



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO INSECTICIDA-INSECTISTÁTICO
EN *Sitophilus zeamais* (MOTS.) Y *Drosophila
melanogaster* (MEIGEN) APLICANDO POLVO Y ACEITES
ESENCIALES EXTRAÍDOS DE PLANTAS MICROPROPAGADAS
DE *Hedeoma drummondii* BENTH.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A:

YURITZI ARACELY VARGAS AGUIRRE

DIRECTORA: DRA. ANA LAURA LÓPEZ ESCAMILLA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
 Licenciatura en Biología

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
 DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR, UAEH

PRESENTE

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado al pasante de Licenciatura en Biología **Yuritzi Aracely Vargas Aguirre**, quien presenta el trabajo recepcional de tesis intitulado **"Evaluación del efecto insecticida-insectistático en *Sitophilus zeamais* (Mots.) y *Drosophila melanogaster* (Meigen) aplicando polvo y aceites esenciales extraídos de plantas micropropagadas de *Hedeoma drummondii* Benth."**, después de revisarlo en reunión de sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE:	Quím. Blanca Estela Pérez Escandón	
PRIMER VOCAL:	Dra. Leticia Romero Bautista	
SEGUNDO VOCAL:	M. en C. Manuel González Ledesma	
TERCER VOCAL:	Dra. Ana Laura López Escamilla	
SECRETARIO:	Dr. Miguel Ángel Villavicencio Nieto	
PRIMER SUPLENTE:	Dr. Ignacio Esteban Castellanos Sturemark	
SEGUNDO SUPLENTE:	Dra. Maritza López Herrera	

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi más atenta consideración.

ATENTAMENTE
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"
 Mineral de la Reforma, Hidalgo a 26 de noviembre de 2014

M. en C. Miguel Angel Cabral Perdomo
 Coordinador Adjunto de la Licenciatura en Biología



c.c.p. Archivo



Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería,
 Carretera Pachuca - Tulancingo Km. 4.5, Ciudad del Conocimiento,
 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
 Tel. +52 771 7172000 exts 2532, Fax 2109
cabralma@uach.edu.mx mcabralperdomo@gmail.com



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a toda mi familia, especialmente a mis abuelitos: Mamá Tita por ser tan amorosa, yo sé que te hubiera encantado ver este trabajo terminado; Papá Peban por despertar mi curiosidad desde pequeña y por su espíritu creativo, por su amor y sus enseñanzas; abuelitos Natividad y Fermín por cuidarme dondequiera que estén.

A mi Tía Tichi, por quererme tanto y cuidar de todos, siendo una madre y abuela al mismo tiempo.

A mis padres, por darme la vida y enseñarme a amarla. A mi madre, por ser tan fuerte y luchona, toda una Victoria. A mi padre, Manuel, por tu sabiduría y por acercarme a la naturaleza.

A mi hermana, Lizenka, por estar a mi lado toda la vida y ser mi ejemplo.

A Jaime, por ser aire fresco en mi vida, por cuidarme, por todo el apoyo que me das, por creer en mí y alentarme a seguir adelante.

A Koffer, mi compañero de desvelos, por recibirme en casa con todo el amor que otra especie puede dar.

A mi familia de Pachuca, mis amigos, especialmente a las niñas: Rosita, Sharon, Erika y Elide, por su apoyo desde la preparatoria, por quitarme el estrés con sus risas y cariño, y a sus familias, por mostrarme siempre su aprecio.

A mis compañeros de la carrera, sobre todo a Sarita, Raquel, Laura, Paulina, Karina, Daniel, Gustavo, Manuel y Chaparro, por las aventuras.

A esas nuevas amistades que surgieron mientras desarrollaba este trabajo, por ser un impulso muy fuerte y darme aliento, gracias Helena, Ivetta, César, Erick, David, Juan Carlos y Alex.

A mis hermanos y primos de laboratorio, especialmente a Ascensión, Su-Lin, Alejandra, Rubí, Fernando y Giovanni.

A todos mis sinodales, por sus observaciones, opiniones y por enriquecer este trabajo.

A la Química Blanca, al Dr. Villavicencio y todas las personas que me ayudaron en el laboratorio de Etnobotánica, por compartir su experiencia conmigo y brindarme todas las facilidades para realizar esta tesis.

A la Dra. Maritza, por sus pláticas tan entretenidas y por contagiarme las ganas de vivir en vacaciones.

A la Dra. Ana Laura, por ser La Doctora, muchas gracias por compartir conmigo su conocimiento, por creer en mí y apoyar mi carrera, pero sobre todo por ser tan humana y cariñosa, por su comprensión y abrazos en los tiempos difíciles, por convertirse en mi mamá académica.

Finalmente agradezco a los “zukulentos” y a la familia Viguera Díaz, sobre todo a Juan Luis Viguera Díaz, por tu hermosa amistad, por todo el cariño que me tenías, por tu interés en mi trabajo al grado de investigar cosas relacionadas sólo para poder “hablar mi lenguaje”, claro, acompañados de una buena taza de café. Por heredarme tu música, misma que se convertiría en parte del “soundtrack de mi tesis”. Porque cada “¡échale átomos!, tu puedes con la Sra. Biología” fue fundamental para que yo terminara mi carrera. Gracias, porque tu vida se ha convertido en un ejemplo para mí, y aún al final, me enseñaste tanto. Para ti este trabajo, con todo mi corazón, por aquella promesa de terminar nuestras tesis al mismo tiempo. Te extraño Juanito.

CONTENIDO

RESUMEN	7
I. INTRODUCCIÓN	8
II. ANTECEDENTES	9
1. Panorama general de los insecticidas.....	9
2. Plantas como una alternativa para el control de insectos.....	10
3. Aceites esenciales y su extracción por arrastre de vapor	12
4. Metabolitos secundarios y monoterpenos.....	15
5. Cultivo de tejidos y producción de metabolitos secundarios	17
6. Familia Lamiaceae: su uso como insecticida.....	20
7. <i>Hedeoma drummondii</i> Benth.....	22
8. Modelos biológicos utilizados en bioensayos	24
a. <i>Sitophilus zeamais</i>	24
b. <i>Drosophila melanogaster</i>	26
III. JUSTIFICACIÓN	28
IV. OBJETIVOS	28
1. Objetivo general	28
2. Objetivos particulares.....	28
V. MATERIAL Y MÉTODO	29
2. Subcultivos de <i>Hedeoma drummondii</i>	29
3. Obtención de microesquejes de <i>Hedeoma drummondii</i> y pulso hormonal	30
4. Extracción de aceites esenciales	30
5. Cultivo de <i>Drosophila melanogaster</i>	32
6. Cultivo de <i>Sitophilus zeamais</i>	32
7. Evaluación del efecto insectistático de los aceites esenciales de <i>Hedeoma drummondii</i>	33
8. Evaluación de la mortalidad y emergencia con el polvo de <i>Hedeoma drummondii</i> , así como la pérdida de peso del maíz.....	34
9. Análisis de resultados	36
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38

1. Rendimiento de los aceites esenciales	38
2. Evaluación del efecto insectistático de los aceites esenciales de <i>Hedeoma drummondii</i>.....	41
3. Evaluación de la mortalidad y emergencia con el polvo de <i>Hedeoma drummondii</i>, así como la pérdida de peso del maíz.....	44
a. Porcentaje de mortalidad.....	44
b. Porcentaje de emergencia.....	46
c. Pérdida de peso	47
VII. CONCLUSIONES	50
VIII. ANEXO	51
IX. LITERATURA CITADA.....	52

RESUMEN

Los insecticidas se han utilizado en todo el mundo para erradicar distintas plagas de insectos. Sin embargo, su uso ha causado problemas al ambiente y a la salud humana. Es por esto que se han utilizado plantas que tienen propiedad insecticida como una alternativa para reducir los daños causados. Las plantas presentan esta característica gracias a compuestos como metabolitos secundarios cuyo rendimiento se puede aumentar usando técnicas de micropropagación.

Plantas previamente micropropagadas de *Hedeoma drummondii* en medio Murashige y Skoog al 50% de sus componentes y adicionado con 1mg L^{-1} de 2-isopentil adenina (2iP) y 2 mg L^{-1} de bencil adeninapurina (BA) fueron subcultivadas periódicamente para obtener microesquejes, los cuales se sembraron para proporcionarles un pulso hormonal con los mismos fitorreguladores durante un mes, después de este lapso de tiempo, fueron sembrados en medio MS 100% y a los 45 días en medio MS 50% para promover su crecimiento. Tanto plantas micropropagadas como silvestres, se usaron para la extracción de aceites esenciales y obtención de polvo para la evaluación de su efecto insecticida-insectistático en *Drosophila melanogaster* y *Sitophilus zeamais*.

El mayor rendimiento de aceites esenciales (0.33%), se obtuvo de plantas tratadas con 1mg L^{-1} de 2- isopentil adenina con el pulso hormonal, seguido de la planta silvestre (0.31%). No se observó mortalidad en *Drosophila melanogaster* al aplicar 0.5, 1 y 2 mg de aceites esenciales. La mayor mortalidad de *Sitophilus zeamais* (54.23%), contabilizada a los 15 días, se obtuvo con 1% de polvo procedente de plantas subcultivadas con 1 mg L^{-1} de 2- isopentil adenina con el pulso hormonal, además es uno de los tratamientos que registró menor emergencia de adultos (13.01%) y tuvo poca pérdida de peso de maíz (2.47%), a los 55 días. Por otra parte, el polvo de la planta silvestre fue el segundo tratamiento con mayor porcentaje de mortalidad (38.96%). El presente trabajo mostró que el efecto insecticida-insectistático está presente en las plantas cultivadas *in vitro* y el rendimiento de los aceites esenciales se puede potenciar proporcionando pulsos con fitorreguladores.

I. INTRODUCCIÓN

A partir de la Segunda Guerra Mundial el uso de pesticidas, entre ellos los insecticidas, se incrementó drásticamente en todo el mundo (Viegas, 2003), sin embargo, se ha comprobado que su empleo causa daño al ambiente (Ramírez-Moreno *et al.*, 2001) y a la salud humana (Pimentel, 2005; Espitia, 2011).

Es por esto que se ha intensificado la búsqueda de sustancias que actúen como insecticidas, matando a los insectos, o bien como insectistáticos al afectar el desarrollo, alimentación, ovoposición o repeliendo a los insectos (Silva *et al.*, 2002). El propósito de estas alternativas es que ayuden a reducir en gran medida el uso e impacto de otras sustancias que han demostrado tener efectos dañinos. Dentro de estas alternativas se ha encontrado que los aceites esenciales de varias plantas presentan un efecto insecticida en mayor o menor medida dependiendo de los compuestos que tengan y de las partes de las plantas que se utilicen para la extracción de sus aceites (Mahmoud y Croteau, 2002). También se han utilizado a las plantas pulverizadas, o polvo vegetal, como insecticidas debido a que su aplicación resulta más fácil y económica (Weaver y Subramanyan, 2000).

Una propuesta para la obtención de sustancias como los metabolitos secundarios de las plantas es el cultivo de tejidos *in vitro*. Este conjunto de técnicas permite tener una fuente potencialmente renovable de plantas para su aprovechamiento (Mulabagal y Tsay, 2004) y aumentar la síntesis de metabolitos secundarios (Santos-Díaz *et al.*, 2005).

Por otra parte se ha reportado actividad insecticida de las plantas de la familia Lamiaceae gracias a los compuestos presentes en sus metabolitos secundarios, como los terpenos (Boulogne *et al.*, 2012). Por lo que, esta familia representa una fuente de investigación en la búsqueda de metabolitos con esta actividad.

En el estado de Hidalgo se han reportado especies usadas tradicionalmente como insecticidas (Villavicencio-Nieto *et al.*, 2010). Se ha comprobado este atributo en algunas de ellas (Cázares, 2006) y se ha analizado la composición química de los aceites esenciales de estas plantas, permitiendo identificar los metabolitos secundarios que les brindan esta propiedad (Cázares, 2006; Zamora, 2012).

Zamora (2012) realizó el establecimiento del cultivo *in vitro* e identificación química de los aceites esenciales de *Hedeoma drummondii*, una planta perteneciente a la familia Lamiaceae que se encuentra en el estado de Hidalgo en los municipios de Actopan, Cardonal e Ixmiquilpan (Pérez-Escandón *et al.*, 2003), encontrando como principales metabolitos secundarios a algunos monoterpenos (mentona y pulegona) tanto en plantas que se encontraban en su ambiente natural (silvestres) como en las micropropagadas. Por esto es importante evaluar el efecto insecticida-insectistático de las plantas micropropagadas y silvestres de *Hedeoma drummondii*, para conocer si los aceites esenciales y polvo de esta planta podrían ser usados como insecticidas naturales para el control de *Drosophila melanogaster* y *Sitophilus zeamais*.

II. ANTECEDENTES

1. Panorama general de los insecticidas

Un insecticida es aquella sustancia química utilizada para atraer, repeler y matar insectos, además deben presentar ciertas propiedades que están asociadas con su actividad: facilidad de obtención, manipulación y aplicación, tasa de eficiencia en varias concentraciones, ausencia de toxicidad en mamíferos y animales superiores, ausencia de fitotoxicidad, viabilidad económica y no ser acumulativa en el tejido adiposo de humanos y animales domésticos (Viegas, 2003).

De acuerdo con Viegas (2003), los insecticidas pueden clasificarse desde tres puntos de vista: finalidad, modo de acción y origen siendo éste último el de mayor importancia.

Los insecticidas empezaron a ser ampliamente utilizados para el control de plagas agrícolas a partir de la Segunda Guerra Mundial gracias al desarrollo de pesticidas (Viegas, 2003; Bejarano, 2007), es decir, cualquier sustancia elaborada para controlar, matar, repeler o atraer a cualquier organismo vivo que provoque daño o pérdidas económicas o transmita enfermedades, convirtiéndose en una pieza fundamental en la producción mundial de alimentos (Viegas, 2003) y en el control de vectores de enfermedades (Calle *et al.*, 2004). Sin embargo, esto ha causado

estragos en el ambiente (Ramírez-Moreno *et al.*, 2001) debido a que muchos de los compuestos que se encuentran en los insecticidas son usados en grandes cantidades, tienen una gran permanencia en el ambiente, además de que se acumulan y pueden ser llevados a otros sitios por corrientes de agua. Asimismo, el uso de insecticidas puede llegar a causar daños a la salud humana convirtiéndose en un problema a nivel mundial (Pimentel, 2005; Espitia, 2011).

Desde el punto de vista económico, existen estimaciones del costo que representa el uso de insecticidas principalmente en agricultura, encontrando que se pueden llegar a gastar 40 billones de dólares por año a lo largo del mundo (Pan-UK, 2003).

El uso de los insecticidas puede llegar a afectar a otros animales debido a la acumulación de sustancias químicas en los organismos. Su uso se ha intensificado debido a la resistencia que presentan algunas plagas y que los hacen más difíciles de combatir y controlar (Leyva *et al.*, 2009; Calle *et al.*, 2004; Pérez e Iannacone, 2004). De esta manera no sólo se afecta a los insectos considerados como plaga, sino que también se causan estragos en las poblaciones de otros que resultan benéficos, por ejemplo aquellos que polinizan o que llegan a ser depredadores de las plagas, denominados “benéficos”.

A partir de los años 60 se han buscado nuevos productos que sean más selectivos a los insectos blanco para ayudar a la preservación de otros animales que comparten el mismo hábitat incluyendo a los predadores naturales de los insectos considerados plaga o que fuesen indeseados (Viegas, 2003).

2. Plantas como una alternativa para el control de insectos

Debido a los problemas causados con el uso de insecticidas convencionales, se han buscado alternativas para el control de insectos usando sustancias que derivan del metabolismo secundario de las plantas (Mareggiani, 2001).

Los metabolitos secundarios de las plantas, tales como terpenos, alcaloides, flavonoides, entre otros, son insecticidas biorracionales efectivos, cuyo potencial aún

no ha sido aprovechado por completo (Pascual-Villalobos y Robledo, 1999; Stefanazzi *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2013).

De acuerdo con Ware (1994) una sustancia o mezcla insecticida ejerce su acción biocida debido a la naturaleza de su estructura química.

Las especies de plantas usadas como insecticidas pueden actuar inhibiendo el desarrollo normal de los insectos, actuando como repelentes, disuasivos de alimentación u ovoposición (Silva *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2013). Esto quiere decir que presentan propiedades insectistáticas (Rodríguez, 2003; Martínez *et al.*, 2013), ya que no matan a los insectos directamente por sus propiedades tóxicas (Silva *et al.*, 2002).

Con base en los trabajos de Ahmed y Grainge (1986) y Rodríguez (1993), Silva *et al.* (2002) enlista una serie de características que debe tener una planta insecticida considerada como “ideal” para evitar el deterioro del ecosistema al aprovecharla:

1. Ser perenne.
2. Estar ampliamente distribuida y en grandes cantidades en la naturaleza, o que se pueda cultivar.
3. Usar órganos renovables de la planta (hojas, flores o frutos).
4. No ser destruida cada vez que se necesite recolectar material (evitar uso de raíces y cortezas).
5. Requerir poco espacio, manejo, agua y fertilización.
6. Tener usos complementarios (como medicinales).
7. No tener un alto valor económico.
8. Ser eficaz en bajas dosis.

Este mismo autor señala que hay especies vegetales difíciles de cultivar o que no existen en suficiente cantidad, por lo tanto es frecuente tener problemas para satisfacer la demanda de plantas insecticidas. Debido a esto, el cultivo comercial representa una opción para obtener plantas, sin embargo, esta práctica puede conducir al monocultivo, y por lo tanto puede llevar al agricultor al uso de insecticidas convencionales o de plantas insecticidas para control de plagas de la planta insecticida cultivada.

De acuerdo con Weaver y Subramanyan (2000) la forma más fácil de utilizar a las plantas para el control de plagas, especialmente en granos almacenados, es en forma de polvo. Existe un gran número de polvos de origen vegetal que han sido evaluados para el control de insectos, entre ellos está el trabajo de Silva *et al.* (2003), donde evaluaron el polvo de siete plantas medicinales: *Buddleja globosa*, *Eucalyptus globulus*, *Foeniculum vulgare var. vulgare*, *Marrubium vulgare*, *Melissa officinalis*, *Peumus boldus* y *Rosmarinus officinalis* para el control de *Sitophilus zeamais* en maíz almacenado. De estas plantas, *Peumus boldus* al 2% resultó un insecticida efectivo (82.8%), mientras que *Foeniculum vulgare var. vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Melissa officinalis* presentan un efecto insectistático al disminuir la emergencia de adultos.

En 2005, Silva-Aguayo y colaboradores evaluaron polvos vegetales de *Chenopodium ambrosoides*, *C. album* y *C. quinoa* para el control de *Sitophilus zeamais*, siendo *C. ambrosoides* al 2% la que obtuvo mayor mortalidad de insectos usando polvos de inflorescencia (69.4%) y una mezcla de hojas y tallos (67.9%).

Salvadores *et al.* (2007), evaluaron el uso de polvos de *Capsicum annum var. grossum*, *Capsicum annum var. longum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Cuminum cyminum*, *Myristica fragrans*, *Origanum vulgare*, *Pimpinella anisum*, *Piper nigrum* y *Syzygium aromaticum* para el control del gorgojo de maíz *Sitophilus zeamais*, encontrando que todos los polvos vegetales fueron repelentes para *S. zeamais*.

3. Aceites esenciales y su extracción por arrastre de vapor

Los aceites esenciales son aquellos líquidos aromáticos que se obtienen de diferentes partes de las plantas tales como semillas, flores, hojas, raíces, frutos, ramas, entre otras dependiendo de la especie (Burt, 2004). Pueden actuar como atrayentes de polinizadores y dispersores, y constituyen parte de la defensa química de las plantas principalmente contra herbívoros entre otros patógenos (Harborne, 1997).

Los aceites esenciales son abundantes en algunas familias de plantas como Coníferas, Rutaceae, Umbelliferae, Myrtaceae y Labiatae, y son localizados en

estructuras histológicas especializadas, en el caso de las labiadas en tricomas y canales secretores (Regnault-Roger, 1997).

Su uso se remonta a épocas muy antiguas como la de los griegos, romanos, egipcios, persas y árabes. Para el siglo XII los aceites esenciales eran usados por sus efectos farmacéuticos pero el auge de este uso en Europa se dio hasta el siglo XVI (Burt, 2004). Actualmente también se utilizan en la elaboración de cosméticos y de alimentos (Durán *et al.*, 2007), saborizantes, fragancias, medicinales, antimicrobianos, insecticidas, antimicóticos, entre otros. Esto es posible gracias a características como su composición química y la función que desempeñan en la planta (Mahmoud y Croteau, 2002). Hasta el año de 1999 se estimaba que alrededor de 3000 aceites esenciales eran conocidos, y de éstos aproximadamente 300 eran comercialmente importantes sobre todo para la industria de los saborizantes y fragancias (Van de Braak y Leijten, 1999).

Respecto al uso de aceites esenciales como insecticidas es importante tomar en cuenta que por su origen son biodegradables y esto ayuda a que no se acumulen en el ecosistema evitando así su daño (Iannacone y Lamas, 2003).

Se pueden encontrar estudios donde se evalúan los aceites esenciales de plantas pertenecientes a las familias Myrtaceae, Lauraceae, Apiaceae y Lamiaceae como insecticidas potenciales (Rajendran y Sriranjini, 2008).

Martínez y colaboradores (2013) aplicaron aceites esenciales de *Piper aduncum* en *Sitophilus zeamais* usando el método de contacto en papel filtro para evaluar el efecto tóxico calculando la concentración letal 50 (CL₅₀) y 95 (CL₉₅), que se refiere a la concentración a la que una sustancia produce la muerte del 50% y 95% de los animales expuestos a dicha sustancia obteniendo un CL₅₀ y CL₉₅ 0.64 y 12.47 µl/g respectivamente. Además evaluaron el porcentaje de pérdida de masa en granos de maíz y el efecto tóxico de los aceites esenciales aplicados directamente en los granos de maíz obteniendo una CL₅₀ y CL₉₅ de 0.06 y 1.38 µl/cm² respectivamente.

Existen diversas técnicas con las cuáles se pueden extraer los aceites esenciales de una planta. Algunas de éstas se utilizan tanto a nivel tradicional como nivel industrial. Entre las más usadas se encuentran: extracción por

prensado, por solventes, hidrodestilación, con fluidos supercríticos, por arrastre de vapor, entre otros (Sánchez, 2006).

En el caso de la extracción por arrastre de vapor, se obtiene el aceite esencial de una planta debido a que la temperatura del vapor de agua (100°C) rompe el tejido vegetal haciendo que se libere el aceite contenido, éste pasa por el tubo de refrigeración y se recupera gracias a la diferencia de densidades (Gil, 1995; Sánchez, 2006). De acuerdo con Simões y Spitzer (1999), los aceites volátiles poseen una mayor tensión de vapor comparada con la del agua, y por ello son arrastrados por el vapor. Es importante tomar en cuenta la temperatura a la que se realiza el procedimiento, ya que algunos compuestos volátiles pueden perderse o no se pueden extraer en su totalidad (Gil, 1995). El aceite esencial se debe envasar para su conservación en recipientes de vidrio, acero inoxidable, PET, policarbonato, nylon evitando el hierro, cobre o poliestireno (Sánchez, 2006). Los residuos vegetales de las extracciones pueden ser utilizados en la elaboración de compostas ya que es materia biodegradable (Sánchez, 2006).

El rendimiento del aceite se puede calcular con la relación entre el volumen obtenido de aceite esencial y el peso de la planta utilizada para la extracción (Gil, 1995). Tanto el rendimiento como la calidad en la composición de los aceites esenciales extraídos por este método son buenas, haciéndolo una opción para la realización de trabajos de investigación científica (Gil, 1995).

Algunas plantas pueden tener cambios en la composición química de sus aceites esenciales debido a factores tales como la ubicación geográfica en la que se encuentran, las características del suelo y el clima donde crecen, así como del desarrollo de la planta y la parte utilizada para la extracción (Durán *et al.*, 2007).

4. Metabolitos secundarios y monoterpenos

Los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas que aparentemente no tienen una función directa en procesos tales como asimilación de nutrientes, fotosíntesis, síntesis de proteínas y carbohidratos, entre otras (Hartmann, 2007). Por otra parte, estos compuestos se sintetizan en pequeñas cantidades y en ocasiones sólo se producen en determinadas familias, géneros o especies de plantas (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Actualmente los metabolitos secundarios representan una fuente comercial importante ya que varios extractos de plantas son usados como pigmentos, suplementos alimenticios, cosméticos, perfumería e insecticidas (Balandrin y Klocke, 1988).

De acuerdo a sus propiedades de solubilidad, origen biosintético y presencia de determinados grupos, los metabolitos secundarios se clasifican en cuatro grupos, siendo tres los principales: compuestos fenólicos, terpenos y compuestos nitrogenados (Harborne, 1980).

Los terpenos son sustancias de origen vegetal que actúan como defensores de las plantas. Se consideran los metabolitos secundarios más numerosos con alrededor de 40000 moléculas diferentes. Estos compuestos han sido utilizados en la industria farmacéutica, de alimentos y otros como limpiadores, agentes antialérgicos y solventes (Zwenger y Basu, 2008). Derivan de la unión de unidades de isopreno, es decir de cinco átomos de carbono (C) (Ávalos y Pérez-Urria, 2009) y se clasifican de acuerdo al número de unidades isopreno que contienen: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos (Villavicencio-Nieto *et al.*, 2010).

Los monoterpenos son terpenos de 10 C, pues tienen dos unidades isopreno (Ávalos y Pérez-Urria, 2009), y además, son constituyentes de los aceites esenciales de plantas aromáticas que desempeñan funciones como la atracción de polinizadores, defensa de la planta y alelopatía (Mahmoud y Croteau, 2002).

Algunas plantas tienen compuestos como los terpenos que les confieren la propiedad insecticida (Ramírez-Moreno *et al.* 2001). En un listado de especies de plantas con actividad insecticida elaborado a partir de 1965

referencias, se encontró que existen alrededor de 119 compuestos con esta propiedad distribuidos en 11 tipos de los cuales tres cuentan con una fuerte actividad, dentro de ellos están los terpenos con un 37% de frecuencia, seguido de los alcaloides y los compuestos fenólicos con 30% y 20% respectivamente (Boulogne *et al.*, 2012).

En estudios sobre el impacto ambiental de sustancias que pueden ser biodegradables y selectivas para el control de insectos destacan los terpenos y alcaloides como alternativas efectivas con bajo impacto en la salud humana, ambiente y animales (Viegas, 2003).

Zamora (2012) realizó la identificación química de los aceites esenciales de *Hedeoma drummondii*, silvestre y micropropagada, encontrando a la mentona y la pulegona como sus principales compuestos.

La mentona (Figura 1) es uno de los monoterpenos mayoritarios en los géneros *Mentha* y *Minthostachys* (Luna, 2010). De acuerdo con el trabajo de Lee *et al.* (2003) la mentona tiene efecto insecticida en *Blattella germanica*, *Musca domestica*, *Sitophilus oryzae*, *Tribolium castaneum*, *Oryzaephilus surinamensis*.

La pulegona (Figura 1) es componente de los aceites esenciales de plantas como poleo y menta, que se utiliza principalmente como saborizante en alimentos (U.S. Department of Health and Human Services, 2011).

Agrelo y colaboradores (2004) reportan que el aceite esencial de la planta *Mentha pulegium* contiene 85.4% de pulegona y otras especies contienen en su aceite hasta un 37.8% de pulegona (Aghel *et al.*, 2004), siendo así el principal terpeno en su composición. En el 2003, Lee y colaboradores probaron la actividad insecticida de la pulegona y otros compuestos en *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Musca domestica* y *Blattella germanica* causando un 100% de mortalidad para estas cinco especies, así como para *Aedes aegypti* (Waliwitiya *et al.*, 2009).

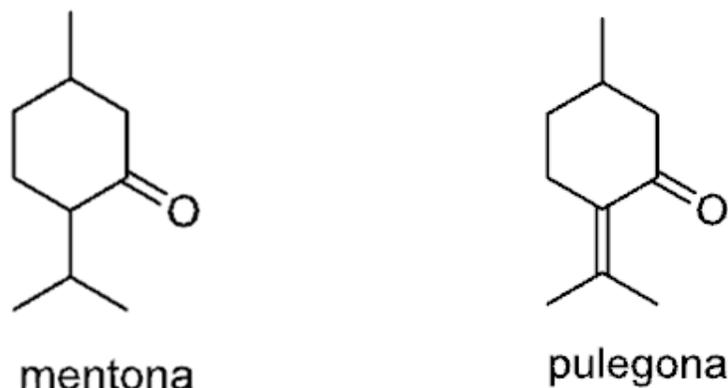


Figura 1. Estructura química de la mentona y pulegona, tomado y modificado de Zamora, 2012.

5. Cultivo de tejidos y producción de metabolitos secundarios

El cultivo de tejidos vegetales se basa en la totipotencialidad celular y consiste en un conjunto de técnicas que consiste en cultivar en condiciones asépticas fragmentos de plantas (explantes) en condiciones nutricionales y ambientales controladas, promoviendo su proliferación por diferentes rutas de propagación. Estas técnicas se emplean en la conservación de germoplasma, micropropagación, mejoramiento genético, producción de semillas artificiales y de compuestos secundarios (Mroginski y Roca, 1991; López y Olguín, 2013).

El cultivo de tejidos ha tomado mayor importancia en la producción de metabolitos secundarios pues representa una fuente potencialmente renovable de plantas que tienen compuestos con aplicación medicinal, como colorantes, fragancias, saborizantes entre otros (Mulabagal y Tsay, 2004).

La síntesis de metabolitos secundarios se puede incrementar mediante la generación de estrés en las plantas cultivadas *in vitro* adicionando bacterias, hongos o modificando las condiciones ambientales tales como temperatura, luz y pH (Santos-Díaz *et al.*, 2005). Saad (2001) señala que se han adoptado varias estrategias para aumentar los rendimientos de metabolitos secundarios como:

- Selección y aislamiento de líneas sobreproductoras. Requiere el desarrollo de estudios fitoquímicos de poblaciones silvestres de la especie en cuestión, para obtener individuos sobreproductores, y

posteriormente el establecimiento y selección de líneas celulares con altos rendimientos.

- Optimización de condiciones de cultivo. Incluye la formulación del medio de cultivo (fuente de nitrógeno, concentración de sales minerales y reguladores de crecimiento).
- Cultivos de tejidos organizados. Los cultivos de tejidos vegetales presentan varias opciones para la producción de metabolitos: raíces, brotes, cultivos de tejidos transformados y cultivos en suspensión. Cuando un metabolito no se produce en cultivos en suspensión, una alternativa es la producción de metabolitos secundarios por tejidos diferenciados.
- Remoción del producto *in situ*. Se refiere a la extracción *in situ* dependiendo del estado físico del medio, líquido o sólido.
- Células inmovilizadas. Usando cultivos en suspensión para la síntesis de metabolitos secundarios que se da en la fase de crecimiento estacionaria.
- Ingeniería de rutas metabólicas en células vegetales. Producción de plantas con contenido alterado de metabolitos secundarios mediante ingeniería genética.
- Elicidores. Uso de agentes de origen biológico que estimulan la acumulación de los productos, aprovechando el hecho de que las plantas responden al ataque de patógenos produciendo compuestos.
- Biotransformación. Involucra el suministro en los cultivos celulares de una sustancia precursora, que en un paso enzimático o varios produce el metabolito de interés.

Muchas industrias tienen por objetivo desarrollar diferentes técnicas de cultivo de tejidos vegetales para poder contar con un buen rendimiento en la producción de metabolitos secundarios, además de que sean técnicas económicas comparadas con la síntesis de compuestos o la extracción de la planta en condiciones naturales (Mulabagal y Tsay, 2004).

Existen trabajos de producción de metabolitos secundarios a partir de cultivos de tejidos, entre ellos unos destinados a obtener alcaloides, antraquinonas, fenoles, en los que se incluyen diterpenos extraídos de células en suspensión de *Torreya nucifera* var. *radicans* (Orihara *et al.*, 2002) y triterpenos de callo de *Eriobotrya japonica* (Taniguchi *et al.*, 2002).

Dentro de las técnicas del cultivo *in vitro* se encuentra la micropropagación, que es prácticamente una multiplicación masiva *in vitro* (Villalobos y Thorpe, 1991). La micropropagación ha demostrado tener importantes ventajas para la propagación vegetal:

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas del material que se propaga.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente costeables.
- Mayor control sobre la sanidad de las plantas.
- Facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones aduaneras.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existan pocos individuos (Villalobos y Thorpe, 1991).

En el 2010, Díaz y colaboradores realizaron un protocolo para la micropropagación de *Hedeoma multiflorum* utilizando segmentos con nodos cultivados en medio SH (Schenk y Hildebrandt, 1972), WPM (Lloyd y McCown, 1980) y B5 (Gamborg, 1968) en diferentes combinaciones de ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA), resultando mejor el medio WPM. Posteriormente determinaron la composición de esta planta usando cromatografía de gases y detección con espectrometría de masas (GC-MS) encontrando pulegona, mentona e isomentona como los principales compuestos.

6. Familia Lamiaceae: su uso como insecticida

La familia Lamiaceae incluye 236 géneros y 7173 especies (Harley *et al.*, 2004). A las plantas de esta familia se les conoce como labiadas y son árboles, arbustos, subarbustos o hierbas perennes o anuales (Harley *et al.*, 2004), que con frecuencia tienen aceites aromáticos; tallos por lo general son tetragonos, erectos o postrados: tienen hojas opuestas generalmente decusadas, también verticiladas, simples y en ocasiones compuestas, dentadas o crenadas, con o sin peciolo. Sus inflorescencias pueden ser terminales o axilares dispuestas en espigas, racimos, panículas o capítulos generalmente con brácteas. Presentan flores generalmente bisexuales, hipóginas, zigomorfas; cáliz persistente, sinsépalo; actinomorfo o zigomorfo a veces bilabiado; corola simpétala generalmente con 5 lóbulos iguales o subiguales, con frecuencia bilabiada, el labio superior bilobado y el inferior trilobado; 4 estambres, a veces reducidos a 2, filamentos libres, anteras ditecas dehiscentes longitudinalmente; gineceo bicarpelar con 1 estilo, ovario superior, 4 óvulos, 1 por lóculo. Fruto drupáceo, tetralobulado indehiscente; por lo general 4 núculas secas, lisas o levemente tuberculadas. Semillas solitarias erectas (Martínez-Gordillo *et al.*, 2013).

Su distribución es subcosmopolita y es más diversa en zonas de clima templado como el Mediterráneo, California y Asia. En México tienen una amplia distribución, ya que se les puede encontrar a lo largo de zonas montañosas y especialmente en la Faja Volcánica Transmexicana (Martínez-Gordillo *et al.*, 2013).

Martínez-Gordillo *et al.* (2013), indican que en el país, esta familia se encuentra representada por 32 géneros nativos o naturalizados por largos períodos. Los géneros distribuidos en México pertenecen a cuatro subfamilias e incluyen 591 especies. También se pueden encontrar 17 géneros introducidos y/o cultivados que en ocasiones se encuentran de forma silvestre. Es considerada una de las familias más diversas en la República ya que representan 13.55% de los géneros y 8.23% de las especies del mundo con un endemismo de 65.82%. Tiene uso ornamental, además es de importancia económica a nivel mundial ya que se usa como condimentos y para obtener aceites esenciales.

Los géneros mejor representados en México son *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys* e *Hyptis*. Además se encuentran géneros compartidos con el sur de Estados Unidos que crecen en zonas áridas como lo son *Hedeoma*, *Monarda*, *Monardella*, *Poliomintha*, *Tetraclea*, *Trichostema* y *Warnockia*.

En el año 2012, Boulogne y colaboradores realizaron un listado de plantas y químicos que podrían usarse para el control de las hormigas cortadoras de hojas basándose en literatura. Como resultado de esa lista, encontraron citas de 656 especies de plantas con actividad insecticida que se encuentran distribuidas en 110 familias de las cuales destaca Lamiaceae con 181 especies distribuidas en 48 géneros. Los géneros más citados son: *Pycnanthemum*, *Teucrium*, *Thymus*, *Satureja*, *Micromeria*, *Origanum*, *Mentha*, *Monarda*, *Ocimum*.

Dentro de los estudios sobre actividad insecticida de esta familia podemos encontrar la realizada por Lamiri y colaboradores (2001), donde se comprobó la propiedad insecticida de *Mentha pulegium*, *Origanum compactum* y *Origanum majorana* contra moscas, mosquitos, larvas y otros insectos voladores.

En 2004, Pascual-Villalobos y colaboradores estudiaron el potencial uso de aceites esenciales de albahaca (*Ocimum basilicum*), para controlar plagas de almacén del arroz. Evaluaron la toxicidad y repelencia en *Sitophilus oryzae*, *Rhyzopertha dominica* y *Cryptolestes pusillus* encontrando que los aceites de albahaca tuvieron toxicidad por contacto.

También se ha probado la toxicidad de aceite esencial de *Micromeria fruticosa*, *Nepeta racemosa* y *Origanum vulgare* contra ninfas y adultos de *Tetranychus urticae* y adultos de *Bemisia tabaco* (Çalmaşur et al., 2006).

Waliwitiya y colaboradores (2009) comprobaron que el aceite de romero (*Rosmarinus officinalis*) muestra alta actividad larvicida contra todas las etapas larvales de *Aedes aegypti* con una CL_{50} de 10.3 – 40.8 mg L⁻¹.

Para el estado de Hidalgo se tiene el registro de algunas plantas de la familia Lamiaceae con uso plaguicida tradicional como lo son: *Hyptis verticillata*, con la que se construyen escobas para barrer sitios con pulgas o se ponen en nidos de gallinas con chahuistles (*Menopon gallinae*) en los municipios de Huejutla, San Bartolo Tutotepec y Tlanchinol; *Marrubium vulgare*, es usada en el municipio de Mineral de

la Reforma para evitar infestaciones de gorupos (*Menopon gallinae*); *Mentha rotundifolia* para eliminar chinches (*Cimex lectularius*), pulgas (*Ctenocephalides canis*) y piojos (*Pediculus humanus*) usando las ramas frescas entre cobijas y petates o con agua para habitaciones y el extracto para bañar animales como perros o también para los humanos. También se ha registrado el uso de *Rosmarinus officinalis* junto con otras plantas y estiércol para ser quemado y con el humo evitar la presencia de gorupos, pulgas y piojos. En el municipio de Epazoyucan, para eliminar borucos (*Menopon gallinae*) que hay en gallinas, se les administra en infusiones de *Stachys coccinea* o bien se coloca en los nidos (Villavicencio-Nieto *et al.*, 2010).

7. *Hedeoma drummondii* Benth.

En el caso particular del género *Hedeoma* se pueden encontrar 42 especies en el mundo de las cuales 29 se encuentran distribuidas en México y 17 son endémicas (Figura 2).

Hedeoma drummondii es una planta perteneciente a la familia Lamiaceae descrita en 1834 por George Bentham. En México comúnmente se le conoce como “santo domingo”. Esta planta tiene aroma a menta, llega a medir de 15 hasta 30 cm de altura. Su tallo es erecto, delgado y de color verde claro. Sus hojas son opuestas, simples, de forma espatulada o elíptica oblonga, se les puede encontrar cortamente pecioladas a subsésiles y sus bordes son enteros. Las flores son de color lavanda y el cáliz tiene dos dientes en el labio superior y tres en el inferior. Sus semillas tienen una forma ovada (Irving, 1970). Crece en bosque de *Quercus* y *Juniperus* (Tovar, 2007).

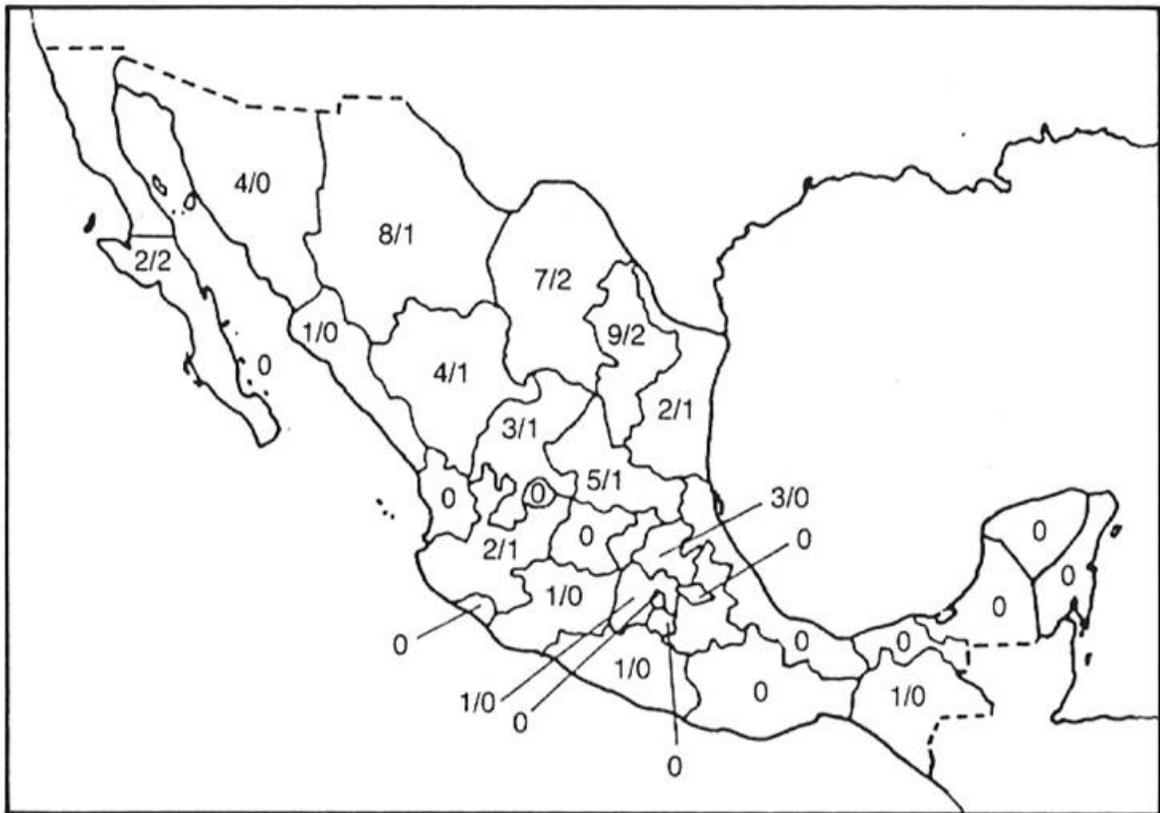


Figura 2. Mapa de la República Mexicana que señala el número de especies/ número de especies endémicas del género *Hedeoma*. Tomado de Ramamoorthy y Elliott (1998), modificado por Zamora (2012)

H. drummondii es una especie endémica de Norteamérica. Se distribuye principalmente en el suroeste de Estados Unidos y al norte de México. En el estado de Hidalgo ha sido reportada en los municipios de Actopan, Cardonal e Ixmiquilpan (Pérez-Escandón *et al.*, 2003) así como Nicolás Flores (Tovar, 2007). Se ha utilizado como bebida, al ser hervida principalmente con fines medicinales para combatir el dolor de estómago, cólicos así como resfriados, tos y como relajante del sistema nervioso (Pérez-Escandón *et al.*, 2003). Es considerada como una especie importante a nivel regional cuyo uso y comercialización es intensa en el Valle del Mezquital (Tovar, 2007).

En el 2007, Tovar realizó una comparación química de los aceites esenciales de seis plantas entre las que se encuentra *H. drummondii* y encontró que su aceite esencial está compuesto por diez sustancias, siendo tres mayoritarias: mentona, pulegona y n-metil-piridona-6-ácido carboxílico.

Zamora en 2012 realizó la propagación *in vitro* de esta especie, y obtuvo extractos con aceites esenciales los cuales contienen mentona y pulegona (Cuadro 1). Ambos monoterpenos que puede tener una aplicación insecticida.

Cuadro 1. Porcentaje de metabolitos secundarios encontrados en aceites esenciales de plantas propagadas *in vitro* tratadas con 1 mg L⁻¹ de 2- isopentil adenina (2iP), 2 mg L⁻¹ de bencil adeninapurina (BA) y en la planta silvestre de *Hedeoma drummondii*. Tomado y modificado de Zamora, 2012.

Tratamiento (mg L ⁻¹)	Pulegona (%)	Mentona (%)	Mentol (%)	Compuesto no identificado (%)
2 de BA	60.3	13.73	-	25.97
1 de 2iP	46.98	21.46	-	31.56
Silvestre	48.3	23.09	21.17	7.44

8. Modelos biológicos utilizados en bioensayos

a. *Sitophilus zeamais*

Conocido comúnmente como gorgojo del maíz (Figura 3), pertenece a la familia Curculionidae dentro del orden Coleoptera, sus larvas se desarrollan en el interior de los granos que infestan y posteriormente emergen al llegar a etapa adulta. Estos insectos miden 5 mm aproximadamente (Serratos *et al.*, 1993).

El ciclo de vida completo dura alrededor de 36 días a 27 ± 1°C y a 69 ± 3% de humedad relativa (Sharifi y Mills, 1971). Cada hembra puede producir hasta 250 huevos en su vida reproductiva (Longstaff, 1981).

Las hembras perforan los granos, depositan un huevo y posteriormente cierran el agujero con un tapón mucilaginoso, el cual se endurece rápidamente y con ello se protege al huevo. A simple vista la única evidencia de la infestación dentro del grano es una pequeña área elevada por encima de la semilla (Longstaff, 1981).

Existen cuatro estadios larvales que se desarrollan dentro del grano, y aun cuando llegan a etapa adulta, permanece en el interior durante algunos días antes de emerger una vez que su cutícula endurece y madura (Longstaff, 1981).

S. zeamais (Mots.), ha sido utilizado como modelo biológico para la búsqueda de sustancias que puedan actuar como control, ya que se le considera como una de las plagas más importantes de semillas almacenadas (Salvadores *et al.*, 2007). Es una plaga que destruye los granos de cereales, con relevancia económica reconocida principalmente en regiones tropicales. Las larvas y adultos provocan pérdida de peso, desvalorización comercial, pérdida en el valor nutritivo y disminución del poder germinativo de las semillas (Salgado *et al.*, 2012).

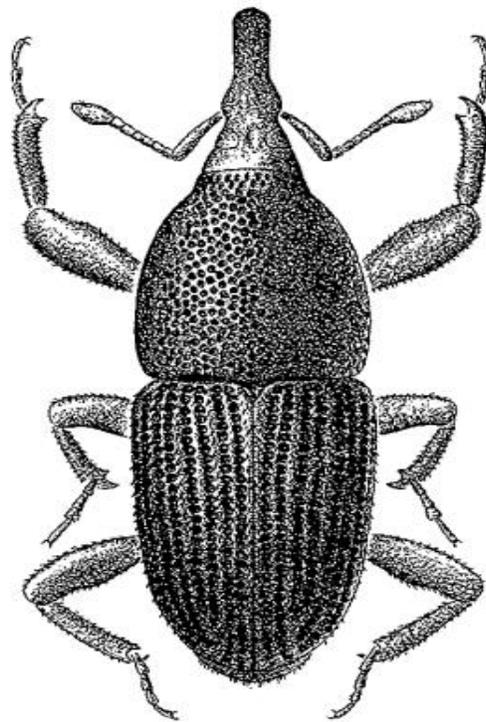


Figura 3. Esquema de un individuo adulto *Sitophilus zeamais* que mide 5 mm de longitud. Tomado y modificado de Whitehead (1987).

b. *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster es un insecto que pertenece a la familia Drosophilidae dentro del orden Diptera. Es conocido comúnmente como mosca del vinagre, de la manzana, del vino o de la fruta debido a que su alimentación consiste en levaduras provenientes de restos vegetales que se encuentran en estado de descomposición. Mide de 3 a 4 mm aproximadamente (Castañeda *et al.*, 2008).

Se introdujo como modelo biológico en 1909 por Thomas Hunt Morgan, debido a que su ciclo de vida es corto, su cultivo resulta fácil, su manutención es de bajo costo y además tiene gran fecundidad. También se ha utilizado en investigaciones científicas en distintas disciplinas como: Genética, Biología del desarrollo, Ecología, Evolución, Genética toxicológica, Etología, Neurobiología y Toxicología (Castañeda *et al.*, 2008).

Su ciclo de vida (Figura 4) dura 10 días a una temperatura de 25 +/- 2° C y 65% de humedad relativa. Tiene varios estados de desarrollo: inicia con la ovoposición, donde una hembra deposita entre 600 a 800 huevos en sus 40-60 días de vida. El huevo mide menos de medio milímetro de largo, es de apariencia translúcida y presenta dos micrópilos los cuales le permiten respirar y también flotar en los jugos de frutas fermentadas, donde generalmente es ovopositado. Del huevo eclosiona la larva que pasa por tres estadios: larva de 1er estadio (24 hrs), larva de 2º estadio (48 hrs) y larva de 3er estadio (72 hrs). Durante la fase larvaria la ingesta de alimento es continua, llegando a consumir hasta 5 veces su peso. Posteriormente, a las 96 hrs, inicia la transformación de larva de 3er estadio a pupa hasta completar 120 hrs del ciclo. Más tarde (240 hrs) emerge el imago, una mosca con apariencia de adulto pero que debe madurar sexualmente en unas horas más para poder convertirse en adulto, que es la fase reproductiva del ciclo (Castañeda *et al.*, 2008; Koliantz y Szymanski ,2009).

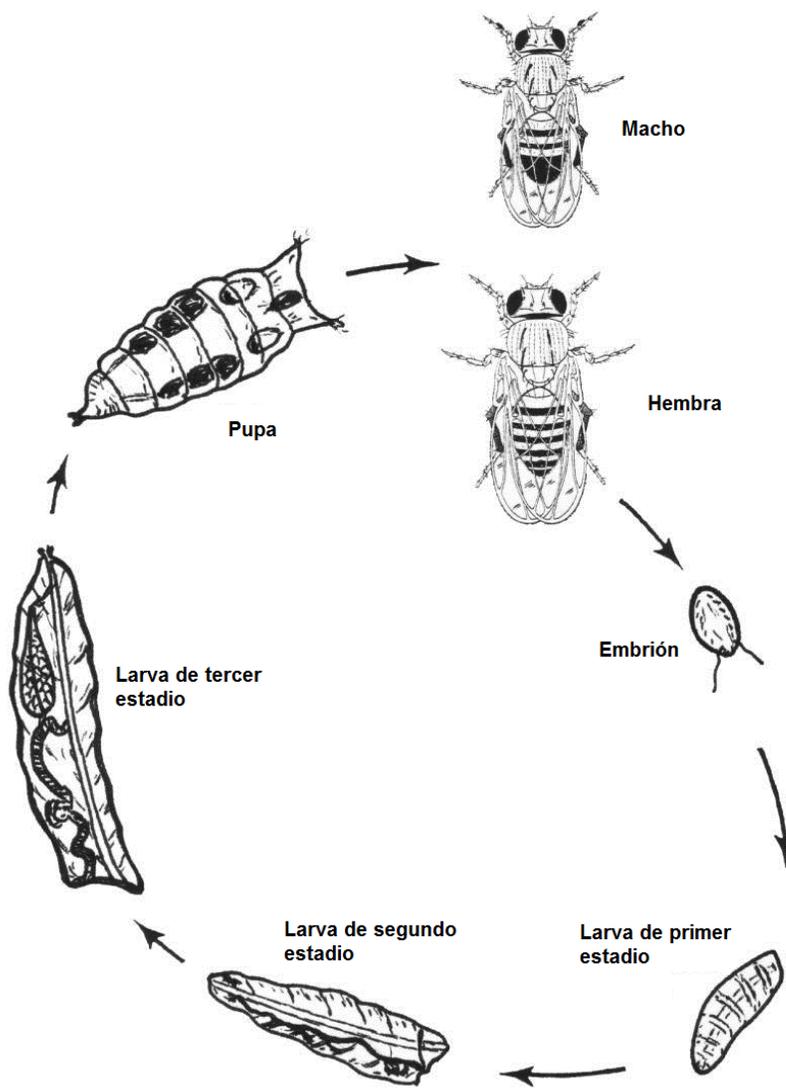


Figura 4. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. Tomado y modificado de Koliantz y Szymanski (2009).

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a que se ha comprobado la actividad insecticida-insectistática en especies de la familia Lamiaceae por la presencia de terpenos como la mentona y la pulegona, presentes en *Hedeoma drummondii*, se ha planteado el uso de sus aceites esenciales como insecticida así como en polvo con la finalidad de controlar especies de insectos consideradas como plagas. Es por esto que se evaluará si los aceites esenciales y polvo de *Hedeoma drummondii*, procedentes de plantas micropropagadas y silvestres, tienen efecto insecticida-insectistático en dos especies de insectos: *Drosophila melanogaster*, por presentar su ciclo de vida es corto y *Sitophilus zeamais*, porque es considerada una plaga importante que afecta a los granos almacenados.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Evaluar el efecto insecticida-insectistático de plantas silvestres y micropropagadas de *Hedeoma drummondii*, usando aceites esenciales y polvo sobre *Drosophila melanogaster* y *Sitophilus zeamais* para corroborar si esta planta puede ser usada como insecticida natural.

2. Objetivos particulares

- Utilizar a la micropropagación como una herramienta para obtener plantas con las cuales se realice la evaluación de la actividad insecticida-insectistática de *H. drummondii*.
- Determinar el porcentaje de rendimiento de los aceites esenciales de las plantas silvestres y de los brotes regenerados *in vitro* de *H. drummondii*.
- Comparar el efecto insectistático de los aceites esenciales de plantas silvestres y de los brotes regenerados *in vitro* de *H. drummondii* en *D. melanogaster*.
- Evaluar la actividad insecticida-insectistática sobre *S. zeamais* al aplicar polvo de plantas silvestres y micropropagadas de *H. drummondii*.

V. MATERIAL Y MÉTODO

1. Material biológico

Se utilizaron plantas completas de *Hedeoma drummondii* adquiridas en el tianguis de Actopan, Hidalgo para realizar la extracción de aceites esenciales y pulverización.

2. Subcultivos de *Hedeoma drummondii*

Con base en los resultados del trabajo de Zamora (2012), se realizaron subcultivos periódicos *in vitro* de microesquejes de *Hedeoma drummondii* (Figura 5), en frascos de vidrio de 100 ml de capacidad con 30 ml de medio Murashige y Skoog (1961) (MS) al 50% de sus componentes y adicionado con 2 mg L^{-1} Bencil adeninapurina (BA) y 1 mg L^{-1} 2-isopentil adenina (2iP), pH 5.7-5.8 y 8 g L^{-1} de agar bacteriológico Bioxon®.

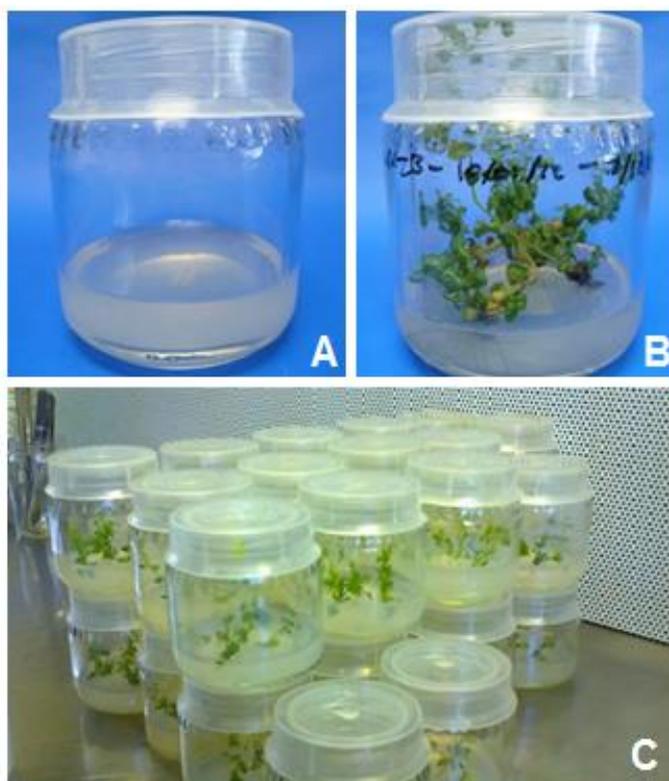


Figura 5. Subcultivo de *Hedeoma drummondii*. A. Medio Murashige y Skoog (MS) al 50% de todos sus componentes. B. Frasco con plantas en crecimiento. C. Subcultivos para la multiplicación de *H. drummondii*, realizados en campana de flujo laminar.

3. Obtención de microesquejes de *Hedeoma drummondii* y pulso hormonal

Se seleccionó un lote de plantas subcultivadas provenientes de los tratamientos con BA y 2iP y se cortaron microesquejes con dos entrenudos (Figura 6) éstos se subcultivaron en medio MS al 100% de todos sus componentes, adicionado con 2 mg L⁻¹ de BA y 1 mg L⁻¹ de 2iP, pH 5.7-5.8, 8 g L⁻¹ de agar bacteriológico Bioxon®.

Los microesquejes permanecieron un mes en este medio (pulso) y posteriormente fueron subcultivados en MS al 100%. Para promover el crecimiento de las plantas se realizó un segundo subcultivo a los 45 días en medio MS al 50%.

Todos los cultivos se mantuvieron en un cuarto de incubación con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/obscuridad, temperatura de 26 ± 1 °C e intensidad luminosa de 54 μ mol m⁻²s⁻¹.

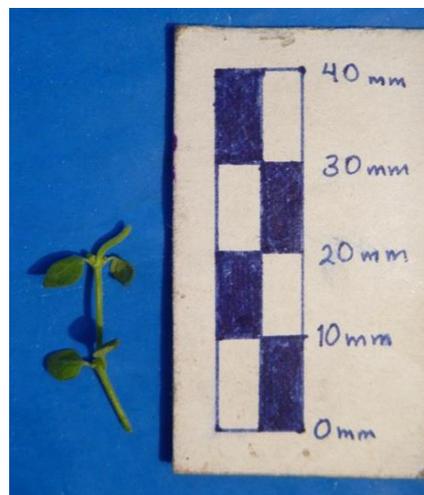


Figura 6. Microesqueje con dos entrenudos usado para la siembra en medio Murashige y Skoog (MS) adicionado con dos concentraciones hormonales.

4. Extracción de aceites esenciales

Después de tres meses, se extrajeron plantas de *H. drummondii* de los frascos y se eliminó el medio de cultivo de las raíces. Tanto de las plantas micropropagadas como de las silvestres se pesaron 30 g en fresco y se llevó a cabo la extracción de aceites esenciales (Figura 7) por la técnica de arrastre de vapor (Domínguez, 1979). Obteniéndose un destilado acuoso de 300 ml, el cual se colocó en un embudo de separación para ser extraído con 10 ml de éter etílico por cuatro veces consecutivas, recolectando la fase orgánica (etérea) en un matraz Erlenmeyer, reuniendo un total de 40 ml, a los que se les agregó 1.5 gr de sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄). Después se filtró con papel Whatman 42 y se evaporó el éter etílico a baño María dentro de campana de extracción para obtener los aceites

esenciales. Finalmente se pesaron los aceites esenciales y se almacenaron en viales de vidrio transparentes previamente rotulados.

Para todos los aceites se calculó el porcentaje de rendimiento empleando la siguiente fórmula:

$$\%AE_s = \left(\frac{PAE_s}{PV} \right) 100$$

Dónde:

PAE_s= Peso de los aceites esenciales obtenidos

PV= Peso fresco del material vegetal extraído



Figura 7. Esquema del proceso para realizar la extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor. Tomado y modificado de Zamora (2012).

5. Cultivo de *Drosophila melanogaster*

Se emplearon adultos de *Drosophila melanogaster* que se mantienen en cultivo en el Laboratorio de Etnobotánica del Centro de Investigaciones Biológicas, UAEH.

Los insectos permanecieron en frascos con medio de cultivo, el cuál se preparó de la siguiente manera: para 300 ml de medio se disolvieron 40 g de fécula de maíz en 50 ml de agua fría y se añadió a 250 ml de agua con 8 g de agar-agar Bioxon® y 40 g de jarabe de maíz previamente calentado y disuelto. Se revolvió hasta que hirvió y se obtuvo una mezcla espesa. Posteriormente en tres frascos de vidrio de 250 ml de capacidad se vertieron 100 ml de ésta mezcla y se esperó a que enfriaran a temperatura ambiente. Una vez fría la mezcla, se agregó levadura en la capa superior del medio y se inocularon los frascos con *D. melanogaster*. Finalmente se cerraron con tapones de hule espuma. Este procedimiento se llevó a cabo cada dos semanas para proporcionar alimento nuevo.

6. Cultivo de *Sitophilus zeamais*

En frascos de vidrio de dos litros, se colocó a la mitad de su capacidad maíz pozolero (*Zea mays*) limpio, posteriormente se introdujeron adultos de *Sitophilus zeamais*, provenientes de un cultivo que se mantiene en el Laboratorio de Etnobotánica del Centro de Investigaciones Biológicas, UAEH y se cerraron con tapaderas de metal con orificios pequeños para evitar que escaparan los insectos.

Se realizaron cambios de maíz pozolero cada mes para proporcionarles alimento. Se separaron los insectos de los residuos de maíz con ayuda de un colador. Inmediatamente se depositaron los insectos de forma manual dentro de los frascos con maíz nuevo y se cerraron.

7. Evaluación del efecto insectistático de los aceites esenciales de *Hedeoma drummondii*

De acuerdo con la metodología de Cázares (2006), en tubos de ensayo de 7.4 cm de longitud se introdujeron cuatro adultos de *D. melanogaster* previamente anestesiados con éter etílico, se cerraron con una tapadera de hule espuma y se esperó alrededor de 3 minutos para que los insectos se recuperaran de la anestesia y presentaran movilidad normal.

Se alargaron capilares y se tararon para tomar una alícuota de los aceites esenciales (Figura 8). Se pesaron 0.5, 1 y 2 mg de aceites esenciales provenientes de *H. drummondii* proveniente de los tratamientos subcultivados con 2 mg L⁻¹ de BA y 1 mg L⁻¹ de 2iP subcultivados así como de los provenientes del pulso hormonal y de las plantas silvestres.

Posteriormente los aceites se impregnaron en tiras de papel filtro de 6.5 cm de largo por 0.5 cm de ancho y se introdujeron en los tubos de ensayo con los insectos. A partir de ese momento se observaron a los insectos durante 20 minutos. Cada concentración se ensayó por triplicado más un tubo sin aceite como testigo de cada una y se evaluó el porcentaje de mortalidad.

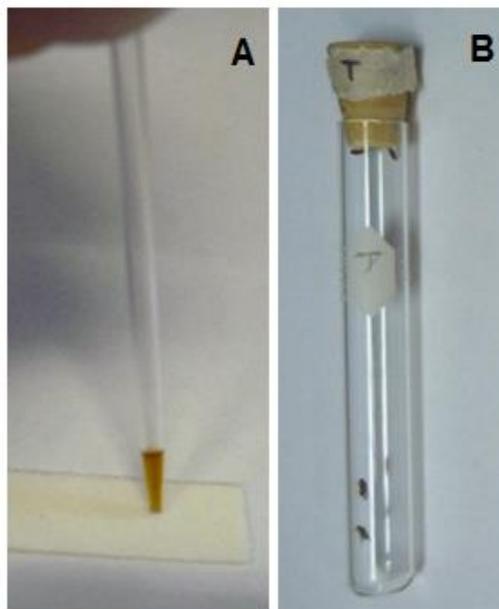


Figura 8. A. Aceite esencial de *Hedeoma drummondii* impregnado en tiras de papel filtro. B. Tubo de ensayo usado en pruebas con *Drosophila melanogaster*.

8. Evaluación de la mortalidad y emergencia con el polvo de *Hedeoma drummondii*, así como la pérdida de peso del maíz

Se deshidrataron las plantas de *H. drummondii* silvestre, de los tratamientos con 2 mg L⁻¹ de BA y 1 mg L⁻¹ de 2iP subcultivados y provenientes del pulso hormonal, en estufa a 50°C durante 48 horas y se pulverizaron en un mortero de porcelana inerte (Figura 9).



Figura 9. A. *Hedeoma drummondii* seca. B. Plantas pulverizadas usadas en las pruebas con *Sitophilus zeamais*.

Con base en la metodología de Lagunes y Rodríguez (1989), se colocaron 100 g de maíz en frascos de 200 ml de capacidad, posteriormente se agregó 1 g de polvo de *H. drummondii* y se revolvió con el maíz.

Para realizar las pruebas con polvo se seleccionaron insectos adultos, ya que en etapa larval se encuentran dentro de los granos de maíz lo cual dificulta su manejo (García, 2004).

Los frascos se infestaron con 20 individuos adultos de *S. zeamais*, 10 hembras y 10 machos, que fueron sexados de acuerdo con la diferencia en la longitud, grosor y textura del rostrum propuesta por Halstead (1963). Cada tratamiento se ensayó por triplicado con un grupo testigo (maíz e insectos).

Las variables que se evaluaron fueron:

- Porcentaje de mortalidad, evaluado después de 15 días, se empleó la fórmula de Abbott (1925):

$$\% \text{ Mortalidad corregida} = \frac{(X - Y)}{Y} \times 100$$

Dónde:

X= Porcentaje de insectos vivos en el testigo

Y= Porcentaje de insectos vivos en el tratamiento

- Emergencia de adultos, que se refiere al número de insectos adultos que emergieron de los granos de maíz a los 55 días de haber sido infestados con *S. zeamais*. Se consideró como 100% el número de insectos que emergieron en el grupo testigo, se empleó la fórmula descrita por Aguilera (2001):

$$\% \text{ de Emergencia} = \frac{Etr}{Ete} \times 100$$

Dónde:

Etr=Emergencia en el tratamiento

Ete=Emergencia en el testigo

- Pérdida de peso del maíz, se registró la diferencia del peso del maíz antes de ser tratada con el polvo (100 g) y al finalizar el experimento.

9. Análisis de resultados

Con el objetivo de evaluar el efecto insecticida-insectistático de los aceites esenciales y polvo de *H. drummondii* en *D. melanogaster* y *S. zeamais* se utilizaron medidas de tendencia central (promedio), de dispersión (error estándar), análisis de varianza y una comparación múltiple de medias de Tukey. Para comprobar la normalidad de la distribución de los valores de la mortalidad y emergencia, se utilizaron pruebas de bondad de ajuste, como Shapiro-Wilk. Los análisis se realizaron con el programa Sigma Plot 13.0™ y las gráficas fueron elaboradas con el programa Microsoft Excell 2013®.

Todas las fases anteriormente mencionadas se representan en la Figura 10.

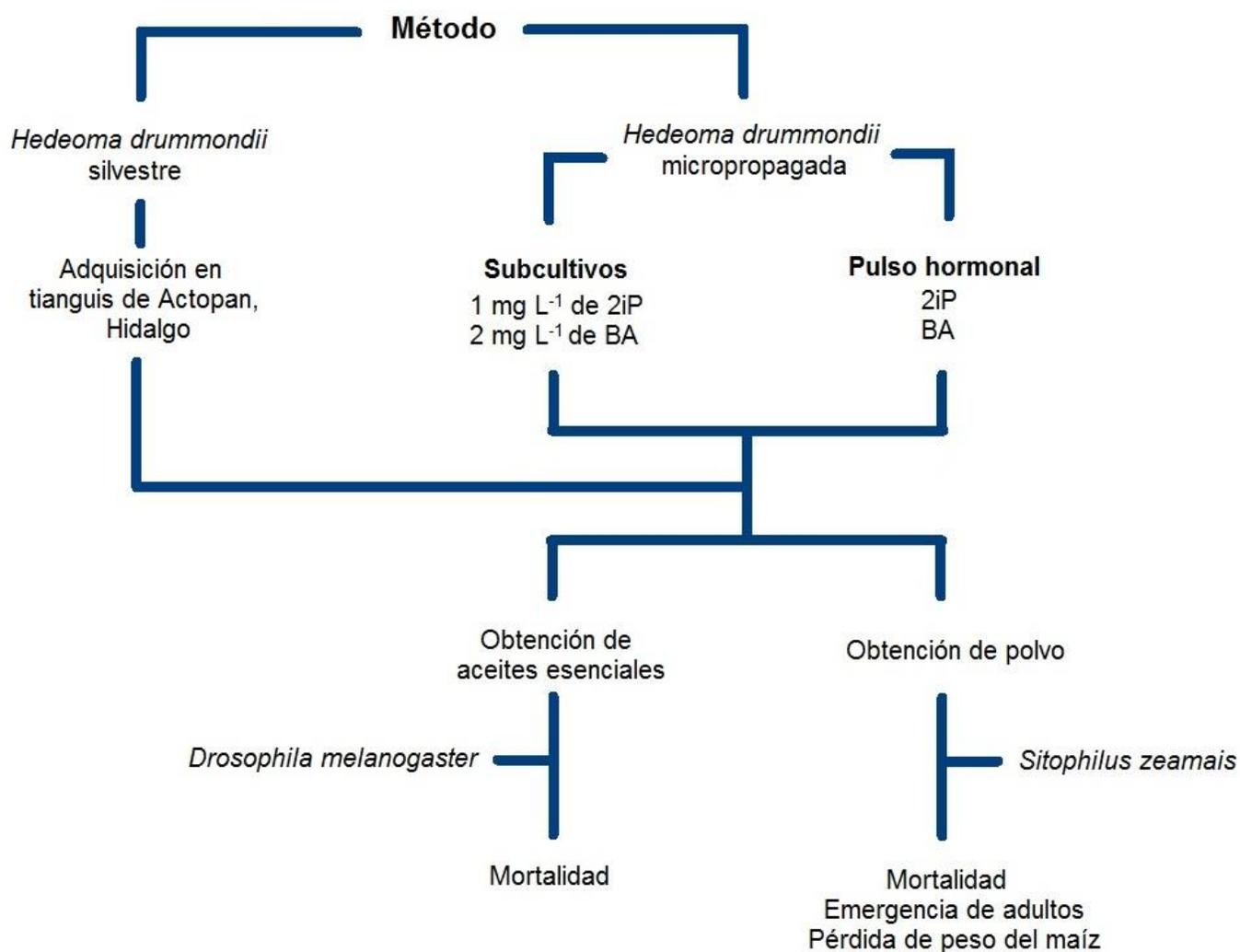


Figura 10. Diagrama general del método utilizado para realizar pruebas de mortalidad, emergencia de adultos y pérdida de peso al aplicar aceites esenciales y polvo de *Hedeoma drummondii* provenientes de plantas micropropagadas con o sin pulso de fitoregulator y de la planta silvestre.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Rendimiento de los aceites esenciales

Una vez que se realizaron las extracciones de los aceites esenciales por arrastre de vapor, se obtuvieron distintos rendimientos dependiendo del tratamiento del que provienen (Cuadro 2).

Cuadro 2. Rendimiento porcentual de los aceites esenciales de *Hedeoma drummondii* silvestre y procedente de los distintos tratamientos con los fitorreguladores 2- isopentil adenina (2iP) y bencil adeninapurina (BA).

Tratamiento (mg L ⁻¹)	Cantidad de planta (g)	Cantidad de aceite (g)	Rendimiento de aceites (%)
1 2iP	30	0.028	0.09
2 BA	30	0.029	0.10
1 2iP con pulso hormonal	30	0.098	0.33
2 BA con pulso hormonal	30	0.031	0.10
Silvestre	30	0.094	0.31

Numéricamente, el tratamiento con un pulso hormonal de 1 mg L⁻¹ de 2iP obtuvo el mayor rendimiento (0.33%), seguida de la planta silvestre con 0.31%. Zamora (2012) registró el 0.33% de rendimiento de aceites esenciales para la planta silvestre, 0.02% más que lo reportado en el presente trabajo, que es un valor porcentual bajo y nos muestra que la planta silvestre mantiene sus proporciones de aceites esenciales.

Lo anterior nos indica que es posible proporcionar a las plantas ya establecidas *in vitro* a través de un nuevo estímulo hormonal (pulso) el incremento, en este caso, de la producción de los aceites esenciales, como se observó en el rendimiento porcentual obtenido (0.33%), muy similar al de la planta silvestre (0.31%) (Cuadro 2).

De manera general, se han realizado estudios sobre el efecto del pulso hormonal aplicado a diferentes especies con el fin de incrementar el número de

brotos como Ramírez-Malagón *et al.*(2008) quienes llevaron a cabo la propagación de *Agave tequilana* por medio de tratamientos con pulsos a diferentes concentraciones de 2,4-D durante 1, 3 y 6 días, aquellos explantes que estuvieron expuestos a 1.5 mg L⁻¹ de 2,4-D durante 3 días fueron los que formaron la mayor cantidad de brotes, y al incrementar el tiempo a 6 días, la formación de los brotes disminuyó.

También se han realizado estudios para estimular el enraizamiento de especies como *Gmelina arborea* y *Vaccinium meridionale* a través de pulsos con diferentes fitorreguladores y tiempos de exposición aunque no siempre han resultado exitosos (Yepes, 2006; Rache y Pacheco, 2010).

La biosíntesis de algunos metabolitos secundarios están regulados por el desarrollo de la planta y algún estímulo ambiental tal como es la luz. Algunas enzimas son reguladas por la luz, como la Rubisco (Buchanan *et al.*, 2000), otras como la triptófano descarboxilasa o la estrictosidina sintasa no requieren luz para su inducción (De-Luca *et al.*, 1988), para *H. drumondii* este factor no fue limitante ya que los cultivos se mantuvieron en las mismas condiciones de incubación y no mostraron diferencia con respecto a la planta silvestre.

Jiménez (2006) reportó que cuando las plantas de *Acmella radicans* cultivadas *in vitro* son transferidas a un medio MS fresco, el contenido de alcaloides se incrementa. El subcultivo a medio fresco aunado al estímulo proporcionado por los fitorreguladores pudo haber elevado el rendimiento de los aceites esenciales de *H. drumondii*.

En los resultados obtenidos las plantas procedentes del tratamiento de 1 mg L⁻¹ de 2iP presentó el menor rendimiento (0.09%) comparado con Zamora (2012) que registró un rendimiento de 0.13% para este mismo tratamiento usando 10 g de planta. Esto se contrapone a lo propuesto por Jiménez (2006), debido a que a pesar de haber sido subcultivadas las plantas varias veces el rendimiento de los aceites disminuyó. Probablemente el efecto es más significativo, no tanto por el medio de cultivo, sino por el fitorregulador empleado, debido a que en el tratamiento de 2 mg L⁻¹ de BA subcultivado de manera consecutiva, así como al que se le proporcionó un pulso hormonal, el rendimiento fue el mismo (0.10%) y es similar a lo reportado por

Zamora (2012) donde se señala que el rendimiento de las plantas micropropagadas fue menor que el de la planta silvestre probablemente por el tipo de fitorregulador del que provienen y además por la hiperhidratación del tejido, en este caso, el tratamiento de 1 mg L⁻¹ de 2iP con el pulso hormonal tuvo un rendimiento mayor que la planta silvestre, lo cual indica que posiblemente la cantidad de agua acumulada en las plántulas del tratamiento *in vitro* fue menor, permitiendo que el rendimiento de los aceites no disminuyera.

Se ha registrado el rendimiento de la planta silvestre de *H. drummondii*, Tovar (2007) reportó el 0.30% para aceites esenciales, Zamora (2012) el 0.33% y el presente trabajo el 0.31%; todas estas plantas provienen del municipio de Actopan, Hidalgo, México, y probablemente por ello se explica por qué los rendimientos no varían drásticamente.

Así mismo se ha reportado que plantas silvestres de *Hedeoma piperitum* y *Hedeoma multiflorum* tienen un rendimiento de 2%, y de 2.69-3.89% (Tovar, 2007; Fernández *et al.*, 2007) respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Rendimiento porcentual de aceites esenciales de distintas especies silvestres del género *Hedeoma*, así como de *Hedeoma drummondii* silvestre y tratada con 2- isopentil adenina (2iP) y bencil adeninapurina (BA).

Planta	Cantidad de planta (g)	Cantidad de aceite (g)	Rendimiento de aceites (%)	Autor
<i>Hedeoma multiflorum</i> silvestre	-	-	2.69-3.89	Fernández <i>et al.</i> , 2007
<i>Hedeoma piperitum</i> silvestre	63.00	1.3095	2.00	Tovar,2007
<i>Hedeoma drummondii</i> silvestre	330.00	1.0005	0.30	Tovar,2007
<i>Hedeoma drummondii</i> silvestre	10.17	0.0340	0.33	Zamora, 2012
<i>Hedeoma drummondii</i> 1 mg L ⁻¹ de 2iP	10.65	0.0140	0.13	Zamora, 2012
<i>Hedeoma drummondii</i> 2 mg L ⁻¹ de BA	10.55	0.0110	0.10	Zamora, 2012

La acumulación de los aceites esenciales ocurre en células, órganos y tejidos específicos, además varía en determinadas fases de su ciclo de vida y bajo condiciones estacionales o de estrés (Verpoorte *et al.*, 2002).

2. Evaluación del efecto insectistático de los aceites esenciales de *Hedeoma drummondii*

Aunque este bioensayo está diseñado para evaluar la actividad insecticida de aceites esenciales con ventajas como la obtención de resultados en lapsos de 20 minutos usando pequeñas cantidades de aceite esenciales y simular una aplicación como fumigante (Cázares, 2006), en el presente trabajo no se registraron organismos muertos en ningún tratamiento evaluado.

Regnault-Roger (1997) menciona que la toxicidad de los aceites esenciales depende de factores como el punto de entrada de la toxina, ya que los aceites pueden ser inhalados, ingeridos o absorbidos por el tegumento de los insectos, pudiendo presentar efectos de contacto, fumigación y fagoinhibidor, con esta prueba no se puede corroborar si hay un efecto por contacto, ya que a pesar de que posiblemente los insectos tuvieron contacto con la tira de papel filtro impregnada con los aceites, este contacto no fue por un lapso de tiempo prolongado ni la cantidad de aceites sobre su tegumento fue suficiente para ejercer toxicidad. Tampoco como fagoinhibidor ya que no hubo ingestión del aceite. Sin embargo, se pueden realizar pruebas dirigidas para evaluar si existe o no estos efectos.

En todas las cantidades de los aceites esenciales se observó el desplazamiento de los insectos a la región del tubo más alejada del aceite esencial impregnado en la tira de papel filtro (Figura 11), excepto en el testigo, lo cual sugiere que podría tener un efecto como repelente.

Santiago *et al.* (2009) evaluaron el efecto repelente en la mosca blanca (*T. vaporariorum*) con los aceites esenciales de canela, naranja dulce, clavo y tomillo y distinguieron tres niveles de repelencia: mínimo (del 0 al 29,9%), moderado (del 30 al 59,9%) y máximo (del 60 al 93%) sus resultados muestran que hay aceites esenciales como el del clavo (*E. caryophyllata*) y naranja (*C. sinensis*) que provocaron la leve y nula repelencia, respectivamente. Aunque también hay trabajos

como el de Choi *et al.*, (2003, citado por Santiago, 2009) que reportan que tanto el aceite esencial de clavo como el de tomillo a concentraciones de $0,0023 \text{ mL} \cdot \text{mL}^{-1}$ de aire causaron mortalidad en adultos de mosca blanca en el 90 y el 100%, respectivamente. Lo que indica que el efecto insectistático e insecticida que se le atribuye a una planta varía dependiendo del tipo de compuestos presentes en los aceites esenciales, el efecto sinérgico que puedan presentar estos compuestos, dosis (Ramírez *et al.*, 2010), tiempo de exposición y tipo de insectos blanco. En este caso los aceites de *H. drummondii* sugieren un efecto insectistático sobre *D. melanogaster*.

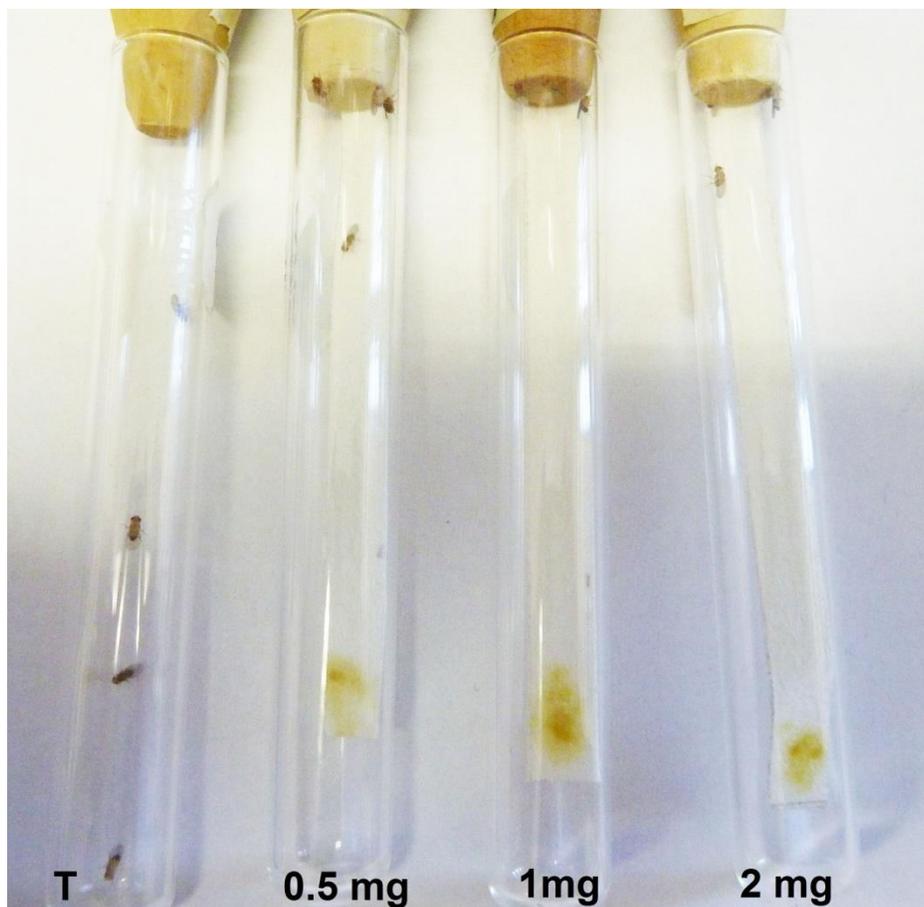


Figura 11. Adultos de *Drosophila melanogaster* replegados en el extremo opuesto donde se encuentran los aceites esenciales de *Hedeoma drummondii*, mientras que en el testigo (T) los insectos se encuentran distribuidos a lo largo del tubo de ensayo. Esta respuesta indica que los aceites pueden tener un efecto repelente.

Al aplicar las diferentes concentraciones de los aceites de *H. drummondii* se observaron movimientos anormales de alas y patas traseras, algo similar reporta Cázares (2006) que indica que los aceites esenciales de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*, *Parthenium hysterophorus*, *Tagetes erecta*, *Zaluzania triloba* y *Liquidambar macrophylla* afectan el comportamiento de *D. melanogaster* provocando caídas repentinas, movimientos anormales o convulsivos, ovoposición y otros efectos que podrían ser producto de la volatilización de los compuestos de los aceites esenciales, los cuales afectan el sistema nervioso de los insectos, esto puede indicar que los aceites esenciales de *H. drummondii* podrían provocar cierto grado de intoxicación en *D. melanogaster* pero no lo suficiente como para provocarles la muerte.

Ramírez *et al.* (2010), evaluaron el efecto de aceites esenciales de *Ocimum basilicum*, *Origanum mejorana*, *Origanum vulgare*, *Mentha piperita*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris* y *Pogostemon cablin* en el desarrollo larval de *Tecia solanivora*, encontrando que no existe ningún efecto de los tratamientos sobre el desarrollo larval ni sobre la longevidad de los adultos, pero la viabilidad de los huevos se reduce significativamente al aplicar aceites de *P. cablin* y *T. vulgaris* al 0.25% , por lo que existe la posibilidad de que lamiáceas como *H. drummondii* puedan tener un efecto similar.

Es importante señalar que el efecto que pueden tener los aceites esenciales está relacionado en gran medida con la etapa del ciclo de vida de cada organismo. En 2012, Suazo *et al.* realizaron la evaluación de la actividad insecticida del aceite esencial de hojas de *Lepechinia chamaedryoides* en larvas de *D. melanogaster* en estado II, reportaron una CL₅₀ de 0.46% v/v y CL₉₀ de 0.77% v/v, además observaron cambios en las larvas de estado III como oscurecimiento de cutícula, aumento de volumen de los organismos, fragmentación de las glándulas salivales, diferencias en los tubos de Malpighi y discos marginales, variaciones en el aspecto de organelos tales como mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplasmático rugoso.

En este estudio se emplearon individuos adultos de *D. melanogaster*, por lo que posiblemente los aceites de *H. drummondii* pueden tener algún efecto más

evidente en otra etapa de su ciclo de vida. Se sabe que las respuestas de los insectos a los metabolitos secundarios de las plantas varía enormemente, y que la sensibilidad de distintas especies de insectos puede ser muy diferente para una misma sustancia (Regnault-Roger, 1997), por lo cual es posible que existan otras especies de insectos más sensibles a los compuestos de los aceites esenciales de *H. drummondii* y que éstos actúen de una manera más eficiente que en *D. melanogaster*.

3. Evaluación de la mortalidad y emergencia con el polvo de *Hedeoma drummondii*, así como la pérdida de peso del maíz

Después de 15 días de iniciado el experimento con granos de maíz, colocando en el mismo recipiente *Sitophilus zeamais* y el polvo de *H. drummondii*, se contabilizó el número de insectos vivos y muertos, se calculó el porcentaje de mortalidad. La emergencia de adultos y la pérdida de peso del maíz fueron evaluadas a los 55 días.

a. Porcentaje de mortalidad

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($F=22.01$; g.l.=17; $p<0.05$) entre los tratamientos, siendo las plantas micropropagadas provenientes del tratamiento 1 mg L^{-1} de 2iP y sometidas al pulso hormonal, las que registraron el mayor porcentaje de mortalidad (54.24%), seguido de la planta silvestre con 38.98%, 1 mg L^{-1} de 2iP con 22.03%, 2 mg L^{-1} de BA con 20.34%, 2 mg L^{-1} de BA más el pulso hormonal con 14.12%, mientras que el testigo sólo registró 1.67% siendo el de menor mortalidad (Figura 12).

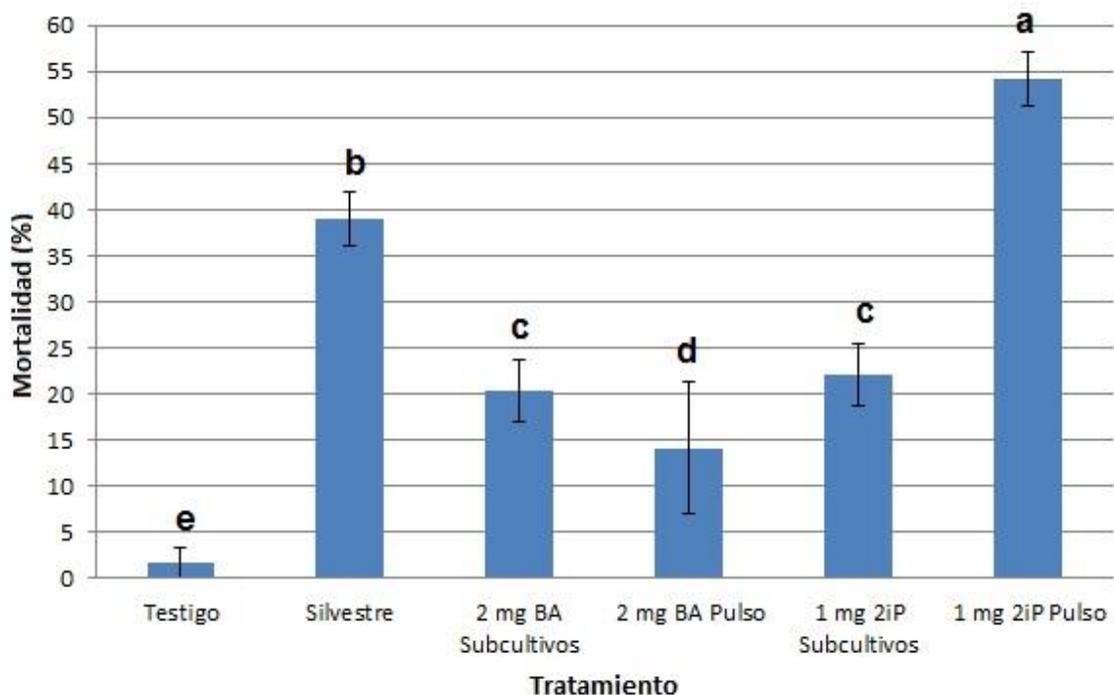


Figura 12. Porcentaje de mortalidad de *Sitophilus zeamais* registrado 15 días después de haber sido tratados con polvo de *Hedeoma drummondii* silvestre y micropropagada con 2 mg L⁻¹ de bencil adeninapurina (BA), 1 mg L⁻¹ de 2- isopentil adenina (2iP), así como de sus respectivos pulsos hormonales. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Estos resultados son comparables con los reportados por Salvadores *et al.* (2007) donde se realizó la evaluación de las propiedades insecticidas/ insectistáticas de polvo de nueve especies aromáticas para el control de *S. zeamais* en trigo almacenado. Dentro de los criterios que evaluaron se encuentra el porcentaje de mortalidad, una de las especies evaluadas fue *Origanum vulgare*, comúnmente conocida como “orégano”, perteneciente a la familia Lamiaceae, que a una concentración del 1% registró un 63.0% de mortalidad a los 15 días de haberse montado el experimento. Silva *et al.* (2005) evaluaron el polvo de 23 plantas para el control de *S. zeamais*, dentro de las cuales se encuentra *Mentha piperita* que al 1% de concentración reportó 0% de mortalidad. Lo que nos indica el efecto selectivo que pueden tener los extractos en función de la especie (Cuadro 5).

.En nuestro objeto de estudio fue posible observar que las plantas silvestres de *H. drummondii* contienen *per se* un efecto importante en el porcentaje de mortalidad (38.98 %) y que este se hace más eficiente o se potencia al recibir un estímulo con los fitorreguladores, registrando 54.24 %.

b. Porcentaje de emergencia

A los 55 días, se registró el porcentaje de insectos adultos que emergieron, tomando como 100% el número de aquellos que emergieron en el grupo testigo.

El tratamiento con 2 mg L⁻¹ de BA (95.55%) no presentó diferencias significativas con el grupo testigo (F=22.70; g.l.=17; p<0.05). Por otra parte, los tratamientos con planta silvestre (48.33%) y 2 mg L⁻¹ de BA más el pulso hormonal (62.83%) difieren estadísticamente, mientras que los tratamientos con 1 mg L⁻¹ de 2iP (17.85%) y 1 mg L⁻¹ de 2iP más el pulso hormonal (13.01%) obtuvieron los menores porcentajes de emergencia siendo estadísticamente iguales (Figura 13).

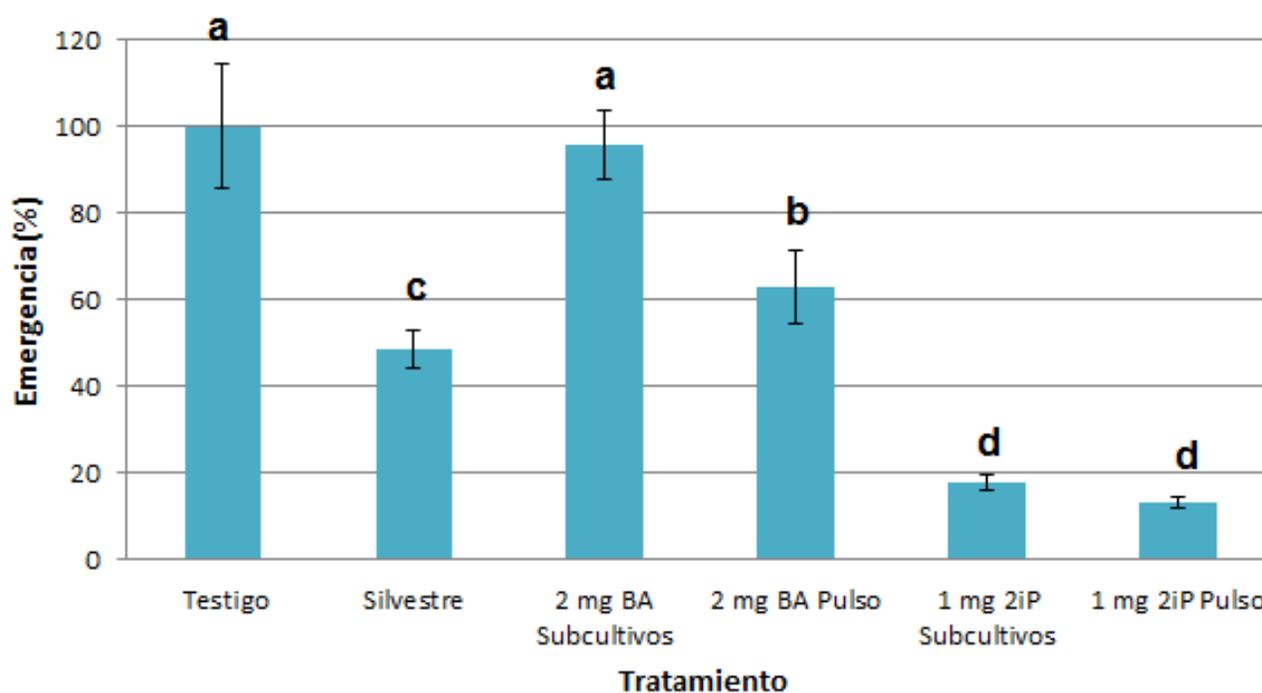


Figura 13. Porcentaje de emergencia de insectos adultos de *Sitophilus zeamais* después de 55 días de haber montado el experimento con polvo de *Hedeoma drummondii* silvestre y micropropagada con distintas cantidades de bencil adeninapurina (BA) y de 2- isopentil adenina (2iP). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

Silva *et al.* (2003) reportan porcentajes de emergencia diversos, en donde se muestra un control parcial del insecto con *Marrubium vulgare* con el 80.7% de emergencia, en cambio con *Mentha piperita* se registró un mejor control 22.20% (Silva *et al.*, 2005) (Cuadro 5).

En *H. drumondii* el estímulo con los fitorreguladores es evidente y se ve reflejado en el control que ejerció el compuesto secundario en el porcentaje de emergencia, 1 mg L⁻¹ de 2iP (17.85%) y este se ve superado (13.01 %) cuando a los brotes se les proporcionó un pulso hormonal con la misma concentración.

Este efecto no se vio reflejado en los brotes que provenían del tratamiento con BA, probablemente a que BA es una citocinina sintética y 2iP es natural.

Se tiene conocimiento de que hay algunas proteínas específicas que se unen a los reguladores de crecimiento y que actuarían como receptores. Varias proteínas ligantes de auxinas (ABPs) han sido halladas en diferentes partes de la célula tales como el retículo endoplásmico, la membrana plasmática, el núcleo y también como ABPs solubles (Jones, 1994 citado por Jordán y Casaretto, 2006), la incorporación de la auxina exógena probablemente tenga un efecto sinérgico con la auxina endógena y de cómo resultado un metabolito secundario eficiente para el control de este insecto.

c. Pérdida de peso

Finalmente, a los 55 días se pesó el maíz y se obtuvo el porcentaje de pérdida de peso, numéricamente se encontró que el tratamiento de 1 mg L⁻¹ de 2iP más el pulso hormonal fue el que perdió menos peso (2.47%), seguido del tratamiento 1 mg L⁻¹ de 2iP (3.79%), la planta silvestre (4.15%), los tratamientos con 2 mg L⁻¹ BA (5.37%) y 2 mg L⁻¹ de BA con el pulso hormonal (5.23%) y finalmente el testigo (5.69%) (Cuadro 4), esto puede deberse posiblemente a la mortalidad temprana de los insectos con una consecuente menor ovoposición por grano (Martínez *et al.*, 2013)

Cuadro 4. Porcentaje de pérdida de peso del maíz utilizado en las pruebas con polvo de *Hedeoma drummondii* silvestre y micropropagada sobre *Sitophilus zeamais* a los 55 días.

Tratamiento (mg L ⁻¹)	Pérdida de peso (%)
1 2iP	3.79
2 BA	5.37
1 2iP con pulso hormonal	2.47
2 BA con pulso hormonal	5.23
Silvestre	4.16
Testigo	5.69

Silva *et al.* (2003) evaluaron también la pérdida de peso del grano de maíz, emplearon el polvo de siete plantas medicinales, de las cuales tres pertenecen a la familia Lamiaceae: *Marrubium vulgare*, *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis*. Estos autores reportan que usando una concentración del 1 % de polvo de las plantas mencionadas se obtuvo 4.6% ,2.9% y 3.3% de pérdida de peso respectivamente (Cuadro 5).

En *H. drummondii* la pérdida de peso fue menor en el polvo procedente de brotes subcultivados en 1 mg L⁻¹ de 2iP con y sin el pulso hormonal con (2.47% y 3.79%) respectivamente. Lo que reitera el efecto del fitorregulador.

De acuerdo con Weaver y Subrbamanyam (2000), la forma más sencilla para usar compuestos de plantas en la protección de granos almacenados es en forma de polvo, el cual se obtiene secando las plantas, moliéndolas y mezclándolas con los granos.

Los polvos pueden actuar como insecticidas de contacto, sustancias antialimentarias, agentes morfogenéticos, sustancias repelentes o sustancias atrayentes (Lagunes, 1994). En este trabajo pudieron actuar tanto como insecticidas de contacto como sustancias antialimentarias, de acuerdo con los porcentajes de mortalidad obtenidos y por el porcentaje de pérdida de peso de los granos de maíz.

Cuadro 5. Porcentajes de mortalidad, emergencia de adultos de *Sitophilus zeamais* y pérdida de peso de los granos tratados con polvo de distintas plantas de la familia Lamiaceae.

Planta	Nombre común	Concentración (%)	Mortalidad (%)	Emergencia (%)	Pérdida de peso (%)	Autor
<i>Marrubium vulgare</i>	Toronjil cuyano	1	2.2	80.7	4.6	Silva <i>et al.</i> , 2003
<i>Melissa officinalis</i>	Melisa	1	1.1	45.2	2.9	Silva <i>et al.</i> , 2003
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero	1	10.0	48.5	3.3	Silva <i>et al.</i> , 2003
<i>Mentha piperita</i>	Menta	1	0.00	22.20	12.70	Silva <i>et al.</i> , 2005
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	1	63.0	39.0	4.7	Salvadores <i>et al.</i> , 2007

La mortalidad de los insectos puede deberse a los compuestos que presenta *H. drummondii*, como la pulegona y la mentona (Zamora, 2012), sin embargo, la probabilidad de que dos extractos de plantas tengan las mismas concentraciones de elementos o compuestos es baja (Silva, 2002). Además existe la posibilidad de que haya variaciones entre poblaciones e individuos (Zamora, 2012).

La producción de metabolitos secundarios, provenientes de cultivo de células vegetales, puede variar por factores químicos y físicos como los componentes del medio de cultivo, fitohormonas, pH, temperatura, aireación, agitación y luz (Mulabagal y Tsay, 2004; Lee y Shuler, 2000). La manipulación de los aspectos físicos es fundamental en la optimización de la productividad del cultivo, bajo condiciones específicas las células de cultivo de tejidos pueden acumular grandes cantidades de compuestos secundarios (Mulabagal y Tsay, 2004).

De acuerdo con los resultados de Zamora (2012), las plántulas de *Hedeoma drummondii* provenientes de distintos tratamientos hormonales presentan diferencias en los porcentajes de compuestos secundarios. En este caso, las fitohormonas de las cuales provienen las plantas micropropagadas (2iP y BA) presentan diferencias estadísticas en cuanto a la mortalidad, emergencia y pérdida de peso, siendo 2iP la que mejores resultados obtuvo.

Es importante señalar que sería conveniente realizar la aclimatización de las plantas para completar todas las etapas de la micropropagación y evaluar si persisten los aceites esenciales, aunque existe la posibilidad de que los resultados varíen ya que las plantas estarían sometidas a condiciones ambientales y nutricionales distintas a las que se encuentran dentro del ambiente *in vitro*.

VII. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados, el rendimiento porcentual de los aceites esenciales fue mayor en el tratamiento de 1 mg L⁻¹ de 2iP más el pulso hormonal que en la planta silvestre y los demás tratamientos *in vitro*.

Los aceites esenciales de *H. drummondii* mostraron un efecto repelente en *D. melanogaster*, el cual podría ser más contundente a mayores concentraciones.

En este estudio se emplearon individuos adultos de *D. melanogaster*, por lo que posiblemente los aceites de *H. drummondii* pueden tener algún efecto más evidente en otra etapa de su ciclo de vida.

H. drummondii, tanto micropropagada como silvestre, presenta actividad insectistática e insecticida sobre *S. zeamais* a una concentración de 1%.

Se puede proponer al tratamiento *in vitro* con un 1 mg L⁻¹ de 2iP con el pulso hormonal y a la planta silvestre como una alternativa para el control de *S. zeamais*.

La micropropagación brinda la posibilidad de obtener suficiente biomasa para extraer compuestos secundarios que pueden ser utilizados para el control de insectos.

Estas técnicas permiten la conservación *in situ* como *ex situ* de material vegetal valioso que se encuentra en riesgo de ser sobreexplotada por su valor como planta útil.

Se comprobó que los compuestos secundarios persisten en plantas micropropagadas y que tienen un efecto similar o superior al de la planta silvestre.

El presente trabajo puede ser una guía para el uso de plantas micropropagadas de la familia Lamiaceae u otras que podrían tener un efecto insecticida- insectistático.

VIII. ANEXO

Preparación de medio MS (Murashige y Skoog, 1962).

ELEMENTOS	CONCENTRACIÓN (g L ⁻¹)	
	MS 100%	MS 50%
MACRONUTRIENTES		
NH ₄ NO ₃	1.65	0.825
KNO ₃	1.9	0.95
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.37	0.185
KH ₂ PO ₄	0.17	0.085
CaCl₂	0.44	0.22
MICRONUTRIENTES		
KI	0.00083	0.000415
H ₃ BO ₃	0.0062	0.0031
MnSO ₄ H ₂ O	0.01689	0.008445
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.0086	0.0043
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.00025	0.000125
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.000025	0.0000125
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.000025	0.0000125
Sol Fe		
Na ₂ EDTA	0.0373	0.01865
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.0278	0.0139
INOSITOL	0.1	0.05
VITAMINAS		
Ácido nocotínico	0.0005	0.00025
Piridoxina-HCl (B6)	0.0005	0.00025
Tiamina-HCl (B1)	0.0001	0.00005
GLICINA	0.002	0.001
SACAROSA	30 g	15 g
AGAR	8 g	8 g
pH	5.7-5.8	5.7-5.8

La esterilización del medio de cultivo se realizó en una autoclave a 121° C y 1.5 Lb. de presión durante 18 minutos.

IX. LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. 1925. **A method of computing the effectiveness of an insecticide.** Journal of Economic Entomology. (18): 265-267.
- Aghel, N., Y. Yamini, A. Hadjiakhoondi y S. M. Pourmortazavi. 2004. **Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium* L. essential oil.** Talanta. 62 (2): 407-411.
- Agrelo, N., A. E. Ricciardi, G. A. L. Torres, A. M. Ricciardi y I. A. Armando. 2004. **Contenido en pulegona de la infusión de *Mentha pulegium* L.** Resumen: E-060. Universidad Nacional del Nordeste. 3 p.
- Aguilera, M. 2001. **Estudios de efectividad biológica con plagas de granos almacenados.** En: Bautista, N. y Y. O. Díaz (Eds.). Bases para realizar estudios de efectividad biológica de plaguicidas. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco, México. 43-50.
- Ahmed, S. y M. Grainge. 1986. **Potential of the Neem tree (*Azadirachta indica*) for pest control and rural development.** Economic Botany 40 (2): 201-209.
- Ávalos, A. y E. Pérez-Urria. 2009. **Metabolismo secundario de plantas.** Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3):119-145.
- Balandrin, M. y J. A. Klocke. 1988. **Medicinal, aromatic and industrial materials from plants.** En: Bajaj Y. P. S. (Ed.) Biotechnology in agriculture and forestry. Medicinal and aromatic plant. Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg: 1-36.
- Bejarano, F. 2007. **El 2,4-D, de arma química a campeón de ventas para las corporaciones transnacionales.** En: Bejarano, F. (Ed.). 2,4-D Razones para su prohibición mundial. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México (RAPAM). México. 5-18.
- Boulogne, I., P. Petit, H. Ozier-Lafontaine, L. Desfontaines y G. Loranger-Merciris. 2012. **Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review.** Environmental Chemistry Letters. 10 (4): 325–347.
- Buchanan, B. B., W. Gruissem y R. L. Jones. 2000. **Biochemistry and molecular biology of plants.** American Society of Plant Physiologist. Rockville, Maryland. 456-527.

- Burt, S. 2004. **Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review**. International Journal of Food Microbiology. 94 (3): 223-253.
- Calle, J., A. M. Espinosa, C. P. Núñez, E. Bautista y R. Pinzón. 2004. **Actividad insecticida del aceite esencial de *Mintostachys mollis* (HBK) Griseb y sus componentes**. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas. 33 (2): 137-144.
- Çalmaşur, Ö., I. Aslan y F. Şahin. 2006. **Insecticidal and acaricidal effect on three Lamiaceae plant essential oils against *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn**. Industrial Crops and products. 23 (2): 140-146.
- Castañeda, L., M. E. Heres e I. E. Dueñas. 2008. ***Drosophila melanogaster* un modelo experimental**. Universidad Nacional Autónoma de México. 86 p.
- Cázares, J. 2006. **Actividad en *Drosophila melanogaster* y *Sitophilus zeamais* (Insecta) de aceites esenciales de plantas usadas para combatir insectos en Hidalgo**. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 108 p.
- De-Luca, V., J. Álvarez-Fernández, D. Campbell y W. G. W. Kurz. 1988. **Developmental regulation of enzymes of índole alkaloide**. Biosynthesis in *Catharanthus roseus*. Plant Physiology. 86 (2): 447-450.
- Díaz, M. S., A. C. Figueroa, L. Palacio y M. E. Goleniowski. 2010. **“In vitro” *Hedeoma multiflorum* Benth propagation in response to different nutritional conditions**. Molecular Medicinal Chemistry. 21 (1): 17-20.
- Domínguez, X. A. 1979. **Métodos de investigación fitoquímica**. Limusa. México. 281 p.
- Durán, D. C., L. A. Monsalve, J. R. Martínez y E. E. Stashenko. 2007. **Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *Lippia alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia, y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite**. Scientia et Technica. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia. 1 (33): 325-438.
- Espitia, C. R. 2011. **Evaluación de la actividad repelente e insecticida en aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas (*Cymbopogon citratus* y**

- Tagetes lucida*) utilizados contra *Tribolium castenum* Herbst. (Coleóptera: Tenebrionidae).** Tesis de Magíster en toxicología. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. 61 p.
- Fernández, E. A., E. Martínez, M. A. Juárez, M. A. Elechosa, A. M. Molina, C. M. van Baren, P. Di Leo Lira y A. L. Bandoni. 2007. **Estudio del aceite esencial de *Hedeoma multiflorum* Benth. (Lamiaceae) “peperina de las lomas” obtenido de poblaciones naturales en la provincia de San Luis, Argentina.** Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 6 (5): 246-247.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller y K. Ojima. 1968. **Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells.** Experimental Cell Research 50 (1): 151-8.
- García, S. 2004. **Mapa genético de las características del maíz tropical (*Zea mays* L.) asociadas con la resistencia a la plaga de almacenamiento, *Sitophilus zeamais* Motsch.(Coleoptera: Curculionidae).** Tesis de Doctorado en Biología Experimental. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México. 116 p.
- Gil, M. 1995. **Estudio etnobotánico de la flora aromática y medicinal del término municipal de Cantalojas (Guadalajara).** Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. España. 369 p.
- Halstead, D. G. H. 1963. **External sex differences in stored-products Coleoptera.** Bulletin of Entomological Research. 54 (1): 119-134.
- Harborne, J. B. 1997. **Biochemical plant ecology.** En: Dey, P.M. y J.B. Harborne (Eds.) Plant biochemistry. Academic Press. 503-516.
- Harborne, J.B. 1980. **Phytochemical methods.** Chapman and Hall. Londres. 278 p.
- Harley, R. M, S. Atkins, A. L. Budantsev, P. D. Cantino, B. J. Conn, R. Grayer, M. M. Harley, R. De Kok, T. Krestovskaja, R. Morales, A. J. Paton, O. Ryding y T. Upson. 2004. **Labiatae.** En: Kubitzki K. y J. W. Kadereit (Eds.) Labiatae. The families and genera of vascular plants VII. Flowering plants dicotyledons: Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae). Springer. 167-275.

- Hartmann, T. 2007. **From waste products to echochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism.** Phytochemistry. 68: 2831-2846.
- Iannacone, J. y G. Lamas. 2003. **Efecto insecticida de cuatro extractos botánicos y del cartap sobre la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae), en el Perú.** Entomotropica. 18 (2): 95-105.
- Irving, R. S. 1970. **Novelties in Hedeoma (Labiatae).** Brittonia. 22 (4): 338-345.
- Jiménez, F. B. M. 2006. **Cuantificación de alcanidas en *Acmella radicans* Jacquin R. K. Cansen (Asteraceae) durante su crecimiento in vitro.** Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH. México. 45 p.
- Jordán, M. y J. Casaretto. 2006. **Hormonas y reguladores del crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas.** Capítulo XV En: Squeo, F.A. y L. Cardemil (Eds.). Fisiología Vegetal. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile. 28 p.
- Koliantz, G. y D. B. Szymanski. 2009. **Transmission genetics (Heredity).** En: Koliantz, G. y D. B. Szymanski (Eds.). Genetics a laboratory manual. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America. 62-76.
- Lagunes, A. 1994. **Extractos de polvos vegetales y polvos minerales para el combate de plagas de maíz y del frijol en la agricultura de subsistencia.** Colegio de Postgraduados/USAID/CONACYT/BORUCONSA. 35 p.
- Lagunes, A. y C. Rodríguez. 1989. **Búsqueda de tecnología apropiada para el combate de plagas del maíz almacenado en condiciones rústicas.** CONACYT/Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 150 p.
- Lamiri, A., S. Lhaloui, B. Benjilali y M. Berrada. 2001. **Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say).** Field Crops Research. 71 (1): 9-15.
- Lee, C. y M. Shuler. 2000. **The effect of inoculum density and conditioned médium on the production of ajmalicine and catharanthine from immobilized *Catharanthus roseus* cells.** Biotechnology and bioengineering. 67 (1): 61-71.

- Lee, S., C. J. Peterson y J. R. Coats. 2003. **Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects**. Journal of Stored Products Research. 39 (1): 77–85.
- Leyva, M., M. del C. Marquetti, J. E. Tacoronte, R. Scull, O. Tiomno, A. Mesa, D. Montada. 2009. **Actividad larvicida de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae)**. Revista Biomédica. 20: 5-13.
- Lloyd, G. B. y B. H. McCown. 1980. **Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture**. En: Proceedings of the International Plant Propagation Society. 30: 421-421.
- Longstaff, B. C. 1981. **Biology of the grain pest species of the genus *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae): A critical review**. Protection Ecology. 3 (2): 83-130.
- López, E. A. L. y L. P. Olgún. 2013. **El cultivo de tejidos vegetales como un método de propagación**. En: Márquez, J. M. Collazo, M. Gordillo, A. Orozco, S. Vázquez (Eds.). Capítulo III, Tema XIV. Las plantas y el hombre. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 512-527.
- Luna, D. M. 2010. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato de *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling**. Tesis de Maestría. Universidade de São Paulo. Brasil. 65 p.
- Mahmoud, S. S. y R. B. Croteau. 2002. **Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants**. Trends in Plant Science. 7 (8): 366-373.
- Mareggiani, G. 2001. **Manejo de insectos plaga mediante sustancias semiquímicas de origen vegetal**. Manejo Integrado de Plagas 60: 22-30.
- Martínez, J. A., L. R. D'Antonino y A. Soto. 2013. **Porcentaje de pérdida de masa en granos y efecto tóxico del aceite esencial *Piper aduncum* en *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)**. Boletín científico. Centro de museos. Museo de historia natural. Universidad de Caldas. 17 (1): 81-90.
- Martínez-Gordillo, M., I. Fragoso-Martínez, M. García-Peña y O. Montiel. 2013. **Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo**. Revista Mexicana de Biodiversidad. 84 (1): 30-86.

- Mroginski, L. A. y W. M. Roca. 1991. **Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro***. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. 20-40.
- Mulabagal, V. y H. Tsay. 2004. **Plant cell cultures-An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites**. International Journal of Applied Science and Engineering. 2 (1): 29-48.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. **A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures**. Physiologia Plantarum. 15 (3): 473-497.
- Orihara, Y., J. W. Yang, N. Komiya, K. Koge y T. Yoshikawa. 2002. **Abietane diterpenoid from suspension cultured cells of *Torreya nucifera* var. *radicans***. Phytochemistry. 59 (4): 385-389.
- Pan-UK. 2003. **Current Pesticide Spectrum, Global Use and Major Concerns**, http://www.pan-uk.org/briefing/SIDA_Fil/Chap1.htm (Enero 18, 2003).
- Pascual-Villalobos, M. J. y A. Robledo. 1999. **Anti-insect activity of plant extracts from the wild flora in southeastern Spain**. Biochemical Systematic and Ecology. 27 (1): 1-10.
- Pascual-Villalobos, M. J., M. C. Ballesta-Acosta y A. Soler. 2004. **Toxicidad y repelencia de aceites esenciales en plagas de almacén del arroz**. Boletín de sanidad vegetal. Plagas. 30 (1): 279-286.
- Pérez, D. y J. Iannacone. 2004. **Efecto insecticida de sachá yocco (*Paullinia clavifera* var. *bullata* Simpson) (Sapindaceae) y oreja de tigre (*Tradescantia zebrina* Hort ex Bosse) (Commelinaceae) en el control de *Anopheles benarrochi* Gabaldon, Cova García y López, 1941, principal vector de malaria en Ucayali, Perú**. Ecología aplicada. 3 (1-2): 64-72.
- Pérez-Escandón, B. E., M. A. Villavicencio-Nieto y A. Ramírez-Aguirre. 2003. **Lista de las plantas útiles del estado de Hidalgo**. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 134 p.

- Pimentel, D. 2005. **Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States**. Environment, Development and Sustainability. 7 (2): 229-252.
- Rache L. Y. y J. C. Pacheco. 2010. **Propagación *in vitro* de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae)**. Acta Botanica Brasilica. 24 (4): 1086-1095.
- Rajendran, S. y V. Sriranjini. 2008. **Plant products as fumigants for stored product insect control**. Journal of Stored Products Research. 44 (2): 126-135.
- Ramamoorthy, T. P., y M. Elliott. 1998. **Lamiaceae de México: diversidad, distribución, endemismo y evolución**. En: T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, y J. Fa (Eds.), Diversidad Biológica de México: Orígenes y distribución. Distrito Federal, México: Universidad Nacional Autónoma de México. 501-526.
- Ramírez, J. E., M. I. Gómez, J. M. Cotes y C. E. Núñez. 2010. **Efecto insecticida de los aceites esenciales de algunas lamiáceas sobre *Tecia solanivora* Povolny en condiciones de laboratorio**. Agronomía Colombiana. 39 (2): 255-263.
- Ramírez-Malagón, R., A. Borodanenko, L. Pérez-Moreno, M. D. Salas-Araiza, H. Gordon y N. Ochoa-Alejo. 2008. **In vitro propagation of three Agave species used for liquor distillation and three for landscape**. Plant Cell Tissue & Organ Culture. 94 (2): 201–207.
- Ramírez-Moreno, L. A., L. E. García-Barrios, C. Rodríguez, H. E. Morales y A. E. Castro. 2001. **Evaluación del efecto insecticida de extractos de plantas sobre *Leptophobia aripa elodia***. Manejo integrado de plagas (Costa Rica). 60: 50-56.
- Regnault-Roger, C. 1997. **The potential of botanical essential oils for insect pest control**. Integrated Pest Management Reviews. 2 (1): 25-34.
- Rodríguez, C. 2003. **Cuantificación de la inhibición de crecimiento en insectos, provocada por sustancias naturales**. En: Tornero C. M, J. F. López-Olguín y A. Aragón. (Eds.). Agricultura, ambiente y desarrollo sustentable. 2003. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. 223-242.

- Rodríguez, H. C. 1993. **Fitoinsecticidas en el combate de insectos**. En: Bases prácticas de la agroecología en el desarrollo centroamericano. Modulo II: Manejo de plagas en el sistema de producción orgánica. San Martín Zapotitlan, Retalhuelu.G.T. 112-125.
- Saad, M. I. 2001. **Producción de monoterpenos por biotransformación de geranil pirofosfato en cultivos *in vitro* de *Piqueria trinervia* cav.** Tesis de doctorado en ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 163 p.
- Salgado, N., D'antonino, L. R. y A. Soto. 2012. **Aceite esencial de *Piper crassinervum* para el control de *Sitophilus zeamais* (Coleóptera: Curculionidae)**. Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural. 16 (1): 99-107.
- Salvadores, Y., A. Silva, M. Tapia y R. Hepp. 2007. **Polvos de especias aromáticas para el control del gorgojo del maíz, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, en trigo almacenado**. Agricultura técnica, Chile. 67 (2): 147-154.
- Sánchez, F. J. 2006. **Extracción de aceites esenciales: experiencia Colombiana**. II Segundo congreso internacional de plantas medicinales y aromáticas. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Colombia. 8 p.
- Santiago, V. S., C. Rodríguez, L. D. Ortega, D. Ochoa y S. Infante. 2009. **Repelencia de adultos de mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum* West.) con aceites esenciales**. Fitosanidad. 13 (1): 11- 14.
- Santos-Díaz, M. S., Y. Velásquez-García y M. M. González-Chávez. 2005. **Producción de pigmentos por callos de *Mammillaria candida* Scheidweiler (Cactaceae)**. Agrociencia. 39 (6): 619-626.
- Schenk, R. U. y A. C. Hildebrandt. 1972. **Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures**. Canadian Journal of Botany. 50 (1): 199-204.
- Serratos, J. A., A. Blanco-Labra, J. A. Mihm, L. Pietrzak y J. T. Arnason. 1993. **Generation means analysis of phenolic compounds in maize grain and susceptibility to maize weevil *Sitophilus zeamais***. Canadian Journal of Botany. 71 (9): 1176-1181.

- Sharifi, S., Mills, R. B. 1971. **Radiographic studies of *Sitophilus zeamais* Mots. In wheat kernels.** Journal of Stored Products Research, 7 (3): 195-206.
- Silva, G., A. Lagunes, J. C. Rodríguez y D. Rodríguez. 2002. **Insecticidas vegetales: una vieja y nueva alternativa en el manejo de plagas.** Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. 66: 4-12.
- Silva, G., D. Pizarro, P. Casals y M. Berti. 2003. **Evaluación de plantas medicinales en polvo para el control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky en maíz almacenado.** Revista brasileira de agrociência. 9 (4): 383-388.
- Silva, G., O. Orrego, R. Hepp y M. Tapia. 2005. **Búsqueda de plantas con propiedades insecticidas para el control de *Sitophilus zeamais* en maíz almacenado.** Pesquisa Agropecuária Brasileira. 40 (1): 11-17.
- Silva-Aguayo, G., R. Kinger-Melivilu, R. Hepp-Gallo y M. Tapia-Vargas. 2005. **Control de *Sitophilus zeamais* con polvos vegetales de tres especies del género *Chenopodium*.** Pesquisa Agropecuária Brasileira. 40 (10): 953-960.
- Simões, C. M. O. y V. Spitzer. 1999. **Óleos Voláteis.** En: Simões, C. M. O., E. P. Schenkel, G. Gosmann, J. C. P. Mello, L. A. Mentz y P. R. Petrovick (Eds.). Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. Porto Alegre: Editora da UFRGS. 394-412.
- Stefanazzi, N., M. M. Gutiérrez, M. Carriac, A. A. Ferrero y T. Stadler. 2004. **Repelencia en larvas de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrinidae) a *Tagetes terniflora* (Asteraceae).** Agricultura Técnica. 77-95.
- Suazo, G., F. González, A. Urbina, E. Pastene, K. Sáez, H. Serri, y R. Chávez. 2012. **Actividad insecticida del aceite esencial de *Lepechinia chamaedryoides* (Balb.) Epling en *Drosophila melanogaster*.** Gayana. Botánica. 69 (2): 256-266.
- Taniguchi, S., Y. Imayoshi, E. Kobayashi, Y. Takamatsu, H. Ito, T. Hatano, H. Sakagami, H. Tokuda, H. Nishino, D. Sugita, S. Shimura y T. Yoshida. 2002. **Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli.** Phytochemistry. 59 (3): 315-323.
- Tovar, J. 2007. **Composición química, actividad antibacteriana y tóxica de aceites esenciales de seis especies medicinales de Lamiaceae en el**

- estado de Hidalgo.** Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 95 p.
- U.S. Department of Health and Human Services. 2011. **NTP Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of pulegone (CAS NO. 89-82-7) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies).** NIH Publication No. 11-5905. 202 p.
- Van de Braak, S. A. A. J. y G. C. J. J. Leijten. 1999. **Essential oils and oleoresins: a survey in the Netherlands and other major markets in the European Union.** CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam. 116 p.
- Verpoorte, R., A. Contin y J. Memelink. 2002. **Biotechnology for the production of plant secondary metabolites.** Phytochemistry Reviews. 1 (1): 13-25.
- Viegas, C. 2003. **Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos.** Química nova. Brasil. 26 (3): 390-400.
- Villalobos, V. M. y T. A. Thorpe. 1991. **Micropropagación: conceptos, metodología y resultados.** Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones prácticas. CIAT. 127-142.
- Villavicencio-Nieto, M. A., B. E. Pérez-Escandón y A. J. Gordillo-Martínez. 2010. **Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el estado de Hidalgo, México.** Polibotánica. 30: 193-238.
- Waliwitiya, R., C. J. Kennedy y C. A. Lowenberger. 2009. **Larvicidal and oviposition-altering activity of monoterpenoids, trans-anethole and rosemary oil to the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** Pest Management Science. 65 (3): 241–248.
- Ware, G. 1994. **The pesticide Book.** Thomson Publications. San Francisco. U. S. 356 p.
- Weaver, D. y B. Subramanyam. 2000. **Botanicals.** En: Subramanyam B. y D. Hagstrum (Eds.). Alternatives to pesticides in stored product IPM. Kluwer Academic Press, Boston, USA. 303-320.
- Whitehead, D. R. 1987. **Weevils (Curculionidae, Coleoptera).** En: Gorham J. R. (Ed). Insect and Mite Pests in Food: An illustrated key. USDA Handbook No.

- 655, United States Department of Agriculture: Washington DC, USA. 1: 223-230.
- Yepes, A. 2006. **Revigorización y establecimiento *in-vitro* de *Gemelina arborea* Roxb. V. mediante cultivo de tejidos vegetales.** Revista Colombia Forestal. 9 (19): 70-87.
- Zamora, H. S. 2012. **Micropropagación e identificación de la composición química de los aceites esenciales de *Hedeoma drummondii* Benth., planta útil de Hidalgo.** Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 89 p.
- Zwenger S. y C. Basu. 2008. **Plant terpenoids: applications and future potentials.** Biotechnology and Molecular Biology Reviews. 3 (1): 1-7.