda serie de concentraciones.

Concentración (ppm)	Mortalidad (%)	IA (%)	PF (%)
10,000	(74.00 ± 0.15 ^{&}) 32.50 ^a [¶]	(86.98 ± 0.08*) 27.50 ab	(77.61 ± 0.08*) 20.40 abc
6,600	(68.00 ± 0.26) 30.40 ab	(92.23 ± 0.09*) 33.30 a	(90.93 ± 0.03) 34.00 a
4,600	(62.00 ± 0.45) 27.90 abc	(91.32 ± 0.07*) 31.20 a	(88.67 ± 0.11) 31.40 ab
3,200	(62.00 ± 0.24) 27.60 abc	(90.34 ± 0.07) 29.90 a	(83.99 ± 0.10) 26.60 abc
2,100	(36.00 ± 0.50) 17.20 bcd	(67.42 ± 0.17) 15.30 bc	(66.23 ± 0.26*) 15.20 cd
1,400	(18.00 ± 0.72*) 15.00 d	(43.94 ± 0.63) 8.60 c	(72.82 ± 0.17) 18.40 bc
1,000	(28.00 ± 0.16) 9.80 cd	(63.36 ± 0.10*) 14.20 bc	(64.28 ± 0.29) 15.00 cd
0.0 ^δ	(4.00 ± 1.37) 3.60 d	—	—
CL₅₀: 3,233.09 ppm		IA₈₀: 2,556.20 ppm	PF₈₀: 2,516.68 ppm

[&]Los valores reales (entre paréntesis) corresponden a 10 individuos y son promedio de cinco repeticiones ± desviación estándar. [¶]media de los rangos de los tratamientos con letra diferente en la columna son estadísticamente diferentes (comparaciones múltiples, 0.05). ^δConcentración correspondiente al testigo (etanol 96%).*Valores no considerados en el cálculo de las CL₅₀, IA₅₀ ó PF₅₀, respectivamente.

Al comparar la actividad insecticida del extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* con otras investigaciones se encontró que ésta es mejor que el polvo de rotenona *Lonchocarpus* sp (CL₅₀ de 6,100 ppm) en larvas neonatas de *T. ni*, y también mejor que el aceite de hoja de clavo *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry, que extractos refinados de mukau *Melia volkensii* Gürke y de nim *A. indica*, y de polvo de

riania *Ryania speciosa* Vahl (CL₅₀ de 4,900, 6,100, 8,300 y 8,800 ppm) en larvas neonatas de gusano soldado *Pseudaletia unipuncta* Haworth; y similar al polvo de *R. speciosa* y aceite de *S. aromaticum* (CL₅₀ de 3,500 y 3,700 ppm) en larvas neonatas de *T. ni*; y menos tóxico que los extractos refinados de cedrillo *Trichilia americana* (Sessé & Moc.) T.D. Penn., *M. volkensis* y nimbo *Azadirachta excelsa* Jacobs (CL₅₀ de 1,200, 1,500 y 2,100 ppm) en larvas neonatas de *P. unipuncta* (Akhtar *et al.*, 2008). En otros estudios donde el extracto fue suministrado a la dieta del insecto, el extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* resultó mejor que los extractos en etanol de hojas jóvenes y maduras de *S. molle* [CL₅₀ de 1.28 y 2.51% (p/v); equivalente a 12,800 y 25,100 ppm] en larvas de tercer instar de *X. luteola* (Chiffelle *et al.*, 2013); que el extracto en etanol de semillas de *A. squamosa* [CL₅₀ de 0.39 y 0.67% (p/v); 3,900 y 6,700 ppm] en larvas de tercero y cuarto instar de *P. xylostella* (Leatemia e Isman, 2004); y que el extracto en etanol de hojas de *M. azedarach* [CL₅₀ de 6.86% (p/v); 68,600 ppm] en larvas de cuarto instar de la conchuela de las cucurbitáceas *Epilachna paenulata* German (Valladares *et al.*, 2003).

La IA₅₀ de 1,575.22 ppm obtenida en larvas sobrevivientes del extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* es mejor que los extractos refinados de *T. americana* y polvo de *R. speciosa* (CI₅₀⁵ de 5,200 y 6,500 ppm) en larvas neonatas de *T. ni*, y que los extractos de semilla de *M. volkensis* y extracto crudo del tallo *A. excelsa* (CI₅₀ de 2,400 y 4,000 ppm) en larvas neonatas de *P. unipuncta* (Akhtar *et al.*, 2008). Pero es menos efectivo que los extractos en metanol crudos de semilla de *A. atemoya* y *A. squamosa* (CI₅₀ de 117 y 38 ppm) a los 10 d en larvas de *T. ni* (Seffrin *et al.*, 2010) y los extractos

⁵CI₅₀ (Concentración Inhibitoria media) y es igual a IA₅₀.

crudos del tallo de *A. excelsa*, semilla de *A. indica* y *M. volkensii*, y de corteza *M. azedarach* (CI₅₀ de 2.90, 2.08, 9 y 100 ppm) a los 7 d en larvas de *T. ni* (Akhtar *et al.*, 2008).

La PF₅₀ de 459.07 ppm del extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* es mejor que los extractos crudos en metanol de semillas de *A. atemoya* y *A. squamosa* (CD₅₀ de 20.10 y 2.30 mg mL⁻¹; 20,100 y 2,300 ppm) en larvas de tercer instar de *T. ni* (Seffrin *et al.*, 2010); y que las saponinas triterpenoides 3 y 6 (CA₅₀ de 946.13 y 5,467.82 µg mL⁻¹; 946.13 y 5,467.82 ppm) en larvas de segundo instar de *P. xylostella* en *B. oleracea* (Gao *et al.*; 2011); y que los alcaloides 1, 2 y totales *C. komarovii* (CA₅₀ de 1.56, 1.82 y 3.89 mg mL⁻¹; 1,560, 1,820 y 3,890 ppm) en larvas de tercer instar de *P. xylostella* (Gou *et al.* (2014). Pero es menos efectivo que la saponina-triterpenoide 5 de *C. spinosa* (CA₅₀ de 106.73 µg mL⁻¹; 106.73 ppm) en larvas de segundo instar de *P. xylostella* en *B. oleracea* (Gao *et al.*, 2011).

3.4.2. Protección foliar en la mitad de la hoja de *P. vulgaris*

El extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* no provocó mortalidad ni redujo el peso de larva cuando a ésta se le dió a escoger entre área no tratada y tratada a la concentración de 5,000 ppm (Cuadro 3), lo que indica que la larva tiende a evitar el extracto y prefiere alimentarse de la área no tratada, logrando con ello un AFP de 91.88 a 98.96% del área aplicada (no de la área total). Estos datos evidencian que no existe efecto fumigante del extracto ya que los vapores, de existir, no afectaron a la larva cuando ésta se alimentó de la mitad no tratada de la hoja y causó de 14.35 a 20.01% de daño foliar (Figura 1); en campo esto se traducirá en repelencia de alimentación y protección

del cultivo. Se infiere que no existen indicios de traslocación o acción sistémica del extracto cuando éste se aplica en aspersión al follaje, ya que en ningún tratamiento se observó protección adicional al área tratada, aun cuando el extracto se aplicó en la base de la hoja donde se presume existe un flujo de agua a través del peciolo con dirección base-punta en la hoja.

Cuadro 3. Mortalidad, peso de larva y área foliar protegida de *E. varivestis* en *P. vulgaris* ocasionados por extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* a 5,000 ppm.

Parte tratada de la hoja	Mortalidad (%)	Peso de larva (mg)	AFP (%)
Base	0.00 ± 0.00 a^{¶¶}	11.46 ± 0.19 a^{¶¶}	93.14 ± 0.02 b^{¶¶¶}
Punta	0.00 ± 0.00 a	11.06 ± 0.06 a	91.88 ± 0.02 b
Derecha	2.00 ± 2.24 a	11.14 ± 0.29 a	98.96 ± 0.01 a
Izquierda	0.00 ± 0.00 a	9.52 ± 0.23 a	93.43 ± 0.02 b

Los valores corresponden al valor de 10 individuos y son promedio de cinco repeticiones ± desviación estándar. ^{¶¶}Medias de tratamientos con letra diferente en la misma columna son estadísticamente diferentes (comparaciones múltiples, 0.05) y ^{¶¶¶}(Tukey, 0.05).

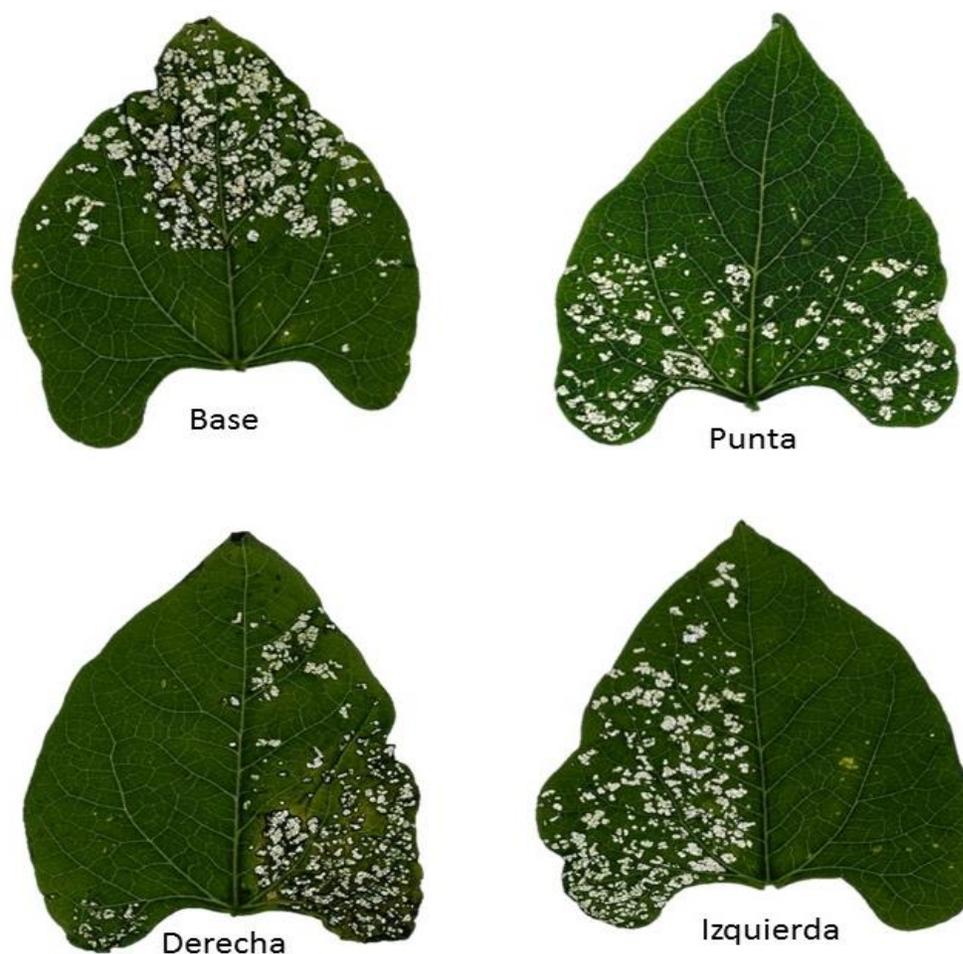


Figura 12. Área protegida (base ó punta, derecha ó izquierda) del daño larval de *E. varivestis* con el extracto en etanol de raíz de *R. ehrenbergiana* a 5,000 ppm.

3.4.3. Caracterización fitoquímica del extracto de *R. ehrenbergiana*

La aplicación del reactivo de Lieberman-Buchard en el extracto, y el revelado de la CCF con vainillina en medio ácido; en ambos casos se obtuvo una coloración violeta típica de compuestos terpenoides (Wagner y Bladt, 1996), lo que confirma la presencia de dichos metabolitos en el extracto en etanol de raíz de *R. ehrenbergiana* (Figura 2). La caracterización fitoquímica se dirigió hacia terpenoides, basados en estudios previos de García (2010), quienes encontraron la presencia de este único grupo de compuestos en el extracto en etanol de raíz de *R. ehrenbergiana*; y puede inferirse la presencia de

sesquiterpenos, los cuales han sido aislados en extracto en metanol de raíz, en la misma especie (Pérez-Castorena *et al.*, 2005).

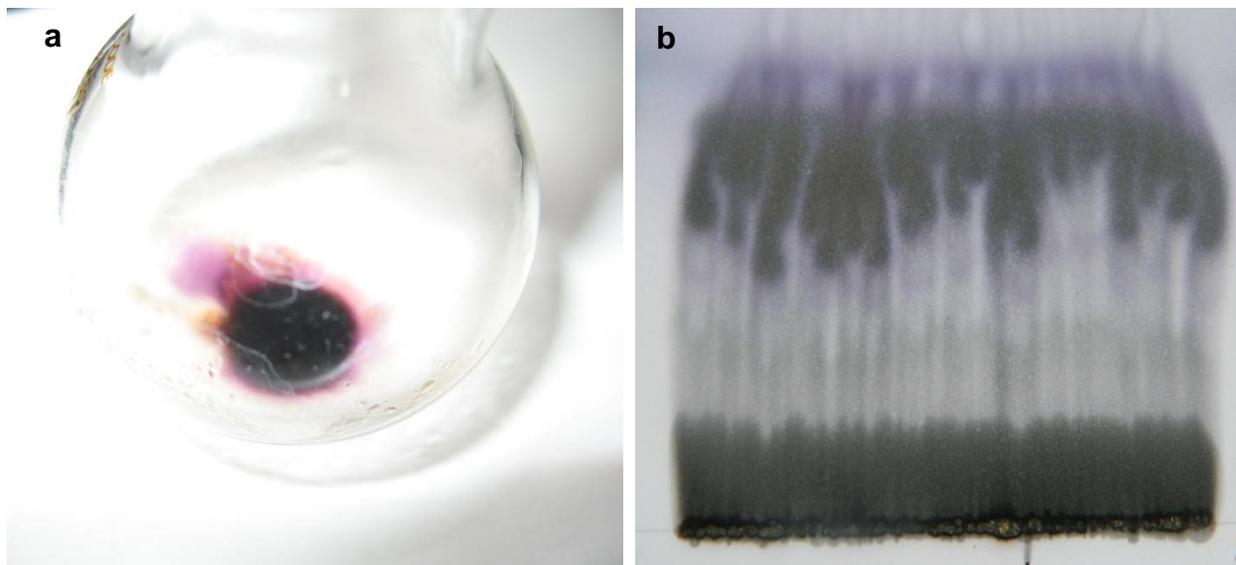


Figura 2. Desarrollo de color violeta en extracto en etanol de raíz de *R. ehrenbergiana*: a) reactivo de Liebermann-Buchard, y b) CCF revelada con vainillina en medio ácido.

3.4.4. Mortalidad, inhibición de la alimentación, protección foliar y área foliar protegida de la raíz de *R. ehrenbergiana*

En los bioensayos sin elección de alimento (CS) el extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* mostró una CL_{50} de 3,233.09 ppm, ocasionó una IA_{50} de 1,575.22 ppm y PF_{50} de 459.07 ppm en larvas de *E. varivestis*. En la modalidad con elección de alimento (CC) se observó hasta 98.96% de AFP con 5,000 ppm, sin afectar a la larva que se alimentó en la mitad no protegida. El efecto insecticida e insectistático en CS es menor que los extractos metanólicos de *A. atemoya* y *A. squamosa* con CL_{50} de 382.30 y 167.50 ppm y Cl_{50} de 117.00 y 38.00 ppm en larvas neonatas de *T. ni* (Seffrin *et al.*, 2010), sin

que los autores consideraran la protección foliar en sus evaluaciones, lo que denota que no se persigue la protección al cultivo como estrategia de fitoprotección.

La importancia de encontrar efectos diferenciados en el extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* brinda herramientas para seleccionar el enfoque más apropiado de manejo de larvas de *E. varivestis*, ante lo cual se debe evitar el uso de concentraciones superiores a 1,375.22 ppm que provocarían inhibición media de la alimentación en la plaga y posteriormente mortalidad, para no presionar al insecto y así dejar de lado la visión imperante de los plaguicidas o plaguistáticos organosintéticos que por 75 años han estado enfocados a controlar o eliminar el total de la población de la plaga, acción que por añadidura incluye a los enemigos naturales, además de aumentar la presión de selección y desarrollar resistencia y contaminar al ambiente e intoxicar mamíferos.

La alternativa a seguir debe ser el uso de concentraciones de 171.05 hasta 746.21 ppm con miras a la protección vegetal del 50% del área foliar cuando no exista una alternativa de alimentación para la plaga. Cuando exista otra opción de alimentación, como en campo, se observará que la larva tenderá a alimentarse de cultivos adyacentes no tratados como se demostró con la aplicación de 5,000 ppm en doble selección.

Así mismo, el uso de extractos en etanol es aceptado en agricultura orgánica con lo cual se brinda una herramienta de protección en este sistema de producción. Adicionalmente se determinó que los compuestos presentes en el extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* son del grupo de los terpenoides. La nueva visión en la producción de alimentos debe empezar a implementar acciones dirigidas a la protección

de cultivos y evitar el mortalidad o inhibición de la alimentación en la plaga, complementado con acciones de resistencia vegetal, inductores de resistencia, rotación de cultivos, uso de enemigos naturales, etc., todas enfocadas a una producción inocua, ecológica y orgánica.

3.5. CONCLUSIONES

El extracto en etanol de la raíz de la hierba del perro *R. ehrenbergiana* asperjado en hojas de frijol en bioensayos en confinamiento sin elección de alimento provoca efecto insecticida con concentración letal media con 3,233.09 ppm e insectistático a través de la Inhibición media de la alimentación con 1,575.22 ppm en larvas de *E. varivestis* y protección foliar media con 459.07 ppm. En ensayos de confinamiento con elección de alimento en la misma hoja, no actúa como insecticida e insectistático, pero se logra un AFP de 91.88 a 98.96% a 5,000 ppm a los 7 d del tratamiento.

3.6. LITERATURA CITADA

Abbott W S (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology 18:265-267.

Akhtar Y and M B Isman (2004) Comparative growth inhibitory and antifeedant effects of plant extracts and pure allelochemicals on four phytophagous insect species. Journal of Applied Entomology 128:32-38.

Akhtar Y, Y Yeoung and M Isman (2008) Comparative bioactivity of selected extracts from Meliaceae and some comercial botanical insecticides against two noctuid

caterpillars, *Trichoplusia ni* and *Pseudaletia unipuncta*. *Phytochemistry Reviews* 7:77-88.

Arnason T J, B J R Philogéne, N Donskov, M Hudon, C McDougall, G Fortier, P Morand and D Gardner (1985) Antifeedant and insecticidal properties of azadirachtin to the european corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 38(1):29-34.

Bartlett M (1937) Properties of sufficiency and statistical tests. *Proceedings of the Royal Society (London), Series A* 160:268-282

BioStat (2013) BioStat ver. 5.8.1 professional, Analyst Soft, Chicago, USA.

Chiffelle I, A Huerta, M Celis and J E Araya (2013) Proximal analysis and insecticidal effects of extracts from pepper tree (*Schinus molle*) leaves on elm leaf beetle (*Xanthogaleruca luteola*) larvae. *Industrial Crops and Products* 43:523-528.

Di Rienzo J A, M Balzarini G, F Casanoves, L Gonzalez, M Tablada and C Walter R (2013). Infostat Software Estadístico versión 2013I. Grupo infoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Gao G, Z Lu, S Tao, S Zhang and F Wang (2011) Triterpenoid saponins with antifeedant activities from stem bark of *Catunaregam spinosa* (Rubiaceae) against *Plutella xylostella* (Plutellidae). *Carbohydrate Research* 346:2200-2205.

García G (2010) Potencial insecticida de *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H. Rob. & Brettell y *Asclepias notha* W. D. Stevens en larvas de *Culex quinquefasciatus* Say. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. 30 pags.

García G, R M Soto H, C Rodríguez H, M A Goytia J y V A González (2012) Potencial insecticida de extractos de *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H. Rob. & Brettell en

larvas de *Culex quinquefasciatus* Say. Revista Latinoamericana de Química (suplemento especial) 39:188.

Gou H, M Yang and Q Qi (2014) Insecticidal and antifeedant effects of two alkaloids from *Cynanchum komarovii* againsts larvae of *Plutella xylostella* L. Journal of Applied Entomology 138:133-140.

Huerta A, I Chieffelle, K Puga, F Azúa and E. Araya (2010) Toxicity and repellence of aqueous and ethanolic extracts from *Schinus molle* on elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola*. Crop Protection 29:1118-1123.

Kimball S y P Mattis (2013). Programa de manipulación de imágenes GNU. GIMP ver. 2.8.4

Kubo I and J A Klocke (1982) An insect growth inhibitor from *Trichilia roka* (Meliaceae). Experientia 38(6):639-640.

Leatemia J A and M B Isman (2004) Toxicity and antifeedant activity of crude seed extracts of *Annona squamosa* (Annonaceae) against lepidopteran pests and natural enemies. International Journal of Tropical Insect Science 24(2):150-158.

Pérez-Castorena A L, A Arciniegas, M L Hernández, R A Toscano, J L Contreras and A Romo de V (2006) 8,9-seco-eremophilanolides from *Roldana ehrenbergiana*. Journal of the Mexican Chemical Society 50(4):157-159.

Pérez-Castorena A L, A Arciniegas, M L Hernández, I de la Rosa, J L Contreras y A Romo de V (2005) Furanoeremophilanes from *Roldana ehrenbergiana*. Zeitschrift für Naturforschung 60b:1088-1092.

Rodríguez H C (1999) Técnicas tradicionales para el combate de hormigas defoliadoras. *In*: Memoria de Avances en la Investigación 1998. Cibrián T J, C Llanderal C, R

Guzmán P y D Alvarado R (eds). Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México, México. p. 15-17.

Royston P (1982) An Extension of Shapiro and Wilk's W Test for Normality to Large Samples. Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics) 31:115

Seffrin R C, I Shikano, Y Akhtar and M B Isman (2010) Effects of crude seed extracts of *Annona atemoya* and *Annona squamosa* L. against the cabbage looper, *Trichoplusia ni* in the laboratory and greenhouse. Crop Protection 29:20-24.

Valladares G, L Garbin, M T Defagó, C Carpinella y S Palacios (2003) Actividad antialimentaria e insecticida de un extracto de hojas senescentes de *Melia azedarach* (Meliaceae). Revista de la Sociedad Entomológica Argentina 62 (1-2):53-61.

Wagner H and S Bladt (1996) Plant Drug Analysis: A thin Layer Chromatography Atlas. 2d. Ed. Springer Verlag. New York. USA. 384 p.

Wilcox C, S Dove, W McDavid and D Greer (2002). Image Tool, Version 3.0. Department of Dental Diagnostics at the University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX.

SECCIÓN 4: ACTIVIDAD INSECTICIDA DEL MACERADO, EXTRACTO Y FRACCIONES DE LA HIERBA DEL PERRO *Roldana ehrenbergiana* EN LARVAS DE *Aedes aegypti*

4.1. RESUMEN	54
4.2. INTRODUCCIÓN	55
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS	56
4.3.1. Material vegetal.....	56
4.3.2. Cría y manejo de <i>A. aegypti</i>	57
4.3.3. Elaboración del macerado y extracto de <i>R. ehrenbergiana</i>	57
4.3.4. Caracterización fitoquímica del extracto	58
4.3.5. Fraccionamiento del extracto por Cromatografía en Capa Fina (CCF).....	58
4.3.6. Caracterización fitoquímica de las fracciones de <i>R. ehrenbergiana</i>	59
4.3.5. Preparación de concentraciones del macerado, extracto y fracciones	59
4.3.6. Bioensayos	60
4.3.7. Análisis estadístico.....	60
4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
4.4.1. Actividad biológica del macerado, extracto y fracciones de <i>R. ehrenbergiana</i>	61
4.4.2. Análisis fitoquímico del extracto de <i>R. ehrenbergiana</i>	67
4.4.3. Efectividad de macerado, extracto y fracciones de raíz de <i>R. ehrenbergiana</i>	71
4.5. CONCLUSIONES.....	73
4.6. LITERATURA CITADA.....	74

4. ACTIVIDAD INSECTICIDA DEL MACERADO, EXTRACTO Y FRACCIONES DE LA HIERBA DEL PERRO *Roldana ehrenbergiana* EN LARVAS DE *Aedes aegypti*

4.1. RESUMEN

El género *Roldana* tiene importancia debido a los compuestos químicos tóxicos encontrados en las diversas especies, en el caso de la hierba del perro *R. ehrenbergiana*, se han identificado sesquiterpenos de tipo eremofilanolidos y furanoemofilanos a los cuales se les atribuye la toxicidad en la especie. Sin embargo, es necesario determinar si estos compuestos son los responsables de la actividad toxica observada en *C. quinquefasciatus* y la mortalidad e inhibición del crecimiento en *E. varivestis* y protección foliar en frijol. Por lo tanto, el objetivo fue evaluar la toxicidad del macerado, extracto y fracciones obtenidos en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* en mosquito doméstico *Aedes aegypti*, en un rango de concentraciones en macerado de 1.0 a 20% (p/v), extracto de 10,000 a 100,000 ppm, y fracciones de 10 a 1,000 ppm. Las evaluaciones se realizaron en larvas de cuarto instar de *A. aegypti*, se colocaron 20 larvas en un vaso con 100 mL de agua destilada, después se agregó 1 mL de cada tratamiento y de etanol 96% como testigo. Se conformaron cuatro repeticiones por concentración. A las 24 h se registró la mortalidad, a la que se le realizó el análisis PROBIT para determinar la Concentración Letal media (CL₅₀). El macerado, extracto y fracciones causaron CL₅₀ de 8.29 a 12.32%, de 51,268.34 a 61,217.24 ppm y de 92.65 a 220.92 ppm, respectivamente. Las fracciones tóxicas fueron la C1 y D1 con rendimiento de 0.07 y 0.13 %, y se obtuvieron en la fracción de hexano:acetato de etilo 17:3 y 16:4; son las responsables de la actividad toxica de los preparados en larvas de *A. aegypti*.

4.2. INTRODUCCIÓN

El género *Roldana* está integrado por 58 especies, de las cuales 55 se ubican en la República Mexicana, distribuidas desde el suroeste de Estados Unidos hasta Centroamérica (Redonda-Martínez y Villaseñor-Ríos, 2011). En México se tienen dos centros de diversidad: a) Eje NeoVolcánico Transversal y centro-sur de la Sierra Madre del Sur, y b) Sierra Madre de Chiapas-Cordillera Centroamericana de Chiapas y América Central (Funston, 2008); lo cual ha favorecido la realización de estudios en taxonomía y fitoquímicos.

Los compuestos encontrados en *Roldana* sp son: derivados de cacalol obtenido del extracto en éter de petróleo de la raíz de *Roldana heterogama* (Benth.) H. Rob. & Brettell (Bohlmann y Zdero, 1978); eremofilanólidos del extracto en hexano y metanol de la raíz de *Roldana sessilifolia* (Hook. & Arn.) H. Rob. & Brettell (Delgado *et al.*, 1991 y 1996); eremofilanos, flavonoides y ácido quínico del extracto en metanol de *Roldana aschenborniana* (S. Schauer) H. Rob. & Brettell (Arciniegas *et al.*, 2004); tocotrienoles e hidroquinonas del extracto en metanol de la parte aérea de *Roldana barba-johannis* (DC.) H. Rob. & Brettell (Céspedes *et al.*, 2004); eremofilanos, angulifolinas y triacetilglucósidos del extracto en acetona y hexano de la raíz de *Roldana angulifolia* (DC.) H. Rob. & Brettell (Arciniegas *et al.*, 2006); eremofilanolidos de *Roldana lobata* La Llave (Maldonado *et al.*, 2008); y 9-oxo-furanoeremofilanos y otros compuestos del extracto subsecuente de hexano-acetato y metanol de raíz y parte aérea de *Roldana reticulata* (DC.) H. Rob. & Brettell (Arciniegas *et al.*, 2013).

En *R. ehrenbergiana* se han identificado rolderenbergiana A, B, β -sitosterol, estigmasterol, quercitrina, L- δ -hidroxinor-valina y sendarwina I, en extracto en metanol de hojas y raíz (Pérez-Castorena *et al.*, 2005); así como rolderenbergiana C, D, 3-O-calenduladiol mistirato e isopalmitato en extracto en metanol de flores (Pérez-Castorena *et al.*, 2006). La actividad tóxica documentada en *R. ehrenbergiana* es atribuida a rolderenbergiana A, B, C, D y sendarwina I; sin embargo, solo este último compuesto mostró moderada actividad citotóxica [Concentración Inhibitoria media (CI₅₀) de 16.6 μ M] en células cancerosas de próstata línea celular PC-3 (Pérez-Castorena *et al.*, 2005).

No obstante, es necesario determinar si dichos compuestos son los responsables de la actividad tóxica observada en larvas de cuarto instar de *C. quinquefasciatus* (García *et al.*, 2012) y de la acción insecticida e inhibición del crecimiento en larvas de primer instar de *E. varivestis* y protección foliar en frijol. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad tóxica del macerado, extracto y fracciones obtenidas del extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* en larvas de cuarto instar temprano de *A. aegypti*, e identificar la fracción responsable de la actividad tóxica.

4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1. Material vegetal

Se colectó raíz fresca de *R. ehrenbergiana*⁶ el 19 de agosto del 2010 (M1) y 19 de agosto del 2011 (M2) en el municipio de San Miguel Tulancingo, Oaxaca, México. En

⁶Material identificado previamente en el 2009 por el Dr. José Luís Villaseñor, investigador en taxonomía de la familia Asteraceae. Instituto de Biología de la UNAM, México.

ambos casos, cada muestra se secó en estufa de aire forzado Riossa® a 45 °C por 72 h, se molió en un molino de grano Corona® y se almacenó en bolsas de papel en un lugar fresco y seco, a temperatura ambiente hasta, su utilización.

4.3.2. Cría y manejo de *A. aegypti*

Se utilizó una colonia de *A. aegypti*, colocando masas de huevos en bandejas de plástico (47 x 35 x 12 cm) con agua para su incubación, una vez que emergieron, a las larvas se les proporcionó alimento para peces cada 2 d hasta la formación de pupas, las cuales se colectaron y colocaron en un recipiente con agua dentro de una jaula entomológica, donde emergieron los adultos; éstos copularon y ovipositaron en la misma jaula y de ahí se colectaron los huevos y se continuó cotidianamente con la cría. De esta manera se tuvieron todos los estadios biológicos, en diversas edades, en alta población para disponer constantemente de larvas de cuarto instar temprano, con los que se realizó esta investigación. La cría se manejó a una temperatura de 25 ± 2 °C y humedad relativa de $60 \pm 10\%$.

4.3.3. Elaboración del macerado y extracto de *R. ehrenbergiana*

El macerado se preparó con 20 g de raíz molida de las muestras M1 y M2, y a cada una se agregaron 100 mL de etanol 96% y se dejaron en reposo por 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se filtraron con papel Whatman® # 40 y el líquido o macerado se colocaron en recipientes de vidrio para su utilización. Para el extracto se pesaron 500 g de raíz molida de las muestras M1 y M2, se agregó 1.0 L de etanol 96%, se dejó en reposo por 48 h a temperatura ambiente, después se filtraron en papel Whatman® # 40 y

se evaporó el etanol con un rotaevaporador Buchi R114® a temperatura de 70 °C, hasta sequedad para obtener los extractos.

4.3.4. Caracterización fitoquímica del extracto

Se realizaron pruebas preliminares para terpenoides; para ello, se pesó 1.0 g de cada extracto y se resuspendió en 3 mL de etanol 96%, se adicionó el reactivo de Lieberman-Buchard (tres gotas de CHCl_3 , tres gotas de anhídrido acético (Ac_2O) y tres gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado en frío). El análisis se complementó por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando el medio de elución acetato de etilo:metanol (8:2) y revelado con vainillina 1% - ácido sulfúrico 10% a 110 °C por 5 min. El resto de los extractos se almacenaron en recipientes de vidrio a 25 °C hasta su utilización.

4.3.5. Fraccionamiento del extracto por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

El extracto de la muestra M2 (17.0 g) se sometió a un proceso de fraccionamiento por el método de cromatografía preparativa en columna utilizando sílica gel G 60 Merck (70-230 mesh ASTM) como absorbente. El proceso de elución se efectuó en dos fases; primero se utilizó la mezcla de hexano:acetato de etilo (AcOEt) en proporciones de 20:0 a 0:20 (v/v), la segunda fase fue AcOEt :metanol en proporciones de 10:0 a 0:10 (v/v); en ambas fases, el volumen final de cada proporción fue de 1.0 L. Se recolectaron 5 fracciones 200 mL en cada proporción, a las que se evaporó el disolvente con un rotaevaporador Buchi R114® hasta un volumen final de 2 mL.

4.3.6. Caracterización fitoquímica de las fracciones de *R. ehrenbergiana*

En la caracterización fitoquímica, en cada proporción de disolventes (hexano:AcOEt y AcOEt:metanol), parte media de cada nivel o proporción de elución, se colectó una muestra con un capilar y se analizó por CCF, revelado con vainillina 1% - ácido sulfúrico 10% a 110 °C por 5 min para observar coloración y obtener los R_f^7 de cada muestra y combinar las fracciones con igual R_f y coloración similares. Una vez combinadas las fracciones, se caracterizaron nuevamente en CCF, las fracciones de la fase hexano:AcOEt se utilizó el medio de elución hexano:AcOEt (10:10), revelado con vainillina 1% - ácido sulfúrico 10%, a 110 °C por 5 min para terpenoides; mientras que las fracciones de la fase AcOEt:metanol se utilizó el medio de elución AcOEt:metanol (50:50) revelado con polietilenglicol (PEG) 5% y 2-aminoetil difenilborinato (NP) 1% y observado bajo luz ultravioleta para flavonoides. Cada una de las fracciones se almacenaron por separado en viales de cristal a temperatura ambiente hasta su utilización.

4.3.5. Preparación de concentraciones del macerado, extracto y fracciones

Del macerado al 20% (p/v) se efectuaron diluciones subsecuentes con etanol 96% para elaborar dos series de concentraciones, denominadas Ventanas Biológicas (VB); la VB1 fue de 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 (v/v), y la VB2 de 13.2, 12.1, 11.4, 10, 6.6, 4.6, 3.2 y 1.0% (v/v). Del extracto se pesó 1.0 g y se agregaron 10 mL de etanol 96% para conformar la primera concentración en la VB1 de 100,000 ppm a partir de la cual se prepararon las concentraciones de 10,000, 1,000, 100, 10, 1.0 ppm, y después la VB2 de 100,000, 66,000, 46,000, 32,000, 21,000, 14,000 y 10,000 ppm. En fracciones se pesó

⁷ R_f = relación de migración de una sustancia, expresada de acuerdo con la fórmula: $R_f = \text{Distancia recorrida por la muestra} / \text{distancia recorrida por la mezcla de eluyente}$.

0.05 g de cada una y en las primeras cuatro fracciones (A1-D1) se disolvió con 5 mL de etanol 96%, y el resto (E1-O) con metanol 96%, para preparar una concentración de 10,000 ppm; posteriormente, de las fracciones que provocaron mortalidad superior al 50% a las 24 h, se prepararon las VB1 a concentraciones de 1,000, 100 y 10 ppm, posteriormente las concentraciones de VB2 fueron de 1,000, 660, 460, 320, 210, 140 y 100 ppm, o en rango de 100, 66, 46, 32, 21, 14 y 10 ppm.

4.3.6. Bioensayos

En las evaluaciones se utilizaron 20 larvas de cuarto instar temprano (OMS, 1981) de *A. aegypti*; se colocaron en un recipiente de plástico que contenía 100 mL de agua destilada, después se aplicó 1.0 mL de cada concentración o disolventes (etanol y metanol) como testigo. Se realizaron cuatro repeticiones por concentración. A las 24 h se registró la mortalidad considerando, muerta aquella larva sin movimiento. El experimento se estableció en condiciones de laboratorio a temperatura de 25 ± 2 °C y humedad relativa de $50 \pm 5\%$.

4.3.7. Análisis estadístico

Los datos de mortalidad (%) de la segunda serie de la VB2 se sometieron a pruebas de los supuestos de normalidad (Shapiro Wilks modificado) (Royston, 1982) y homogeneidad de varianza (prueba de Bartlett) (Bartlett, 1937), para posteriormente aplicar ANAVA o Kruskal Wallis, y posteriormente determinar diferencias estadísticas entre tratamientos con la prueba de comparación de Tukey ($P \leq 0.05$) o comparaciones múltiples ($P \leq 0.05$), respectivamente, en el programa InfoStat 2013I (Di Rienzo, 2013). En las **comparaciones múltiples**, éstas se realizaron comparando cada media de rango

entre tratamientos para determinar diferencia estadística. Después se realizó un análisis PROBIT con el programa BioStat ver. 5.8.1 (BioStat, 2013) para obtener Concentración Letal media (CL₅₀).

4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1. Actividad biológica del macerado, extracto y fracciones de *R. ehrenbergiana*

4.4.1.1. Macerado

En la primera ventana biológica, la evaluación de la actividad tóxica del macerado en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana*, el rango de mortalidad de 0 a 72.5 - 75.0% a las concentraciones de 1 - 20%, en ambas muestras. En el bioensayo subsecuente (Cuadro 1), la mortalidad fue significativa ($P \leq 0.05$) a partir de 6.6% en ambas muestras, llegando a ser de 40 a 87.5% y de 30.0 a 65.0% para la muestra M1 y M2; datos que considerando los dos valores inferiores permitió obtener la CL₅₀ de 8.29 (7.28 - 9.46)% en M1, y de 12.32 (11.14 - 13.63)% para M2. Lo anterior indica que la raíz colectada en agosto del 2010 (M1) fue más tóxica que la de agosto del 2011 (M2), no obstante de tener un año de almacenamiento; lo cual puede ser posible, ya que si la muestra fue colectada bajo condiciones húmedas en el suelo, ésta es más tóxica comparada con colectas realizadas en sequía (García *et al.*, 2010), debido a una menor síntesis de compuestos o un cambio en la relación ó concentración de los mismos; respuesta observada en hojas de romero *Rosmarinus officinalis* L., en donde la emisión de compuestos sesquiterpénicos se inhibió después de 4 días de estrés hídrico (Ormeño *et al.*, 2007), debido a que el estrés disminuye la tasa de fotosíntesis neta en las plantas, como en

hierba de San Juan *Hypericum perforatum* L., la cual fue de 6.2 a 3.8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ después de 12 días bajo estrés hídrico, lo que afectó la producción de metabolitos, propicia la disminución de ciertos compuestos (hipericina) y el incremento de otros (hiperforina) (Zobayed *et al.* 2007). La actividad tóxica del macerado de la raíz de *R. ehrenbergiana* es menor que el macerado acuoso de la semilla de *A. muricata* al 5%, el cual provocó 100% de mortalidad en larvas de tercer instar de *A. aegypti* (Sanabria *et al.*, 2009).

Cuadro 1. Mortalidad ocasionada por el macerado de la raíz de *R. ehrenbergiana* en larvas de cuarto instar de *A. aegypti*

Concentración (%)	Mortalidad (%)	
	M1 ^a	M2 ^b
13.2	87.50 ± 0.22 a [¶]	65.00 ± 0.27 a
12.1	62.50 ± 0.15 ab	47.50 ± 0.20 ab
11.4	57.50 ± 0.30 ab	45.00 ± 0.22 ab
10.0	55.00 ± 0.31 b	27.50 ± 0.35 bc
6.6	40.00 ± 0.35 bc	30.00 ± 0.38 bc
4.6	20.00 ± 0.71 cd	10.00 ± 0.82 cd
3.2	15.00 ± 0.38 cd	7.50 ± 1.28 cd
0.0 ^δ	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 d
CL₅₀	8.29%	12.32%

^aM1= raíz colectada el 19 de agosto del 2010; ^bM2= raíz colectada el 19 de agosto del 2011. Los valores corresponden a 20 individuos y son promedio de cuatro repeticiones ± desviación estándar. [¶]Medias con letra diferente en la columna son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ^δConcentración correspondiente al testigo (etanol 96%).

4.4.1.2. Extracto

El extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* provocó 100% de mortalidad a 100,000 ppm en ambas muestras, seguido de 12.5 y 35.0% de mortalidad a 10,000 ppm para las muestras M1 y M2, por lo que el rango de efectividad se consideró de 10,000 a 100,000 ppm. En bioensayo posterior (Cuadro 2), la respuesta fue significativa ($P \leq 0.05$) a 46,000 y 66,000 con mortalidad de 40 y 50% para M2 y M1, respectivamente, y la correlación de las siete dosis permitió ubicar la CL_{50} de 61,217.24 (55,309.56 - 67,176.22) ppm para M1 y una CL_{50} de 51,268.34 (44,845.86 - 58,007.25) ppm para M2, en larvas de cuarto instar de *A. aegypti*. Lo anterior indica que ambas muestras presentan el mismo nivel de toxicidad.

Cuadro 2. Mortalidad causada por extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* en larvas de cuarto instar de *A. aegypti*

Concentración (ppm)	Mortalidad (%)	
	M1 ^a	M2 ^b
100,000	95.00 ± 0.06 a[¶]	90.00 ± 0.09 a
66,000	50.00 ± 0.28 b	65.00 ± 0.20 ab
46,000	25.00 ± 0.40 bc	40.00 ± 0.54 bc
32,000	22.50 ± 0.67 c	22.50 ± 0.99 cd
21,000	5.00 ± 1.15 c	17.50 ± 0.98 cd
14,000	12.50 ± 0.77 c	7.50 ± 0.67 cd
10,000	2.50 ± 2.00 c	10.00 ± 1.41 cd
0.0 ^δ	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 d
CL₅₀	61,217.24 ppm	51,268.34 ppm

^aM1= raíz colectada el 19 de agosto del 2010; ^bM2= raíz colectada el 19 de agosto del 2011. Los valores corresponden a 20 individuos y son promedio de cuatro repeticiones ± desviación estándar. [¶]Medias con letra diferente en la columna son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ^δConcentración correspondiente al testigo (etanol 96%).

La CL₅₀ de la muestra M2 del extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* es igual de efectiva que el extracto etanólico-acuoso de corteza de *A. muricata* (CL₅₀ de 43.62 (36.60 - 52.63) mg mL⁻¹; equivalente a 43,620 (36,600-52,630) ppm) en larvas de cuarto instar de *A. aegypti* (Bobadilla *et al.*, 2005); pero las CL₅₀ de M1 y M2 tienen menor efectividad que el extracto en etanol de frutos de *R. communis* y *M. azedarach*, y que semillas de *A. muricata* (CL₅₀ de 860, 900 y 1,800 ppm) en larvas de cuarto instar temprano de *A. aegypti* (Parra *et al.*, 2007); y que los extractos en etanol de hojas de cardosanto *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey y cempaxúchitl *Tagetes patula* L. (CL₅₀ de 12.2 y 143.8 ppm) en larvas de cuarto instar de *A. aegypti* (Vidal *et al.*, 2009); y que extractos metanólicos de *A. muricata*, *S. saponaria* y *G. sepium* (CL₅₀ de 7.26, 658.64 y 1,532.89 ppm) en larvas de tercer instar de *A. aegypti* (Amariles-Barrera, 2013).

4.4.1.3. Fracciones

En las 16 fracciones obtenidas del extracto en etanol de la raíz de la muestra M2 de *R. ehrenbergiana*, la mortalidad del 100% se obtuvo en C1 y D1, y de 22.5 y 17.5% con K1 y E1 a 10,000 ppm; el resto de fracciones no provocaron mortalidad en larvas de cuarto instar temprano de *A. aegypti*. En la búsqueda de mejor correlación efectividad y concentración de las fracciones sobresalientes, en la VB1 se observó de 30 a 87.5% de mortalidad en la fracción C1 de 10 a 1,000 ppm, lo que permitió delimitar el rango de toxicidad de 10 a 100 ppm; mientras que D1 provocó de 10 a 72.50% de mortalidad en el mismo rango, sin embargo la toxicidad media se ubicó de 100 a 1,000 ppm (Cuadro 3).

Cuadro 3. Mortalidad causada por las fracciones C1 y D1 del extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* en larvas de cuarto instar de *A. aegypti* en la primera ventana biológica

Concentración (ppm)	Mortalidad (%)	
	C1	D1
1,000	87.50 ± 0.06	72.50 ± 0.24
100	65.00 ± 0.20	37.50 ± 0.40
10	30.00 ± 0.47	10.00 ± 2.00
0.0 ^δ	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

Los valores corresponden a 20 individuos y son promedio de cuatro repeticiones ± desviación estándar.

^δConcentración correspondiente al testigo (etanol 96%).

En bioensayos subsecuentes, la fracción C1 presentó mortalidad significativa ($P \leq 0.05$) de 55.0% a 100 ppm (Cuadro 4) y basado en respuestas y concentraciones inferiores permitió ubicar la CL_{50} de 92.65 (60.39 - 142.13) ppm; por su parte, la fracción D1 tuvo una toxicidad máxima ($P \leq 0.05$) de 75.0% de mortalidad a 1,000 ppm, y basado en datos inferiores, se obtuvo la CL_{50} de 220.92 (132.61-368.06) ppm. Lo anterior indica que la fracción C1 y D1 presentan mismo nivel de toxicidad, en larvas de cuarto instar de *A. aegypti*.

Cuadro 4. Mortalidad causada por fracciones C1 y D1 del extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* en larvas de cuarto instar de *A. aegypti* en la segunda ventaba biológica

Concentración (ppm)	Mortalidad (%) C1	Concentración (ppm)	Mortalidad (%) D1
100	55.00 ± 0.18 a [¶]	1,000	75.00 ± 0.08 a ^{¶¶}
66	42.50 ± 0.28 ab	660	72.50 ± 0.13 a
46	15.00 ± 0.86 abc	460	65.00 ± 0.20 ab
32	10.00 ± 1.41 bc	320	62.50 ± 0.15 ab
21	2.50 ± 2.00 c	210	55.00 ± 0.38 abc
14	0.00 ± 0.00 c	140	40.00 ± 0.35 bc
10	0.00 ± 0.00 c	100	27.50 ± 0.75 cd
0.0 ^δ	0.00 ± 0.00 c	0.0 ^δ	0.00 ± 0.00 cd
CL₅₀	92.65 ppm	CL₅₀	220.92 ppm

Los valores corresponden a 10 individuos y son promedio de cinco repeticiones ± desviación estándar. [¶]Medias con letra diferente en la columna son estadísticamente diferentes (comparaciones múltiples, 0.05) y ^{¶¶} (Tukey, 0.05). ^δConcentración correspondiente al testigo (etanol 96%).

El compuesto de la fracción C1, con CL₅₀ de 92.65 ppm presenta una toxicidad similar a los alcaloides libres (CL₅₀ de 87.5 (75.7 - 100.7) ppm) obtenidos del extracto en metanol de semilla de colorín *Erythrina americana* Mill; mientras en la fracción D1, con CL₅₀ de 220.92, la toxicidad se compara al alcaloide puro β-eritroidina (CL₅₀ de 225 (205 - 258) ppm) evaluados en larvas cuarto instar temprano de *C. quinquefasciatus* (García *et al.*, 2004). Los compuestos presentes en las fracciones C1 y D1 pertenecen a los terpenoides, debido a que el extracto desarrolló una coloración violeta con el reactivo de

Lieberman-Buchard (Wagner y Bladt, 1996), y puede tratarse de furanoemofilanos o seco-eremofilanos, compuestos aisladas previamente del extracto en metanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* y que mostraron moderada actividad anticancerígena (Pérez-Castorena *et al.*, 2005 y 2006).

4.4.2. Análisis fitoquímico del extracto de *R. ehrenbergiana*

En la proceso de extracción de compuestos activos, utilizando 1.0 L de etanol 95%, de una muestra de 500 g de raíz seca (M2 de raíz de *R. ehrenbergiana*, se obtuvo 27.45 g de extracto, lo que representa 5.49% de rendimiento. Al extracto se aplicó el reactivo de Lieberman-Buchard y el revelado de la CCF con vainillina en medio ácido, en ambos casos se obtuvo una coloración violeta típico de terpenoides (Wagner y Bladt, 1996). Posteriormente, en el fraccionamiento de la muestra, de un total de 147 fracciones obtenidas en la elución de hexano, acetato de etilo (AcOEt) y metanol, se integraron 16 fracciones con mismo Rf, calculados a partir de la CCF. Las primeras 13 desarrollaron colores característicos de tipo rosa, violeta, verde y café (Figura 1), con Rf de 0.01 a 0.76; mientras que las ultimas 3 fracciones de la fase AcOEt:metanol (10:0 a 0:10) mostraron una tonalidad azul en todas las fracciones (Figura 2), pero con Rf de 0.23 a 0.69 (Cuadro 5).

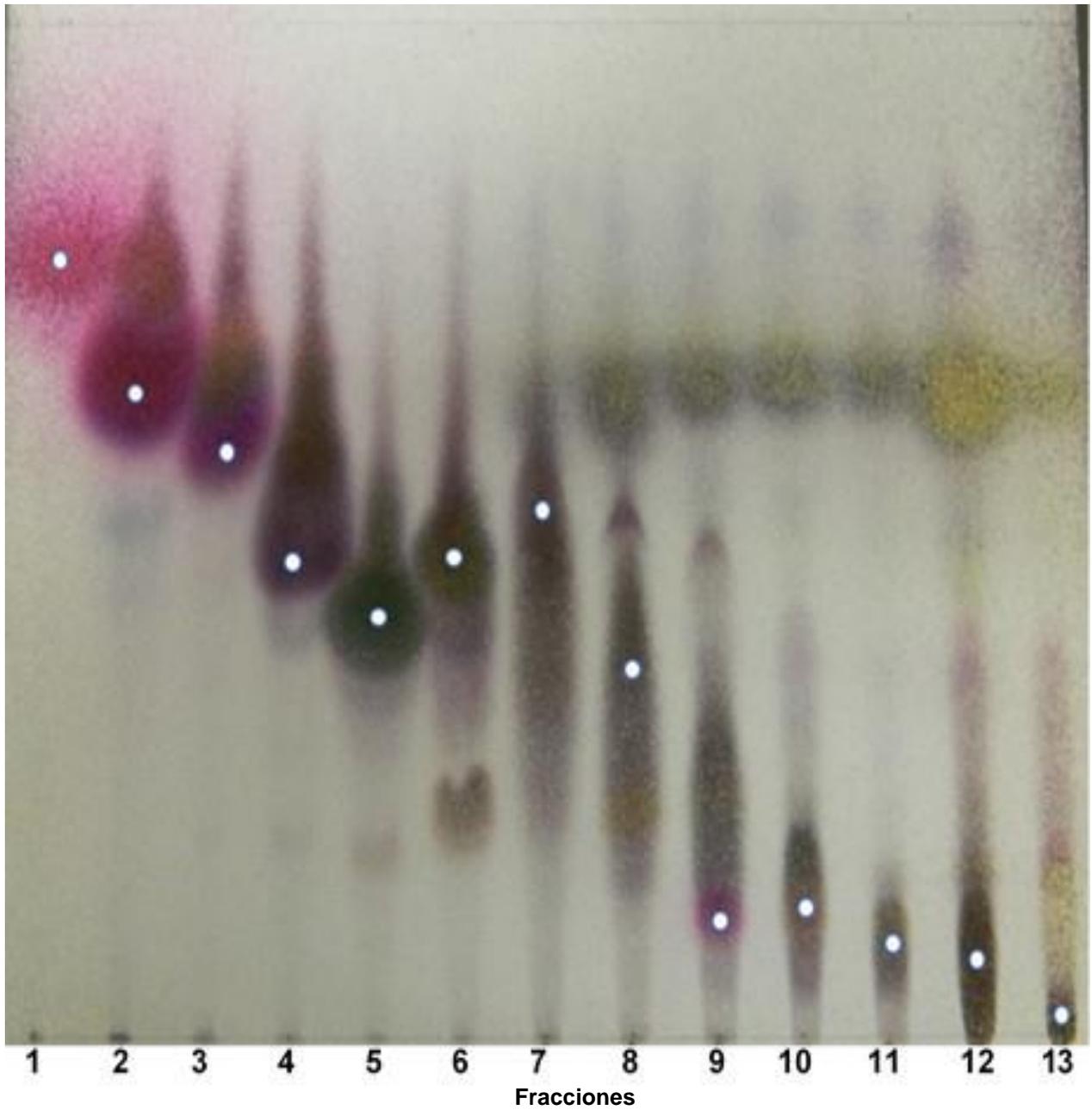


Figura 1. Desarrollo diferenciado de color y Rf, de las 13 fracciones obtenidas en la fase de elución hexano:AcOEt (20:0 a 0:20).

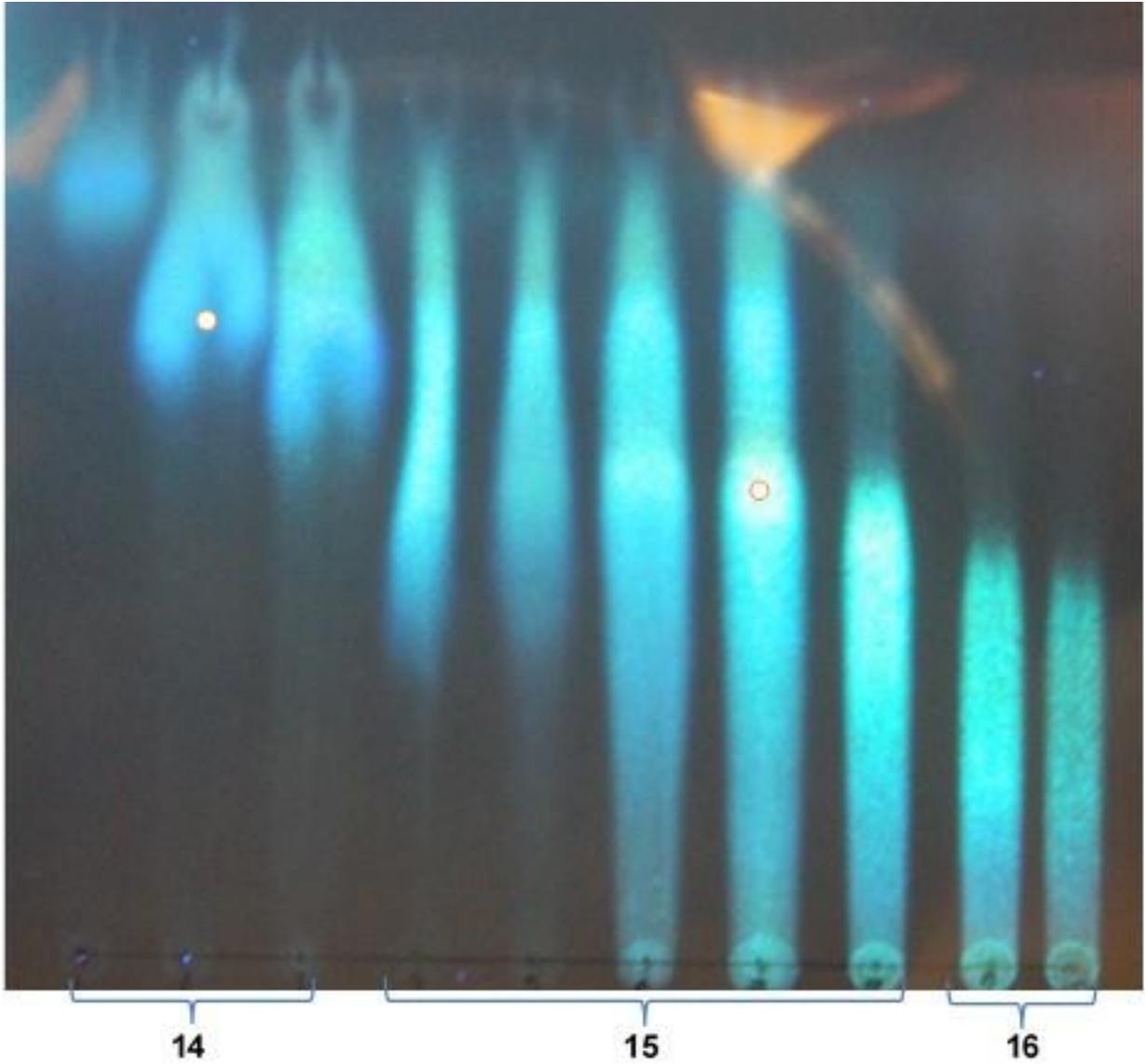


Figura 2. Desarrollo similar de color azul, pero diferente Rf en las fracciones obtenidas en la fase AcOEt:metanol (10:0 a 0:10).

Cuadro 5. Fracciones, polaridad, R_f y rendimiento de compuestos que integran el extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana*.

Fracción	Clave de fracción	Polaridad	R _f	Rendimiento	
				g	% ^a
(Hexano:AcOEt)					
1	A1	20:0 - 19:1	0.76 ^b	0.0919	0.54
2	B1	18:2	0.63	0.2185	1.29
3	C1*	17:3	0.58	0.2468	1.45
4	D1*	16:4	0.46	0.4128	2.43
5	E1	15:5	0.39	5.1882	30.52
6	F1	14:6	0.46	0.6739	3.96
7	G1	13:7 - 12:8	0.46	0.6162	3.62
8	H1	11:9	0.34	0.3969	2.33
9	I1	10:10 - 9:11	0.12	0.5328	3.13
10	J1	8:12	0.13	0.1631	0.96
11	K1	7:13	0.08	0.1064	0.63
12	L1	6:14 - 2:18	0.08	0.4204	2.47
13	M1	1:19 - 0:20	0.01	0.2172	1.28
(AcOEt:metanol)					
14	N1	10:0 - 7:3	0.69 ^d	1.5360	9.04
15	Ñ1	6:4 - 2:8	0.50	5.4360	31.98
16	O1	1:9 - 0:10	0.23	0.2690	1.58
Total				16.5261	97.21

^aRendimiento basado en un total de 17.0 g de muestra. ^bMedio de elución en cámara de revelado 10:10 (Hexano:AcOEt), ^cMedio de elución en cámara de revelado 50:50 (AcOEt:metanol).

*Fracciones responsables de la actividad tóxica en larvas de cuarto instar de *A. aegypti*.

Entre fracciones, y con base a la muestra representativa de 17.0 g sometida a fraccionamiento, el mayor rendimiento se obtuvo en la fracción 8 (Ñ1) con 5.43 g (31.98%), seguido de la fracción 5 (E1) con 5.18 g (30.52%). Las fracciones 3 (C1) y 4(D1), con mayor actividad tóxica tuvieron un rendimiento de 0.2468 g (1.45%) y 0.4128

g (2.43%), respectivamente. Adicionalmente, en el proceso de fraccionamiento del extracto se obtuvo una recuperación de 97.21% de la muestra, lo que indica que prácticamente se analizó la totalidad de la muestra.

Al momento de cuantificar el rendimiento a nivel de las fracciones, por cada 100 g de muestra de raíz seca de *R. ehrenbergiana*; la C1 y D1 tuvieron 0.07 y 0.13 g, respectivamente, por cada 100 g de muestra, lo que indica que *R. ehrenbergiana* puede ser fuente de fracciones activas de tipo terpenoides, ya que según Robinson (1979) una planta puede considerarse fuente de alcaloides cuando contiene más de 0.05 g de alcaloides por cada 100 g de muestra.

4.4.3. Efectividad de macerado, extracto y fracciones de raíz de *R. ehrenbergiana*

El macerado, extracto y fracciones obtenidas con etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* mostraron actividad insecticida cuyas CL₅₀ fueron menores conforme era mayor el refinamiento del preparado. Es decir, el macerado tuvo CL₅₀ de 8.29 (M1) y 12.32% (M2), equivalente a 82,900 y 123,200 ppm, respectivamente; en el extracto fue de 61,217.24 (M1) y 51,268.34 ppm (M2), y las fracciones, de la muestra M2, en C1 y D1 fue de 92.65 y 220.92 ppm. Esta tendencia de efectividad concuerda con lo reportado por Díaz *et al.* (2012) quienes determinaron a nivel de extracto en etanol de semillas de acahuite *Trichilia hirta* L. una CL₅₀ de 219.22 ppm, mientras que la fracción F008 y subfracción F011 tuvieron CL₅₀ de 20.94 y 14.98 ppm. Con el extracto en etanol de semillas de *Tabernaemontana cymosa* Jacq. la CL₅₀ fue de 35.1 ppm, y en fracción SM-I-5N y subfracción SM-I-5Q tuvieron CL₅₀ de 20.9 y 14.9 ppm, ambas especies evaluadas con larvas de cuarto instar temprano de *A. aegypti*.

Con respecto a las muestras, al utilizar el macerado, la M1 es más toxica que M2, sin embargo hay que considerar que se partió de 20 g para elaborar preparado, lo cual pudiera no ser representativo de la muestra aunado a la homogeneidad en la muestra y preparado; mientras que a nivel de extracto, no se observó diferencias de efectividad entre M1 y M2, lo cual puede ser más representativo y confiable ya que se utilizaron 500 g raíz, de cada muestra, para realizar el extracto, aunado a la eliminación del disolvente; y en fracciones, C1 y D1 presentan la misma efectividad. Ante lo cual, es más factible considerar las condiciones de colecta, misma que deben ser cuando haya humedad o sea época de lluvias, condiciones que favorecen a una mayor toxicidad en la raíz (García *et al.*, 2010).

Por otro lado, al parecer la actividad tóxica del extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* observada en *A. aegypti* no es ocasionada por sendarwina I, rolderenbergiana A, B, C o D, ya que dichos compuestos se han aislado en la fracciones de elución hexano:EtOAc 9:11 en el extracto en metanol de hojas, raíz y flores de *R. ehrenbergiana* (Pérez-Castorena *et al.*, 2005 y 2006), mientras que en el presente trabajo, las fracciones tóxicas se aislaron en el nivel de elución hexano:EtOAc 17:3 y 16:4 del extracto en etanol de la raíz, lo cual indica que puede tratarse de compuestos diferentes, posiblemente de tipo seco-furanoeremofilano 1 con mezcla de β -sistosterol y estigmasterol, el cual se obtuvo del extracto en metanol de la parte aérea de *R. aschenborniana* en la fracción hexano:EtOAc (85:15; equivalente a 17:3) utilizando cromatografía en columna al vacío (Arciniegas *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos con anterioridad ofrecen una alternativa de manejo de plagas sanitaria como *A. aegypti*, vector del dengue, utilizando una especie toxica y endémica de México como *R. ehrenbergiana* en tres formas de uso, macerado, extracto o fracciones, con la seguridad de conocer las fracciones responsables de dicha toxicidad, las cuales puede dar pauta a estudios posteriores para determinar los posibles riesgos en la utilización de esta planta.

4.5. CONCLUSIONES

El macerado, extracto y fracciones en etanol de la raíz seca de *R. ehrenbergiana* provocaron acción insecticida en larvas de cuarto instar temprano de *A. aegypti*. De las dos muestras y tres formas de uso, el macerado tuvo una CL₅₀ de 8.29 (M1) y 12.32% (M2), en extracto de 61,217.24 (M1) y 51,268.34 (M2), y en fracciones de 92.65 (C1) y 220.92 ppm (D1) de la muestra M2. La toxicidad del macerado y extracto es atribuida a las fracciones C1 y D1, con rendimiento de 0.07 y 0.13 %, por cada 100 g de muestra de raíz seca. Las fracciones activas C1 y D1 fueron obtenidas en el nivel de elución hexano:EtOAc 17:3 y 16:4, lo que sugiere compuestos tóxicos diferentes a los reportados en *R. ehrenbergiana*. La presente investigación brinda una alternativa usando sustancias naturales para el manejo de *A. aegypti*, principal vector del dengue.

4.6. LITERATURA CITADA

- Amariles-Barrera S, C M García-Pajón y G Parra-Henao (2013)** Actividad insecticida de extractos vegetales sobre larvas de *Aedes aegypti*, Diptera:Culicidae. CES Medicina 27(2):193-203.
- Arciniegas A, A L Pérez-Castorena, J L Villaseñor y A Romo de V (2006)** Cacalol derivatives from *Roldana angulifolia*. Journal of Natural Products 69: 1826-1829.
- Arciniegas A, A L Pérez-Castorena, J L Villaseñor y A Romo de V (2004)** Chemical constituents of *Roldana aschenborniana*. Biochemical Systematics and Ecology 32: 615-618.
- Arciniegas A, J I Maldonado, K González, A L Pérez-Castorena, J L Villaseñor and A Romo de V (2013)** Sesquiterpenes and other natural products from *Roldana reticulata*. Journal of the Mexican Chemical Society 57(1):16-18.
- Bartlett M (1937)** Properties of sufficiency and statistical tests. Proceedings of the Royal Society (London), Series A 160:268-282
- BioStat (2013)** BioStat ver. 5.8.1 professional, Analyst Soft, Chicago, USA.
- Bobadilla M, M Zavala, M Sisniegas, G Zavaleta, J Mostacero y L Taramona (2005)** Evaluación larvicida de suspensiones acuosas de *Annona miricata* Linnaeus “guanabana” sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae). Revista peruana de biología 12(1):145-152.
- Bohlmann F y C Zdero (1978)** New cacalol derivatives from *Roldana heterogama*. Phytochemistry 17: 565-566.

- Céspedes C L, P Torres, J C Marín, A Arciniegas, A Romo de V, A L Pérez-Castorena y E Aranda (2004)** Insect growth inhibition by tocotrienols and hydroquinones from *Roldana barba-johannis*. *Phytochemistry* 65: 1963-1975.
- Delgado G, P E García, R A Bye y E Linares (1991)** Eremophilanolides from *Roldana sessilifolia*. *Phytochemistry* 30: 1716-1719.
- Delgado G, P E Patricia, R I Roldan, R Bye and E Linares (1996)** New eremophilane sesquiterpene lactones from the roots of the medicinal plant *Roldana sessilifolia* (Asteraceae). *Natural Product Letters* 8:145-150.
- Di Rienzo J A, M Balzarini G, F Casanoves, L Gonzalez, M Tablada and C Walter R (2013)**. Infostat Software Estadístico versión 2013I. Grupo infoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Díaz C C F, S M Morelos C, M Carrascal M, Y Pájaro G y C H Gómez E (2012)** Actividad larvívica de extractos etanólicos de *Tabernaemontana cymosa* *Tabernaemontana cymosa* y *Trichilia hirta* sobre larvas de estadio III y IV de *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 17(3):256-267.
- Funston A M (2008)** Taxonomic revisión of *Roldana* (Asteraceae:Senecioneae), a genus of the southwestern U.S.A., México and Central América. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 95: 282-337.
- García G (2010)** Potencial insecticida de *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H. Rob. & Brettell y *Asclepias notha* W. D. Stevens en larvas de *Culex quinquefasciatus* Say. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. 30 pags.
- García G, R M Soto H, C Rodríguez H, M A Goytia J y V A González (2012)** Potencial insecticida de extractos de *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H. Rob. & Brettell en

larvas de *Culex quinquefasciatus* Say. Revista Latinoamericana de química (suplemento especial) 39: 188.

García M R, R Pérez P, C Rodríguez H y M Soto H (2004) Toxicidad de alcaloides de *Erythrina americana* en larvas de mosquitos *Culex quinquefasciatus*. Revista Fitotecnia Mexicana 27 (004): 297-303.

Maldonado J, A Arciniegas, A L Pérez-Castorena, M Arciniegas, J L Villaseñor y A Romo de V (2008) Eremophilanolides from *Roldana lobata*. Zeitschrift fur naturforschungs section B-A Journal of chemical sciences 63 (3): 331-334.

OMS (1981) Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Organización Mundial de la Salud (OMS). Geneva: WHO (WHO/VBC/81.80).

Ormeño E, J P Mévy, B Vila, A Bousquet Melou, S Greff, G Bonin and C Fernández (2007) Water deficit stress induces different monoterpene and sesquiterpene emission changes in Mediterranean species. Relationship between terpene emissions and plant water potential. Chemosphere 67: 276-284

Parra H G J, C M García P y J M Cotes T (2007) Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) vector del dengue en Colombia. CES Medicina 21(1): 47-54.

Pérez-Castorena A L, A Arciniegas, M L Hernández, I de la Rosa, J L Contreras y A Romo de V (2005) Furanoeremophilanes from *Roldana ehrenbergiana*. Zeitschrift für Naturforschung 60b:1088-1092.

Pérez-Castorena A L, A Arciniegas, M L Hernández, R A Toscano, J L Contreras y A Romo de V (2006) 8,9-Seco-Eremophilanolides from *Roldana ehrenbergiana*. Journal of the Mexican Chemical Society 50(4):157-159.

- Redonda-Martínez R y J L Villaseñor-Rios (2011)** Flora del valle de Teotihuacán-Cuicatlán. Fascículo 89: 1-64.
- Robinson T (1979)** The evolutionary ecology of alkaloids *In: Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*. G A Rosenthal, D H Janzen (eds). Academic Press. New York, USA. Pp: 413-48.
- Royston P (1982)** An Extension of Shapiro and Wilk's W Test for Normality to Large Samples. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)* 31:115
- Sanabria L, E A Segovia, N González, P Alcaraz y V N de Bilbao (2009)** Actividad larvívica de extractos vegetales acuosos en larvas de *Aedes aegypti* (primeros ensayos). *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud* 7(2): 26-31.
- Vidal J, A Carbajal, M Sisniegas y M Bobadilla (2009)** Efecto tóxico de *Argemone subfusiformis* Ownb. y *Tagetes patula* Link sobre larvas de IV estadios y pupas de *Aedes aegypti* L. *Revista Peruana de Biología* 15 (2): 103-109.
- Wagner H and S Bladt (1996)** *Plant drug analysis: A thin Layer Chromatography Atlas*. 2d. Ed. Springer Verlag. New York. 384 p.
- Zobayed S M A, F Afreen and T Kozai (2007)** Phytochemical and physiological changes in the leaves of St. John's wort plants under a water stress condition. *Environmental and Experimental Botany* 59:109-116

SECCIÓN 5: DISCUSIÓN, CONCLUSIÓN Y LITERATURA CITADA GENERAL

5.1. DISCUSIÓN GENERAL	79
5.2. CONCLUSIÓN GENERAL	82
5.3. LITERATURA CITADA GENERAL.....	83

5.1. DISCUSIÓN GENERAL

En la búsqueda de alternativas ecológicas para manejo de plagas, se ha recurrido al uso de plantas alimenticias como el *A. sativum*, *Capsicum* sp y *C. ambrosioides*; medicinales como *A. indica*, *S. officinale* y *N. tabacum*, y de recolección como *H. cimidium*, *M. azedarach*, *T. patula*, entre otras, las cuales han mostrado actividad toxica en diversos organismos. Pero también existen especies silvestres como *R. ehrenbergiana* la cual ha sido utilizada desde la época colonial y que recientemente se ha empezado a estudiar a nivel fitoquímico, pero en la cual no se han realizado trabajos enfocados a su utilización en el control de plagas agrícolas o sanitarias. En este sentido, la presente investigación generó información enfocada a la acción biológica que causa el extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana* en *E. varivestis* y *A. aegypti*, habiendo encontrando acción insecticida en ambos organismos, así como efecto insectistático a través de la inhibición de la alimentación en *E. varivestis* y protección foliar en frijol.

A nivel de toxicidad, al utilizar el extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana*, en larvas de neonatas de *E. varivestis* se tuvo una CL₅₀ de 3,233.09 ppm, mientras que en larvas de cuarto instar de *A. aegypti* fue de 51,268.34 ppm; lo anterior puede deberse a diversos factores:

1. Ambos organismos son diferentes, el primero es coleóptero cuyo ciclo larva lo realizar al aire libre, mientras el segundo es un díptero con el ciclo larval dentro del agua, lo que supone diferencias en metabolismo.
2. Las etapas larvales en donde se evaluó el extracto fue diferente, en conchuela se realizó en neonatas-primer instar y en mosquitos en cuarto

instar, lo que influye en el nivel de resistencia del insecto, siendo esta mayor en instares más avanzados o adultos, como es el caso de larvas de *P. xylostella*, donde la utilización del extracto en etanol de semillas de *A. squamosa* en larvas de tercer y cuarto instar, la CL_{50} paso de 3,900 a 6,700 ppm (Leatemia e Isman, 2004).

3. Larva de *E. varivestis* tiene hábito masticador por lo tanto, en el proceso de alimentarse ingirió el extracto junto con el alimento, causando intoxicación desde su interior; mientras que en *A. aegypti*, la larva solo estuvo en contacto con el extracto en su medio de vida (agua) y no en la fuente de alimento, lo que supone que la principal entrada al organismos fue por penetración o absorción a través de la piel, vía por la cual *A. aegypti* ha generado estrategias de dextosificación para evitar el daño de los insecticidas (y posiblemente a extractos botánicos), como la “penetración reducida”, siendo este mecanismo el responsable de una resistencia 5X en el caso de malation (Badii y Garza, 2007).
4. La diferencia en concentración a la cual se expusieron a los insectos, en caso de las larvas de *E. varivestis*, éstas estuvieron en contacto o ingirieron el extracto vía alimento a la concentración inicial aplicada a las hojas, ya que solo se evaporó el disolvente; mientras que en *A. aegypti*, la concentración inicial al ser aplicada al medio (1 mL de extracto en 100 mL agua) se presentó una dilución y la larva se expuso a una concentración 100 veces menos. Si este factor fuera el más importante, entonces, las larvas de *A. aegypti* son más susceptibles al extracto de *R. ehrenbergiana* con una CL_{50} de 512.68 ppm comparado con larvas de *E. varivestis* con CL_{50} de 3,233.09 ppm.

No obstante a los elementos antes mencionados, se requieren de estudios enfocados a evaluar dichos factores para determinar que cual o cuales influyen en las diferencias de toxicidad observada en *E. varivestis* y *A. aegypti*.

En otro enfoque observado hacer referencia al efecto observado en larvas de *E. varivestis* con respecto a la estrategia de aplicación o manejo. Primero, en el supuesto de proteger el 100% del área de interés, se tienen la posibilidad de provocar diferentes efectos en la plagas. La utilización de concentraciones elevadas de 2,687.77 ppm en adelante, se estaría privilegiando un efecto insecticida con una mortalidad del 50% de la población; mientras que de 1,376.24 a 1,735.22 ppm se promovería un efecto insectistático en términos de disminuir un 50% el peso de larva y de forma paralela disminuir el daño foliar; y con uso de 746.21 ppm o menos se buscaría proteger un 50% el área foliar del cultivo de frijol, sin afectar a la plaga. Esta última estrategia sería la mejor forma de manejo para evitar el desarrollo rápido de resistencia. No obstante, a nivel de campo al aplicar productos para el manejo de plagas, éstas tienen la opción de elegir otra fuente de alimento, ya sea otros cultivos o especies hospederas alternas, lo cual puede propiciar de un 91.88 hasta 98.96% de protección foliar a una concentración de 5,000 ppm, sin afectar el crecimiento ni provocar mortalidad en larvas de *E. varivestis*.

La otra diferencia encontrada se observó a nivel de preparación de la raíz de *R. ehrenbergiana* en *A. aegypti*; cuando se utilizó el macerado, la CL₅₀ fue de 8.29 a 12.3% (82,900 - 123,200 ppm), por su parte, el extracto tuvo una CL₅₀ de 51,268.34 a 61,217.24 ppm, y en fracciones activas C1 y D1 la CL₅₀ fue de 92.65 y 220.92 ppm. Lo anterior

sugiere que a mayor refinamiento del preparado se incrementa la toxicidad del mismo, posiblemente como resultado de tener compuestos más puros y concentrados, con la desventaja de obtener un menor rendimiento por unidad de muestra, adicional a que se requiere de un proceso más largo y caro por los solventes y equipos utilizados. Lo anterior es importante tomarlo en cuenta al momento de sugerir el uso del macerado, extracto o fracciones en el manejo de plagas o protección foliar, sobre todo al promoverlo como alternativa en la Agricultura orgánica.

Finalmente, conocer las condiciones climáticas que determinan la distribución potencial de *R. ehrenbergiana*, brinda las herramientas para ubicar nuevas áreas colectas o ambientes favorables al cultivo a gran escala para obtener la materia prima. En este sentido, se obtuvo a través de programa MaxEnt, que la variable que tiene mayor pesos es la isothermalidad, ésta indica la relación que existe entre variación de temperatura diurna con respecto a la anual, misma que no debe ser mayor a 36%, lo cual permitió delimitando área potenciales en los estados de Oaxaca, Puebla y Tlaxcala.

5.2. CONCLUSIÓN GENERAL

La hierba del perro *R. ehrenbergiana* presentó acción tóxica y efecto insectistático en larva de primer instar de *E. varivestis*, así como protección foliar en frijol; y efecto insecticida en larvas de cuarto instar de *A. aegypti*. La actividad insecticida en *E. varivestis* tuvo CL₅₀ de 3,233.09 ppm, IA₅₀ de 1,575.22 ppm y PI₅₀ de 459.07 ppm. En *A. aegypti*, la CL₅₀ del macerado fue 8.29 a 12.32%, el extracto de 51,268.34 a 61,217.24 ppm, y las fracciones C1 de 92.65 y D1 de 220.92 ppm, siendo estas fracciones las

responsables de la acción toxica del extracto en etanol de la raíz de *R. ehrenbergiana*. La distribución de la especie está influenciado principalmente la isotermalidad, y en segundo término es la precipitación del trimestre más frio, variación de la temperatura anual, temperatura media del trimestre más lluvioso y del trimestre más cálido.

5.3. LITERATURA CITADA GENERAL

- Amariles-Barrera S, C M García-Pajón y G Parra-Henao (2013)** Actividad insecticida de extractos vegetales sobre larvas de *Aedes aegypti*, Diptera:Culicidae. CES Medicina 27(2):193-203.
- Badii M H y V Garza A (2007)** Resistencia en insectos, plantas y microorganismos. CULCyT (Cultura Científica y Tecnológica. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez) // Impacto ecológico. 4(18): 9-25.
- Domínguez R., R.; J.L. Ayala O.; C. Rodríguez H.; B. Domínguez R., y H. Sánchez A. 2001.** Plagas Agrícolas. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. Pag: 267-270.
- García G, R M Soto H, C Rodríguez H, M A Goytia J y V A González (2012)** Potencial insecticida de extractos de *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H. Rob. & Brettell en larvas de *Culex quinquefasciatus* Say. Revista Latinoamericana de química (suplemento especial) 39: 188.
- Leatemia J A and M B Isman (2004)** Toxicity and antifeedant activity of crude seed extracts of *Annona squamosa* (Annonaceae) against lepidopteran pests and natural enemies. International Journal of Tropical Insect Science 24(2):150-158.

- Martínez M (1959)** Las plantas medicinales de México. Ediciones Botas, tomo 1. Quinta edición. México D.F., pag.: 176-178.
- Pérez-Castorena A L, A Arciniegas, M L Hernández, I de la Rosa, J L Contreras y A Romo de V (2005)** Furanoeremophilanes from *Roldana ehrenbergiana*. Zeitschrift für Naturforschung 60b:1088-1092.
- Pérez-Castorena A L, A Arciniegas, M L Hernández, R A Toscano, J L Contreras y A Romo de V (2006)** 8,9-Seco-Eremophilanolides from *Roldana ehrenbergiana*. Journal of the Mexican Chemical Society 50(4):157-159.
- Rodríguez H C y A Lagunes T (1992)** Plantas con propiedades insecticidas: resultados de pruebas experimentales en laboratorio, campo y granos almacenados. Agroproductividad, p:17-59
- Rodríguez H C (2012)** Plagas contra plagas 2: epazote, hierba de la cucaracha, paraíso, higuierilla y sabadilla. Colegio de postgraduados. México, D.F. 209 pag.
- Rodríguez H C (2006)** Plagas contra plagas 1: potencial práctico de ajo, anona, nim, chile y tabaco. Colegio de Postgraduados, México, D.F. 133 pag.
- Rodríguez H C (1999)** Técnicas tradicionales para el combate de hormigas defoliadoras. *In*: Memoria de Avances en la Investigación 1998. Cibrián T J, C Llanderal C, R Guzmán P y D Alvarado R (eds). Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México, México. p. 15-17.
- Rodríguez H C, G Silva A y J Djair V (2003)** Insecticidas de Origen Vegetal. *In*: Bases para el Manejo Racional de Insecticidas. Silva Aguayo G y R Hepp G (eds). Capítulo 5. Trama Impresiones. Chillán, República de Chile. Pag. 87-111.
- Sanabria L, E A Segovia, N González, P Alcaraz y V N de Bilbao (2009)** Actividad larvicida de extractos vegetales acuosos en larvas de *Aedes aegypti* (primeros

ensayos). Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud 7(2):
26-31.

Yerkes W D, M.A. Crispín, y D. Barnes. 1959. Enfermedades y plagas del frijol en
México. Folleto de divulgación num. 29. OEE, SAG. México. 39p.