

El Colegio de la Frontera Sur

Actividad biológica de extractos vegetales en *Phyllophaga ravida* y *P. obsoleta* (Coleoptera: Melolonthidae)

TESIS

Presentada como requisito parcial para optar por el grado de Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural

por

Martha Marisol Torres Alvarez

2009

DEDICATORIA

A Dios por ensañarme que el soñar no solo es imaginar...se necesita creer en lo imposible y luchar por aquello que se cree inalcanzable.

A mi madre, Socorro, por todo su esfuerzo y dedicación para conmigo. Por todas aquellas noches en que más que mi madre fuiste mi compañera de trabajo. Este logro es tuyo!!!.

A mi hija, Camila, la bendición más grande que Dios me ha dado. Sin ti hija, hoy el mundo no tendría sentido.

Al amor de mi vida, Arbey, gracias por ser más que mi compañero, mi ¡cómplice! Gracias por enseñarme que en lo sencillo está lo extraordinario, que el amor, es algo que se construye en el día a día...Gracias!! Muchas gracias...por todas las motivaciones prestadas en los momentos más difíciles de mi vida.

A la familia Torres, quienes con su forma peculiar de querer me han enseñado que todos tenemos la capacidad de amar y apoyar a la gente que nos necesita.

A mi nueva familia, Gómez Ruiz, por haber abierto las puertas de su casa y acogernos como un miembro más.

Al que en su momento fue mi jefe y amigo, Roberto Hernanz Burguete, Gracias por tu apoyo en la tesis, sin tu comprensión y colaboración este trabajo no hubiera sido posible.

A mis amigos de la maestría, José M. González Fernández, por haber cumplido junto conmigo esta lección de vida "la victoria hasta el final". A L. Felipe Zamora Cornelio, por estar siempre conmigo y enseñarme todas las connotaciones de la palabra "Amistad". A Rubén Pérez Ayala, siempre guardo los momentos bonitos de

nuestra amistad. A Anay López, por ser mi compañera en tantas locuras. A Yareli Balam, por enseñarme el significado de la palabra nobleza.

A mis amigos de siempre, Gustavo Gómez Jiménez, por apoyarme en la realización de mis experimentos y tenerme sobre todo paciencia. A I. Patricia Hernández Gómez, y Karina Antonio Martínez, por haber sido más que mis compañeras, mis hermanas.

Creo que si siguiera escribiendo la lista es interminable. He contado con el apoyo de mucha gente, que de una u otra forma han contribuido a la conclusión de este trabajo. A todos ellos muchas gracias! Me llevo de ustedes lo mejor y hoy por hoy, sus enseñanzas definen mi vida.

Es un mal sueño largo, una tonta película de espanto, un túnel que no acaba lleno de piedras y de charcos.
¡Qué tiempo éste, maldito, que revuelve las horas y los años, el sueño y la conciencia, el ojo abierto y el morir despacio!

Jaime Sabines

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de la Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de posgrado durante la generación 2006-2007.

A la Dra. Adriana Elena Castro Ramírez por alentarme en la investigación y compartir conmigo el trabajo realizado desde hace más de 14 años en los Altos de Chiapas. Al Dr. Francisco López Olguín y el Dr. Luis Enrique García Barrios, por compartir sus experiencias y enseñanzas para la realización de la tesis, por el tiempo prestado a la conclusión de los trabajos y sobre todo a la amistad brindada.

A la Ingeniera Concepción Ramírez Salinas, por su valioso apoyo en el montaje de los experimentos. Por su esfuerzo y dedicación mostrado hacia el control del complejo "gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae).

Al Q. A. Miguel Ángel López Anaya y Tec. Manuel de Jesús Gutiérrez Gómez por apoyarme en el préstamo de material y recolecta de adultos de *Phyllophaga*. A los técnicos de los laboratorios, Jesús Carmona, Guadalupe Pérez y Juan Morales, quienes me apoyaron en la realización de pruebas y bioensayos. A Miguel Martínez lco por su valioso apoyo en la identificación de las plantas utilizadas para la elaboración de los extractos.

Al grupo de "gallinólogos" Cutberto Pacheco, María de J. Méndez, Olinda Velázquez, Eduardo Velázquez, Francisco Gerardo López Vázquez, Emer López Vázquez y muchos más. Compañeros que a través de los años han migrado a otros espacios y hoy son miembros productivos de este país. A todos ustedes, los recuerdo siempre.

CONTENIDO

		Pág
	ÍNDICE DE CUADROS	iii
	ÍNDICE DE FIGURAS	iii
	RESUMEN	iv
I	INTRODUCCIÓN	1
II	OBJETIVOS	8
Ш	HIPÓTESIS	8
IV	ANTECEDENTES	10
	4.1. El maíz como cultivo y sus principales plagas.	10
	4.2. "Gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae).	12
	4.2.1. Biología.	14
	4.2.2. Ecología y comportamiento.	16
	4.3. Descripción y antecedentes de los estadios larvales de	18
	Phyllophaga.	
	4.3.1. Phyllophaga (Phyllophaga) ravida (Blanchard, 1850)	20
	4.3.2. Phyllophaga (Phytalus) obsoleta (Blanchard, 1850)	21
	4.4. Actividad biológica de plantas en el control de insectos.	21
	4.4.1. Actividad insecticida e insectistática de extractos vegetales.	25
	4.4.2. Barkleyanthus salicifolius (H.B.K.) Rob & Brettell	27
	4.4.2.1. Fenología y ecología.	28
	4.4.2.2. Fitoquímica.	29
	4.4.3. <i>Piper auritum</i> Kunth.	31
	4.4.3.1. Fenología y ecología.	31
	4.4.3.2. Fitoquímica.	32

V	MATERIAL Y MÉTODO	35
	5.1. Material vegetal y obtención de extractos.	35
	5.1.1. Procesamiento del material vegetal.	36
	5.1.2. Elaboración de extractos vegetales.	38
	5.1.2.1 Extracción por infusión.	38
	5.1.2.2. Extracción soxhlet.	39
	5.2. Insectos.	40
	5.2.1. Recolecta de adultos y obtención de larvas de Phyllophaga	41
	ravida y P. obsoleta.	
	5.3. Bioensayos.	43
	5.3.1. Actividad antialimentaria.	43
	5.3.1.1. Tratamientos establecidos.	46
	5.3.1.2. Ensayos de preferencia.	47
	5.3.1.3. Ensayos de no-preferencia.	49
	5.3.1.4. Ensayos nutricionales.	50
	5.3.2. Bioensayos de protección a la raíz del maíz.	52
	5.3.2.1. Tratamientos establecidos.	53
	5.3.2.2. Infestación de las unidades experimentales.	55
	5.3.2.3. Aplicación de extractos.	55
	5.3.2.4. Evaluación del daño al sistema radical.	55
	5.4. Análisis estadístico.	56
VI	RESULTADOS	58
	6.1. Actividad antialimentaria, disuasoria y supresiva de los extractos	58
	de B. salicifolius y P. auritum en larvas L3 de P. ravida.	
	6.1.1. Efecto de los tratamientos sobre la nutrición de <i>P. ravida.</i>	60

	6.2. Actividad antialimentaria, disuasoria y supresiva de los extractos	62
	de B. salicifolius y P. auritum en larvas L3 de P. obsoleta.	
	6.2.1. Efecto de los tratamientos sobre la nutrición de <i>P. obsoleta</i> .	64
	6.3. Efecto de los extractos de B. salicifolius y P. auritum en la	66
	protección de la raíz de matas de maíz durante los estadios L2 y L3	
	de P. ravida.	
	6.4. Efecto de los extractos de B. salicifolius y P. auritum en la	67
	protección de la raíz de matas de maíz durante los estadios L2 y L3	
	de P. obsoleta.	
VII	DISCUSIÓN	71
	7.1. Actividad de los extractos de hojas de Piper auritum y raíz de	71
	Barkleyanthus salicifolius como antialimentarios en larvas de P. ravida	
	y P. obsoleta.	
	7.2. Protección a las plantas de maíz por extractos de hojas de <i>Piper</i>	78
	auritum y raíz de Barkleyanthus salicifolius contra la rizofagia de P.	
	ravida y P. obsoleta durante su segundo (L2) y tercer estadio (L3).	
VIII	CONCLUSIONES	80
IX	LITERATURA CITADA	83

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro Pág.

Peso de los polvos de HPA Y RBS para la preparación de los 39 extractos por infusión, de acuerdo al porcentaje de concentración requerido.

- 2 Peso de los extractos puros para la elaboración de las 41 concentraciones elaboradas bajo el método de extracción soxhlet.
- 3 Tratamientos establecidos en los bioensayos de actividad 47 antialimentaria.
- Tratamientos para evaluar la protección a la raíz del maíz por tres 54 concentraciones de los extractos de las hojas de *Piper auritum* (HPA) y la raíz de *Barkleyanthus salicifolius* (RBS) contra la rizofagia de *Phyllophaga ravida* y *P. obsoleta*.
- Índices en porcentaje de actividad antialimentaria (IA), disuasión 59
 (ID) y de supresión (IS) de extractos de hojas de *Piper auritum*(HPA) y raíz de *Barkleyanthus salicifolius* (RBS) sobre las larvas de *Phyllophaga ravida*.
- findices nutricionales (miligramos larva) de las larvas L3 de P. 61
 ravida alimentadas por 60 horas con discos de zanahoria tratados
 con extractos de hojas de P. auritum (HPA) y raíz de B. salicifolius
 (RBS) en diferentes concentraciones.
- findices en porcentajes de actividad antialimentaria (IA), disuasión 63 (ID) y de supresión (IS) de extractos de hojas de *Piper auritum* (HPA) y raíz de *Barkleyanthus salicifolius* (RBS) sobre la larvas de *Phyllophaga obsoleta*.

- 8 Índices nutricionales (miligramos larva) de las larvas L3 de P. 65 obsoleta alimentadas por 60 horas con discos de zanahoria tratados con extractos de hojas de P. auritum (HPA) y raíz de B. salicifolius (RBS) en diferentes concentraciones.
- 9 Efecto de la rizofagia de las larvas de *Phyllophaga ravida* en el 67 desarrollo fenológico de las plantas de maíz cuando son tratadas con extractos de hojas de *P. auritum* (HPA) y raíz de *B. salicifolius* (RBS).
- 10 Respuesta de *P. ravida* a la presencia de extractos de hoja de 68

 *Piper auritum (HPA) y raíz de *Barkleyanthus salicifolius (RBS) en las raíces de plantas de maíz.
- 11 Efecto de la rizofagia de las larvas de *Phyllophaga obsoleta* en el 69 desarrollo de las plantas de maíz cuando son tratadas con extractos de hojas de *P. auritum* (HPA) y raíz de *B. salicifolius*.
- Promedio de las respuestas de *P. obsoleta* a la presencia de 70 extractos de hoja de *Piper auritum* (HPA) y raíz de *Barkleyanthus* salicifolius (RBS) en las raíces de plantas de maíz.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág
1	Espectrofotometría del extracto de raíz de Barkleyanthus	37
	salicifolius a 80 nanómetros (nm) de transmitancia. Cetonas (3500-	
	3100 nm), lactonas (3200-1700 nm), amidas (1700-1000 nm).	
2	Espectrofotometría del extracto de hojas de Piper auritum a 80	37
	nanómetros (nm) de transmitancia. Grupos OH y COOH (3800-	
	3500 nm), Cetonas (3500-3100 nm), lactonas (3200-1700 nm),	
	amidas (1700-1000 nm), compuestos polifenólicos (1000-800 nm).	
3	Unidad básica experimental para la evaluación de los extractos	44
	sobre la alimentación de las larvas de Phyllophaga.	
4	Distribución alternada de los discos de zanahoria en las unidades	48
	experimentales del bioensayo de preferencia (Escoubas et al.,	
	1993). DT = disco tratado, DC = disco control, DTS = disco testigo.	
5	Distribución alternada de los discos de zanahoria en las unidades	50
	experimentales del bioensayo de no preferencia (Escoubas et al.,	
	1993). DT = disco tratado, DTS = disco testigo.	

RESUMEN

Phyllophaga ravida y P. obsoleta son dos especies rizofagas del complejo "gallina" ciega", cuyas densidades larvales en las parcelas de agricultura de subsistencia en Los Altos de Chiapas pueden mermar severamente la cosecha. El objetivo fue identificar el efecto de los extractos de hojas de Piper auritum (HPA) y raíz de Barkleyanthus salicifolius (RBS) en la alimentación de P. ravida y P. obsoleta, mediante bioensayos de actividad antialimentaria y de protección a la raíz. Los extractos se prepararon bajo el método de infusiones y soxhlet. El bioensayo de actividad antialimentaria (laboratorio) contempló dos etapas: a) ensayo de no preferencia, cuatro discos de zanahoria contenían 20 µl extracto o 20 µl de agua (testigo externo) una larva de tercer instar (L3) se colocaba al centro, b) ensayo de preferencia, dos de los discos contenían extracto y dos agua. En el de protección a la raíz se utilizaron plantas de maíz infestadas con larvas de segundo instar regadas cada 20 días con extracto por 80 días. La actividad de HPA y RBS sobre Phyllophaga no fue insecticida (0 % de mortalidad). En P. ravida hay una actividad disuasoria ($F_{(11,115)} = 1.86 P < 0.05$), no antialimentaria ($F_{(11,116)} = 1.00 P > 0.45$), ni supresiva ($F_{(11,115)} = 1.43 P > 0.17$). En *P. obsoleta* actúan como antialimentarios $(F_{(11.117)} = 4.14 P < 0.0001)$ y disuasorios $(F_{(11.117)} = 2.04 P < 0.03)$, no como supresores ($F_{(11,117)} = 1.25 P > 0.26$). Su ingesta causó una desnutrición en las larvas de *P. ravida* (TIP $F_{(12,112)} = 1.93 P < 0.04$) y *P. obsoleta* (TIP $F_{(12,111)} = 16.74 P <$ 0,0001). En los bioensayos de protección a la raíz, la rizofagia de P. ravida (raíz $F_{(6.69)} = 1.15 P > 0.3440$), *P. obsoleta* (raíz $F_{(6.69)} = 1.59 P > 0.1691$).

Palabras claves: plagas edáficas, insecticidas, insectistáticos, piperamidas y piretros.

I. INTRODUCCIÓN

El complejo "gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae) es un grupo de larvas de hábitos subterráneos que está conformado por especies saprófagas, rizófagas estrictas o rizófagas facultativas (Deloya, 1993; Morón, 2003; Castro-Ramírez *et al.*, 2004). Las dos últimas, por alimentarse de raíces de cultivos y mostrar daño económico en la producción de la cosecha, se han llegado a considerar como plaga.

El maíz, trigo, frijol, papa, arroz, chile, caña de azúcar, pastos, fresa, zanahoria, espinaca, betabel, jitomate, haba, cebolla, sorgo, maguey y palma de coco son, entre otros, cultivos que puede dañar (Aragón *et al.,* 2003). En la región de Los Altos de Chiapas su daño se ha llegado a estimar en pérdidas entre 36 y 42% de la producción de maíz producido bajo condiciones de temporal (Castro-Ramírez *et al.,* 2006).

En búsqueda de una solución, los agricultores de la región han optado por hacer uso recurrente de productos organosintéticos, que lejos de remediar el problema han generado otras complicaciones (Hunt *et al.*, 1999). Se han eliminado los enemigos naturales, provocado resistencia en los insectos, contaminado el ambiente y se ha incrementado la acidez del suelo (Van Lenteren, 1993).

Como opción al manejo de la plaga se han buscado alternativas biorracionales y económicas que permitan el manejo sostenible del cultivo en la región. Se han identificado los ciclos biológicos de las especies que conforman el complejo (Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez, 1998; Ramírez-Salinas *et al.*, 1999 y 2000;

Gómez *et al.*, 1999), se ha identificado la respuesta olfativa de hembras y larvas de melolóntidos (Coleoptera) a sustratos de parcelas agrícolas y sistemas radicales de cultivos (Méndez-Aguilar *et al.*, 2008). Como medidas de manejo se realizó la captura sistemática y masiva de adultos (Cruz *et al.*, 1998), promovido la diversificación de cultivos (García-López *et al.*, 2006), y la incorporación de composta (Castro-Ramírez *et al.*, 2001).

Como parte del control biológico de la plaga se ha evaluado el uso de hongos entomopatógenos nativos (Velázquez-Cruz *et al.*, 2006; Velázquez-López *et al.*, 2006, Polanco, 2008) y no nativos (Flores *et al.*, 2002) de la región; igualmente, se ha probado la aplicación de infusiones de plantas durante el tercer estadio larval (Velázquez-Cruz *et al.*, 2005).

Aunque la búsqueda de compuestos en las plantas como alternativa al uso de compuestos organosintéticos para el control de plagas del maíz afines al orden Coleoptera tiene más de 20 años en México (Rodríguez-Hernández *et al.*, 1982; Lagunes y Rodríguez-Hernández, 1989; Rodríguez, 1990; Cuevas *et al.*, 1990; Endersby y Morgan 1991; Cortez y Celaya, 1992; Rodríguez-Hernández y Lagunes, 1992; Rodríguez-Hernández *et al.*, 1992; Araya, 1993; Luna *et al.*, 1995; Ortega y Rodríguez-Hernández, 1998; Domínguez y Correa, 2005; Rodríguez-Hernández y Vendramim, 1998), son pocos los estudios realizados para el control específico de "gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae) (Aragón y Caselín, 1995; Aragón *et al.*, 2003; Velázquez-Cruz *et al.*, 2005; Torres-Alvarez *et al.*, 2006).

Los extractos, polvos e infusiones de plantas han mostrado ser eficientes en el control de más de una plaga. Esto ha motivado a una nueva era en la concepción del manejo integral de plagas, donde se promueve la generación de insecticidas ecológicos, orgánicos y sostenibles que eviten o retarden la aparición de resistencia en los insectos (Gliessman, 2005).

Los insecticidas generados a partir de plantas fundamentan su mecanismo de acción en los diferentes elementos de respuesta que las plantas han desarrollado como parte de su coevolución con los insectos y cuya información ha quedado almacenada en su fitoquímica (Espinosa-García y Delgado, 1998).

Los compuestos químicos que una planta desarrolla dependen de las condiciones ecogeográficas^{II} bajo las cuales crece (Schumutter, 1990). Durante años se ha tratado de escrudiñar si la composición química de un extracto o polvo vegetal potencialmente insecticida puede verse alterada por las condiciones de almacenamiento y tamaño de las partículas que se utilizan (Ermel *et al.*, 1986).

El avance más notable a esta interrogante ha sido la formulación y establecimiento de criterios para la búsqueda de compuestos de plantas con actividad biológica. Lagunes y Rodríguez-Hernández (1990) mencionan cinco pasos a seguir en la exploración del potencial insecticida de una planta: 1) estudiar la toxicidad de las estructuras de la planta, 2) conocer la dinámica de la concentración y la forma de acción de los principios activos, 3) probar el tamaño de la partícula más apropiada, 4) evaluar los solventes más adecuados que ayuden a la conservación y, 5) la

liberación paulatina de los principios activos así como su persistencia en el ambiente.

En los últimos años del desarrollo en la fitoquímica enfocada a la generación de insecticidas, se ha visto que no necesariamente los compuestos de las plantas deben de tener un efecto letal (insecticida) en los insectos, sino que puede modificar el ciclo biológico (inhibidores de crecimiento), comportamiento o patrones de alimentación (antiapetitivo, efecto disuasivo). Cuando esto ocurre se dice que los compuestos tienen un efecto insectistático (Rodríguez-Hernández y López-Pérez, 2001).

Estas propiedades de las plantas han sido aprovechadas desde hace tiempo para el control de plagas (Bruneton, 2001). Se tienen antecedentes de su aprovechamiento en la agricultura de subsistencia de Los Altos de Chiapas desde hace más de medio siglo (Miranda, 1952; López-Pérez y Rodríguez-Hernández, 1999; Trujillo-Vásquez y García-Barrios, 2000). En la región se reportan alrededor de 1600 plantas medicinales con diferentes usos (Berlin, 1996), dentro de ellas están *Piper auritum* (mumun, mumo, hierba santa) y *Barkleyanthus salicifolius* (chilca). Estas plantas en Amatenango del Valle, Teopisca y Villa Las Rosas son utilizadas en forma de polvos para la protección de granos almacenados (López-Pérez y Rodríguez-Hernández, 1999).

Como parte de la búsqueda de principios activos de las plantas en México, Lagunes y Rodríguez-Hernández (1992) exploraron las propiedades fitoquímicas de estas dos plantas sobre los órdenes Coleoptera y Lepidoptera. Encontraron que las hojas de *P*.

auritum muestran poca actividad insecticida sobre el género Zabrotes, mientras que la raíz de *B. salicifolius* revela efectividad de media a alta en el género.

El polvo de la raíz de *B. salicifolius* ha demostrado proteger a los granos de frijol (bayo bolita, bayo larguito, pazco, negro) del gorgojo (*Zabrotes subfasciatus*) hasta por 30 días después de su infestación, mostrando mayor efectividad durante la oviposición (Rodríguez-Hernández y López-Pérez, 2001). Resultó efectiva como nematicida (*Helycotylenchus* sp, *Meloidogyne* sp, *Pratylenchus* sp, *Rotylenchus* sp, *Tylenchorhynchus* sp) al intercalarse con los cultivos (Ijani *et al.*, 2000; Reynolds *et al.*, 2000). La fitoquímica de la planta la constituyen piretros, lignanos y compuestos azufrados (Merritt y Rey, 1992).

Parmar *et al.* (1997), mediante una recopilación bibliográfica de 1907 a 1996, reportaron más de 600 compuestos en la familia Piperácea y la actividad biológica de algunos de ellos sobre insectos. La fitoquímica de *Piper auritum* la forman piperamidas, monoterpenos, sesquiterpenos y arilo-propanoides (Davyson *et al.,* 2001) que, en conjunto, confieren una toxicidad aguda y propiedades "entorpecedoras" a los extractos. Se ha utilizado contra *Spodoptera litura, Biomphalaria glabrata, Musca domestica* y *Aedes aegypti.*

La actividad de *P. auritum* y *B. salicifolius* altera las funciones normales de los insectos, incapacitándolos para el desarrollo de funciones esenciales como la movilidad y la alimentación (Merritt y Rey, 1992; Regnault-Roger *et al.*, 2004; Parmar *et al.*, 1997). Piperamidas (Piperaceae) y piretros (Asteraceae) intervienen en la cadena respiratoria de la célula, alterando el sistema de producción de energía en el

insecto, el cual como respuesta disminuye sus actividades a las esenciales para vivir.

Sobre la ecología y comportamiento de las larvas del complejo "gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae) se conoce poco. Se sabe que las larvas presentan su mayor movilidad y requerimiento energético durante el segundo y tercer instar (Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez, 1998; Ramírez-Salinas et al., 1999). Se ha documentado que los monocultivos de maíz y sorgo resultaron con oviposiciones significativamente mayores que los cultivos con frijol (*Phaseolus vulgaris*), soya (*Glicine max*) y girasol (*Helianthus annus*) (Rodríguez del Bosque, 1984); sin embargo, las larvas consumen el tomatillo verde o miltomate (*Physalis philadelphica*) con mayor preferencia que las raíces de tomate (*Solanum lycopersicum*) y frijol (García-López et al., 2006).

No obstante, estudios en las larvas de coleópteros *Diabrotica virgifera* y *Costelytra zealandica* han evidenciado que responden a estímulos químicos que las plantas expiden a través de las raíces como volátiles o metabolitos secundarios (Dethier *et al.*, 1956).

Probar si los extractos acuosos de la raíz de *B. salicifolius* y de hojas de *P. auritum* son efectivos para el control de la "gallina ciega" al alterar la percepción de las larvas cuando están en contacto con el extracto o son ingeridos, representa la generación de una alternativa que viene a ser complementaria en el manejo integrado de la plaga.

Para probar la efectividad de los extractos se seleccionaron los segundos y terceros estadios larvales de *Phyllophaga ravida*, especie rizófaga estricta (Méndez-Aguilar *et al.*, 2003) y de *P. obsoleta*, rizófaga facultativa (Castro-Ramírez *et al.*, 2006). Se evaluó la respuesta de protección de los extractos contra la rizofagia de las larvas en condiciones de invernadero, mediante la infestación de plantas de maíz con un mes de crecimiento. Asimismo, a través de pruebas de preferencia de la alimentación en el laboratorio se observó el efecto de los extractos sobre los patrones de alimentación en larvas de tercer instar.

II. OBJETIVOS

Identificar la actividad insecticida e insectistática de los extractos acuosos de la raíz de *Barkleyanthus salicifolius* y hojas de *Piper auritum* en las larvas rizófagas de tercer instar (L3) de *Phyllophaga ravida* y *P. obsoleta* (Coleoptera: Melolonthidae), mediante ensayos de actividad antialimentaria.

Estimar bajo condiciones de invernadero si la aplicación de los extractos de *B. salicifolius* y *P. auritum* sobre plantas de maíz (*Zea mays*) infestadas con larvas de segundos y tercer estadio, disuaden a las larvas de alimentarse normalmente de las raíces en bioensayos de protección a la raíz.

III. HIPÓTESIS

La concentración relativamente alta de piperamidas en *P. auritum* y piretrinas en *B. salicifolius*, las hacen tóxicas a diversos insectos (Regnault-Roger *et al.*, 2004). Estos compuestos dificultan la alimentación y el movimiento de insectos (Weinzerl, 1998); por lo que se espera que el contacto o ingesta de los extractos de hojas de *Piper auritum* y raíz de *Barkleyanthus salicifolius* disminuirán la capacidad de las larvas de *Phyllophaga ravida* y *P. obsoleta* para alimentarse en los bioensayos. Su efecto en los patrones de alimentación puede ser de disuasión, repelencia o supresión. Esta alteración en las larvas se manifestará en un menor consumo de alimento (discos de zanahoria tratados con extracto, o raíces con extracto) en las opciones donde se encuentre el extracto presente. En el bioensayo de actividad

antialimentaria las larvas comerán menos de los discos de zanahoria tratados con extracto, comparados con los que no tienen o no están en contacto con discos con extracto. En el experimento de protección de la raíz habrá un mayor desarrollo radical en las plantas que sean protegidas con los extractos que en las plantas testigo (sin extractos).

IV. ANTECEDENTES

El presente capítulo narra la importancia del cultivo de maíz como medio de subsistencia en México y el impacto que tienen para su producción las diferentes plagas que los infestan. Se hace énfasis en el complejo "gallina ciega" por ocasionar pérdidas cercanas al 50% de la cosecha en zonas de alta marginación en Los Altos de Chiapas (Castro-Ramírez, 2004).

Del complejo se citan biología, composición, ecología y comportamiento en la región, particularizando en el estado larval de *Phyllophaga ravida* y *P. obsoleta*; especies rizófagas estrictas.

Se refieren los trabajos que se han realizado para el control del complejo y se especifican aquellos en los que se han utilizado como medio de control extractos, infusiones y/o polvos de plantas. Se describe la fenología, ecología y fitoquímica de *Barkleyanthus salicifolius* y *Piper auritum;* plantas de las cuales se elaboraron los extractos probados con las larvas de ambas especies.

4.1. El maíz como cultivo y sus principales plagas.

En México dos terceras partes de los productores en el sector agrícola están relacionados con la producción de maíz (*Zea mays*), se estima que de 15 a 18 millones de personas depende de la producción de grano como medio de subsistencia (Nadal, 2001). Su cultivo en más del 62% de las tierras cultivables del país, bajo un gran espectro de ambientes y nichos ecológicos, han desencadenado

diferentes procesos evolutivos en la especie, hoy su diversidad se contabiliza en 41 razas y 3,532 variedades (López-Losano, 2003).

En Chiapas se cultivan alrededor del 10% de las variedades del país. El maíz comiteco es una de las variedades que mantiene mayores áreas de cultivo dentro del estado; su basta distribución se asocia a la longitud de más de 30 cm que puede alcanzar la mazorca y al proceso expansivo de la etnia tzeltal en la cual forma parte de los alimentos básicos (Perales, 2009).

El arreglo espacial del cultivo y las asociaciones (policultivos) en las que se puede encontrar es variable; en su forma simplificada (monocultivo) contribuye a la pérdida de la fertilidad de los suelos por dejar unidades de tierra desprovistos de cobertura vegetal. Los monocultivos son más susceptibles a las plagas por la simplicidad estructural que presentan (Altieri, 1989; Nicholls y Altieri, 2002).

En México la producción de maíz se ve afectada durante su proceso de obtención en el campo o en su almacenamiento por insectos (Arthropoda: Insecta), nemátodos (*Pratylenchus brachyurus* Godfrey, 1929, *P. scribneri* Godfrey, 1929, *P. hexincisus* Taylor y Jenkins, 1957, *P. zeae* Graham, 1951, *P. thornei* Sher y Allen, 1953), aves (*Aratinga pertinax* Meyer Schauensee,1950, *Molothrus bonariensis* Gmelin, 1789) y ratas (*Sigmodon alstoni* Thomas, 1881, *Sigmodon* sp) (Ortega y Rodríguez-Hernández, 1998; Clavijo y Pérez, 2000).

Más de 47 especies de artrópodos infestan al maíz en algunas de sus etapas de producción(Araya, 1993), entre las que están el ácaro rojo (Aracnida: Tetranychidae; *Oligonychus zeae* Banks,1912), mírido del maíz (Hemiptera: Miridae; *Collaria oleosa* Distant, 1883); salta hojas del maíz (Homoptera: Delphacidae; *Dalbulus maidis* Delong y Wolcott, 1923); áfido verde del maíz (Homoptera: Aphididae; *Rhopalosiphum maidis* Fitch, 1856), gusano cogollero (Lepidoptera:

Noctuidae; Spodoptera frugiperda Smith), pelador de los pastos (Lepidoptera: Noctuidae; Mocis latipes Guenée, 1852), gusano del jilote (Lepidoptera: Noctuidae; Helicoverpa zea Boddie, 1850), taladrador del tallo (Lepidoptera: Pyralidae; Zeadiatraea lineolata Wlk, 1970), taladrador menor del tallo (Lepidoptera: Pyralidae; Elasmopalpus lignosellus Zeller, 1948), ronrón rinoceronte (Coleoptera: Scarabeidae; Podischnus agenor Olivier, 1789), gorgojo (Coleoptera: Bruchidae; Zabrotes subfasciatus Bohemann, 1833), gorgojo del grano (Coleoptera: Cucujidae; Oryzaephilus surinamensis Lineo, 1978), gorgojo negro del maíz (Coleoptera: Curculionidae; Sitophilus zeamais Motschulaky, 1855), gorgojo del grano (Coleoptera: Bostrichidae; Dinoderus minutus Fabricius,1775), gorgojo del grano (Coleoptera: Bostrichidae; Rhizopertha dominica Fabricius,1775) y la gallina ciega (Coleoptera: Melolonthidae).

4.2. "Gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae).

En México el nombre de "gallina ciega" se utiliza para describir a la etapa larval o inmadura de los escarabajos^{III}. Agronómicamente el complejo está formado por un grupo de larvas en forma de "c" que vive en el suelo, son de color blanco-cremoso y tienen cabeza café-amarillenta. En Los Altos este grupo es conocido en tzeltal y chol como *k'olom*, en tzotzil *k'onom* y *k'olomchan* en tojolabal (Castro-Ramírez *et al.*, 2004).

El complejo se compone por larvas de distintos géneros de la familia Melolonthidae, su estructura varía entre periodo anual, localidad y cultivo (Nájera-Rincón, 1993; Morón *et al.,* 1997). Su presencia en las parcelas se asocia a la tolerancia o siembra

de plantas hospederas de adultos, a la combinación de prácticas agrícolas, como la quema del rastrojo y la eliminación de arvenses y a las características edáficas particulares. Cuando existe más de uno de estos factores en las parcelas, las densidades larvales se pueden ver beneficiadas y el daño a los cultivos aumentar (Castro-Ramírez *et al.*, 1998).

En Los Altos de Chiapas el complejo está formado por 16 especies registradas en el cultivo de maíz, el cual es producido mayormente bajo condiciones de temporal (Castro-Ramírez y Silva, 2002). Para la región, el perjuicio que causa la plaga a las raíces del cultivo se han llegado a estimar en pérdidas entre 36 y 42% de la producción (Castro-Ramírez *et al.*, 2006).

El umbral económico de daño lo determinan las densidades entre especies rizófagas estrictas, rizófagas facultativas y saprófagas; densidades mayores a 3.33 larvas/m² son significativas cuando están bien representadas especies rizófagas de *Phyllophaga*, mientras que son inocuas cuando la forman larvas de los géneros *Hoplia*, *Diplotaxis*, *Macrodactylus* y *Anomala* (saprófagas) (Aragón *et al.*, 2003). En Los Altos de Chiapas, durante el ciclo agrícola de 1997, se encontraron densidades de *P. obsoleta* de 37.26 larvas/m² (Gómez *et al.*, 1999) y de *P. ravida* de 12.29 larvas/m² (Méndez-Aguilar *et al.*, 2003).

4.2.1. Biología

Las especies tropicales y subtropicales de los coleópteros pueden tener ciclos de vida anual o bianuales, ser univoltinos o bivoltinos (con una generación o dos

generaciones en un año) y hemimetábolos u holometábolos (metamorfosis incompleta o completa) (Rodríguez del Bosque, 1996). Las especies del complejo "gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae) en la región Altos son holometábolas y tienen ciclo de vida anual dividido en cuatro fases: huevo, larva, pupa y adulto, las tres primeras las viven en el suelo y la última enterrados en el día y volando o sobre plantas hospederas en las noches (Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez, 2000).

Los huevos son depositados en el suelo a finales de la primavera y principios de verano, eclosionan de 10 a 14 días después de la postura (Morón, 2003). El número y tamaño de huevos que ponen los miembros del complejo en la región es variable, especies pertenecientes al género *Phyllophaga* ponen de 3 a 14 huevos por hembra, entre los meses de mayo a junio (Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez, 2000; Vázquez-López, 2008). Los huevos son de color blanco aperlado con tamaño de 2 a 3.1 mm (Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez, 1997 y 2000; Vázquez-López *Op cit*).

El estado larval se divide en tres estadios. El primero (L1) dura de 20 a 60 días, durante él las larvas miden en promedio de 1 a 1.5 cm de longitud, se alimentan de materia orgánica y de raíces pequeñas (Morón, 1986; Ramírez-Salinas *et al.*, 1999; Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez, 2000, Vázquez-López, 2008).

El segundo estadio (L2) dura de 30 a 60 días y miden de 2 a 2.5 cm. En esta etapa la larva incrementa sus necesidades alimentarias para aumentar de 5 a 7 veces su biomasa y el daño a las raíces de las plantas comienza a notarse. El tercer estadio (L3) es la fase más extensa y voraz del complejo, ya que puede durar de 4 a 8 meses en las zonas tropicales y de 7 a 14 meses en zonas templadas. Las larvas L3 miden de 2.7 a 3.7 cm; y es en esta etapa donde pueden consumir la totalidad de las raíces de una planta (Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez, 2000).

A mitad de otoño y principios de invierno las larvas L3 se inactivan, se protegen de las bajas temperaturas y la falta de humedad del sustrato enterrándose en celdas en las que después pupan. Esta etapa dura de 30 a 45 días. Después de este tiempo se forma el imago, el cual permanece dentro de la celda en tanto madura el aparato reproductor y se incrementan la humedad y temperatura del sustrato para facilitarle comenzar sus actividades al exterior como adulto (Morón, 1986).

La emergencia de los adultos en la región de Los Altos de Chiapas ocurre, entre los meses de abril y junio. En esta etapa pueden permanecer, en promedio entre 8 y 30 días (Morón, 1986; Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez, 2000; Vázquez-López, 2008).

4.2.2. Ecología y comportamiento

La actividad de los adultos en la familia Melolonthidae comienza junto con el inicio de las lluvias, en el campo de la región de Los Altos de Chiapas se han registrado movimientos de 18:40 a 23:00 horas (Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez, 2000; Gómez *et al.*, 1999 y 2000), cuando llueve en ese horario las actividades se suspenden, renovándose hasta el otro día (Ramírez-Salinas *et al.*, 1999).

Durante el vuelo, los adultos de las distintas especies buscan los hospederos para alimentarse o copular, algunos de ellos sobrevuelan lámparas u otros objetos luminosos como respuesta a su fototactismo (Castro-Ramírez *et al.*, 2001; Méndez-Aguilar *et al.*, 2005). Árboles como el aile (*Alnus acuminata*), fresno (*Quercus laurina*), chiquinib (*Quercus crispipilis*) y roble (*Q. rugosa*) y cultivos como el durazno (*Prunus persica*) y frijol bótil (*Phaseolus coccineus*) son los principales hospederos (Cruz *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 2000; Pacheco-Flores *et al.*, 2002; Castro-Ramírez *et al.*, 2004).

Los hábitos subterráneos del estado larval de la familia Melolonthidae han hecho que se conozca poco sobre su taxonomía, biología y comportamiento. En general, el complejo "gallina ciega" se clasifica como plaga agrícola por tener dentro de sus miembros larvas que se alimentan exclusivamente de raíces (rizófagas estrictas) de cultivos.

Se han registrado al menos 57 tipos de cultivos (destacan de las familias Poaceae, Rosaceae y Fabaceae) en el que las larvas pueden ocasionar daños; maíz, trigo, frijol, papa, arroz, chile, caña de azúcar, pastos, fresa, zanahoria, espinaca, betabel, jitomate, haba, cebolla, sorgo, maguey y palma de coco (Morón, 1999; Aragón *et al.,* 2003).

Hoy se conoce que, como parte de la estrategia que la comunidad de Melolontidos guarda para su supervivencia, algunos miembros pueden modificar sus hábitos alimenticios, por ejemplo, pueden pasar de la rizofagia al saprofitismo. Esta capacidad se pierde cuando cambia la composición del suelo o se presentan cambios radicales en la dinámica de las comunidades, como el reemplazo o sustitución de miembros prioritarios (consumidores primarios y descomponedores), ya que se omiten niveles dentro de la cadena trófica (Morón, 1988).

Con estas perturbaciones intensas, se acentúa la proliferación de miembros con actividad rizófaga y es cuando el daño a los cultivos se hace evidente y se considera un problema. El consumo severo de raíces por las larvas dentro de las parcelas agrícolas se observa en forma de "manchones" irregulares, los cuales pueden deberse al hábito de las hembras de ovipositar grupos de numerosos huevos en áreas pequeñas. Las larvas L2 comienzan a afectar al sistema radical, desplazándose del centro de la planta hacia la periferia cuando son larvas L3 y tienen una mayor movilidad (Morón, 1986; Rodríguez del Bosque, 1993).

Su desplazamiento vertical y la poca capacidad de las larvas para desplazarse horizontalmente explican las altas densidades que puede llegarse a encontrar en un

metro (Morón, 1986). En Los Altos de Chiapas se ha registrado una densidad de *Phyllophaga obsoleta* de 37.3 larvas/m² (Gómez *et al.,* 2000) y de *P. ravida* de12.3 larvas/m² (Méndez-Aguilar *et al.,* 2003).

No se conocen con exactitud los factores que intervienen para las hembras ubiquen los sitios de oviposición dentro de las parcelas, se piensa que puede estar relacionada con la presencia y distancia a los hospederos, a la presencia de un porcentaje mayor de materia orgánica, o de "zacate" (Morón, 1986), mayor humedad, protección de insolación, etc. (Rodríguez del Bosque, 1988; Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez, 2000).

4.3. Descripción y antecedentes de los estadios larvales de *Phyllophaga*.

Se tiene una descripción completa sobre la morfología de los inmaduros de las dos especies aquí utilizadas, *Phyllophaga ravida* y *P. obsoleta* (Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez, 1998). A continuación se describe la información existente sobre el comportamiento de las dos especies durante su estadio larval.

Durante los años 60, investigaciones sobre el género *Phyllophaga* relacionaban las mayores tasas de oviposición, supervivencia larval y agregación a los suelos ligeramente ácidos y no alcalinos (Shorey *et al.*, 1960). Méndez-Aguilar *et al.* (2003) encontró que estas características no se cumplen para la región de Los Altos, donde las especies de *Phyllophaga* no mostraron correlación con el pH, textura o el color en el suelo, sólo una ligera relación, no significativa, con el alto contenido de materia orgánica.

La distribución agregada, capacidad de dispersión, mortalidad y canibalismo en el estadio larval son factores diferenciales para las especies de *Phyllophaga* y obedecen a más de una circunstancia dentro de las parcelas^{IV} (*i. e. P. crinita* muestra una mayor agregación en los dos primeros estadios larvales y disminuye hacia el tercero). Estas características no se conocen con exactitud para *P. ravida* y *P. obsoleta*, se sabe que al igual que otras especies de *Phyllophaga* tienen su mayor capacidad de desplazamiento y voracidad en el tercer estadio (L3).

Antes se tenía la percepción de que la "gallina ciega", y en específico *Phyllophaga*, solo se alimentaban de raíces de cultivos, hoy se conoce que pueden ingerir una gran variedad de arvenses (León-Chanona *et al.*, 1997) con la misma intensidad con la que consumen los cultivos. Como ocurre con las especies de *Phyllophaga* en la región de Los Altos, donde la ingesta de las raíces de *Salvia* sp se compara con el consumo de las raíces del maíz (Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez, 2000).

4.3.1 Phyllophaga (Phyllophaga) ravida (Blanchard, 1850).

Esta especie se encuentra en al menos ocho localidades de Los Altos de Chiapas: Aguacatenango, Amatenango del Valle, El Madronal, Piedra Escrita, San Cristóbal, Teopisca, Yalumá y San Francisco (Castro-Ramírez *et al.*, 2004). Es considerada plaga agrícola de importancia debido a la capacidad de los adultos de distribuirse en todos los tipos de vegetación, originales o derivados, ubicados entre los 150 y 2,100 m s.n.m. y a la tendencia del estadio larval de mantener altas densidades en los

agrosistemas derivados de los cambios de vegetación (Morón 1986; Morón *et al.*, 1997).

Es una larva moderadamente robusta, de cuerpo color blanco hialino y cabeza café amarillenta, el tercer estadio es de 2.7 a 3.6 cm de longitud. Su principal característica es la forma de "Y" de la palidia (Ramírez-Salinas *et al.*, 2000). Se encuentran preferentemente en los pastizales y parcelas agrícolas (Castro-Ramírez *et al.*, 2004).

Durante esta etapa causa daños de intensidad variable en al menos 18 de los más de 100 cultivos que se siembran en México (Morón, 2003), se le ha encontrado alimentándose de raíces (rizófaga estricta) de maíz (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum vulgare*), pastos (*Cynodon* sp, *Bouteloua* sp, *Poa* sp, *Hilaria* sp, *Bromus* sp) y caña de azúcar (*Saccharum* sp) (Morón, 1986). En el cultivo de maíz se ha registrado daño del 94% de las raíces, independiente del contenido de materia orgánica del suelo (Castro-Ramírez *et al.*, 1999).

4.3.2. Phyllophaga (Phytalus) obsoleta (Blanchard, 1850).

Se encuentra presente en 19 localidades de Los Altos de Chiapas; Aguacatenango, Amatenango del Valle, Balún Canal, Bochil, El Madronal, Juznajab, Majosik, Navil, Oxchuc, Pacvilná, Piedra Escrita, Las Piedrecitas, San Cristóbal, Tenejapa, Teopisca, Tzunum, Winikton, Yalumá y San Francisco (Castro-Ramírez *et al.*, 2004).

Es una de las "gallinas ciegas" con mayor distribución en el territorio mexicano, se encuentra en casi todos los tipos de vegetación natural e inducidos ubicados entre 800 y 2,500 m s.n.m. (Morón *et al.*, 1997). Se alimenta estrictamente de raíces, consume cultivos como el maíz (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*) y pastos (Poaceae) por lo que es considerada una especie plaga (Morón, 1986). Se ha visto que puede llegar a causar menor daño en parcelas donde abunda la materia orgánica (Castro-Ramírez, 2004).

Las larvas son de color blanco cremoso, con la cabeza café amarillenta. El tercer estadio mide en promedio 3.11 cm, entre un intervalo de 2.5 a 3.6 cm (Ramírez-Salinas *et al.*, 2000).

4.4. Actividad biológica de plantas en el control de insectos.

Durante el curso evolutivo las plantas han desarrollado diferentes mecanismos de respuesta hacia el ataque de insectos. Plantas, insectos y enemigos naturales han interaccionado desde hace más de 400 millones de años, generado una selección recíproca entre los tres niveles, lo que ha provocado diferentes formas de interacción (Rodríguez-Hernández, 2004).

El ataque de un insecto fitófago selecciona nuevas defensas en la planta, a las cuales el insecto debe adaptarse para seguir subsistiendo. La presión continua entre ellos por varios ciclos ocasiona una relación específica, hasta alcanzar una diferenciación de sus congéneres para llegar a la primera fase de la coevolución (Altieri, 1993).

En este proceso, los insectos desarrollan mecanismos de desintoxicación para neutralizar los compuestos secundarios que han actuado como una barrera para la alimentación, propiciando una modificación química del tóxico a un conjugado inocuo, o generando mecanismos para su almacenamiento en tejidos especiales (Altieri, *Op. cit*; Rodríguez-Hernández, *Op. cit*).

Su efectividad como repelente, productos antialimentarios, compuestos que alteran el ciclo biológico y demás acciones tóxicas, basan su acción en los compuestos que se han formado como resultado de la evolución de su metabolismo secundario (Rodríguez-Hernández, *Op. cit*).

Estas propiedades de las plantas han sido utilizadas a lo largo del desarrollo de la historia humana. A inicios del siglo XIX, extractos y polvos de plantas se utilizaban para el control de plagas como alternativa al uso de productos químicos. Durante el siglo XX se perdió un poco su uso, con la aparición de los insecticidas clorados y fosforados, que por su efectividad pronta denotaron un "boom" en la agricultura. La poca persistencia del efecto de estos productos organofosforados hacen retornar nuevamente al uso de los productos de origen vegetal, dando paso a toda una generación de insecticidas botánicos (Regnault-Roger *et al.*, 2004).

La primera generación de insecticidas vegetales incluyó la producción de extractos y compuestos derivados de plantas, como piretro, rotenona y nicotina. En la segunda generación se tomaron de base algunos de estos compuestos para elaborar productos sintetizados químicamente, como es el caso de los piretroides sintéticos, generados a partir de la piretrina obtenida de *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Casida y Quistad, 1998; Dhadialla *et al.*, 1998).

Bajo esta misma corriente aparecen los insecticidas de tercera generación que, a diferencia de los insecticidas químicos, no provocan directamente la muerte del insecto, su fin es evitar el daño al cultivo. En esta categoría se incluyen a los reguladores del desarrollo, como los juvenoides (fenoxycarb), los inhibidores de muda (benzoil-fenil urea) y los antagonistas de la ecdisona (tebufenocida) (Dhadialla et al., Op. cit).

Adicionados a ellos, están aquellos productos que sirven para la protección de los cultivos, como los de actividad antialimentaria; quienes por permitir una mayor permanecia y un menor daño al cultivo, retardando o inhibiendo la alimentación en el insecto y hacer al sustrato inapetecible, son altamente utilizados en la agricultura orgánica (Rodríguez-Hernández, 2000).

La ingesta de estos compuestos en general causa desorientación y estrés en los insectos, al actuar sobre los receptores sensitivos que utilizan para la búsqueda de su alimento. Esta condición les provoca un estado de desnutrición y los hace más susceptibles a la depredación, parasitismo y enfermedades (Leos y Salazar, 1990; Rodríguez-Hernández, 2000).

En México el uso de las plantas para el control del insectos tiene registros muy antiguos. Plantas como la "hierba de la cucaracha" (*Haplophyton cimicidum*) eran utilizadas contra la "mosca doméstica" (Diptera: Muscidae, *Musca domestica* Linneo,1758), "gusano de la naranja" (Diptera: Scandinaviae, *Trypeta ludeas* Loew, 1873) y el "picudo del algodonero" (Coleoptera: Curculionidae, *Anthonomus grandis* Boheman, 1843). La raíz del "chichicamole" (*Microsechium helleri*) se empleó contra la "cochinilla de la humedad" (Hemiptera: Dactylopiidae, *Dactylopius coccus* Costa, 1835), "babosa" (Stylommatophora, *Deroceras reticulatum* Müller 1774), "caracol"

(Pulmonata), "gallina ciega" (Ceoleoptera: Melolonthidae) y "cucaracha" (Blattodea) (Rodríguez-Hernández, 2004).

En el país, el tratamiento de las plagas de maíz en las diferentes etapas de producción del cultivo con productos de origen vegetal data de muchos años. En la Sierra Norte de Puebla se ha utilizado por generaciones la semilla de "rama tinaja" (*Trichilia havanensis*) para proteger a los granos contra los coleópteros durante su germinación (López-Olguín, 1998).

Otras plantas que han sido probadas en el centro, occidente y sureste del país, son el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y el nim (*Azadirachta indica*). Este último se ha comprobado que como extracto es poco tóxico y tiene un efecto insectistático (antialimentario), pero cuando del extracto se separan sus compuestos activos (azadiractina y el meliantrol), sus propiedades se pierden y puede llegar a comportarse como un compuesto químico, generando resistencia en el insecto (Rodríguez-Hernández, 2000). Se ha utilizado contra el "mosquito" (Diptera: Culicidae, *Anopheles* sp), "gorgojo" (Coleoptera: Bruchidae, *zabrotes* sp), "palomilla del maíz" (Lepidoptera: Noctuidae, *Spodoptera frugiperda* Smith), ácaros (*Tetranychus urticae* Koch, 1836 y *Panonychus citri* McGregor, 1916) y nemátodos (*Meloidogyne incognita* Kofoid & White, 1919).

Los extractos del tabaco tienen un comportamiento similar, la nicotina como compuesto puro puede llegar a ocasionar una temprana resitencia en el insecto cuando es aplicada en proporciones no dosificadas. Se ha empleado en el control de los "barrenadores del tallo" (Lepidoptera), "chinches" (Hemiptera), "gallina ciega"

(Coleoptera), "gorgojos" (Coleoptera) y "pulgones" (Homoptera) (Bentz y Neal, 1995).

Muchas veces la combinación de los compuestos en los extractos de plantas son más efectivos como mezclas que como compuestos puros, debido a que entre las substancias que lo conforman hay algunas que sin tener efecto por si solas potencian su acción y le confieren la capacidad de actuar en más de un sitio de acción (Regnault-Roger *et al.*, 2004).

4.4.1. Actividad insecticida e insectistática de extractos vegetales

La efectividad de extractos, infusiones y polvos de plantas en el control de los insectos se basan en la gran cantidad de compuestos secundarios que las plantas resguardan en sus componentes estructurales. Estos metabolitos son únicos en cada especie y su producción y almacenamiento en los tejidos responden a más de una característica biofísica del desarrollo de la planta (Regnault-Roger *et al.*, 2004).

Cuando estos compuestos se liberan al ambiente son captados por los insectos a través de receptores, los cuales, a diferencia de los insecticidas organosintéticos, difícilmente tienen un efecto letal (insecticida) y generalmente solo alteran su comportamiento o parte del ciclo biológico (insectistático) (Rodríguez-Hernández, 2004).

La respuesta en los insectos a estos mensajes químicos puede ser como atrayentes (cairomonas), repelentes (alomonas), reguladores del desarrollo, estimulantes o

inhibidores de la alimentación y oviposición (Jacobson, 1989; Ascher, 1993; Rodríguez-Hernández; 2004).

El comportamiento de atracción sigue una secuencia acorde al comportamiento del insecto, al metabolito y concentración a la que está respondiendo. Este se da en cuatro fases: atrayente, arrestante, incitante y estimulante. Las dos primeras son de carácter olfativo y visual, en tanto que las dos restantes son de carácter gustativo y táctil (Metcalf, 1987).

La forma de acción repelente o disuasoria no ha sido descrita por completo, se conoce que la función de los repelentes es crear una confusión química que evita que el insecto se alimente u oviposite y se considera contrario a la fase de atrayente (Rodríguez-Hernández; 2004).

Los reguladores del desarrollo pueden ser empleados en las fases tempranas de crecimiento o en cualquier otra etapa del desarrollo. Sus efectos pueden manifestarse por inhibir o adelantar la metamorfosis, al suprimir o disminuir las hormonas que participan en el proceso. Como consecuencia de estas alteraciones el insecto puede desarrollarse en una época poco favorable, desarrollar malformaciones, ser estériles o morir (Mordue y Blackwell, 1993; Celis *et al.*, 2008).

Los compuestos inhibidores de la alimentación actuán en una de las seis etapas del proceso alimenticio, orientación, prueba, ingestión, digestión, asimilación y excreción. El insecto prueba el alimento, si emite una respuesta positiva (estimulante) continua con la ingestión, si es negativa (inhibidor) evita segir consumiéndolo (disuasivo) (Rodríguez-Hernández, 2004).

En el proceso de la oviposición los registros son escasos, se piensa que la emisión de aleloquímicos de los hospederos pueden ser alterados por la presencia de compuestos ajenos a ellos. Este proceso es aún más complejo si consideramos que en él se engloban factores ambientales y de conducta de los insectos (Hansson *et al.*, 1999).

4.4.2. Barkleyanthus salicifolius (H.B.K.) Rob. & Brettell

Pertenece a una de las 21,000 especies de la familia Asteraceae. Familia que se caracteriza por tener miembros raramente arbustivos o epífitos. Son a menudo herbáceas con inflorescencias en capítulos y se distribuyen en todos los continentes excepto en el Antártico (Bruneton, 2001).

Esta familia es ampliamente reconocida por sus propiedades nematicidas. Especies como *Tagetes erecta* y *T. patula* han sido utilizadas ampliamente en America Central y Sur para el control *Helicotylenchus* sp, *Meloidogyne* sp, *Pratylenchus* sp, *Rotylenchus* sp, *Tylenchorhynchus* sp (Regnault-Roger *et al.*, 2004).

4.4.2.1 Fenología y Ecología

Se conoce comúnmente como chilca, azomiate, azumiate, camisa macho, flor de dolores, jara, jara mexicana, jaral, jaralillo, jarilla, jarilla amarilla, jarilla verde o pajarilla. Sus sinonimias son: *Senecio salignus* DC., *Cineraria angustifolia* Kunth., *Cineraria salicifolia* Kunth., *Senecio vernus* DC. y *Senecio xarilla* Sessé & Moc (Martínez, 1979; Rzedowski y Rzedowski, 2001).

La chilca es un arbusto de 4 m de altura, ramificado, tallos lisos de color cenizo, hojas lanceoladas con márgenes aserrados, pubescente en el haz y blanco-lanudas en el envés, dos nervaduras recorren paralelamente la nervadura central, su inflorescencia es compuesta por 18 a 28 flores de ápice amarillo y la base caférojizo, las sedas del vilano son blancas y muy largas, por lo que, al perder los ápices las flores, da la apariencia de que las flores son blancas. Tiene frutos aquenios, claviformes o subcilíndricos de 1-1.5 mm de largo, estriados y pubescentes de color café verdoso (Martínez, 1979).

Originaria de México, se distribuye desde el sur de los Estados Unidos de América hasta Honduras. Crece desde alturas a nivel del mar hasta altitudes cercanas a los 2800 m se encuentra generalmente a orillas de los arroyos, caminos y lugares perturbados. Florece durante la primavera (Miranda, 1952).

4.4.2.2. Fitoquímica

La familia Asteraceae se caracteriza por la presencia de Senecioneas y Eupatorieas que tienen alcaloides pirrolidínicos. Su metabolismo terpénico es intenso, elaboran una gran variedad de estructuras mono, sesqui, di y triterpénicas; los sesquiterpenos existen principalmente bajo la forma de lactonas (Bruneton, 2001).

Las principales lactonas son, alantolactona, helenalina, hymenovina, anthecotulida, cynaropicrina, niveusin, lactupicrina, nobilina, vermeerina, arteglasin. Se caracterizan por alterar los niveles enzimáticos (transaminasas, fosfatasas y y-glutamil

transferasa) de los organismos, al modificar el intercambio catiónico durante la transmisión de los impulsos nerviosos (Craig *et al.*, 1994).

La investigación fitoquímica hasta hoy realizada en el género *Barkleyanthus*, solo explica la acción que puede tener la ingesta de hojas por periodos largos de tiempo en los caballos (7% de la masa corporal) y ganado (3.6% de la masa corporal) (Cheeke, 1989).

La fase clínica de estos animales demuestra que la ingesta de hojas pueden causar depresión, pérdida de coordinación de movimientos, debilidad, anorexia y rápida pérdida de peso, puede haber diarrea y en algunos casos fotosensibilización. Los síntomas no han mostrado una relación con las dosis ingeridas y la duración de la ingestión, son poco correlativos (Craig *et al.*, 1994).

Estas propiedades en los mamíferos han incitado a la búsqueda de los compuestos activos que confieren esa actividad biológica. Se ha encontrado que *Senecio vulgaris* contiene hasta 0.16% de alcaloides totales en las hojas, entre los cuales se encuentran la senecionina, la senecifilina y la retrorsina, acompañadas por sus isómeros integerrimita, espartioidina, usaramina y ridellina (Ingolfsdottir y Hylands, 1990; Roeder, 1995).

Al igual que otras especies del mismo género, *B. salicifolius* ha sido utilizada con mayor frecuencia en el tratamiento de patologías humanas, como la migraña e inflamaciones. En esta especie se determinó que las propiedades terapéuticas de las hojas están asociadas a las altas cantidades de piretrinas, lignanos y

compuestos azufrados (Merritt y Rey, 1992). Los extractos etanólicos, metanólicos, diclometanólicos de la planta registraron actividades antioxidantes. Esta propiedad está correlacionada con la presencia de polifenoles, los cuales actúan inhibiendo parte de la peroxidación de lípidos (Domínguez y Correa, 2005).

4.4.3. *Piper auritum* Kunth

La familia Piperaceae agrupa a más de 11 géneros de origen tropical y subtropical, los cuales incluyen arbustos, lianas, plantas herbáceas y epífitas. Se considera una de las familias con mayor actividad biológica; ha sido efectiva en el control de arvenses, plagas y enfermedades del sector agrícola (Bruneton, 2001; Regnault-Roger *et al.*, 2004).

4.4.3.1. Fenología y ecología

Piper auritum pertenece a la familia pantropical de las Piperáceas, tradicionalmente utilizadas como fuente de insecticidas, especias y fitomedicamentos (Regnault-Roger *et al.*, 2004). Se conoce comúnmente como yerba santa, zoaplate, acacóytl, acuyo, cordoncillo, hoja de ajan, hoja de anís, jaco, tlamapaquelite, tlanapaquelite, mumu, mumun (Martínez, 1979).

Es un arbusto herbáceo de 2.5 a 5 m de alto, con un tallo grueso carnoso regularmente poco fibroso. Hojas alternas, elípticas ovadas a aovadas, de forma acorazonada en la base, de 15 a 50 cm de largo y de 8 a 31 cm de ancho. Flores

dispuestas en espigas de 10 a 26 cm de largo y de 3 a 5 mm de ancho. Fruto pequeño y subgloboso (Castro y Poveda, 1983).

Originario de México, de distribución tropical asociada a lugares con altas precipitaciones; en el país se encuentra en San Luis Potosí, Morelos, Puebla, Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Tabasco. Debido a los usos que tiene en la comida mexicana, regularmente se encuentra en los patios, traspatios y solares de las casas. Florece en el mes de junio, aunque es frecuente ver ejemplares con flores hasta el mes de agosto (Martínez, 1979).

4.4.3.2. Fitoquímica

Parmar *et al.* (1997) realizaron una recopilación de los metabolitos que han sido aislados de la familia Piperaceae desde 1907 a 1996. En el cual se cita la composición del género *Piper* por alcaloides, amidas (isobutilamina, piperidina y pirrolidona) propenilfenoles, lignanos, neolignanos, terpenos, flavonoides, kavalactonas o kavapironas, butenólidos y epóxidos del ciclohexano entre otros (Gupta *et al.*, 1985, Parmar *et al.*, 1997; Delgado *et al.*, 2007).

Destaca como característica del género la presencia de aceites esenciales, como los fenilpropanoides, monoterpenoides y sesquiterpenoides; en *Piper auritum* se encontró de 70 a 85% de safrol 2. Estos aceites en la naturaleza cumplen funciones de alelopatía y de atracción para polinizadores (Nigam y Purohit, 1962; Castro y Poveda, 1983; Gupta *et al.*, 1985; Ramos *et al.*, 1986).

La acción de las piperamidas (Piperaceae) ha sido comparada con las piretrinas de la familia Asteraceae. Los ésteres presentes en los extractos activos de esta familia están formados por la combinación de los ácidos crisantémico y pirétrico y los alcoholes piretrolona, cinerolona y jasmolona. Estos compuestos alteran el intercambio catiónico de las células nerviosas (sistema nervioso central y periférico) al tapar las entradas de los canales de sodio, lo que ocasiona en el insecto descargas repetidas, seguidas de convulsiones. El efecto "knock down" puede preceder a las convulsiones, en esta situación el insecto tiene movimientos desordenados y deja de alimentarse (Silva et al., 2002).

Miyakado *et al.* (1989) y Regnault-Roger *et al.* (2004) mencionan que la actividad de los compuestos aislados de *Piper* sp muestran un estado de sinergia y potenciación, es decir su efecto es mayor cuando se mezclan tres o cuatro compuestos que cuando se aplica uno solo.

Scott *et al.* (2004) evaluaron la actividad de tres especies de *Piper* (*P. nigrum*, *P. guineense* y *P. tuberculatum*) en insectos de tres órdenes; las tres contenían isobutyl-amidas^V. Los valores de LD₅₀ mostraron un efecto diferencial de 20 a 80% en *Malacosoma americanum* Fabricius, 1793 (Lepidoptera), *Neodiprion sertifer* Geoffroy,, 1785 (Hymenoptera), *Yponomeuta cagnagella* Hübner, 1813 (Lepidoptera), *Pyrrhalta viburni Paykull*, 1799 (Coleoptera), *Acalymma vittatum* Fabricius, 1775 (Coleoptera), *Leptinotarsa decemlineata* Say,1824 (Coleoptera), *Popillia japonica* Newman, 1838 (Coleoptera) y *Blissus leucopterus hirtis* Hirtus (Hemiptera)^{VI}.

Soberón *et al.* (2007) evaluaron la acción biocida de extractos de *P. tuberculatum* sobre larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera). Utilizaron extractos acuosos, diclorometano-metanol y etanólico de hojas, tallos e inflorescencias, en larvas del tercer estadio. Los extractos de diclorometano-metanol y etanólico de inflorescencias mostraron niveles significativos de mortalidad en las larvas.

La aplicación de extractos etanólicos de 10 especies de *Piper* sp presentes en la región del Sumapaz (Cundinamarca) en larvas de *Spodoptera frugiperda* de tercer instar ocasionó un efecto antialimentario y altos porcentajes de mortalidad, similares al presentado con el testigo comercial biológico (*Bacillus thuringiensis*) (Murcia y Bermúdez, 2008).

Piper auritum ha sido probada, como extracto, contra Spodoptera litura Fabricius, 1775, Biomphalaria glabrata Say 1818, Musca domestica Linneo, 1758, Aedes aegypti Linneo 1762, y Zabrotes sp; donde su efectividad ha sido igual o mayor que el control por productos organofosforados (Rodríguez-Hernández y Lagunes; 1992; Parmar et al., 1997).

V. MATERIAL Y MÉTODO

Para identificar el potencial insecticida e insectistático de los extractos acuosos de raiz *Barkleyanthus salicifolius* y hojas de *Piper auritum* en larvas de *Phyllophaga* obsoleta y *P. ravida* el método comprendió dos etapas.

En el invernadero se analizó si la aplicación recurrente de los extractos de las dos plantas disuadía a las larvas de alimentarse normalmente de las raíces del maíz, cuando eran aplicados a partir del segundo hasta el tercer instar de las larvas. El experimento consistió en infestar con larvas de segundo instar (L2) plantas de maíz con un mes de crecimiento. Después de tres días de la infestación se comenzó a aplicar el extracto cada 20 días hasta cumplir 60 días en total, cuando las larvas estaban en tercer estadio (L3).

En los bioensayos de actividad antialimentaria, efectuados en el laboratorio, se determinó si la presencia de los extractos disuadió, suprimió o repelió a las larvas de alimentarse normalmente con discos de zanahoria. El ensayo duró 60 horas y se utilizaron larvas L3.

5.1. Material vegetal y obtención de extractos.

La recolección de *Barkleyanthus salicifolius* y *Piper auritum* se realizó en la cabecera municipal de Amatenango del Valle, Chiapas, México; entre las coordenadas 16° 31' 43" N y 92° 26' 05" W a una altitud de 1860 m s.n.m. (INEGI, 2005).

Las raíces de *B. salicifolius* se recolectaron de los caminos ruderales del municipio en febrero de 2007 y las hojas de *P. auritum* en los solares de las casas en junio del

mismo año. Durante la recolección las plantas tenían 50% de floración y estaban libres de enfermedades. Duplicados de los ejemplares se encuentran en resguardo en el herbario ECOSUR-San Cristóbal de Las Casas.

5.1.1. Procesamiento del material vegetal.

Las hojas de *P. auritum* se secaron bajo sombra de invernadero por cinco días y las raíces de *Barkleyanthus salicifolius* por 25 días. De la raíz solo se utilizó la corteza. Las muestras secas se pasaron por un molino, marca VYREX, y por un tamiz de 1.5 mm. El polvo vegetal obtenido se guardó en bolsas de papel estraza hasta la preparación de los extractos (Rodríguez-Hernández y Ortega, 1998).

Para comparar la composición fitoquímica de los extractos con los compuestos reportados en las plantas se preparó una muestra acuosa de los polvos para una espectofotometría. Se utilizó espectrofotómetro infrarrojo VARIAN 800 FT-IR SCIMITAR SERIES a 80 nanómetros de transmitancia. En el extracto de raíz de *B. salicifolius* se encontraron grupos amidas, lactonas y acetonas (figura 1). En *P. auritum* la mayoría de los compuestos que están presentes tienen como grupos funcionales radicales OH⁻ y COOH⁻; además de compuestos polifenólicos amidas y cetonas (figura 2).

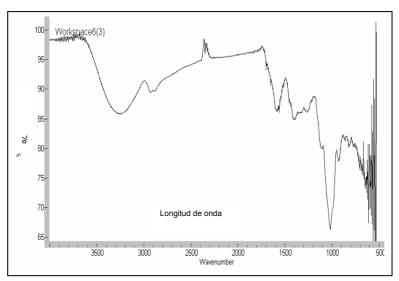


Figura 1. Espectrofotometría del extracto de raíz de *Barkleyanthus salicifolius* a 80 nanómetros (nm) de transmitancia. Cetonas (3500-3100 nm), lactonas (3200-1700 nm), amidas (1700-1000 nm).

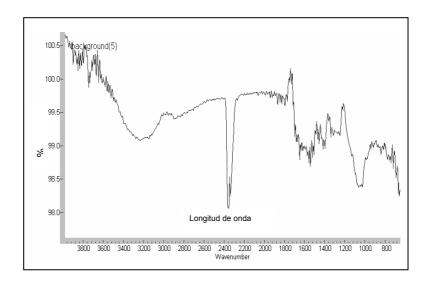


Figura 2. Espectrofotometría del extracto de hojas de *Piper auritum* a 80 nanómetros (nm) de transmitancia. Grupos OH⁻ y COOH (3800-3500 nm), Cetonas (3500-3100 nm), lactonas (3200-1700 nm), amidas (1700-1000 nm), compuestos polifenólicos (1000-800 nm).

5.1.2. Elaboración de extractos vegetales.

5.1.2.1 Extracción por infusión.

Los extractos de las hojas de *P. auritum* (HPA) y las raíces de *B. salicifolius* (RBS) obtenidos por infusión se prepararon en una parrilla de gas y una olla de aluminio de 4 litros. Se disolvió el polvo vegetal en agua de la llave mediante una relación de peso del polvo sobre 1.5 litros de agua según la concentración deseada (cuadro 1). Después de que el agua alcanzó el punto de ebullición se agregó el polvo y se dejó hervir por 10 minutos a fuego lento (Rodríguez-Hernández y López-Pérez, 2001; López-Olguín, 1998).

Posteriormente, las infusiones se retiraron del fuego y dejaron enfriar en recipientes plásticos de 4 litros, tapados con gasas, para facilitar su aeración. El método de preparación se basó en el procedimiento que se realiza en las comunidades indígenas de la Sierra Norte de Puebla, donde *Trichilla havanensis* es utilizada para la protección de la semilla durante la germinación contra el ataque de la "gallina ciega" (López-Olguín, 1998; Aragón *et al.*, 2003). En el mismo sentido, las concentraciones de RBS y HPA se establecieron de acuerdo a los antecedentes que han reportado estas plantas en el tratamiento contra insectos afines al orden Coleoptera (Castro y Poveda, 1983; Cortez y Celaya, 1992; Rodríguez-Hernández y López-Pérez, 2001; Domínguez y Correa, 2005; Blanco *et al.*, 2006; Torres-Alvarez *et al.*, 2006; Celis *et al.*, 2008).

Cuadro 1. Peso de los polvos de HPA Y RBS para la preparación de los extractos por infusión, de acuerdo al porcentaje de concentración requerido.

Tratamiento	Peso del	
	polvo (g)	
RBS 1%	15	
RBS 0.5%	7.5	
RBS 0.1%	1.5	
HPA 15%	225	
HPA 10%	150	
HPA 5%	75	

5.1.2.2. Extracción soxhlet.

La extracción soxhlet permite obtener los componentes puros de un determinado producto en una concentración más alta. En este tipo de extractos se encuentran representados todos los compuestos (metabolitos secundarios) cuyo punto de ebullición es mayor a la solución recuperante (Blanco *et al.*, 2006).

El equipo soxhlet utilizado estuvo compuesto por una parrilla eléctrica, un matraz de fondo plano de 500 ml, un refrigerante, un embudo de separación, un cartucho de papel filtro de poro medio (1.5 mm a 2 mm) y una corriente constante de agua (Bozov *et al.*, 1994). En él se realizó la extracción sólida-líquida con 50 g de la raíz de *B. salicifolius* y 50 g de hojas de *P. auritum*, de manera continua 109 °C, por 36 horas.

A esta extracción se le agregó metanol al 10% y se congeló a -70 °C en un ultracongelador REVCO por 24 horas. Se eliminó el agua de los extractos a través del liofilizador, LABCONCO LYPH-LOCK6, a 3000 atmósferas, 22 °C temperatura ambiente y -52 °C temperatura del recuperante. Los extractos liofilizados se guardaron dentro de cajas Petri selladas en una cámara de vacío hasta su empleo.

La preparación de los tratamientos en partes por millón consistió en disolver los extractos liofilizados en agua para obtener la concentración deseada en una relación del peso del extracto al peso promedio del disco de zanahoria, considerando un volumen de aplicación por disco de 20 µl (cuadro 2).

5.2. Insectos.

Los ensayos se realizaron con larvas de *P. ravida* y *P. obsoleta* obtenidas en el laboratorio a partir de adultos recolectados durante los meses de abril y mayo de 2007. Las crías se mantuvieron bajo condiciones ambientales apropiadas para su desarrollo (60% de humedad y temperatura promedio de 26 °C) de mayo a agosto, alimentándolas con rodajas de zanahoria fresca (Ramírez *et al.*, 2000).

Cuadro 2. Peso de los extractos puros para la elaboración de las concentraciones elaboradas bajo el método de extracción soxhlet.

Peso de	Volumen del
extracto [†] (mg)	disolvente (μl)
1.9770	20
0.1977	20
0.01977	20
	extracto [†] (mg) 1.9770 0.1977

ppm, partes por millón; mg, miligramos; µl, microlitros.

5.2.1. Recolecta de adultos y obtención de larvas de *Phyllophaga ravida* y *P. obsoleta.*

Antes de la recolecta de adultos se esterilizó suelo por el método de solarización (Sikora *et al.*, 2007). Se cernió el suelo con una malla de 2 mm de luz, se extendió dentro del invernadero y envolvió en un plástico transparente de 1.5 mm de grosor. Cada cinco días se removió y humedeció ligeramente, por un periodo total de 60 días

Del 27 de abril al 11 de mayo de 2007 se recolectaron ejemplares de *P. ravida* y *P. obsoleta* en parcelas agrícolas, bajo el alumbrado público, en hospederos, césped y mediante atracción con una lámpara de luz blanca (Méndez-Aguilar *et al.*, 2008), a partir de las 18:40 h hasta las 21:30 h (Ramírez-Salinas *et al.*, 1999), en San Cristóbal de Las Casas y Amatenango del Valle, Chiapas.

[†]La concentración de extracto para obtener un tratamiento estuvo en función al peso promedio de los discos de zanahoria que lo contendrían (395.4 mg).

Los escarabajos se mantuvieron en botes plásticos de 4 litros de capacidad con 1 kg de suelo estéril húmedo (40%), alimentándolos con hojas de *Alnus acuminata* y *Quercus crispipilis* como alimento y tapados con malla de tul (Castro-Ramírez, 2004).

Con base en su morfología externa, los escarabajos de *P. ravida* y *P. obsoleta* fueron separados y agrupados por sexo. En cada bote se formaron 10 parejas para asegurar su copulación (Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez, 2000; Morón, 1984). Cada tercer día se les cambió el alimento y aplicaron 15 ml de agua para mantener una humedad cercana al 60 %, que se asemeja a las condiciones de los suelos donde se encuentran.

Aproximadamente después de cinco días de formadas las parejas comenzaron a observarse los primeros huevos. En cuanto emergieron las larvas se separaron de los adultos y se colocaron de tres en tres en vasos de 250 ml de capacidad con 150 g de suelo estéril; cada tercer día se les alimentó con rodajas de zanahoria fresca y se mantuvo la humedad edáfica con 8 ml de agua.

Durante la primera semana de mayo, la recolecta hecha a finales de abril comenzó a tener larvas de primer estadio (L1). Entre la primera y tercera semanas de julio se observaron larvas de segundo estadio (L2). En la segunda semana de agosto comenzaron a obtenerse las larvas L3, mismas que se utilizaron en los bioensayos de actividad antialimentaria.

5.3. Bioensayos.

Consistieron en evaluar la actividad de los extractos sobre la alimentación de las larvas. Primero se describe el bioensayo de actividad antialimentaria que se realizó con larvas de tercer instar (L3). Posteriormente, se describe el método empleado en invernadero para evaluar la protección de la raíz contra la rizofagia de las larvas durante su segundo (L2) y tercer instar (L3).

5.3.1. Actividad antialimentaria.

La unidad experimental fue adaptada para *Phyllophaga ravida* y *P. obsoleta* de acuerdo a lo descrito por Escoubas *et al.* (1993) para la especie *Spodoptera exigua*, de hábitos defoliadores. Consistió en una caja Petri de vidrio con cuatro discos de zanahoria tierna de 13 mm de diámetro por 5 mm de grosor, hechos con un sacabocados del no. 5, los cuales se adhirieron a la superficie de la caja con 50 µl de agar bacteriológico al 2.5% y fueron dispuestos cada 90 ° a partir del centro de la caja (figura 3). En el centro de la unidad se colocó una larva L3 con 24 horas de ayuno (López-Olguín, 1998).

Con la finalidad de reducir tanto la variabilidad de los datos como los errores en el cálculo de los índices, al inicio del bioensayo se registró el peso fresco de las larvas y de los discos de zanahoria en cada unidad experimental. Posteriormente estos datos se refirieron a peso seco.

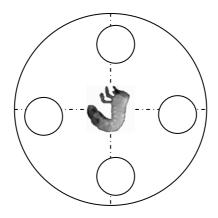


Figura 3. Unidad básica experimental para la evaluación de los extractos sobre la alimentación de las larvas de *Phyllophaga*.

Estos ensayos incluyeron dos tipos de pruebas. En el ensayo de preferencia las larvas tenían la opción de escoger entre un alimento normal (discos de zanahoria sin extracto) y un alimento tratado con extracto (discos de zanahoria con extracto), dentro de una caja Petri. En el ensayo de no preferencia las larvas no podían seleccionar su alimento dentro de cada caja, o ingerían discos de zanahoria tratados o sin tratar (placas con el tratamiento o testigo, respectivamente). En esta evaluación y mediante el cálculo de los índices correspondientes, que más adelante se explican, se incluyó la evaluación de actividad antiapetitiva (antixenosis) y tóxica (antibiosis) de los extractos (Escoubas *et al.*, 1993).

Para la realización de las pruebas se utilizaron tres tipos de discos de zanahoria. Los tratados (DT) contenían 20 µl de extracto vegetal, los discos control (DC) y los discos testigo (DTS) 20 µl de agua. Los discos DC a diferencia de los DTS se encontraba dentro de la misma unidad experimental que los DT, mientras que los DTS se encontraban por aparte solos dentro una unidad experimental. Estos últimos

tipos de discos sirvió para evaluar el consumo normal en las larvas y detener los bioensayos cuando el consumo promedio de las larvas fue ligeramente mayor al 50 % (60 horas). La disposición de los discos dentro de las cajas Petri y las cajas entre si fue totalmente al azar.

Para conocer el peso seco inicial de las larvas y su variación en peso seco después de alimentarse, se realizó un factor de conversión entre peso fresco y seco. Doscientas larvas L3, seleccionadas al azar, se pusieron en ayuno por 24 horas, posteriormente se pesaron y 100 de ellas se colocaron a 60 °C en una estufa por 48 horas. Las otras 100 larvas se alimentaron por 60 horas con discos de zanahoria sin tratar. Al término de este tiempo se pesaron en fresco y después se colocaron en la estufa bajo las mismas condiciones que las primeras para obtener su peso seco (Waldbauer, 1968; Blau *et al.*, 1978; Farrar *et al.*, 1989).

De igual forma, para conocer el consumo por larvas de zanahoria en peso seco por las larvas se obtuvo el factor de conversión en los discos de zanahoria mediante sus pesos fresco y seco (López-Olguín, 1998).

5.3.1.1. Tratamientos establecidos.

Para descartar el peso de las larvas L3 como una covariable, se eliminaron las larvas de más temprana emergencia y mayor peso, así como las más tardías y de bajo peso. Para este proceso, las larvas se mantuvieron en ayuno 24 horas, en forma individual, en vasos de 50 ml de capacidad con un papel filtro húmedo.

Así, el peso promedio de *Phyllophaga ravida* fue de 480 mg y el de *P. obsoleta* de 552 mg. Para los dos bioensayos de actividad antialimentaria se seleccionaron 240 larvas de cada especie, a partir del peso promedio ± 10% de variabilidad. Para asegurar que en cada tratamiento estuvieran representados todos los pesos posibles, las larvas se asignaron a las unidades de ensayo totalmente al azar.

Los tratamientos (cuadro 3) consideraron los extractos obtenidos por los dos métodos de elaboración y sus concentraciones. La cantidad de extracto que se aplicó a cada disco se calculó en relación con el peso promedio de un disco de zanahoria (395.4 mg) (peso del extracto/peso del disco). De esta forma, se determinó que 20 µl de cada extracto era la cantidad que se agregaría para saturar con la solución los discos (DT) y alcanzar las concentraciones de los tratamientos, misma cantidad que se aplicó de agua a los discos control (DC) y testigo (DTS).

Por especie de *Phyllophaga*, en cada bioensayo, se tuvieron los 12 tratamientos más un grupo testigo, Cada uno con 10 repeticiones o unidades experimentales.

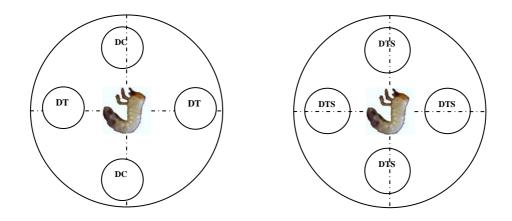
Cuadro 3. Tratamientos establecidos en los bioensayos de actividad antialimentaria.

	Infusiones		Extracción soxhlet		ılet	
Extractos	%		(ppm ^{††})			
Hoja de <i>Piper auritum</i> ,	15	10	5	5000	500	50
Raíz de Barkleyanthus salicifolius, RBS	1	0.5	0.1	5000	500	50
Testigo				agua		

^{††} Partes por millón

5.3.1.2. Ensayos de preferencia.

A dos de los cuatro discos de zanahoria que estaban dentro de cada unidad experimental se les aplicaron 20 µl de extracto (DT) y a los dos restantes 20 µl de agua (DC) (figura 4). Por estar dispuestos los discos de manera alternada, las larvas tuvieron la misma probabilidad de consumir DT o DC. En cada ensayo se incluyó un testigo DTS, donde a los cuatro discos se le agregó agua. Los datos de ingestión por cada larva se determinaron en miligramos (mg) de peso seco de zanahoria.



Unidad de ensayo

Testigo

Figura 4. Distribución alternada de los discos de zanahoria en las unidades experimentales del bioensayo de preferencia (Escoubas *et al.*, 1993). DT = disco tratado, DC = disco control, DTS = disco testigo.

Se consideró que un tratamiento tenía efecto disuasorio cuando en una unidad experimental la larva después de probar un DT dejaba de alimentarse y prefería alimentarse de los DC. Para cada especie de *Phyllophaga* se calcularon los índices de disuasión (ID) (Blaney *et al.*, 1987) mediante la ecuación:

$$ID = [(DC - DT)/(DC + DT)] \times 100$$

Donde: DC = ingestión en discos control y DT= ingestión en discos tratados.

5.3.1.3. Ensayos de no-preferencia

En este bioensayo, además de calcular el potencial de los tratamientos para inhibir la alimentación, evaluó el efecto de los extractos en la mortalidad de las larvas de *Phyllophaga*. Los cuatro discos de zanahoria de la unidad experimental tenían el tratamiento o el testigo (figura 5). Se calcularon los índices antiapetitivos (IA) de acuerdo a Bentley *et al.* (1984), mediante la ecuación:

$$IA = [(DTS - DT)/DTS] \times 100$$

Donde: DTS = ingestión en discos testigo y DT= ingestión en discos tratados.

Para determinar si los tratamientos inhibían la alimentación de las larvas se utilizaron los datos obtenidos en los bioensayos de preferencia. Se calcularon los índices de supresión (IS) mediante la ecuación de Raffa & Frazier (1988):

$$IS = [(Ing DTS - Ing DC + DT)/Ing DTS] \times 100$$

Donde: Ing DC + DT = Ingestión en las placas con discos tratados y no tratados (ensayo de preferencia) e Ing DTS = Ingestión en las placas testigo.

La comparación del consumo en los DTS con la ingesta en las placas del bioensayo de preferencia permitió considerar cuánto dejaron de comer las larvas en los DC por haber ingerido DT (toxicidad potencial) en el ensayo.

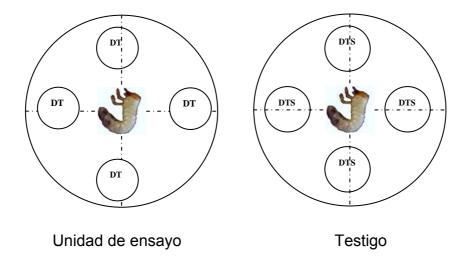


Figura 5. Distribución alternada de los discos de zanahoria en las unidades experimentales del bioensayo de no preferencia (Escoubas *et al.*, 1993). DT = disco tratado, DTS = disco testigo.

5.3.1.4. Ensayos nutricionales.

Para determinar el efecto y modo de acción (tóxico o antiapetitivo) de los extractos sobre *Phyllophaga ravida* y *P. obsoleta,* se calcularon los índices nutricionales de los tratamientos.

Los datos utilizados para calcular los índices provinieron de las placas del ensayo de no preferencia (figura 5). Se relacionó la ingestión de los discos tratados (mg) con el aumento o pérdida de peso de las larvas (mg larva) mediante el cálculo de las tasas de consumo relativo y la tasa de incremento de peso en el periodo de 60 horas que duraron los bioensayos. Para efecto del cálculo de los índices, las 60 horas del ensayo se transformaron a su equivalencia en días, 2.5.

La tasa de consumo relativo (TCR) y la tasa de incremento de peso de la larva (TIP) se determinaron mediante las ecuaciones (Farrar *et al.*, 1989):

$$TCR = (Ing/PiLxT)$$

Donde: Ing = consumo de disco tratado (DT) durante el periodo de ensayo (mg de peso seco), PiL = peso inicial de la larva (mg de peso seco) y T = tiempo de duración del ensayo (días).

$$TIP = (\Delta P/PiLxT)$$

Donde: ΔP = incremento de peso de la larva durante el periodo de ensayo (mg de peso seco), PiL y T, igual que en TCR.

Por la falta de disponibilidad de larvas L3 de *P. ravida* y *P. obsoleta* no se realizó el ensayo de simulación de ingestión paralelo al ensayo de preferencia, en donde se debía mantener en ayuno la misma cantidad de larvas. Por esta razón no fue posible calcular la eficiencia de crecimiento (EC, que se define como la pendiente de la regresión de la TIP sobre la TCR, asumiendo una ordenada al origen común, determinada como la TIP de larvas mantenidas en ayuno) y la eficiencia de conversión de alimento (EC, calculada para el periodo de post-tratamiento y se determina como el cociente de la TIP sobre la TCR) para las dos especies de *Phyllophaga* durante el tiempo que duraron los bioensayos (Waldbauer, 1968).

Para el cálculo de las tasas fue necesario conocer el incremento de peso seco en las larvas antes y después de haber sido sometidas a los tratamientos. Este se determinó a partir de una población de 100 larvas de cada una de las especies de *Phyllophaga*. Se registraron los pesos fresco de cada larva, posteriormente se

congelaron a -70 °C en un ultracongelador REVCO por 4 horas, para después colocarlas en una estufa de secado a 60 °C por 48 horas, al término de este tiempo se obtuvo el peso seco. Con los datos de cada especie se realizó un análisis de regresión que generó un modelo para estimar el peso seco en función del peso fresco de las larvas.

Modelo para estimar el peso de las larvas L3 de P. ravida:

Peso seco = 0.480 + 0.27456 (peso fresco) + 0.00054 (peso fresco)²; $r^2 = 0.89$

Modelo para estimar el peso de las larvas L3 de *P. obsoleta*:

Peso seco = 0.552 + 0.31361 (peso fresco) + 0.00032 (peso fresco)²; $r^2 = 0.91$

5.3.2. Bioensayos de protección a la raíz.

Evaluar la efectividad de los extractos en condiciones aproximadas a las que se observan en el campo (maíz en suelo infestado con "gallina ciega"), permitió considerar si lo extractos eran una alternativa dentro del manejo integral de la plaga. Para estos bioensayos bajo invernadero se utilizaron larvas L2 de las dos especies de *Phyllophaga*.

5.3.2.1. Tratamientos establecidos.

De la población de larvas L2 de cada especie de *Phyllophaga* se seleccionaron intervalos de peso, descartando las que se diferenciaban marcadamente del peso promedio (las de mayor y menor peso). La población de larvas se pesó con 24 h de

ayuno y posteriormente se colocaron de forma individual en vasos de 50 ml de capacidad con un papel filtro húmedo en el fondo.

A partir de esta separación se seleccionaron 70 larvas al azar y se pesaron de siete en siete; el peso promedio de un grupo de larvas L2 de *P. ravida* fue de 820 mg y de *P. obsoleta* de 840 mg.

La unidad experimental consistió en una maceta con 4 kg de tierra solarizada en invernadero (semiesterilizada), con dos plantas de maíz criollo comiteco. Después de la siembra a principios de junio de 2007, las semillas se regaron a capacidad de campo cada tercer día. A un mes de crecimiento de las plantas, las unidades se infestaron con un grupo de siete larvas (Castro-Ramírez, 2004), tomando de base el peso promedio del grupo ±10% de variabilidad. Desde la emergencia de la plántula y durante el desarrollo del experimento, la cantidad de agua de riego se reguló a esparcir homogéneamente 250 ml de agua cada tercer día en la maceta (Torres et al., 2006).

Cuadro 4. Tratamientos para evaluar la protección a la raíz del maíz por 3 concentraciones de los extractos de las hojas de *Piper auritum* (HPA) y la raíz de *Barkleyanthus salicifolius* (RBS) contra la rizofagia de *Phyllophaga ravida* y *P. obsoleta.*

Extractos	Tratamientos			
HPA	15%	10%	5%	
RBS	1%	0.5%	0.1%	
Testigo infestado	Planta + agua	+ P. ravida		
Testigo imestado	Planta + agua + <i>P. obsoleta</i>			

Los tratamientos en el invernadero (cuadro 4) se establecieron bajo un modelo de bloques al azar para distribuir los recursos lumínicos equitativamente . El intervalo del peso de los grupos de larvas de *Phyllophaga ravida* fue de 740–900 mg y de *P. obsoleta* de 760–920 mg. En un periodo de 80 días, a partir de la infestación con las larvas en las unidades experimentales se evaluó la actividad de los extractos de las hojas de *Piper auritum* (HPA) y de la raíz de *Barkleyanthus salicifolius* (RBS) realizados por el método de infusión.

Las 10 repeticiones de cada uno de los seis tratamientos y el testigo infestado se distribuyeron totalmente al azar dentro del invernadero. Se tuvieron 80 unidades experimentales por especie de *Phyllophaga*. Los resultados se registraron a principios del mes de octubre.

5.3.2.2. Infestación de las unidades experimentales.

La infestación se realizó a mediados del mes de julio de 2007. Consistió en facilitar la introducción de las siete larvas al sistema radical de las plantas, mediante la perforación del suelo de la unidad experimental con siete orificios (10 mm de diámetro) alrededor de la planta. Se registró el peso inicial del grupo de larvas introducido. Se escogió el grupo de siete larvas, por ser el número que se ha utilizado para evaluar la rizofagia en matas de maíz (Castro-Ramírez, 2004).

5.3.2.3. Aplicación de extractos.

Entre el proceso de infestación y aplicación de los extractos se dejaron transcurrir tres días, en este tiempo las larvas de *Phyllophaga* se alimentaron libremente de las raíces de las plantas. La aplicación consistió en verter, cada 20 días, a pie de mata (par de plantas), 150 ml de los extractos preparados por el método de infusión sin filtrar, o, según la unidad experimental, verter la misma cantidad de agua. Se realizaron tres aplicaciones desde la mitad de julio hasta principios de octubre en un periodo de observación de 80 días.

5.3.2.4. Evaluación del daño al sistema radical.

La protección de las raíces de las plantas por efecto de los extractos se determinó al comparar los pesos secos de las raíces de los tratamientos con el testigo.

Al levantar las unidades experimentales se registraron los pesos frescos de la parte área de la planta, de las raíces y del grupo de siete larvas. Las estructuras de las plantas se colocaron en bolsas de polipapel para su secado en una estufa a 60 °C,

durante cinco días para las raíces y ocho días para la parte aérea. Las larvas se colocaron individualmente en vasos de 50 ml de capacidad, con tapa, para su secado en la estufa a 60 °C por 48 horas (Torres *et al.*, 2006; Velazquez-Cruz *et al.*, 2005)

5.4. Análisis estadístico.

Para analizar la actividad de los extractos en los bioensayos de actividad antialimentaria y los de protección a la raíz sobre *Phyllophaga ravida* y *P. obsoleta* se realizó un análisis de varianza (ANOVA).

La comparación entre las medias de los índices de actividad antialimentaria y los tratamientos del bioensayo de protección de la raíz se realizó mediante la prueba de Tukey.

Las pruebas estadísticas realizadas se corrieron con los datos reales de cada bioensayo. En miligramos (mg) para los de actividad antialimentaria y en gramos (gr) para los de protección a la raíz. Posteriormente, los datos obtenidos de los bioensayos de actividad antialimentaria e índices nutricionales se transformaron a porcentajes para su interpretación.

Todas las comparaciones estadísticas consideraron un nivel de significancia de α = 0.05. Para los cálculos y comparaciones se utilizó el programa estadístico *Statistical Analysis System* (SAS) 11.2 \otimes .

VI. RESULTADOS

A continuación se presentan primero los resultados obtenidos en los bioensayos de laboratorio y después los de invernadero.

6.1 Actividad antialimentaria, disuasoria y supresiva de los extractos de *B. salicifolius* y *P. auritum* en larvas L3 de *P. ravida*.

Los análisis de varianza (ANOVA) de los datos obtenidos en los bioensayos de preferencia y no preferencia mostraron que el efecto de los extractos a la concentraciones evaluadas sobre la alimentación de las larvas L3 de P. ravida no es insecticida (0% de mortalidad), se limita a una actividad insectistática donde la actividad disuasoria fue ligera ($F_{(11,115)} = 1.86 P < 0.0543$), básicamente por el tratamiento RBS 5000 ppm con 41.9% de actividad disuasoria de la alimentación. La actividad de los extractos como antialimentarios ($F_{(11,116)} = 1.00$, P > 0.4492) y supresivos ($F_{(11,115)} = 1.43$, P > 0.1703) no fue significativa (cuadro 5).

Se observó que cuando P. ravida no tenía la posibilidad de seleccionar su alimento (bioensayo de no-preferencia), esta ingiere más cantidades de los discos de zanahoria tratados con extracto (IA, $F_{(11,116)} = 1.00$, P > 0.4492), que de los discos sin extracto en el testigo externo o DTS, (IS, $F_{(11,115)} = 1.43$, P > 0.1703), donde la larva no está en contacto con los extractos. A su vez este último índice demostró que cuando las larvas pueden escoger entre las dos opciones de alimento (ensayo de preferencia), y prueban primero discos tratados, no las imposibilita que sigan comiendo (cuadro 5).

Cuadro 5. Índices en porcentaje de actividad antialimentaria (IA), disuasión (ID) y de supresión (IS) de extractos de hojas de *Piper auritum* (HPA) y raíz de *Barkleyanthus* salicifolius (RBS) sobre las larvas de *Phyllophaga ravida*.

Tratamiento	IA	ID	IS
HPA 50 ppm	-27.64 A	33.17 A	40.22 A
HPA 500 ppm	-28.19 A	27.39 A	29.68 A
HPA 5000 ppm	-27.92 A	26.92 A	31.44 A
HPA 10%	-24.24 A	38.11 A	41.90 A
HPA 15%	-25.63 A	18.50 A	28.73 A
HPA 5%	-23.86 A	24.08 A	44.36 A
RBS 50 ppm	-34.26 A	31.67 A	44.42 A
RBS 500 ppm	-30.08 A	33.00 A	28.77 A
RBS 5000 ppm	-32.42 A	41.90 A	39.69 A
RBS 0.1%	-31.06 A	24.24 A	41.46 A
RBS 0.5%	-22.93 A	30.86 A	39.85 A
RBS 1%	-31.12 A	23.47 A	35.53 A

Dentro de cada columna, medias con la misma letra no difieren significativamente (Tukey $P \le 0.05$, n = 10).

6.1.1. Efecto de los tratamientos sobre la nutrición de *P. ravida*.

Aunque los extractos no mostraron actividad antialimentaria en las larvas L3 de *P. ravida*, se decidió correr los índices nutricionales (TCR y TIP) para los datos de los bioensayos de no-preferencia, con el fin de analizar si verdaderamente los tratamientos no tuvieron efecto sobre la fisiología de las larvas y que este resultado nulo no era un efecto compensatorio del metabolismo de la larva.

El cálculo de la tasa de consumo relativo (TCR) permitió estimar que el peso inicial de la larva no determinó su capacidad de ingesta ($F_{(12,115)} = 1.24$, P > 0.2617) y que el consumo dentro de los tratamientos es igual que en el testigo. Reafirmando que ninguno de los tratamientos mostró un efecto antialimentario (tóxico), ni disuasorio (Cuadro 6).

Sin embargo, la tasa media de incremento de peso (TIP) mostró que la ganancia de peso en las larvas L3 de P. ravida durante el tiempo que duró el bioensayo es diferencial entre los tratamientos ($F_{(12,112)} = 1.93$, P > 0.0376); en RBS 5000 ppm el peso que ganan las larvas (11.50% de su peso inicial) es significativamente menor con respecto al testigo donde obtienen el mayor peso (Cuadro 6).

Cuadro 6. Índices nutricionales en miligramos (mg) de las larvas L3 de *P. ravida* alimentadas por 60 horas con discos de zanahoria tratados con extractos de hojas de *P. auritum* (HPA) y raíz de *B. salicifolius* (RBS) en diferentes concentraciones.

Tratamiento	TCR	TIP	
Tratamiento	(%)	(%)	
Testigo	16.05 A	33.07 A	
RBS 500 ppm	11.50 A	32.47 AB	
HPA 5%	12.51 A	32.32 AB	
RBS 0.1%	14.98 A	32.15 AB	
HPA 500 ppm	13.78 A	32.06 AB	
RBS 1%	13.26 A	31.97 AB	
HPA 50 ppm	12.98 A	31.82 AB	
HPA 15%	11.68 A	31.74 AB	
HPA 10%	11.65 A	31.71 AB	
RBS 0.5%	12.57 A	31.55 AB	
HPA 5000 ppm	13.21 A	31.48 AB	
RBS 50 ppm	15.92 A	31.25 AB	
RBS 5000 ppm	13.01 A	30.89 B	

TCR = Tasa media de consumo relativo; TIP = Tasa media de incremento de peso. Dentro de cada columna, medias con la misma letra no difieren significativamente (Tukey $P \le 0.05$, n = 10).

6.2 Actividad antialimentaria, disuasoria y supresiva de los extractos de *B. salicifolius* y *P. auritum* en larvas L3 de *P. obsoleta*.

Los valores negativos en los índices de actividad antialimentaria (IA) muestran que, al igual que en *P. ravida,* la presencia de discos tratados con extracto como única opción de alimento (ensayo de no preferencia) promovió la alimentación de las larvas. En los tratamientos de HPA 15% (IA= -53.54%) y RBS 500 ppm (IA= -51.76%) la ingestión es mayor que en los tratamientos HPA 50 ppm (IA=-27.64%) y HPA 5000 ppm (IA=-27.92%), donde las larvas consumieron menos discos tratados (valor más antialimentario).

Aunque el ANOVA es significativo para los valores obtenidos en los índices de disuasión, la comparación de medias no mostró diferencia (cuadro 7), debido a la alta variabilidad en la prueba (error estándar de 1.94). No existe un patrón de respuesta hacia los tratamientos (índice de disuasión), las larvas tienen un comportamiento aleatorio al momento de iniciar la alimentación (ensayo de preferencia).

Los valores de los índices de supresión mostraron que para *P. obsoleta*, el poner en el mismo medio el alimento tratado con extracto y el alimento sin tratar (ensayo de preferencia) afecta su consumo. La ingesta de discos sin tratar es mayor en los testigos externos (DTS) que en los internos de las placas (DC, discos control). Si al inicio de la alimentación las larvas probaron discos tratados, no impidió que estas continuaran alimentándose, no hubo efecto post-ingestivo (cuadro 7).

Cuadro 7. Índices en porcentajes de actividad antialimentaria (IA), disuasión (ID) y de supresión (IS) de extractos de hojas de *Piper auritum* (HPA) y raíz de *Barkleyanthus salicifolius* (RBS) sobre la larvas de *Phyllophaga obsoleta*.

Tratamiento	IA	ID	IS

HPA 50 ppm	-27.64 A	29.68 A	10.70 A
HPA 5000 ppm	-27.92 A	31.56 A	11.33 A
RBS 50 ppm	-30.09 AB	39.83 A	11.69 A
HPA 10%	-30.96 AB	42.26 A	46.91 A
RBS 0.1%	-31.05 AB	44.04 A	57.70 A
RBS 1%	-31.13 AB	40.20 A	45.87 A
HPA 5%	-44.03 AB	22.66 A	43.87 A
HPA 500 ppm	-44.39 AB	20.50 A	5.40 A
RSB 5000 ppm	-46.36 AB	42.90 A	39.21 A
RBS 0.5%	-50.74 AB	30.81 A	39.35 A
RSB 500 ppm	-51.76 B	31.65 A	15.43 A
HPA 15%	-53.54 B	16.79 A	25.44 A

Dentro de cada columna, medias con la misma letra no difieren significativamente (Tukey $P \le 0.05$, n = 10).

6.2.1. Efecto de los tratamientos sobre la nutrición de *P. obsoleta*.

Se corrieron índices nutricionales (TCR y TIP) para las larvas L3 de *P. obsoleta* de los tratamientos ensayados con los datos obtenidos en el bioensayo de no preferencia, con la finalidad de conocer si el que dejaran de alimentarse en los tratamientos no afectó significativamente el metabolismo de las larvas.

El cálculo de la tasa de consumo relativo (TCR) para las larvas L3 de *P. obsoleta* demostró que, cuando se encuentran en situación de no elección (ensayo de no preferencia), su capacidad de ingestión dentro de tratamientos como RBS 5000 ppm, RBS 500 ppm, RBS 50 ppm, HPA 50 ppm, HPA 15% y RBS 0.5% puede ser igual al testigo externo (DTS) (F_(12,111) = 11.32, P < 0.0001), donde la ingesta se da de forma normal. En los tratamientos RBS 500 ppm, HPA 500 ppm, RBS 1%, RBS 0.1%, y HPA 5% las larvas consumieron menos cantidad de discos tratados (cuadro 8).

La tasa media de incremento de peso (TIP) corrida para los tratamientos mostró que la pérdida de peso en las larvas L3 de P. obsoleta fue significativa entre los tratamientos con respecto al testigo externo (DTS) ($F_{(12,111)}$ = 16.74, P < 0.0001); en los tratamientos RBS 0.5% (TIP= -34.22%) y HPA 50 ppm (TIP= -34.52%) las larvas mostraron una mayor dificultad para transformar a biomasa el alimento consumido (menor peso), con respecto al de HPA 5% (TIP= 37.08%) donde las larvas obtiene el mayor peso (cuadro 8).

Cuadro 8. Índices nutricionales (miligramos larva) de las larvas L3 de *P. obsoleta* alimentadas por 60 horas con discos de zanahoria tratados con extractos de hojas de *P. auritum* (HPA) y raíz de *B. salicifolius* (RBS) en diferentes concentraciones.

	TCR	TIP	
Tratamiento	(%)	(%)	
RBS 0.5%	31.74 A	-34.22 A	
HPA 50 ppm	33.01 A	-34.52 A	
RBS 5000 ppm	31.80 A	-34.65 AB	
RBS 50 ppm	32.29 A	-34.74 AB	
HPA 5000 ppm	34.42 A	-35.09 ABC	
HPA 15%	31.48 A	-35.18 ABC	
Testigo	35.41 A	-35.62 BCD	
RBS 1%	20.51 B	-35.90 CD	
RBS 0.1%	20.15 B	-35.94 CD	
RBS 500 ppm	14.26 B	-36.09 CDE	
HPA 500 ppm	19.14 B	-36.26 DE	
HPA 10%	20.70 A	-36.36 DE	
HPA 5%	20.28 B	-37.08 E	

TCR = Tasa $\overline{\text{media}}$ de consumo relativo; TIP = Tasa media de incremento de peso. Dentro de cada columna, medias con la misma letra no difieren significativamente (Tukey P \leq 0.05, n = 10).

6.3. Efecto de los extractos de *B. salicifolius* y *P. auritum* en la protección de la raíz de matas de maíz durante los estadios L2 y L3 de *P. ravida*.

En estos bioensayos se estimó la protección que le confieren los extractos de hojas de *P. auritum* y raíz de *B. salicifolius* a las raíces de maíz cuando las matas de un mes de crecimiento se infestaron con larvas L2 de *P. ravida*. Esta se estimó midiendo la biomasa radical y el crecimiento de la parte aérea de las plantas, así como el incremento de peso y mortalidad en las larvas.

El análisis de varianza determinó que el modelo de bloques al azar utilizado para la distribución de grupos de larvas dentro de los tratamientos en el invernadero fue significativo para el desarrollo de las plantas de maíz (biomasa de raíces $F_{(6,69)}$ = 2.64, P < 0.0129; biomasa aérea $F_{(6,69)}$ = 1.71, P < 0.0010), no así en el incremento de peso en las larvas ($F_{(6,69)}$ = 1.39, P > 0.2168) y su mortalidad ($F_{(6,69)}$ = 1.00, P > 0.4514).

La comparación de medias mostró que el consumo de las raíces por las larvas de P. ravida no afectó el crecimiento de las plantas entre tratamientos (raíz $F_{(6,69)} = 1.15$, P > 0.3440; parte aérea $F_{(6,69)} = 0.21$, P > 0.5649) (cuadro 9).

La aplicación de los extractos para el control de la rizofagia de las larvas de P. ravida se comportaron como insectistáticos, al tener tasas de mortalidad cercanas al 1%. Ninguno de los tratamientos inhibió significativamente la alimentación de las larvas $(F_{(6,69)} = 0.59, P > 0.7385)$ no se diferencian del testigo donde la larva se alimenta normalmente (cuadro 10).

Cuadro 9. Efecto de la rizofagia de las larvas de *Phyllophaga ravida* en el desarrollo fenológico de las plantas de maíz cuando son tratadas con extractos de hojas de *P. auritum* (HPA) y raíz de *B. salicifolius* (RBS).

Tratamiento	Raíz (gr)	Parte aérea (gr)
HPA 10%	95.75 A	282.52 A
RBS 1%	91.89 A	229.13 A
HPA 5%	90.66 A	224.36 A
Testigo infestado	83.75 A	193.68 A
HPA 15%	82.67 A	181.78 A
RBS 0.5%	77.54 A	230.16 A
RBS 0.1%	74.45 A	225.48 A

Dentro de cada columna, medias con la misma letra no difieren significativamente (Tukey $P \le 0.05$, n = 10).

6.4. Efecto de los extractos de *B. salicifolius* y *P. auritum* en la protección de la raíz de matas de maíz durante los estadios L2 y L3 de *P. obsoleta.*

Este bioensayo permitió estimar la protección que le confieren los extractos de *Piper auritum* y *B. salicifolius* a las raíces de las plantas de maíz contra la rizofagia de *P. obsoleta*. Como variables de respuesta se calculó la biomasa del sistema radicular y parte aérea de la planta, se cuantificó el incremento de peso de las larvas y su mortalidad.

Cuadro 10. Respuesta de *P. ravida* a la presencia de extractos de hoja de *Piper auritum* (HPA) y raíz de *Barkleyanthus salicifolius* (RBS) en las raíces de plantas de maíz.

Tratamiento	Incremento de peso	Mortalidad
	en larvas (mg)	(indv/mata)
HPA 10%	948.14 A	1.4000 A
Testigo infestado	944.71 A	0.9000 A
HPA 15%	943.27 A	0.9000 A
HPA 5%	930.22 A	0.8000 A
RBS 1%	899.79 A	0.8000 A
RBS 0.1%	895.01 A	0.7000 A
RBS 0.5%	873.87 A	0.3000 A

Dentro de cada columna, medias con la misma letra no difieren significativamente (Tukey $P \le 0.05$, n = 10).

El análisis de varianza determinó que el modelo de bloques al azar utilizado para la distribución del peso de las larvas dentro de todos los tratamientos fue significativo para algunas variables medidas. El efecto de bloque se observó en el desarrollo de las plantas de maíz (biomasa de las raíces $F_{(6,69)}$ = 2.45, P < 0.0204; biomasa de parte aérea $F_{(6,69=)}$ = 3.81, P < 0.0009) y en la mortalidad ($F_{(6,69)}$ = 2.37, P < 0.0244) de las larvas, no así en el incremento de su peso ($F_{(6,69)}$ = 1.22, P < 0.0043).

Cuadro 11. Efecto de la rizofagia de las larvas de *Phyllophaga obsoleta* en el desarrollo de las plantas de maíz cuando son tratadas con extractos de hojas de *P. auritum* (HPA) y raíz de *B. salicifolius*.

Tratamiento	Raíz	Parte aérea
	(gr)	(gr)
HPA 10%	105.10 A	211.52 A
HPA 5%	100.50 A	225.73 A
HPA 15%	98.40 A	224.36 A
RBS 1%	94.40 A	183.68 A
RBS 0.1%	86.90 A	191.78 A
RBS 0.5%	71.30 A	210.76 A
Test. Infestado	90.40 A	215.98 A

Dentro de cada columna, medias con la misma letra no difieren significativamente (Tukey $P \le 0.05$, n = 10).

La prueba de Tukey mostró que la rizofagia de las larvas de P. obsoleta no provocó diferencias entre tratamientos en el desarrollo de la planta (raíz $F_{(6,69)} = 1.59$, P > 0.1691; parte aérea $F_{(6,69)} = 0.70$, P > 0.6495); la respuesta de las larvas a la presencia de los extractos fue ligera, por lo que su capacidad de rizofagia no se vio seriamente afectada como para mostrar una diferencia estadística en la evaluación de las raíces (cuadro 11).

Cuadro 12. Promedio de las respuestas de *P. obsoleta* a la presencia de extractos de hoja de *Piper auritum* (HPA) y raíz de *Barkleyanthus salicifolius* (RBS) en las raíces de plantas de maíz.

Tratamiento	Incremento de peso en	Mortalidad
	larvas (mg)	(indv)
HPA 15%	642.19 A	1.6000 A
HPA 10%	631.46 A	1.5000 A
Testigo infestado	626.75 A	2.5000 A
RBS 0.1%	626.42 A	1.7000 A
HPA 5%	616.45 A	1.7000 A
RBS 0.5%	586.46 A	1.7000 A
RBS 1%	551.34 A	1.7000 A

Dentro de cada columna, medias con la misma letra no difieren significativamente (prueba de Tukey $P \le 0.05$, n = 10).

La aplicación de los extractos no modificó sustancialmente la capacidad de las larvas para alimentarse ($F_{(6,69)}$ = 1.15, P > 0.3448), ni su mortalidad ($F_{(6,69)}$ = 1.18, P > 0.3323); las tasas de mortalidad que presentaron los tratamientos y el testigo parecen una respuesta ajena a la aplicación de los tratamientos (cuadro 12).

VII. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los bioensayos demuestran un mediano control de los extractos de hojas de *P. auritum* y raíz de *B. salicifolius* en la alimentación de las larvas de *P. ravida* y *P. obsoleta*. Su ingesta o contacto modificaron los patrones normales de alimentación en las larvas, permitiendo tener al final de los bioensayos una mayor cantidad de alimento (discos de zanahoria o raíces) disponible. Su acción puede estar asociada a la presencia de piretros (*B. salicifolius*) y piperámidas (*P. auritum*) presentes en los extractos.

Bajo este precepto a continuación se argumentan primero los resultados obtenidos para los ensayos de actividad antialimentaria para las dos especies de *Phyllophaga* y se continúa con los ensayos de protección a la raíz.

7.1. Actividad de los extractos de hojas de *Piper auritum* y raíz de *Barkleyanthus* salicifolius como antialimentarios de *P. ravida* y *P. obsoleta*.

El análisis de varianza (ANOVA) de los bioensayos de actividad antialimentaria (ensayos de preferencia y no preferencia) muestran que los extractos de HPA y RBS en sus diferentes concentraciones se comportan como insectistáticos en las larvas L3 de *P. ravida* y *P. obsoleta*, ya que el porcentaje de mortalidad se mantiene por debajo del 1%.

Estadísticamente, el ANOVA corrido para los índices de actividad antialimentaria mostraron una ligera actividad disuasoria (ID) de los extractos para las dos especies

de *Phyllophaga*; en *P. obsoleta* además promovieron una actividad antialimentaria (IA). La diferencia estadísticas en los índices de disuasión (ID) de *P. ravida* y *P. obsoleta* no se apreciaron en la comparación de medias entre los tratamientos por la alta variabilidad en cada una de las pruebas, en la primera especie el error estándar fue de 1.94 y en *P. obsoleta* de 1.21. En ambas especies los extractos no actuaron como supresores de la alimentación (IS).

Esta respuesta poco homogénea de *Phyllophaga* a su control mediante extractos puede obedecer a la amplitud ecológica que mantiene cada una de ellas. Se ha documentado que *P. ravida* es una de las especies rizófagas estrictas del complejo "gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae) con una mayor distribución geográfica y ecológica en el país (Castro-Ramírez *et al.*, 2004; Morón, 1996; Morón, 2003). Rizofágicamente puede ser más agresiva frente a la actividad que muestran otras especies del mismo complejo, como *P. obsoleta* quién ocasionalmente puede consumir cantidades pequeñas de materia orgánica (Gómez *et al.*, 2000; Castro-Ramírez *et al.*, 2004.)

Esta amplitud en la alimentación de *P. ravida* explica el porque las larvas de esta especie pueden ingerir discos tratados con extracto como un mecanismo de tolerancia, que le permiten en primer instancia asegurar su subsistencia, mientras que *P. obsoleta*, desde un principio prefiere no comer de los discos con extracto. La capacidad de respuesta de *P. ravida* no puede ser considerada como una réplica desfavorable para su control, ya que la presencia de los extractos la disuade de alimentarse de forma normal en un 41.9%.

En las dos especies de *Phyllophaga* la ingesta de los extractos desencadeno diferentes procesos fisiológicos. Se observó un aumento en las evacuaciones (no medida) de las larvas, que sugiere que el organismo trata de compensar la toxicidad de los extractos al eliminarlos más rápidos de su sistema. El exceso de evacuaciones en un mayor tiempo pudiera haberles causado la muerte; esta hipótesis no fue corroborada durante el tiempo que duraron los bioensayos (60 horas), dicha observación requería de un mayor de tiempo de observación.

Este resultado, si se traslada a un ensayo a campo puede ser complementaria a otras de las estrategias agroecológicas (Velázquez-Cruz *et al.*, 2005) que se han fomentado para el manejo de la plaga. Si la presencia del extracto disminuye el daño, en conjunto con otra práctica, como la aplicación de hongos entomopatógenos, puede permitir mantener a los cultivos protegidos un mayor tiempo. Sin embargo, habrá que evaluar dicha combinación.

El proceso metabólico que sufren las larvas quedó evaluado mediante el cálculo de los índices nutricionales (TIP y TCR), sus valores demuestran que los extractos ocasionan desnutrición en las larvas de *Phyllophaga*. La prueba de comparación de medias en *P. ravida* demostró que el consumo de discos tratados con extractos es igual al consumo que se presenta en el testigo externo (DTS) y que la capacidad de transformar lo consumido a biomasa (TIP) se ve afectado por la ingesta de los extractos (cuadro 6). En el tratamiento RBS 5000, las larvas muestran una mayor dificultad para transformar a biomasa el alimento consumido, el peso que ganan es menor con respecto al testigo que obtiene el mayor peso.

En *P. obsoleta* el cálculo de los índices muestra dos grupos estadísticos para la tasa de consumo relativo (TCR), el grupo A donde las larvas se alimentan igual que el testigo y el grupo B donde el consumo difiere significativamente de éste (cuadro 8). Su relación con la tasa de incremento de peso (TIP) no denota un patrón en la conversión de lo ingerido a biomasa, como la que se observó en *P. ravida*; no obstante que en RBS 0.5% y HPA 50 ppm las larvas gana un menor peso con respecto a HPA 5% donde obtienen el mayor peso.

Cuando las larvas de las dos especies de *Phyllophaga* fueron sometidas a condiciones de elección entre discos tratados con extractos (DT) y discos testigo (DC) en una misma unidad experimental (ensayo de preferencia), prefirieron alimentarse de discos sin tratar. El haber optado durante el inicio de la alimentación por consumir un disco tratado no las condicionó a dejar de alimentarse (López-Olquín, 1998).

Los valores positivos de los índices de supresión en las dos especies de *Phyllophaga* denotan un menor consumo en los discos sin tratar (DC) cuando están junto con discos tratados con extracto (ensayo de preferencia) que cuando se encuentran solos en las unidades experimentales (DTS, testigo externo). Se le atribuye a los extractos la capacidad de crear una confusión química (Waldbauer, 1968; Blau *et al.*, 1978; Farrar *et al.*, 1989) cuando en el mismo medio tiene disponibles las dos opciones de alimento.

La tendencia del efecto que mostraron los tratamientos en el control de la rizofagia de las larvas L3 de *Phyllophaga* está asociado a la presencia de compuestos

secundarios activos en los extractos de raíz de *Barkleyanthus salicifolius* y hojas de *Piper auritum*. Y aunque no se realizó un análisis cromatográfico a detalle de los extractos, con base en el barrido espectrofotométrico (figuras 1 y 2) de los polvos utilizados para su preparación y las referencias bibliográficas existentes, se puede hacer una aproximación de los tipos de compuestos que están alterando la percepción del alimento en *Phyllophaga*.

El barrido espectofotométrico en *B. salicifolius* demostró que los extractos de la raíz tenían un alto contenido de amidas, lactonas y grupos cetónicos. Las amidas podrían estar en forma de piretros y los terpenos en forma de lactonas. Ambos tipos de compuestos han sido evaluados para determinar la toxicidad de la planta. Se ha encontrado que el metabolismo terpénico es uno de los más intensos en la planta, ya que se puede producir en más de una isoforma (mono, di, tri y sesquiterpenos) (Ingolfsdottir y Hylands, 1990; Merritt y Rey, 1992; Bruneton, 2001).

Tanto los piretros como las lactonas no han reportado actividad tóxica para los mamíferos de gran talla (Bruneton, 2001). Su efecto tóxico se ha documentado a partir de mamíferos pequeños (Merritt y Rey, 1992) e insectos de diversos órdenes (López-Pérez y Rodríguez-Hernández, 1999; Rodríguez-Hernández y López-Pérez, 2001). Para ambos casos se han estudiado los efectos que causan los compuestos a nivel celular y como se refleja en su sistema nervioso central (Ingolfsdottir y Hylands, 1990; Craig *et al.*, 1994).

Los compuestos actúan a nivel enzimático, modificando la respiración de las células nerviosas. Cuando los piretros y las lactonas entran al organismo del insecto son

llevadas al sistema nervioso a través de la hemolinfa (torrente sanguíneo), quien los pone disponibles en el líquido intersticial del ganglio supraesofágico (cerebro). Durante la sinapsis intervienen en la recepción del impulso nervioso al sustituir al sustrato receptor del impulso. Además, se alteran los niveles enzimáticos (transaminasas, fosfatasas y γ-glutamil transferasa) del insecto y se afecta la generación de energía que se produce normalmente en el citocromo P450 (Craig *et al.,* 1994; Regnault-Roger *et al.,* 2004).

De esta forma se explica la alteración de las funciones de coordinación, movilidad y percepción del medio ambiente en *Phyllophaga* una vez que ha estado en contacto con los extractos. A esta sintomatología en conjunto se le ha llamado efecto "*knock down*" (Davyson *et al.*, 2001). Y aunque no se documentaron estrictamente las alteraciones fisiológicas que se produjeron durante el efecto "*knock down*" en las larvas, si se observó una mayor excreción en las unidades experimentales cuando consumieron alimento con extractos que en las testigos (DTS).

Esta reacción en las larvas puede ser comparada con el caso clínico que documentaron Craig et al. (1994) para mamíferos grandes. En donde se señalan que la ingesta de altas cantidades de piretros encontrados en una Asteraceae (*Centaurea solstitalis*) ocasiona depresión, pérdida de coordinación de movimientos, debilidad, anorexia y rápida pérdida de peso, y en algunos casos se presentan cuadros de diarrea y fotosensibilización.

En análisis espectrofotométrico de *P. auritum* mostró que los extractos contenían diversos compuestos polifenólicos, amidas y cetonas, además de una gran cantidad

de compuestos solubles, en donde los alcoholes (OH⁻) y los grupos carboxilos (COOH⁻) representaban un mayor porcentaje.

A estos compuestos se suman los que Nigam y Purohit (1962), Gupta *et al.* (1985), Parmar *et al.* (1997) y Delgado *et al.* (2007) han encontrado durante el estudio de la fitoquímica de la planta: amidas (isobutilamina, piperidina y pirrolidona) propenilfenoles, lignanos, neolignanos, terpenos, flavonoides, fenilpropanoides, monoterpenoides y sesquiterpenoides, kavalactonas, butenólidos y epóxidos del ciclohexano.

Estos avances en la fitoquímica de la especie han permitido estimar a las piperamidas (amidas) como uno de sus compuestos más tóxicos, al modificar el sistema PSMO (polisubstrato monoxigenasa) del insecto blanco (Parmar *et al.*, 1997). Al igual que los extractos de *B. salicifolius* promueven un efecto "*knock down*" en las larvas de *Phyllophaga*, se interviene en el intercambio catiónico de las células nerviosas obstruyendo los canales de sodio. Pudiendo ocasionar convulsiones, desorientación, o bien promover una menor alimentación. El mecanismo por el cual se pudo haber generado esta reacción en las larvas L3 de *Phyllophaga* es igual al descrito para los tratamientos con *B. salicifolius*.

7.2. Protección a las plantas de maíz por extractos de hojas de *Piper auritum* y raíz de *Barkleyanthus salicifolius* contra la rizofagia de *P. ravida* y *P. obsoleta* durante su segundo (L2) y tercer estadio (L3).

La aplicación periódica de los extractos a las plantas de maíz después de su infestación con larvas de *P. ravida* y *P. obsoleta* permitió medir indirectamente la respuesta de *Phyllophaga* a la presencia de los extractos a partir del segundo hasta el tercer instar. Y valorar si la aplicación de los tratamientos en un estado temprano de la rizofagia de la larva prevenía mejor los daños. La mortalidad para todos los tratamientos en ambas especies de *Phyllophaga* no sobrepasó el 2%, por lo que los extractos de las dos plantas se consideraron como insectistáticos y no insecticidas.

La ausencia de resultados estadísticamente contundentes puede sugerir que se requieran mayores concentraciones o aplicaciones de los extractos en las plantas infestadas. Para experimentos posteriores se recomendaría que los pesos de las larvas dentro de los tratamientos tuvieran una menor variabilidad; lo cual se podría lograr al tener una mayor población de larvas y menos tratamientos a ensayar.

Se esperaba que la presencia de los extractos en las plantas infestadas pudiera disuadir a las larvas de las dos especies de *Phyllophaga* de alimentarse de sus raíces, permitiendo así obtener un mayor peso en aquellas plantas donde las larvas se alimentaban en presencia del extracto que con respecto a las que se alimentaron libremente.

La prueba de homogeneidad de varianzas (Tukey) mostró que, aunque la protección a las raíces de las matas de maíz por los tratamientos no fue significativa para ninguna de las especies de *Phyllophaga*, el tratamiento de hojas de *P. auritum* al 10% (HPA 10%) confirió una mayor protección a las plantas de maíz, al resultar con un desarrollo radical (biomasa) por arriba del testigo infestado, donde las larvas se

alimentaron libremente. Esto pudiera estar sugiriendo la actividad de los compuestos secundarios de la planta como disuasorios o distractores de la alimentación.

Entre las causas que podrían explicar esta respuesta puede estar la aplicación periódica de los extractos y la sensibilidad que muestran las larvas cuando se encuentran en proceso de muda (paso de L2 a L3). Tal vez, de haber aplicado un mayor número de veces los extractos en un periodo total de observación más largo se hubiera llegado a manifestar algún efecto estadísticamente válido.

VIII. CONCLUSIÓN

La actividad biológica de los extractos de hojas de *Piper auritum* y raíz de *Barkleyanthus salicifolius* se catalogan como insectistáticos, y no insecticidas, por mantener una mortalidad menor al 1% y modificar únicamente los patrones de búsqueda de alimento en las larvas de *Phyllophaga ravida* y *P. obsoleta*.

La sutil eficacia que manifestaron los extractos en el control de la rizofagia de las larvas estuvo asociada a las cualidades de la especie. Ambas especies de *Phyllophaga* mostraron un proceso de tolerancia y adaptación a las condiciones temporales a las cuales fueron sometidas durante los bioensayos.

El efecto que produjeron los extractos de hojas de *P. auritum* y raíz de *B. salicifolius* mediante los ensayos de actividad antialimentaria se determinó como "*knock down*" para las dos especies de *Phyllophaga*, ya que su aplicación disminuyó su capacidad de rizofagia.

Los cálculos de los índices de actividad antialimentaria permitieron identificar que cuando las larvas de *P. ravida* y *P. obsoleta* no tienen otra opción de alimento más que el tratado con extractos, la presencia de estos en su alimento les promueve la alimentación; las larvas se adaptan a estas condiciones, aunque su consumo les provoque una desnutrición.

Cuando las larvas tienen la opción de escoger entre alimento tratado con extracto y alimento sin tratar, la presencia de los extractos las distrae de una alimentación

normal; prueban del alimento tratado y después pueden o no continuar alimentándose de ellos u optar por alimento sin tratar.

En *P. ravida* y *P. obsoleta* los extractos de hojas de *P. auritum* y raíz de *B. salicifolius* actuaron como disuasorios de la alimentación; cuando las larvas de *P. obsoleta* tuvieron como única opción de alimento discos tratado con extractos estas prefirieron dejar de alimentarse.

La evaluación de la actividad de los extractos de hojas de *P. auritum* y raíz de *B. salicifolius* permitió estimar que en *P. ravida* al igual que en *P. obsoleta* actúan como disuasorios, en esta última además como antialimentarios.

La aplicación de los extractos resultó medianamente efectiva en el control de la rizofagia de las larvas de *Phyllophaga* bajo condiciones de invernadero, disminuyendo el daño que causan las larvas, pero no controlaron toda la afectación.

El que los extractos disminuyeran la capacidad de alimentación en las larvas permite considerar su aplicación como complementaría a otras estrategias agroecológicas en el manejo de la plaga. Ya que representa una tecnología de bajo costo y fácil reproducción, que permitirá una mayor permanencia de uso en cultivos, como el maíz.

NOTAS

- I. La fitoquímica de las plantas se divide en dos partes, metabolismo primario y secundario. Compuestos como glúcidos, lípidos, aminoácidos y proteínas son producidos durante el metabolismo primario para el desarrollo y crecimiento de la planta, estos se dejan de producir con la muerte celular. Los productos del metabolismo secundario son compuestos no esenciales que las plantas producen para facilitar su interacción con el ambiente, y pueden permanecer por un tiempo indeterminado después de la muerte celular. En el escrito se utiliza la palabra fitoquímica para referir a los compuestos que se producen durante el metabolismo secundario; alcaloides, fenoles, terpenos, sikimatos, acetatos, esteroides (Bruneton, 2001).
- II. Tipo de suelo, humedad, temperatura, evapotranspiración.
- III. Conocidos popularmente como ronrones, sanjuaneros, toritos, chonchos, temoles, mayates etc.
- IV. En la agregación larval intervienen directamente la oviposición de las hembras hacia dentro de las parcelas, la cuallos insectos fueron citados en orden de acuerdo a la sensibilidad mostrada a los extractos. está estrechamente relacionada a la materia orgánica y características físico químicas del suelo, a la estructura del paisaje (Sweetman, 1927; Szendrei e Isaacs, 2005), cobertura vegetal (Rodríguez del Bosque, 1984) y estímulos visuales (Harris y Rose, 1990; Szendrei e Isaacs, 2005).
- V. Compuestos secundarios que actúan como neurotoxinas contra los insectos.
- VI. los insectos fueron citados en orden de acuerdo a la sensibilidad mostrada a los extractos.

IX. LITERATURA CITADA

- Altieri M. 1989. Agroecology: a new research and development paradigm of world agriculture. Agric. Ecosystem. Env. 27: 37-46.
- Altieri M. A. 1993. Designing and improving pest management systems for subsistence farmers. Pp. 1-20. *In:* Altieri M. A. (Comp.). Crop protection strategies for subsistence farmers. Westview Press, Colorado.
- Aragón G. A. y S. Caselín Castro. 1995. Control de plagas a base de productos vegetales. Pp: 91–105. En: Aragón G., A. (Comp.). Control de plagas con métodos alternativos al químico. Publicación Especial de la Sociedad Mexicana de Entomología, Puebla.
- Aragón G. A.; A. M. Tapia Rojas; J. F. López Olguín y C. Pérez Torres. 2003.
 Especies de gallina ciega en algunos cultivos del estado de Puebla y su control con extractos vegetales. Pp. 283-297. En: Aragón G., A.; M. A. Morón y A. Marín (Comp.). Estudio sobre coleópteros del suelo en América. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla.
- Araya G. J. A. 1993. Evaluación de polvos minerales y vegetales contra plagas de maíz y frijol almacenado, en los estados de Zacatecas y Guerrero. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados, Estado de México. Pp. 81.
- Ascher K. R. S. 1993. Nonconventional insecticidal effects of pesticides available from the neem tree, *Azadirachta indica*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 22: 433-449.
- Bentley M. D., Leonard D. E., Stoddard W. F. y Zalkow L. H. 1984. Pyrrolizidine alkaloids as larval feeding deterrents for spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 77: 393-397.

- Bentz J. A. y Neal J. W. 1995. Effect of a natural insecticide from Nicotiana gossel on the whitefly parasitoid *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae). J. Econ. Entomol. 88(6): 1611-1615.
- Berlin E. A. 1996. Medical Ethnobiology of the Highland Maya of Chiapas, Mexico: the gastrointestinal diseases. Princeton University, New Jersey. Pp. 557.
- Blanco Hernández N., Ramos R. A., Vizoso P A. 2006. Evaluación tóxica y genotóxica del extracto fluido de *Piper auritum* H.B.K. Rev. Cubana Plant. Med.11: 3-4.
- Blaney W. M., Simmons M. S., Ley S. V., Kats B. 1987. An electrophysiological and antifeedant properties of natural and synthetic drimane-related compounds. Physiol. Entomol. 12: 281-291.
- Blau P. A., Feeny P., Contardo L. y Robson D. S. 1978. Allylglucosinolate and herbivorous caterpillars: A contrast in toxicity and tolerance. Science 200: 1296-1298.
- Bozov P. I., Papanov G. Y. e Malakov P. Y. 1994. Neo-clerodane diterpenoids from *Scutellaria alpina*. Phytochemistry 35: 1285-1288.
- Bruneton J. 2001. Farmacognosia, fitoquímica y plantas medicinales. Laboratorio de farmacología, Farmacia de Angers, Francia. Pp. 1120.
- Casida J. E. y Quistad G. B. 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future. Annu. Rev. Entomol. 43: 1-16.
- Castro O. y Poveda L. J. 1983. *Piper auritum* (H.B.K.) familia Piperaceace Estudio preliminar del aceite esencial de sus hojas. Ingeniería y Ciencia Química. 7: 24-25.

- Castro-Ramírez A. E. 2004. Diversidad del complejo "gallina ciega" (Coleoptera) y su impacto al cultivo de maíz en un gradiente ambiental de Los Altos de Chiapas, México. Tesis de Doctoral, Universidad Autónoma de Yucatán, Yucatán. Pp.177
- Castro-Ramírez A. E. y Silva Aparicio M. 2002. Hacia la producción sustentable de maíz de temporal en Los Altos de Chiapas. Pp. 159-170. En: A. Aragón G., J. F. López-Olguín y M. A. Tornero C. (Comp.). Métodos para la generación de tecnología agrícola de punta. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla.
- Castro-Ramírez A. E., C. Ramírez S. y L. Ruiz M. 1998. Evaluación del daño en maíz causado por "gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae) en Amatenango del Valle, Chiapas, México. Pp. 107-120. En: Morón, M. A. y A. Aragón (Comps). Avances en el estudio de la diversidad, importancia y manejo de los coleópteros edafícolas americanos. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla- Sociedad Mexicana de Entomología, A. C., Puebla.
- Castro-Ramírez A. E., Cruz-López J. A., Perales-Rivera H. R., Ramírez- Salinas C. y
 Hernández-López L. 2001. Composta y rizofagia de cuatro especies de

 Phyllophaga bajo invernadero. Pp. 51-58. V Reunión Latinoamericana de
 Sacarabaeoidología. Quito, Ecuador.
- Castro-Ramírez A. E., C. Ramírez-Salinas y C. Pacheco-Flores. 2004. Guía ilustrada sobre "gallina ciega" en la región Altos de Chiapas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla-ECOSUR, México. Pp. 47.
- Castro-Ramírez A. E., González H. H. D., Parra-Tabla V. y Morón M. A. 2005. Fauna de melolóntidos (Coleoptera: Scarabaeoidea) asociados al maíz (*Zea mays* L.) en Los Altos de Chiapas, México. Folia Entomológica Mexicana 44(3): 339-365.

- Castro-Ramírez A. E., H. R. Perales-Rivera y V. Parra-Tabla. 2006. Propuesta metodológica para la evaluación del daño ocasionado por "gallina ciega" (Coleoptera) al maíz (*Zea mays* L.). En: Castro-Ramírez A. E., M. A. Morón y A. Aragón (Comp.) Diversidad, Importancia y Manejo de Escarabajos Edafícolas. Publicación especial de El Colegio de la Frontera Sur, la Fundación PRODUCE Chiapas, A. C. y la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. Pp. 163-180.
- Celis A., Mendoza C., Pachón M., Cardona J., Delgado W. y Cuca L. E. 2008.

 Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia

 Piperaceae: Una Revisión. Agronomía Colombiana. 26 (1): 97-106.
- Cheeke P. R. 1989. Pyrrolizidine alkaloid toxicity and metabolism in laboratory animals and livestock. Toxicants of Plants Origin. 1(2): 1-22.
- Clavijo S y Pérez Granier G. 2000. Protección y sanidad vegetal: Insectos plagas del maíz. Pp. 345-358. En: Fontana Nieves H. y C. González Narváez. El maíz en Venezuela. Fundación Polar, Venezuela.
- Cortez R. M. O. y Celaya G. J. L. 1992. Utilización de polvos vegetales como alternativa para control del gorgojo del picudo del maíz *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Pp. 449-500. En Congreso Nacional de Entomología, San Luis Potosí.
- Craig A. M., Blythe L. L., Roy D. N. y Spencer P. S. 1994. Detection and isolation of neurotoxins from yellow star thistle (*Centaurea solstitialis*), the cause of nigropallidal encephalomalacia. Pp. 257-262. En: Colegate S. M. & Dorling, P. R., (Comp.) Agricultural, phytochemical and ecological aspects. CAB International, Wallingford.

- Cruz J., Castro A., Ramírez C. 1998. Campaña escolar contra el "ronrón" (Coleoptera: Melolonthidae) en Amatenango del Valle, Chiapas. Pp. 308-313. En: Memorias del XXXIII Congreso Nacional de Entomología, Sociedad Mexicana de Entomología, A.C. Guerrero, México.
- Cuevas S. M., Romero N. C., García M J. C. 1990. Utilización de chicalote *Argemone mexicana* (Papaveraceae) como alternativa para el control del gorgojo pinto del frijol *Zabrotes subfasciatus* (Bohn.) (Coleoptera: Curculionidae). Pp 3-10. En: Simposio Nacional sobre Sustancias Vegetales y Minerales en el Combate de Plagas, Oaxaca.
- Davyson L. M., Souza P. O., Kaplan M. A., Pereira N. A., Cardoso G. L. y GumarãesE. F. 2001. Effect of leaf essential oil from *Piper solmsianum* C.DC. in mice behavior. Acad. Bras. Ci. 73: 33-37.
- Delgado W., Pachón M. E., Celis A., Mendoza C., Cardona J. O., Bustamante M., Daza M. y Cuca L. E. 2007. Informe técnico de avance proyecto "Bioprospección participativa de comunidades vegetales asociadas a la familia Piperaceae en la región del Sumapaz medio bajo occidental" (Código 1101-05-17783). Colciencias-Universidad Nacional de Colombia-Universidad de Cundinamarca. Pp. 55.
- Deloya L. C. 1993. El género *Phyllophaga* Harris en Cuernavaca, Morelos, México (Coleoptera: Melolonthidae). Pp. 123-131. En: Morón, M. A. (Comp.) Diversidad y manejo de plagas subterráneas. Sociedad Mexicana de Entomología e Instituto de Ecología, Veracruz.
- Dethier V. G., Evans D. R. y Rhoades M. V. 1956. Some factors controlling the ingestion of carbohydrates by the blowfly. Biol. Bull., 111: 204-222.

- Dhadialla T. S., Carlson G. R. y Lee D. P. 1998. New insecticides with ecdysterioidal and juvenile hormone activity. Ann. Rev. Entomol. 43: 545-570.
- Domínguez M. V. M. y Correa L. A. J. 2005. Uso de plantas silvestres para el control del "gorgojo del maíz" *Sitophilus zeamais* Mots. y el "gorgojo pinto del frijol" *Zabrotes subfasciatus* Bohemam. Pp. 91-97. En: Simposio Internacional y IV Nacional sobre Sustancias Vegetales y Minerales en el Combate de Plagas, Guerrero.
- Endersby N. M y Morgan W. C. 1991. Alternatives to synthetic chemical insecticides for use in crucifer crops. Biological Agriculture and Horticulture 8: 33-52.
- Ermel K., Pahlich E. y Schumutter H. 1986. Azadirachhtin content of neem kernels from different geographical locations, and its dependence on temperature, relative humidity, and light. Neem conf., Nairobi, Kenya. Pp. 171-184.
- Escoubas P., Lajide L. y Mitzutani J. 1993. An improved leaf-disk antifeedant bioassay and its application for the screening of Hokkaido plants. Entomol. Exp. Appl. 66: 99-107.
- Espinosa-García F. J. y Delgado G. 1998. Relationship between ecology of plant defense and the prospection of secondary metabolites with potential medicinal or agricultural application. Revista Latinoamericana de Química. 26: 13-29.
- Farrar R. R., Barbour J. D. y Kennedy G. G. 1989. Quantifying food consumption and growth in insects. Ann. Entomol. Soc. Am. 82: 593-598.
- Flores A. G., De la Rosa W., Rojas J. C., Castro-Ramírez A. E. 2002. Evaluation of Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae (Mitosporic) against species of the "white grub complex" in the South of Mexico. Southwestern Entomologist. 27(1): 73-83.

- García-López O., Castro-Ramírez A. E., Flores-Ricárdez A. G., Ramírez-Salinas C. 2006. Evaluación del daño a las raíces de leguminosas y solanáceas por "gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae). Pp. 135-146. En: Castro Ramírez A. E., Morón Ríos M. A., Aragón García A. (Comp.). Diversidad, importancia y manejo de escarabajos edafícolas. ECOSUR-Fundación PRODUCE Chiapas-BUAP, Puebla, México.
- Gliessman S. R. 2005. Agroecología y el proceso de transición hace a los agroecosistemas sostenibles. Pp. 1-6. En: Libro de artículos científicos breves, VIII Simposio Internacional y III Congreso Nacional de Agricultura Sostenible, Tamaulipas.
- Gómez B., Villalobos F. J., Ruiz M. L., Castro-Ramírez A. E. y Valle M. J. 1999. El complejo "gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae) en maíz en Los Altos de Chiapas, México: Su relación con el tiempo de uso agrícola y materia orgánica del suelo. Folia Entomol. Mex. 107: 1-20.
- Gómez B., Castro A., Junghans C., Ruiz M. L. y Villalobos J. 2000. Ethnoecology of the white grubs (Coleoptera: Melolonthidae) among the Tzeltal Maya of Chiapas. Journal of Ethnobiology. 20: 56-65
- Gupta M. P., Arias T. D., Williams N. H., Bos R. y Tattje D. H. E. 1985. Safrole, the main component of the essential oil from *Piper auritum* of Panama. J. Natural Products. 48: 330–343.
- Hansson B. S., Larsson M. C. y Leal W. S. 1999. Green leaf volatile-detecting olfactory receptor neurons display very high sensitivity and specificity in a scarab beetle. Physiol. Entomol. 24: 121-126.

- Harris M. O. y Rose S. 1990. Chemical, color, and tactile cues influencing oviposition behavior of the Hessian Fly (Diptera: Cecidomyiidae). Environ. Entomol. 19: 303-308.
- Hunt L. M., Tinoco R., Schwartz N., y Halperin D. 1999. Balancing Risks and Resources: Applying Pesticides without Using Protective Equipment in Southern Mexico. Pp. 235-254. En: R.A. Hahn and K. W. Harris (Comp.) Anthropology in Public Health: Bridging Differences in Culture and Society. Oxford University Press.
- Ijani A. S. M., Mabagala R. B. y Nchimbi-Msolla S. 2000. Efficacy of different control methods applied separately and in combination in managing root-knot nematodes (*Meloidogyne* sp) in common beans. Eur. J. Plant. Pathol. 106: 1-10.
- Ingolfsdottir K y Hylands P. J. 1990. Pyrrolizidine alkaloids in *Senecio vulgaris* L. growing in Iceland. Acta Pharm. Nord. 2: 343-348.
- Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática (INEGI). 2005. Anuario estadístico de Chiapas Tomo II. Gobierno del Estado de Chiapas, Chiapas. 1120 p.
- Jacobson M. 1989. Botanical pesticides: past, present and future. Pp. 1-10. En: Arnason, J. T., B. J. R. Philogene y P. Moran (Comp.). Insecticides of plant origin. A.C.S.. American Chemical Society, Washington D.C.
- Lagunes T. A. y Rodríguez Hernández C. 1989. Búsqueda de tecnología apropiada para el combate de plagas del maíz almacenado en condiciones rústicas.

 Chapingo-CONACYT-Colegio de Postgraduados, Estado de México. 150 p.
- Lagunes T. A. y Rodríguez Hernández C. 1990. Combate químico de plagas agrícolas en México. Colegio de Postgraduados, Estado de México. 63 p.

- Lagunes T. A. y Rodríguez Hernández C. 1992. Plantas con propiedades insecticidas. Agroproductividad. 1: 17-25.
- León-Chanona C., Vázquez S. M. A., Carpio P. C. U., Valdvieso O. G., Díaz G. C., Argüello C. J. L., Paniagua A. y Trejo G. F. 1997. Plan de desarrollo urbano en el centro de población de San Cristóbal de Las Casas. Gobierno del Estado, Chiapas. 130 p.
- Leos M. J. y Salazar R. P. 1990. Importación y diseminación del árbol insecticida neem (*Azadirachta indica* A. Juss) en México. Pp. 106-127. En: Memorias del II Simposio Nacional sobre Sustancias Vegetales y Minerales en el Combate de Plagas. Sociedad Mexicana de Entomología, Oaxaca, México.
- López-Losano M. 2003. El cultivo de maíz en México y la contribución del fitomejorador para favorecer la autosuficiencia. Revista Mexicana de Agronegocios-Sociedad Mexicana (Readministración Agropecuaria A. C. Universidad Autónoma de la Laguna-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro). 12(1): 596-607.
- López-Olguín J. F. 1998. Actividad y modo de acción de productos de *Trichilia havanensis* Jacq. y *Scutellaria alpina* subsp. javalambrensis (Pau), sobre *Leptinotarsa decemlineata* (Say) y *Spodoptera exigua* (Hübner). Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Madrid. 137 p.
- López-Pérez E. y Rodríguez-Hernández C. 1999. Uso de la chilca *Senecio salignus* (Asteraceae) contra el gorgojo mexicano del frijol, *Zabrotes subfasciatus*. Agrociencia. 32: 285-292.
- Luna L. C., Pérez S. S., Domínguez M. V. M., Catalán H. C. 1995. Dosificación de polvos vegetales contra el "gorgojo pinto del frijol" *Zabrotes subfasciatus*

- (Coleoptera: Bruchidae) en Iguala, Guerrero. Pp. 212-216. En: Congreso Nacional de Entomología, Sociedad Mexicana de Entomología, A.C. Estado de México, México.
- Martínez M. 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas.

 1 edición. Editorial Fondo de Cultura Económica. México. 1247 p.
- Méndez-Aguilar M. J., Castro-Ramírez A. E., Ramírez-Salinas C. y López-Anaya M.
 A. 2003. Preferencias de hábitat de las especies de "gallina ciega" (Melolonthidae) en parcelas agrícolas de Oxchuc, Chiapas. Pp. 149-165. En: A.
 Aragón G., Morón M. A. y Marín J. A. (comp.). Estudios sobre coleópteros del suelo en América. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- Méndez-Aguilar M. de J., Castro-Ramírez A. E., Alvarado Barrentes R., Pacheco-Flores C. y Ramírez-Salinas C. 2005. Eficacia de dos tipos de recolecta para registrar la diversidad de melolóntidos nocturnos (Coleoptera: Scarabaeoidea). Acta Zoológica Mexicana 21(3): 109-124.
- Méndez-Aguilar M. J., Castro-Ramírez A. E., Rojas J. C., Huerta-Lwanga E. 2008.

 Respuesta olfativa de larvas de *Phyllophaga ravida* y *P. tumulosa*(Melolonthidae) a volátiles de raíces de cuatro plantas hospederas. Acta

 Zoológica Mexicana. 24(1): 115-128.
- Merritt A. T. y Rey S. V. 1992. Clerodane diterpenoids. Nat. Prod. Rep. 9: 243-287.
- Metcalf R. L. 1987. Plant volatiles as insect attractants. CRC Crit. Rev. Plant Sci. 5: 251-301.
- Miranda F. 1952. La Vegetación de Chiapas. Editorial Gobierno del estado, Chiapas. 319 p.
- Miyakado M., Nakayama I. y Ohno N. 1989. Insecticidal unsaturated isobutyhamides.

 ASC Symp Ser. 387: 173-187.

- Mordue L. A. y Blackwell J. 1993. Azadirachtin: an update. Journal of Insect Physiology. 39(11): 903-924.
- Morón M. A. 1984. Escarabajos; 200 millones de evolución. 1 edición. Editorial Instituto de Ecología A. C., México. 130 p.
- Morón M. A. 1986. El género *Phyllophaga* en México. Morfología, distribución y sistemática supraespecífica. (Insecta: Coleoptera). Publicación No 20. Instituto de Ecología, México. 344 p.
- Morón M. A. 1988. Las especies de *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae) con mayor importancia agrícola en México. Pp. 81-102. En: III Mesa Redonda sobre Plagas del Suelo. Sociedad Mexicana de Entomología, A.C. México.
- Morón M. A. 1999. El control de los coleópteros Melolonthidae rizófagos en los cultivos de gramíneas en México. Pp. 99-102. En: Memoria de la IV Reunión Latinoamericana de Scarabaeoidologia. Viçosa, MG, Brasil.
- Morón M. A. 2003. Diversidad, distribución e importancia de las especies de *Phyllophaga* Harris en México (Coleoptera: Melolonthidae). Pp: 1-27. En: A. Aragón G., M. A. Morón y A. Marín J. (Comp.). Estudios sobre coleópteros del suelo en América. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla.
- Morón M. A., Ratclife C. B. y Deloya C. 1997. Atlas de los escarabajos de México. *Coleoptera Lamellicornia*, Vol. I. Familia Melolonthidae. Sociedad Mexicana de Entomología-CONABIO. México. 274 p.
- Murcia A. M. y Bermúdez H. 2008. Evaluación de la actividad insecticida de extractos vegetales de la familia Piperaceae, sobre *Spodoptera frugiperda* Smith, en condiciones semicontroladas. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cundinamarca, Fusagasuga, Colombia. 105 p.

- Nadal A. 2001. Lineamientos de una estrategia alternativa de desarrollo para el sector agrícola. Política económica para el desarrollo sostenido con equidad, tomo II. Juan Pablos-IIE-UNAM, México. Pp. 1-9.
- Nájera-Rincón M. B. 1993. Coleópteros rizófagos asociados al maíz de temporal en el centro del estado de Jalisco, México: identificación, ecología y control. Pp. 143-154. En: M. A. Morón (Comp.). Diversidad y manejo de plagas subterráneas. Sociedad Mexicana de Entomología e Instituto de Ecología, Veracruz, México.
- Nicholls C. y Altieri M. 2002. Biodiversidad y diseño agroecológico: un estudio de caso de manejo de plagas en viñedos. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. 65: 50-64.
- Nigam S. S. y Purohit R. M. 1962. Chemical examination of the essential oil of the leaves of *Piper betle*. Riechstoffe Aromen. 12: 185-190.
- Ortega A., L. D. y Rodríguez H. C. 1998. Plantas insecticidas y Minerales como alternativas de combate de plagas del maíz en ambientes tropicales. Pp. 79-88. Memorias del I simposio internacional y IV nacional sobre sustancias vegetales y minerales en el combate de plagas. Colegio de Postgraduados-Benemérita Universidad de Puebla, Puebla.
- Pacheco-Flores C., Castro-Ramírez A. E., Gutiérrez-Gómez M. J. 2002. Consumo de frijol bótil (*Phaseolus coccineus* L.) por adultos de *Phyllophaga tumulosa* (Bates, 1988) en Chiapas, México. Pp. 374-377. En: Memorias del XXXVII Congreso Nacional de Entomología, Acapulco.
- Parmar V. S., Jain S. C., Bisht K. S., Jain R., Taneja P., Jha J. H., Tyagi O. D., Prasad A. K., Wengel J., Olsen C. E. y Boll P. M. 1997. Phytochemestry of the genus *Piper*. Phytochemestry. 46(4): 591-673.

- Perales H. R. Maíz, riqueza de México. Ciencias. 92-93:46-55.
- Polanco Mendoza J. C. 2008. Patogenicidad de aislamientos nativos de hongos entomopatógenos sobre el complejo "gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae) de los Altos de Chiapas, México. Tesis de licenciatura, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 78 p.
- Raffa K. F. y Frazier J. L. 1988. A generalized model for quantifying behavioral desensitization to antifeedants. Entomol. Exp. Appl. 46: 93-100.
- Ramírez-Salinas C. y Castro-Ramírez A. E. 1997. El complejo "gallina ciega" (*Phyllophaga* y *Anomala*) en el cultivo de maíz en El Madronal, municipio de Amatenango del Valle, Chiapas, México. Pp. 6-7. En: Deloya, C. (Comp.). Memorias de la III Reunión Latinoamericana de Escarabaeidología. Instituto de Ecología, A. C., México.
- Ramírez-Salinas C. y Castro-Ramírez A. E. 1998. Estudio morfológico del estado larval de seis especies de *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae) de la región de Los Altos, Chiapas. México. Pp. 37-50. En: Morón M. A. y A. Aragón (Comp.). Avances en el estudio de la diversidad, importancia y manejo de los coleópteros edafícolas Americanos. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y Sociedad Mexicana de Entomología, A. C., México.
- Ramírez-Salinas C. y Castro-Ramírez A. E. 2000. El complejo "gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae) en el cultivo de maíz, en el Madronal, municipio de Amatenango del Valle de Chiapas, México. Acta Zoológica Mexicana 79: 17-41.
- Ramírez-Salinas C., Arredondo H. I. y Castro-Ramírez A. E. 1999. Biología y Comportamiento de *Phyllophaga* (*Phytalus*) *obsoleta*, en la región Altos de Chiapas, México. Pp. 177-182. En: Memorias del XXXIV Congreso Nacional de

- Entomología-Sociedad Mexicana de Entomología, A. C., Aguascalientes, México.
- Ramírez-Salinas C., Morón M. A. y Castro-Ramírez A. E. 2000. Descripción de los estados inmaduros de seis especies de *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae) de la región de los Altos de Chiapas, México. Folia Entomol. Mex. 109: 73-106.
- Ramírez-Salinas C., Castro-Ramírez A. E. 2008. Descripción morfológica de larvas de cuatro especies de Melolonthidae (Coleoptera) presentes en los suelos de Los Altos de Chiapas. Pp. 1062-1067. En: Estrada Venegas E.G., Equihua Martínez A., Padilla Ramírez J.R., Mendoza Estrada A. (Comp.). Entomología Mexicana Vol. 7. Sociedad Mexicana de Entomología A. C., México.
- Ramos L. S., Da Silva M. L., Luz A. I. R., Zoghbi M. G. B. y Maia J. G. S. 1986. Essential oil of *Piper marginatum*. J. Natural Products. 49: 712-713.
- Regnault-Roger C., Philogéne B. y Vicent C. 2004. Biopesticidas de origen vegetal. 1 edición. Editorial Mundi prensa. España. 322 p.
- Reynolds L. B., Potter W. y Ball-Coelho B. R. B. 2000. Crop rotation with *Tagetes* sp in an alternative to chemical fumigation for control of root-lesion nematodes. Agron. J. 92: 957-966.
- Rodríguez del Bosque L. A. 1984. Oviposición de *Phyllophaga crinita* Burmeister sobre diferentes cultivos en el norte de Tamaulipas, México. Southwest. Entomol. 9: 184-186.
- Rodríguez del Bosque L. A. 1988. *Phyllophaga crinita* Burmeister (Coleoptera: Melolonthidae): historia de una plaga del suelo (1855-1988). Pp. 53-79. En: Morón, M. A. (Comp.). Memorias de la III Mesa Redonda Sobre Plagas del Suelo. Sociedad Mexicana de Entomología, Michoacán, México.

- Rodríguez del Bosque L. A. 1993. Abundancia estacional y ecología de coleópteros rizófagos: un estudio durante 15 años en agroecosistemas del norte de Tamaulipas. Pp. 7-15. En: M. A. Morón (Comp.). Diversidad y manejo de plagas subterráneas. Sociedad Mexicana de Entomología e Instituto de Ecología, Veracruz, México.
- Rodríguez del Bosque L. A. 1996. Pupation and adult longevity of *Phyllophaga crinita*, *Anomala flavipennis* and *A. froaminosa* (Coleoptera: Scarabaeidae). Southwest. Entomol. 21: 55-58.
- Rodríguez-Hernández C. 1990. Actividad insecticida de *Hippocratea excelsa* (Hippocrateaceae) en siete especies de insectos de importancia económica. Pp. 37-47. En Simposio Nacional sobre substancias vegetales y minerales en el combate de plagas, Oaxaca, México.
- Rodríguez-Hernández C. 2000. Plantas contra plagas; potencial practico de ajo, anona, nim, chile y tabaco. RAPAM, RAAA y fundación HO'Oli. Editorial Futura. Texcoco, Estado de México. 133 p.
- Rodríguez-Hernández C. 2004. Plantas Atrayentes de plagas. Ciencias Ambientales y Agricultura. Benemérita Universidad de Puebla. Pp. 203-234.
- Rodríguez-Hernández C. y Lagunes T. A. 1992. Plantas con propiedades insecticidas; resultados de pruebas experimentales en laboratorio, campo y granos almacenados. Agroproductividad.1: 17-25.
- Rodríguez-Hernández C. y Ortega A. L. D. 1998. Plantas insecticidas y minerales como alternativas de combate de plagas del maíz en ambientes tropicales. Pp. 79-88. En: Memorias del I Simposio Internacional y IV Nacional sobre sustancias vegetales y minerales en el combate de plagas. Colegio de

- Postgraduados-Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Estado de México, México.
- Rodríguez-Hernández C. y Vendramim J. D. 1998. Uso de índices nutricionales para medir el efecto insectistático de extractos de Meliáceas sobre *Spodoptera frugiperda*. Manejo integrado de plagas. 48: 11-18.
- Rodríguez-Hernández C. y López-Pérez. E. 2001. Actividad insecticida e insectistática de la Chilca (*Senecio salignus*) sobre *Zabrotes subfasciatus*. Manejo integrado de plagas. 59: 28-25.
- Rodríguez-Hernández C., Lagunes T. A., R. Domínguez R. y L. Bermúdez V. 1982. Búsqueda de plantas nativas del estado de México con propiedades tóxicas contra el gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, y mosquito casero, *Culex quinquefasciatus*. Revista Chapingo. 7(37): 35-39.
- Rodríguez L. D. A, Sánchez S. S., Arenas L. V. 1992. Evaluación de las actividades tóxicas de plantas silvestres del estado de Tabasco, sobre *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) "gorgojo mexicano del frijol" (Coleoptera: Bruchidae) y de *Sitophilus zeamais* L. "gorgojo del maíz" (Coleoptera: curculionidae), en frijol y maíz almacenado bajo condiciones de laboratorio. Pp. 207-209. En Congreso Nacional de Entomología, San Luís Potosí, México.
- Roeder E. 1995. Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids. Pharmazaie. 50: 83-98.
- Rzedowski G. C. y Rzedowski J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Michoacán, México. 133 p.
- Schumutter H. 1990. Properties and potencial of natural pesticidas from the neem tree, *Azadirachta indica*. Annu. Rev. Entomol. 35: 271-297.

- Scott I. M., Jensen H., Nicol R., Lesage L., Bradbury R., Sánchez- Vindas P., Poveda L., Arnason J. T. y Philogene B. J. R. 2004. Efficacy of Piper (Piperaceae) extracts for control of common home and garden insect pests. J. Econ. Entomol. 97(4): 1390-1403.
- Shorey H. H., Burrage R. H. y Gyrisco G. G. 1960. The relationship between several environmental factors and the density of European chafer larvae in permanent pasture sod. Ecology. 41: 253-258.
- Sikora E., Rivas M., Hagan A., Gazaway W. y Kemble J. 2007. Soil solarization for control of soilborne diseases. insects and weeds. Extension system Alabama A & M and Auburn Universities. ANR-1213: 12-17.
- Silva R. V., Navickiene H. M. D., Kato M. J., Bolzani V. S., Méda C. I., Young M. C.
 M. y Furlán M. 2002. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. Phytochem. 59: 521-527.
- Soberón M. L., López G. I., Tabashnik I., Bravo B. E. 2007. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. Science. 1: 56-72.
- Sweetman H. L. 1927. A preliminary report on the factors controlling the oviposition of May beetles in Minnesota (*Phyllophaga*, Scarabaeidae: Coleoptera). J. Econ. Entomol. 20: 783-794.
- Szendrei Z. y Isaacs R. 2005. Do plant cues influence the oviposition behavior of Japanese Beetles. Entomologia Experimentalis Applicata. 117: 165-174.
- Torres-Alvarez M. M, Rodríguez-Hernández C. y Espinosa-Mendoza L. M. 2006. Efecto de extractos acuosos vegetales en larvas de tercer instar de *Phyllophaga vetula* Horn, 1887 (Coleoptera: Melolonthidae). Pp. 36-39. En: Memoria del X Congreso de Manejo Integrado de Plagas y Agroecología, Chiapas, México.

- Trujillo-Vásquez R. y García-Barrios L. 2000. Conocimiento indígena del efecto de plantas medicinales locales sobre plagas agrícolas en Los Altos de Chiapas, México. Agrociencias. 35: 685-692.
- Van Lenteren J. C. 1993. Parasites and predators play a paramount role in pest manegament. Pp. 68- 81. En: Lumsden R. D and Vaughn J. L. (Comp.). Pest management: biologically based technologies. American Chemical Society, Washington, DC.
- Vázquez-López F. G. 2008. Biología y comportamiento de siete especies de "gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico de Comitán, Chiapas, México. 61 p.
- Velázquez-Cruz E. J., Ramírez-Salinas C. y Torres-Álvarez M. M. 2005. Control de larvas de *Phyllophaga ravida* (Blanchard, 1850) (Coleoptera: Melolonthidae) mediante extractos vegetales. Entomología Mexicana 5(2): 758-761.
- Velázquez-Cruz E. J., Castro-Ramírez A. E., Ramírez-Salinas C. 2006. Manejo agroecológico de "gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae). Pp. 209-220. En: Castro Ramírez A. E., Morón Ríos M. A., Aragón García A. (Comp.). 2006. Diversidad, importancia y manejo de escarabajos edafícolas. ECOSUR-Fundación PRODUCE Chiapas-BUAP, Puebla, México.
- Velázquez-López O. E., Castro Ramírez A. E. y Flores-Ricardez A. 2006.

 Aislamiento y evaluación de cepas nativas de *Beauveria bassiana* (Balsamo)

 Vuillemin en "gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae) en Chiapas.

 Entomología Mexicana. 5(1): 619-624.
- Waldbauer G. P. 1968. The consumption and utilization of food by insects. Adv. Insect Physiol. 5: 229-288.

Weinzerl R. 1998. Botanical insecticides, soaps and oils. En: Recheigl J. E., N. A Recheigl. Pp. 101-121. (Comp.). Biological, biotechnological control of insect pest. Lewis Publication. Boca Ratón, Florida.