



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias
Instituto de Química

Ecología Química de *Vismia mexicana*
Schldl (Clusiaceae):
Metabolismo secundario y daño foliar

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Biología experimental)

P R E S E N T A

Biol. Edgar Antonio Estrella Parra

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Ricardo Reyes Chilpa

COMITÉ TUTOR: Dra. Alma Delfina Orozco Segovia
Dr. José Guillermo Avila Acevedo

MÉXICO, D.F.

Octubre 2010



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/501/10

ASUNTO: Oficio de Jurado

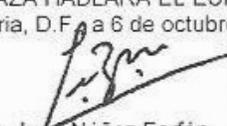
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 6 de septiembre de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de del (la) alumno (a) **ESTRELLA PARRA EDGAR ANTONIO** con número de cuenta **92061619** con la tesis titulada "**Ecología Química de *Vismia mexicana* Schldl. (Clusiaceae): Metabolismo Secundario y Daño Foliar**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. RICARDO REYES CHILPA**:

Presidente: DR. MANUEL JIMENEZ ESTRADA
Vocal: DRA. ALMA DELFINA LUCIA OROZCO SEGOVIA
Secretario: DR. RICARDO REYES CHILPA
Suplente: M. EN C. EDITH LOPEZ VILLAFRANCO
Suplente: DR. JOSE GUILLERMO AVILA ACEVEDO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 6 de octubre de 2010.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa



JNF/DCRV/ASR/ipp

Agradecimientos

A DIOS por crear misterios interesantes y darme la sensates y paciencia para estudiar la vida y explorar su química como un gambusino en busca de oro.

Agradezco al Posgrado en Ciencias biológicas por las facilidades y la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado así como su confianza en desempeñar mi tema de investigación.

Así también agradezco al CONACYT por el apoyo económico otorgado durante los cuatro semestres que duro la investigación; con número de registro 262267.

Agradezco al Dr. Ricardo Reyes Chilpa por su asesoría, su trato amable como persona, su paciencia para enseñar y su dedicación, pero en especial por su calidez como ser humano algo que no se encuentra todos los días.

Agradezco a la Dra. Alma Delfina Orozco Segovia, por sus asesorías así como su paciencia para este proyecto; así como a la M. en C. Esther Sánchez Coronado por la atención prestada para el uso de diferentes herramientas vitales para la conclusión de este proyecto.

De igual manera agradezco al Dr. José Guillermo Avila Acevedo por su asesoría y observaciones sobre el mismo y a su acertada visión de la química de plantas.

Agradezco, de manera especial al M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez, por facilitarme el laboratorio de cultivo de insectos, así como diferentes compuestos para la dieta de los bichos; así mismo estoy eternamente agradecido con mi compañera Lorena Sánchez por su compañerismo en momentos de urgencia de este proyecto, y también a Armando Rodríguez por guiarme en mi tesis cuando estaba confundido sirviéndome de guía.

Agradezco a la M. en C. Laura Lina García por sus facilidades en la donación de larvas y alimento de *S. frugiperda*.

Agradezco a la Directora General del Medio Ambiente-Naucalpan Marcela Beatriz Reyes Medrano por el tiempo facilitado para dedicarle a la tesis sin ello no se hubiera concluido a tiempo.

Agradezco a mi madre Ma. Del Socorro Sánchez por su paciencia y por alentarme en todo momento a continuar más allá de lo que otros llegan.

Agradezco a mis Hermanos Pablo y José Carlos por su trato y por inculcarme el hábito de la autosuperación.

Agradezco a mi compañero de laboratorio Julio Cesar Zamudio por sus asesorías en la estadística sin el cual hubiera retrasado mi fecha de titulación.

Agradezco y siempre será así a todos mis amigos Maesse, Paty Sauza, Fabiola, Ghitto, Nacho, Agustín, More y todos los demás que sería insuficiente el espacio por su amistad que es inconmensurablemente vital para mi vida

En memoria de mi padre Eleuterio Estrella Barrón, ejemplo de cómo se debe vivir la vida con integridad, honestidad y constante trabajo para lograr las metas, gran padre y modelo a seguir...

Así como a mi amigo Yemin... el cual faltarían palabras para describirlo gracias por tu amistad amigo. . .

Resumen

Vismia mexicana Schltdl. (Clusiaceae) es un árbol pequeño de los bosques lluviosos en México. Análisis preliminares por cromatografía en capa fina (TLC) del extracto de hexano de recogida de hojas comidas ("dañado") por los insectos, presentaron un compuesto (s) que no está presente en hojas intactas ("sanos"); Por lo tanto se realizó un estudio ecológico con los siguientes objetivos: 1) determinar la herbivoría de las hojas de *V. mexicana* colectadas en dos fechas diferentes, comparando el modelo de TLC del extracto de hexano, 2) determinar la composición química de los frutos y las hojas; el objetivo fue identificar los compuestos inducidos por herbivoría, 3) evaluar las propiedades insecticidas o antialimentarias de los extractos de hexano y compuestos de *V. mexicana* con un insecto generalista como *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero).

Métodos: Se colectaron las hojas de cinco árboles de *V. mexicana* en Xico, Veracruz, en octubre de 2008 y enero de 2009. En cada árbol se tomaron muestras en tres estratos diferentes (bajo, medio, alto) y el área foliar consumida se determinó. Se prepararon extractos hexánicos de hojas sanas y de hojas dañadas y se analizaron por TLC. Las hojas dañadas mostraron un patrón similar por CCF con el extracto hexánico de los frutos de *V. mexicana*. De este extracto del fruto se tenía cantidad suficiente, y por lo tanto se sometió a cromatografía en columna con el fin de aislar sus componentes. El índice de inhibición de los extractos y compuestos se determinó con larvas de la quinta etapa de *S. frugiperda*. Se realizaron dos tipos de bioensayos con discos de hojas de *Beta vulgaris* L.: de elección y de alimentación forzada.

Resultados: La herbivoría en el campo fue mayor en octubre de 2008 que en enero de 2009, pero no hubo diferencias estadísticamente significativa entre los niveles (bajo, medio y alto) por fecha. Los registros meteorológicos mostraron que hubo más precipitaciones en octubre de 2008 que en enero de 2009, pero la temperatura media (a las 8 am) no fue diferente (7 ° C). La sustancia adicional (s) presente en extracto de hexano de las hojas dañadas de *V. mexicana*, también se encontró en el extracto de los frutos hexánicos de la misma planta, y de acuerdo a la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) el análisis es una mezcla

de cadena larga alcanos (C_{16} , C_{17} , C_{18} , C_{27} , C_{29}). Otros compuestos fueron aislados también: la friedelina triterpeno, una mezcla compuesta principalmente de ésteres de ácidos grasos (ésteres metílicos de ácidos hexadecanoico, éster etílico del ácido hexadecanoico, éster metílico del ácido 15-tetracosenoico), el triterpeno lup-20 (29)-en-3 -ol, acetato, (3alfa) y alcoholes de cadena larga. En los bioensayos de elección, los discos tratados con hexano (control) fueron más consumidos por *S. frugiperda*, que los no tratados con hexano (intacto). Las hojas sanas de octubre de 2008 se consumieron más que las hojas sanas de enero de 2009, que coincide con los registros en el campo. Otros tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control. En los bioensayos de alimentación, *S. frugiperda* consumían menos discos de acelga tratados con la mezcla de alcanos, friedelina, extractos de hojas sanas de enero de 2009, y el extracto hexánico de la fruta de *V. mexicana*, lo que indica que estos tratamientos inhiben a algunos palatabilidad medida .

Conclusiones: Las hojas de *V. mexicana*, así como las del fruto, sintetizan alcanos de cadena larga provocando en *S. Frugiperda*, y otros insectos en campo menor palatabilidad, y otros insectos en respuesta a la herbivoría, ya que incorporados a la dieta son capaces de inhibir la alimentación de los insectos, mientras que su extracción con hexano puede aumentar su palatabilidad. Hay diferencias en la herbivoría en ambas fechas de colecta sufrida por *V. mexicana* en el campo (octubre > de enero); podría estar relacionada con la cantidad de lluvia (octubre > de enero). Se sabe de la literatura que la síntesis de alcanos se induce en la cutícula de las hojas en condiciones de estrés hídrico como ocurrió en el mes de enero del 2009.

Summary

Vismia mexicana Schltdl. (Clusiaceae) is a small tree of the Cloud Forests in Mexico. Preliminary analysis by thin layer chromatography (TLC) of the hexane extract of collected leaves eaten ("damaged") by insects, showed a compound(s) not present in intact leaves ("healthy"); therefore a chemical ecology study was performed with the following objectives: 1) to determine the grazing of the leaves of *V. mexicana* collected in the field on two dates, comparing the TLC pattern of the hexane extract, 2) to determine the chemical composition of the fruits and leaves, aimed to identify the compounds induced by herbivory, 3) to evaluate the insecticidal or antifeedant properties of the hexane extracts and compounds *V. mexicana* with a generalist herbivorous insect *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm).

Methods: Leaves of five trees of *V. mexicana* were collected at Xico, Veracruz in October 2008 and January 2009. Each tree was sampled at three different strata (low, medium, high) and the leaf area consumed was determined. Hexane extracts of healthy leaves and damaged leaves were prepared, and analyzed by TLC. HED showed a similar TLC pattern compared with that of the fruit. This extract was obtained in high yield, and therefore was subjected to column chromatography in order to isolate its components. The antifeedant index of extracts and compounds was determined with fifth stage larvae of *S. frugiperda*. Two types of bioassays were performed with leaf discs of *Beta vulgaris* L.: choice and feeding.

Results: Herbivory in the field was higher in October 2008 than in January 2009, but there were not statistically differences among the strata (low, medium and high) at any date. The weather records showed there was more precipitation in October 2008 than in January 2009, but the average temperature (at 8 am) was not different (7 °C). The extra substance (s) present in hexane extract of the *V. mexicana* damaged leaves, was also found in the extract of the fruits, and according to gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) analysis it is a mixture of long chain alkanes (C16, C17, C18, C27,

C29). Other compounds were also isolated: the triterpene friedelin, and a mixture composed mainly of fatty acid esters (hexadecanoic acid methyl ester, hexadecanoic acid ethyl ester, 15-tetracosenoic acid methyl ester), the triterpene lup-20 (29)-en-3-ol, acetate, (3 α) and long chain alcohols. In the choice bioassays, discs treated with hexane (control) were more consumed by *S. frugiperda*, than those not treated with hexane (intact). The healthy leaves of October 2008 were more consumed than the healthy leaves of January 2009, which coincides with the records in the field. Other treatments showed no statistically differences as compared to control. In feeding bioassays, *S. frugiperda* consumed less beet discs treated with the mixture of alkanes, friedelin, extracts of healthy leaves of January 2009, and with the hexane extract of the fruit of *V. mexicana*, indicating that these treatments inhibit to some extent palatability.

Conclusions: The leaves of *V. mexicana*, as well as the fruits, synthesize long-chain alkanes in the cuticle which are feeding deterrents to *S. frugiperda*, and other insects in response to herbivory, since incorporated to the diet are able to inhibit the insect feeding, while their extraction with hexane increase it. There are seasonal differences in herbivory suffered by *V. mexicana* in the field (October > January) and could be correlated with the amount of rainfall (October > January). It is known from the literature that the synthesis of alkanes is induced in the cuticle of the leaves in water stress conditions as occur in January.

Abreviaturas

AcOEt : Acetato de Etilo

CC: Cromatografía en columna

CCF. Cromatografía en capa fina

CCFp: Cromatografía en placa preparativa

CDCl₃: Cloroformo deuterado

CG-EM: Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas

CHx: Hoja de acelga tratada con hexano

CH₂Cl₂- MeOH: Mezcla diclorometano-metanol

DE: Extracto hexánico de las hojas dañadas de *V. mexicana* colectadas en enero 2009.

DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (Experimento de RMN)

DO: Extracto hexánico de las hojas dañadas de *V. mexicana* colectadas en octubre 2008.

δ: Desplazamiento químico

EM : Espectrometría de Masas

FM. Fase móvil

gl: Grados de libertad

HETCOR: Experimento de correlación heteronuclear ¹H-¹³C

Hx: Hexano

IR : Espectroscopia de Infrarrojo

MeOH: Metanol

Mhz: Megahertz

msnm : metros sobre el nivel del mar

nm: Nanometros

μl: Microlitro

Pf : Punto de fusión

ppm: Partes por millón

Rf: Referencia

RMN ¹H: Resonancia Magnética Nuclear Protónica

RMN¹³C: Resonancia Magnética Nuclear de Carbono

Scion image: Software de de libre acceso

SE: Extracto hexánico de las hojas sanas de *V. mexicana* colectadas en enero 2009

SHx: Hoja de acelga sin disolvente

SO: Extracto hexánico de las hojas sanas de *V. mexicana* colectada en octubre 2009

SPSS V.15: Software de análisis estadístico

UV: Espectroscopia de Ultravioleta

Índice

1.-Introducción.....	1
2.- Antecedentes.....	2
2.1 Ecología química.....	2
2.1.1 Interacción planta-insecto: herbivoria.....	3
2.1.2 Tipos de interacción planta-insecto fitófago.....	6
2.1.3 Metabolitos insecticidas, antialimentarios e inhibidores del desarrollo.....	7
3.- Area de estudio.....	9
4.- <i>Vismia mexicana</i> Schledt. (<i>Clusiaceae</i>).....	11
5.- <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith).....	14
6.- Justificación y Objetivos.....	17
7.- Pregunta científica e Hipótesis.....	17
8.- Materiales y métodos.....	18
8.1 Evaluación de la Herbivoria.....	18
8.2 Obtención de extractos.....	18
8.3.- Análisis de los extractos por CCF.....	19
8.3.1 Aislamiento e identificación los compuestos químicos (Extracto hexánico de frutos).....	21
Fracciones 1 a 14.....	22
Fracciones 3-14.....	22
Fracciones 23-35.....	23
Fracciones 36-45.....	24
Fracciones 90-92.....	24
9.- Bioensayos.....	28
9.1.-Bioensayo de elección.....	28
9.1.1 Evaluación del área foliar consumida.....	29
9.2 Bioensayo de alimentación forzada.....	30
10.- Resultados.....	31
10.1.- Evaluación de la Herbivoria.....	31

10.2.- Climatología.....	33
10.3.- Estudio químico.....	35
Fracciones 3-14.....	35
Fracciones 23-35.....	36
Fracciones 36-45.....	39
Fracciones 90-92.....	43
10.4. Bioensayos.....	44
10.4.1 Bioensayo de elección.....	44
10.4.2 Bioensayo de alimentación forzada.....	45
11.- Discusión.....	47
12.-Conclusiones.....	52
13.- Bibliografía.....	53
Apéndice I.....	62
Apéndice II.....	66

Índice de Tablas y Figuras

Fig.3.1 Area de colecta.....	10
Fig 4.1. Fotos de <i>Vismia mexicana</i>	12
Fig. 4.2. Compuestos aislados del extracto de CH ₂ Cl ₂ -MeOH (1:1) de las hojas de <i>V. Mexicana</i>	13
Fig. 4.3. Compuesto sintetizado en hojas atacadas de <i>Vismia mexicana</i>	14
Fig. 5.1. Larva (5to. estadio) y palomilla de <i>S. frugiperda</i>	15
Tabla 8.2.1. Colectas de <i>V. mexicana</i>	18
Tabla 8.2.2. Rendimiento (%) de los extractos de las hojas de <i>V. mexicana</i>	19
Fig. 8.3.1 CCF de los frutos y hojas de <i>V. mexicana</i> (FM: Hx /Acoet 9:1).....	20
Tabla 8.3.1.1 Elusión de la Columna I (Extracto de hexano de los frutos).....	21
Fig. 8.3.1.1. CCF de las fracciones 1- 14 de la columna del extracto hexánico.....	22
Fig. 8.3.1.2. CCF de las subfracciones 12 y 13.....	23
Fig. 8.3.1.3. CCF el cual se observan las subfracciones 2-6.....	24
Fig. 8.3.1.4. CCF de las subfracciones 20-22.....	25
Fig. 8.3.1.5. Cromatografía en Columna del Extracto Hexánico de los Frutos de <i>V. mexicana</i> (VMFRH).....	26
Fig.8.3.1.6. CCF de las fracciones reunidas del extracto hexánico mostrando sus diferentes compuestos.....	27
Tabla 10.1.1 Área foliar consumida (cm ²) en árboles de <i>V. mexicana</i> en dos fechas de colecta.....	31
Figura 10.1.2. Porcentaje de área foliar consumida en tres estratos de árboles de <i>V. mexicana</i> en dos fechas de colectas	32
Fig.10.2.1 Datos de Temperatura y Precipitación pluvial en Xico, Veracruz.....	34
Fig. 10.3.1. Cromatograma de la fracción VMFRH2 (1) y VMFRH2.....	35
Fig. 10.3.2. CCF y Cromatograma de la fracción VMFRF23-35 (12 y 13).....	36
Tabla 10.3.1. Compuestos en la fracción VMFRF23-35 (12 y 13).....	37

Fig. 10.3.3. Compuestos presentes en la la fracción VMFRF23-35 (12 y 13) analizados por CG-EM.....	38
Fig 10.3.4 Estructura de la Friedelina,.....	39
Fig. 10.3.5 RMN ¹³ C de Friedelina.....	40
Tabla 10.3.2 RMN H (300 Mhz, CDC13), RMN ¹³ C de la Friedelina (74.4 MHz, CDCL3,δ (ppm)).....	41
Fig. 10.3.6 RMN ¹ H y DEPT de Friedelina. (Fracción VMFRHSF9-10(2-6)).....	42
Fig. 10.3.7. RMN ¹³ C de la subfraccion 20-22.....	43
Fig 10.4.1.1 Área foliar (cm ²) consumida por <i>S. frugiperda</i> de discos de acelga.....	45
Tabla 10.4.2.1 Efecto de diversos extractos y compuestos de <i>Vismia mexicana</i> sobre la alimentación de <i>S. frugiperda</i>	46

1.- Introducción

Las plantas, organismos sésiles, están obligados a responder a los diferentes retos que les plantea su entorno. Estas respuestas, a su ambiente biótico y abiótico, muchas de ellas de tipo químico, les permiten la mejor distribución de sus recursos para crecer, reproducirse y defenderse (Vivanco et al 2005). Se conocen aproximadamente 260,000 especies de plantas vasculares en el mundo; es decir, aquellas que han sido colectadas, catalogadas científicamente y depositadas en algún herbario; sin embargo estas son prácticamente desconocidas desde cualquier otro punto de vista. Por ejemplo, apenas se conocen las características químicas y fisiológicas, así como requerimientos ecológicos del 1 al 2% de estas (Lara y Márquez 1996). Sus aplicaciones reales son enormes; de aproximadamente 120 medicinas de uso corriente tienen como principios activos compuestos sintetizados por las plantas, y estos han sido extraídos de un poco menos de 100 especies (Lara y Márquez 1996). De esta forma, el almacén químico que representan las plantas, particularmente la de las zonas tropicales está virtualmente inexplorado desde el punto de vista farmacológico. Menos aún se conoce el papel de estos compuestos en sus interacciones con otras especies, es decir desde el punto de vista de la Ecología Química.

En México existen poco más de 20,000 especies probables de plantas vasculares, por lo cual tiene una flora más vasta que la antigua Unión Soviética (hoy Asia y otros países), los Estados Unidos de América y Canadá en conjunto. Por esta razón, el territorio nacional, y en particular, su mitad meridional se considera entre las zonas florísticas más ricas del mundo (Wulff, 1937 citado por Rzedowski, 1978).

En el presente trabajo se estudió el papel de los metabolitos secundarios de un árbol de México, *Vismia mexicana* Schledt (Clusiaceae), localizado en el Bosque Mesófilo de Montaña; en especial se investigó el papel de algunos compuestos químicos como defensa al daño foliar por el insecto fitófago polífono *Spodoptera frugiperda*.

2.- Antecedentes

2.1.- Ecología Química.

La Ecología Química se define como “el estudio de la estructura, función, origen y significado de los compuestos químicos naturales que actúan como mediadores de interacciones intra- e interespecíficas; se enfoca en determinar el papel de los compuestos semioquímicos en su contexto natural.”(Millar y Haynes 1998)

El número de especies, su papel en el ecosistema, los tipos de interacciones, su estructura trófica y sus mecanismos evolutivos constituyen aspectos del estudio de la biodiversidad (Herrera y Pellmyr 2002). La actividad de todo organismo cambia el medio ambiente en el que vive, puede alterar las condiciones, puede añadir o sustraer recursos del ambiente y alterar así su disponibilidad para otros organismos; pero además, los organismos interaccionan cuando influyen en la vida de otros (Begon 1996).

Las interacciones entre las especies pueden ser clasificadas con base a sus efectos (Ricklefs y Miller 1999); de esta forma tenemos: neutralismo, competencia, parasitismo, depredación, comensalismo, proto cooperación y mutualismo (Odum 1972). Los metabolitos secundarios de las plantas proveen protección contra microbios, insectos, herbívoros y además pueden ser factor de competencia contra otras especies vegetales (Firn y Jones, 2000; Papadopoulou et al. 1999; Wink 2003; citados por Cseke et al 2006), es decir han sido considerados como agentes de defensa, tanto en las interacciones planta-patógeno, y planta-herbívoro, planta-planta (alelopatía). Aunque por su relativa toxicidad a varios taxa se necesita hacer una revisión y más experimentación, pues las sustancias de defensa de las plantas no afectan igualmente a todos los enemigos potenciales (Rosenthal y Janzen 1979).

2.1.1 Interacción planta-insecto: herbivoría

De acuerdo a Schowalter (2000), la herbivoría es el consumo de las partes de una planta, esto incluye follaje, corteza, raíces, flores, frutos y semillas, realizado por animales. La herbivoría es un proceso que reduce la biomasa y densidad de plantas. Existen diferentes modos de herbivoría, el más común es la folivoría, la cual consiste en especies que mastican el follaje, reduciendo el área de tejido fotosintético. Este tipo de herbivoría es el mejor estudiado. (Schowalter 2000); debido a que alimentarse de las plantas verdes es la forma más común de un animal para obtener alimento (Jolivet 1992).

La herbivoría puede inducir cambios en el tamaño y la forma de las plantas, teniendo efectos sobre la competencia con otras plantas (Herrera y Pellmyr 2002). Asimismo, los herbívoros pueden consumir directamente las plantas, alterando el ciclo de los nutrientes y perturbando suelos y otros substratos; además la herbivoría puede alterar la sucesión, la diversidad de especies de plantas, la estructura heterogénea y la productividad. (Olf 1999).

Algunos factores ambientales pueden modificar las propiedades de una planta y por tanto la capacidad de reproducción y crecimiento de sus consumidores. Las características de una especie vegetal pueden influir en la eficiencia ecológica de los herbívoros, particularmente a través de modos de defensa y valores nutricionales, contribuyendo con esto a limitar la población del herbívoro (Hunter 1992). La relación planta-herbívoro puede ser considerada un componente funcional del ecosistema, la dinámica puede ser medida en términos de producción primaria y secundaria, y en el flujo de la energía y la materia (Olf 1999). De igual forma muchos factores influyen en la planta y al herbívoro: disponibilidad de nutrientes ambientales, estrés abiótico, daño biótico y el tercer nivel trófico (Barbosa 1991).

La interacción con organismos microbianos, herbívoros y otras especies de plantas puede ser de carácter positivo, negativo o neutral (Vivanco et al 2005). En el caso de las interacciones entre plantas e insectos, por ejemplo, ciertos compuestos con estructuras similares pueden ejercer

actividades muy disímiles, desde insecticidas hasta repelentes o incluso atrayentes (Vivanco et al 2005).

La distribución de las plantas define la localización y abundancia de los herbívoros y el tipo, también frecuentemente el tipo de defensas contra los herbívoros y depredadores (Herrera, y Pellmyr 2002). Además es muy importante saber cuáles son las preferencias de los insectos en cuanto a la alimentación y hábitat. De acuerdo a Romo de Vivar (1985) existen dos posibilidades para explicar porque algunos insectos solo viven y se reproducen en una planta o en un número limitado de estas. La primera señala que los insectos se guían por sus requisitos alimenticios, mientras que la segunda postula que los repelentes o atrayentes que produce la planta son las guías que indican al insecto la planta donde ovopositar. Por ejemplo, señala que los insectos utilizan esteroides de las plantas y levaduras con doble ligadura en C-5 en su dieta, y logran desarrollarse hasta la etapa adulta.

Los fenómenos de preferencia a los que responden los insectos son extensos incluyen características físicas como color, superficie de la planta, estructura interna de la misma y reflexión de radiación infrarroja y de otros tipos, pero en general las características químicas son las más importantes. Por ejemplo, la polilla *Plutella maculapennis* (Curtis) puede percibir el sabor de la sinigrina a 1/1,000 partes de la cantidad que puede saborear un ser humano; un solo pelo sensorial de la mosca *Phormia regina* (Meigen) al estar en contacto con una concentración de sacarosa de 3 millonésimas de gramo por cm³ de agua, provoca una respuesta del insecto.

La primera planta registrada como resistente a un insecto, de la cual se tiene constancia es la variedad de manzana winter Majetin, *Malus pumilla* Miller, la que se catalogó en 1831 como resistente al áfido lanoso *Mayetiola destructor* (Say) y según los últimos informes aun es resistente. Algunos genes de las plantas que les confieren resistencia a los áfidos, parecen ser muy sensibles a la temperatura. El factor genético simple conocido como resistencia del trigo al pulgón verde, se manifiesta mejor a temperaturas por debajo de 24C° que a temperaturas de 77C° ó mayores. Por el contrario, en la resistencia de *Medicago sativa* (Linnaeus) al áfido del guisante y al áfido manchado de la alfalfa, en ambos casos los clones portadores de factores

genéticos son mas efectivos a temperaturas altas que a bajas. (Comité Sobre Plagas de Plantas y Animales, 1991)

Es muy raro que alguna característica física sea particular a una sola especie vegetal, pero las características químicas son mucho más específicas; por tanto, no es sorprendente que los estímulos químicos determinen en su mayor parte la selección del huésped para la ovoposición y la alimentación. (Haynes y Millar 1998). La resistencia química estimulada por un ataque de un herbívoro puede ser clasificada como constitutiva o inducida. La mayor resistencia a la alimentación del depredador es constitutiva y está basada en la presencia de inhibidores al contacto. La resistencia inducida se fundamenta en la acumulación y modificación de metabolitos del hospedero, como consecuencia de interacciones químicas y físicas entre la planta y el atacante (Levin, 1976)

La elaboración de metabolitos secundarios en plantas es potencialmente peligrosa y metabólicamente cara. Si un herbívoro puede seleccionar alimentos que no son tóxicos o al menos que contengan pocos compuestos secundarios, podrá comer mejor, con menos peligro y con un costo metabólico mas económico; así, los herbívoros deberán preferir alimentarse de plantas, que contengan pocos metabolitos secundarios tóxicos (Freeland y Janzen 1974).

Se ha señalado que las tasas de herbivoría son más altas en los bosques tropicales que en los templados; así en los bosques tropicales húmedos, las especies tolerantes a la sombra pierden anualmente el 11% de su área foliar, una cantidad 50% más alta que en los bosques templados, por lo que existe la hipótesis que las especies tropicales están mejor defendidas, sin embargo presentan tasas de herbivoría altas determinadas por poblaciones grandes de herbívoros. (Anaya 2001). Coley y Barone (1996) también observaron que en un bosque tropical seco las hojas sufren fuerte daño por insectos herbívoros afectando el crecimiento y sobrevivencia de las plantas; además observaron una mayor depredación en hojas jóvenes que en las maduras debido a su alta calidad nutricional.

Estos autores sugieren que las plantas tienden a defenderse químicamente de sus enemigos naturales, así una alta diversidad de especies de plantas significa que sus enemigos herbívoros tendrán que enfrentar numerosas defensas por parte de las plantas. Con base en lo anterior plantearon las siguientes hipótesis: 1) las defensas de las plantas son mas potentes en zonas tropicales que en el resto de las zonas climáticas, y 2) a mayor longevidad de una hoja existe una mayor defensa por parte de la misma. También indican que aproximadamente el 70% del daño en las hojas ocurre cuando estas se están desarrollando, sugiriendo que en hojas jóvenes deberá ser intensa la inversión en defensas químicas (Corey y Barone 1996). Se ha propuesto que la diversidad de metabolitos secundarios es mayor en bosques tropicales que en bosques templados, y la actividad de los alcaloides es más toxica en los trópicos, así como las hojas jóvenes presentan una mayor concentración de defensas químicas (Corey y Barone 1996).

2.1.2 Tipos de interacción planta-insecto fitófago

Del millón de especies de insectos descritos, aproximadamente la mitad son fitófagos (Brues 1946; citado por Maxwell y Jennings 1984). Por supuesto, ninguna especie vegetal es susceptible al ataque de todas las especies de insectos fitófagos; y tampoco ningún insecto es capaz de utilizar todas las especies de plantas como huéspedes; no obstante existe un amplio rango de especificidad en cuanto a la planta huésped (Haynes y Millar 1998).

Algunos insectos herbívoros se alimentan de una sola especie de planta y otros o hacen comiendo una amplia variedad de plantas de diferentes familias, las categorías reconocidas son: monofagas, oligofagos y poligofagos. Los insectos polífagos no comen todas las plantas que se encuentran y esto es cierto para las especies que utilizan como alimento una amplia variedad de plantas (Anaya, et al. 2001). En el orden *Lepidoptera*, unos cuantos clados tienen un número poco usual de generalistas; los mas conspicuos se encuentran en las enormes superfamilias *Geometridae* y *Noctuidae* (Anaya 2001.)

Algunos insectos recurren a estrategias diversas para eludir la defensa vegetal: incrementan su actividad proteolítica, induciendo la síntesis de enzimas proteolíticas insensibles

a los inhibidores de proteasas o expresan proteasas que degradan específicamente a los inhibidores de proteasas producidos por las plantas y para los cuales no tienen inhibidores (Vivanco et al 2005). Así tenemos que la infoquímica, en un contexto natural, es el intercambio de la información e interacción entre individuos, evocando en el receptor una respuesta fisiológica o ambiental que es adaptativa para uno de los interactuantes o para ambos (Dicke y Sabelis, 1988)

Como resultado de la coevolución los insectos herbívoros se han adaptado a las defensas de las plantas. Muchos insectos se hallan dotados para detoxificar metabolitos secundarios, para ello se sirven de monooxigenasas citocromo P450 y glutatión S-transferasas. Otros insectos secuestran las defensas químicas de las plantas y las aplican contra sus propios depredadores; un caso típico de esta estrategia la ofrece la mariposa monarca *Danaus plexippus*, cuyas orugas secuestran cardenolidos de las plantas del género *Asclepias* que consumen y lo incorporan a su organismo hasta en la etapa adulta, estos compuestos son tóxicos para las aves depredadoras (Vivanco et al 2005).

2.1.3 Metabolitos insecticidas, antialimentarios e inhibidores del desarrollo

Las plantas deben protegerse de la herbivoría, y desarrollan estrategias de defensa en forma de compuestos químicos, así, las plantas pueden servir como una fuente de compuestos tóxicos, inhibidores de la alimentación (antialimentarios) y del desarrollo de los insectos. Cientos de extractos de plantas han sido evaluadas, en algunos casos los compuestos han sido aislados y probados contra insectos (Haynes y Millar 1998). Por ejemplo, *Azadirachta indica*, ha sido usada durante cientos de años como un repelente de insectos, posee numerosos compuestos químicos como limonoides, tetranoterpenoides (C-40) que poseen actividad antialimentaria, insecticida o que interrumpen el crecimiento del insecto (Tomli 1997; citado por Cseke 2006).

Los tejidos de las plantas superiores contienen sustancias con funciones defensivas, entre otras: alcaloides, esteroides, fenoles, saponinas, taninos, resinas, aceites y diversos ácidos orgánicos; adicionalmente, las defensas contra la depredación por los insectos pueden ser

adaptaciones anatómicas que tienen efectos adversos sobre la conducta del insecto o reducen la protección necesaria en los estados larvarios (Haynes y Millar 1998).

La biosíntesis de metabolitos de defensa en las plantas es frecuentemente inducida por el daño o la herbivoría causando un incremento en el monto (por unidad de peso seco) de polifenoles, taninos y terpenos, tal como ocurre con *Betula spp.* y *Populus spp.*, en ambos árboles, se incrementan los niveles de metabolitos después de un ataque de insectos o moluscos (Lancher 1995; citado por Cseke 2006). El daño a las hojas, ya sea mecánico o enzimático, puede inducir la producción de defensas químicas tales como alcaloides, terpenoides, inhibidores de la proteasa, o activar rutas biosintéticas. Se ha demostrado que el gusano del algodón *Spodoptera exigua* al alimentarse de las hojas de (*Gossipum hirsutu*) induce la producción de terpenos volátiles e indoles. El inductor químico parece ser un ácido graso de origen vegetal modificado por el insecto. (Pare y Tumlinson, 1997).

Entre las defensas vegetales inducidas por los herbívoros destacan la producción de metabolitos secundarios tóxicos o repelentes y moléculas volátiles. Las plantas dañadas emiten diferentes mezclas de compuestos volátiles; en algunos casos la liberación de sustancias volátiles por las plantas pueden reducir la herbivoría hasta en un 90 % (Vivanco et al 2005). Algunos compuestos volátiles parecen ser comunes a muchas especies; encontramos entre ellos aldehídos, alcoholes, esterres y terpenoides de bajo peso molecular (C-10 y C-15); los hay que sirven para atraer depredadores y parásitos que destruyan a los herbívoros agresores, en otras palabras ciertas especies vegetales reclaman la ayuda de otros artrópodos (Vivanco et al 2005). En respuesta a la herbivoría se genera una acumulación de transcriptos distinta de la formada ante el daño mecánico. El ácido jasmónico desempeña un papel central en la acumulación de transcriptos en plantas expuestas a herbívoros. (Vivanco et al 2005)

3.- Area de estudio

El estado de Veracruz, cuenta con 210 municipios, se encuentra en la porción Oriental del País, entre los 17° 27' 18'' de Latitud Norte y entre los 93°36' 13'' y 98° 36' 0'' de Longitud Oeste. Por el Norte limita con Tamaulipas, al Este con el Golfo de México, al Oeste con San Luis Potosí, Hidalgo y Puebla, al Sur y Suroeste con Oaxaca y al Sureste con Chiapas y Tabasco. Su extensión es de 72,410.05 Km², área que lo sitúa en el décimo lugar con respecto a las otras entidades de la República Mexicana. Las corrientes superficiales que surcan el territorio quedan comprendidas en la Vertiente del Golfo, son abundantes y de las más caudalosas del País, tal es el caso de los ríos Coatzacoalcos, Papaloapan y Panuco. Es uno de los principales productores de café, tabaco, maíz, caña de azúcar en el sector agrícola; y de ganado bovino en el pecuario (INEGI, 1988).

El trabajo de campo se realizó en terrenos adyacentes a la Cascada de la Monja (fig. 3. 1), próxima a la Cascada de Texolo, cercana a la ciudad Xico, cabecera del Municipio de Xico, Estado de Veracruz. Dicho municipio tiene una extensión de 223.51 Km², se localiza en las coordenadas 97° 5' longitud Oeste y 19° 25.2' latitud Norte a una altitud de 1320 msnm Los límites municipales son al Norte con Acajete y Coatepec, al Sur con Ixhuacan, al Este con Coatepec y Teocelo y al Oeste con Perote y Ayahualulco. El nombre se origina de Xico-chimalco, voz nahuatl que significa "En donde hay panales de cera amarilla" o bien "En el escudo de los Xicotes" (INEGI 1988).

El municipio de Xico está ubicado en la provincia fisiográfica del Eje Neovolcanico (INEGI 1988) y es regado por los ríos Texolo, mismo que forma las Cascadas de Texolo, Grande, Pixquiac y Xoloapa; tiene un clima semicálido (A)C(fm) con una temperatura media anual mayor de 18°C y una temperatura del mes mas frío entre 3°C y 18°C, con lluvias todo el año y con una precipitación anual del mes mas seco mayor de 40 mm³, y un porcentaje de lluvia invernal menor de 18mm³ (INEGI 1988) (Tipos de clima según Köppen modificado por García). Presenta vegetación característica del Bosque Mesófilo de Montaña.

Su carta geológica es rocas ígneas extrusivas básicas *Q(igeb)*, con un tipo de suelo Andosol molico con una clase textural media y Luvisol crómico con vertisol crómico al igual que una clase textural media (carta estatal de suelos, INEGI 1988). En la parte Este del territorio municipal se presenta una zona de aproximadamente 58 Km² (76%), cuyas altitudes están comprendidas en el intervalo de 1000 a 2000msnm, mientras que en la porción Oeste y Noroeste se localizan altitudes entre 2000 y 3000 msnm en un área de 18 Km² (24%) (Gómez 1991).

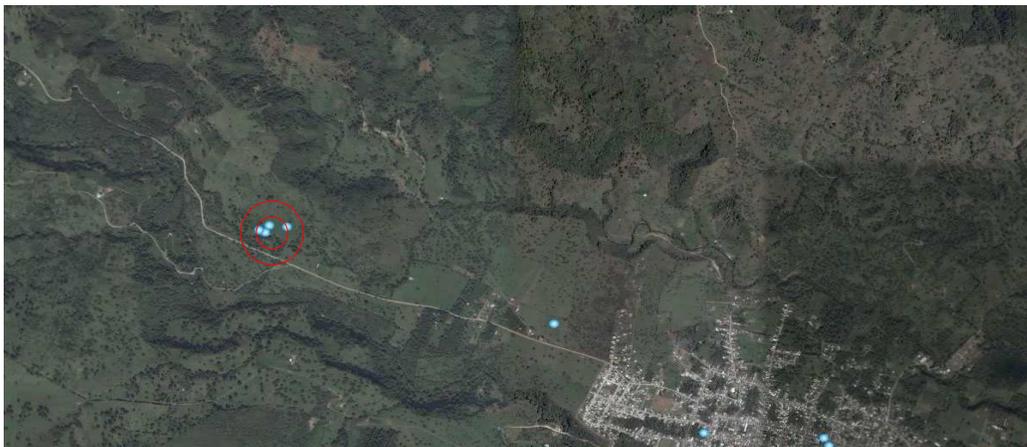


Fig.3.1. Area de colecta cerca de la cascada la Monja (señalado en círculos rojos) en Xico, Veracruz, Mex.(Google Earth)

El Bosque Mesofilo de Montaña tiene un clima húmedo de altura dentro de las comunidades de la zona montañosa; ocupa sitios más húmedos que los bosques de *Quercus* y *Pinus*, pero más cálidos que el bosque de *Abies*, y más frescos que los bosques tropicales; tienen una condición limitada y fragmentaria. El límite altitudinal inferior en el centro de Veracruz es de 400 m, la precipitación pluvial media anual característica de este tipo de bosque nunca es inferior a 1,000 mm³; así mismo el número de meses secos varía de 0 a 4; son frecuentes las neblinas y la humedad atmosférica es alta; la temperatura media anual varía de 12 a 24°C. Este tipo de bosque se desarrolla en regiones de relieve accidentado y laderas de pendiente

pronunciada; los suelos son someros o profundos, amarillos, rojos o negruzcos, son ácidos (pH 4 a 6), de textura arenosa a arcillosa y húmedos durante todo el año (INEGI 1988).

Fisonómicamente es un bosque denso, por lo general de 15 a 35 m de alto; con frecuencia la comunidad incluye tanto árboles perennifolios como de hoja decidua, en el estado de Veracruz una variante de bosque mesófilo la integran las comunidades de baja estatura, que llegan a ser solo de 8 a 12 m de alto; así *Orepanax* y *Clusia* son dominantes en las regiones de los Tuxtlas, Veracruz, y su talla reducida es debida a la acción de fuertes vientos, a los cuales están expuestas las laderas y cimas de los cerros (Rzedowski 1986). El bosque Mesofilo de montaña que ocupa el 39% del área boscosa de Veracruz, se encuentra en climas semicalido subhúmedo y templado húmedo con lluvias de verano cuya precipitación total anual fluctúa entre 1,500 y 2,000 mm³ y su temperatura media anual entre 14 y 21°C. (INEGI 1988).

4.-*Vismia mexicana* Schledt. (*Clusiaceae*)

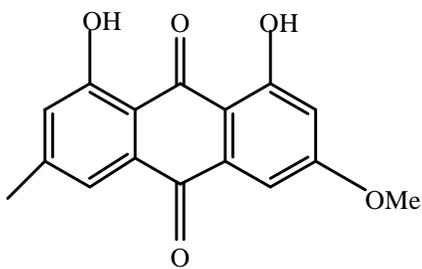
Es un árbol pequeño que crece en los Bosques Mesófilo de Montaña de México, de copa piramidal, hojas pecioladas, delgadas, lanceoladas, de 18 cm de largo, agudas o acuminadas (fig 4.1). Envés finamente blanquecino o parduzco, haz glabro. Inflorescencias terminales en cimas paniculadas. Flores pediceladas, sépalos 5, iguales de 7 mm de largo, pétalos 5, de 7 mm de largo. Fruto: baya, globoso-ovoide, de 1.5 cm de largo, que contiene muchas semillas, su distribución comprende Veracruz, Oaxaca y Centro América (Standley 1928). *Vismia mexicana* es considerada como parte de la vegetación secundaria (Gómez Pompa 1977).

El tronco ser dañado exuda latex amarillo. En los estados Oaxaca y Veracruz, los campesinos lo nombran: “achiotillo, nanchillo, o nanchillo amarillo” (Martínez 1994). Los nahuas del Estado de Puebla lo denominan “manexkuauit” el cual se traduce como “árbol blando (Mora 1985).

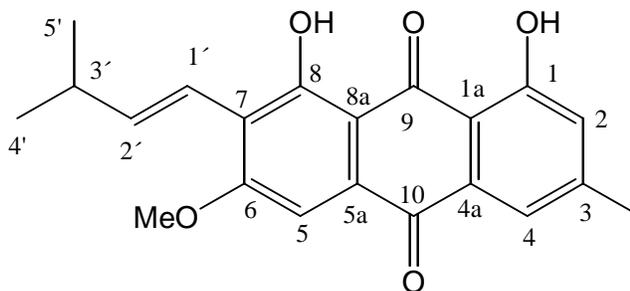


Fig 4.1. Fotos de *Vismia mexicana* del área de Xico, Ver.

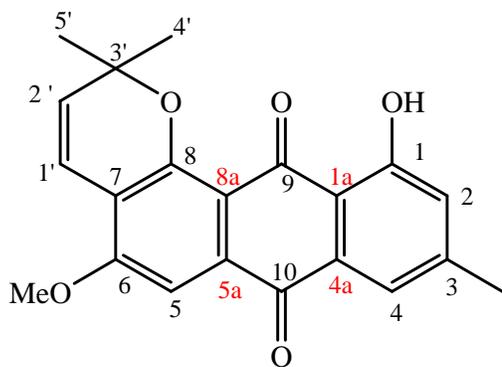
En cuanto a estudios químicos, previamente se han analizado los frutos de *V. mexicana* colectado en Xico, Veracruz, (Pinheiro 1984) obteniendo varios compuestos como: (-)-isocaryofileno, cis- α -farneseno, vismiona A, vismiona B, ferruginina A, cis- γ -hydroxyferruginina A, 7-(trans-3-metil-1-butenil), fision, γ , γ' -dihroxyferruginina A, quercitina, (-)-epicatequina y procianidina B₂; las hojas no han sido estudiadas químicamente. También se han aislado vismiaquinona A, Vismiaquinona D, de las hojas de *V. Mexicana* (fig 4.2) (Reyes-Chilpa 2010, comunicación personal)



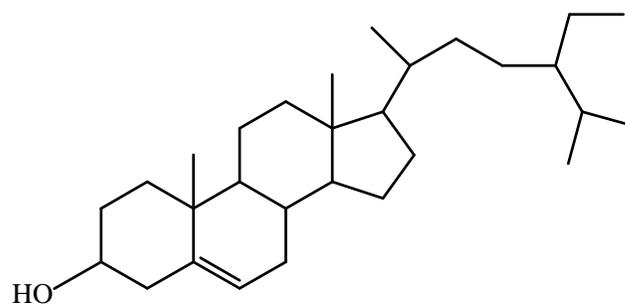
fisión



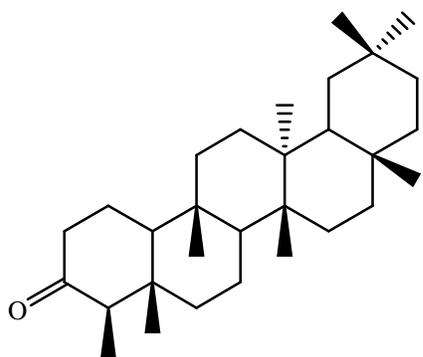
Vismioquinona A



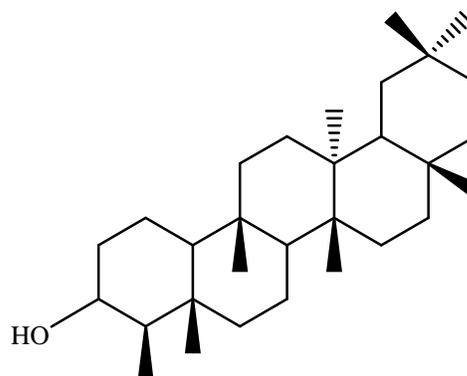
Vismioquinona



Sitosterol



Friedelina



3-Hidroxifriedelina

Fig. 4.2. Compuestos aislados del extracto de CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) de las hojas de *V. Mexicana*.

En observaciones preliminares realizadas con ejemplares colectados en septiembre de 2003 en la región de Xico, Veracruz, se detectó que las hojas sanas y dañadas por herbivoría muestran un patrón cromatográfico diferente (fig 4.3). En particular las hojas sanas no presentan un compuesto o grupo de compuestos que si se encuentra(n) en las hojas atacadas (Véase figura 4.3). Aun no se ha identificado dicho compuesto.

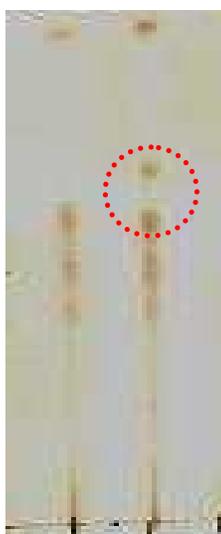


Fig. 4.3. Compuesto sintetizado *de novo* ($R_f = 0.67$) en hojas atacadas de *Vismia mexicana*. Cromatografía en capa fina del extracto hexánico de las hojas de *V. mexicana*. a: sanas, b: atacadas.

5.- *Spodoptera frugiperda* (Smith).

Su taxonomía según Arnett (1993) es la siguiente:

Phyllum: *Arthropoda*

Superclase: *Hexapoda*

Clase: *Insecta*

Subclase: *Dicondylia*
Superorden: *Pterygota*
Division: *Neoptera*
Subdivision: *Holometabola*
Orden: *Lepidoptera*
Suborden: *Ditrysia*
Seccion: *Neuroptera*
Subseccion: *Amphiesmenoptera*
Superfamilia: *Noctuoidea*
Familia: *Noctuidae*
Subfamilia: *Amphipyrinae*
Tribu: *Amphipyritini* (Walker)
Especie: *Spodoptera frugiperda* (Smith)

Spodoptera frugiperda es una especie polífaga, pues las larvas se alimentan de las partes aéreas de un gran número de plantas (fig 5.1). Se desarrolla, sin ningún problema, en el rango comprendido entre 20 y 30°C, aunque puede soportar temperaturas comprendidas entre 15 y 35°C, según la fase de desarrollo en consideración (Fontana y Gonzáles 2000). A este insecto se le conoce popularmente como “plaga del maíz”, aunque también se alimenta de algodón, alfalfa, trébol, cacahuate, pastos, tabaco y muchas hortalizas.



Fig. 5.1. Larva (5to. estadio) y palomilla de *S. frugiperda*

Los huevos están cubiertos de pelusa y son de color gris claro, se depositan en la noche en masas de 100 o más sobre pastos u otras plantas, eclosionando como larvas en un periodo de 2 a 10 días. Estas mudan seis veces antes de completar su desarrollo en aproximadamente 20 días; tras lo cual penetran en el suelo y se transforman en pupas. El estado de pupa inactivo dura 10 días, después de los cuales las palomillas adultas emergen y con frecuencia emigran muchas millas antes de que se apareen y las hembras depositen sus huevos (Davidson, y Lyon 1992).

La fase larvaria pasa normalmente por seis estadios o mudas, pero es dependiente de la temperatura. Es posible observar frecuentemente individuos que completan dicha fase en cinco o siete mudas y en menor porcentaje, en 4 u 8 mudas, en la medida que la temperatura es menos adecuada incrementándose o disminuyendo, respectivamente. Como ya se ha dicho, la duración de la fase larvaria y de las fases depende directamente de la temperatura y se puede esperar que en la mayoría de las condiciones en las que se siembra maíz, las larvas completen su ciclo en unos 14 días. De manera general, el daño en las plantas puede manifestarse en la forma de raspado e ingestión de la epidermis superior y del mesófilo de las hojas, muy evidente cuando se presenta en plantas jóvenes, ocasionado por larvas de pequeño tamaño, dejando sólo la epidermis inferior, la cual mientras permanece, le confiere una apariencia traslúcida y que al caerse, deja en la superficie de las hojas unas pequeñas "ventanas" de forma irregular. (Fontana y Gonzales 2000). Los enemigos parásitos de esta especie son numerosos, algunos como la avispa icneumonida *Ophion bilinetaus*, las avispas braconidas *Chelonus insularis* Cress, *Meterous laphygmae* Vier., especies de *Apanteles*, las moscas taquinas *Archytas marmoratus* (Townsend) y otras más (Davidson y Lyon 1992).

6.- Justificación y Objetivos

Justificación:

El presente estudio puede ayudar a documentar que los cambios en la composición química de las hojas afectan su palatabilidad a los insectos, además del interés ecológico básico, es importante identificar las sustancias que defienden o incrementan la palatabilidad de las plantas a los insectos fitófagos, en especial aquellos de importancia agrícola como *Spodoptera frugiperda*.

Objetivo General:

Determinar la existencia del fenómeno de inducción de metabolitos secundarios en hojas atacadas por insectos en *Vismia mexicana*.

Objetivos Particulares:

- 6.1 Determinar el daño por herbivoría y patrón cromatográfico en las hojas de *Vismia mexicana* en diferentes fechas de colecta a lo largo del año y en diferentes estratos.
- 6.2 Evaluar la posible actividad insecticida o antialimentaria de extractos de *Vismia mexicana* con un insecto fitófago generalista *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero del maíz).
- 6.3 Determinar la composición química de los frutos y relacionarla con la composición química de las hojas.

7.- Pregunta Científica e Hipótesis

¿Los cambios en la composición química de las hojas dañadas son causa o resultado del ataque de los insectos herbívoros en el campo?

Las hojas de *V. mexicana* presentarán diferencias en su composición química a lo largo del año y su palatabilidad a un insecto fitófago generalista (*Spodoptera frugiperda*)

8.- Materiales y métodos

8.1 Evaluación de la Herbivoría

Se colectaron hojas de 5 árboles de *V. mexicana* en Xico, Estado de Veracruz, México (octubre 2008 y enero 2009), tomando 3 hojas en cada estrato mediante muestreo aleatorio simple en tres estratos (basal, medio y alto) por árbol. Se estimó el área foliar total con el aparato Portable Area Meter (modelo LI-3000 A LICOR) y el porcentaje de herbivoría por árbol y estrato (Dirzo 1995), (se aplicó el arcoseno (sen^{-1}) para transformar y normalizar datos porcentuales). Los registros del área consumida efectuados en el campo se analizaron para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas. Primero se aplicó la prueba de Leven $p < 0.05$ para determinar si existía normalidad en los datos para proceder a realizar la prueba estadística T-student ($p < 0.05$). En caso de no existir homogeneidad de las varianzas se aplicó una prueba de Kruska-Wallis y C de Dunnet ($p < 0.05$).

8.2 Obtención de extractos

Se prepararon los extractos de hexano, tanto de hojas sanas y dañadas de *V. mexicana*. Para ello se colectaron hojas durante enero y octubre del 2008, así como enero del 2009. Las diferentes colectas se muestran en la tabla 8.2.1. Las hojas de cada lote se secaron a temperatura ambiente y se maceraron con hexano durante 19 días, concentrando el disolvente mediante la acción de un rotovapor. Se calcularon los rendimientos de las últimas dos colectas (tabla 8.2.2)

COLECTA	HOJAS SANAS g	HOJAS DAÑADAS g
OCTUBRE 2008	85.97	376.94
ENERO 2009	30.21	204.57

Tabla 8.2.1. Colectas de las hojas sanas y dañadas de *V. mexicana* en dos diferentes fechas (gramos en peso seco).

MUESTRA	CALIDAD	PESO g	Colecta 10/08 %	PESO g	Colecta 01/09 %
HX	SANA	1.97	2.291	0.60	1.98
HX	DAÑADA	7.88	2.090	6.04	2.95
ACETONA	SANA	8.79	10.224	2.28	7.54
ACETONA	DAÑADA	8.27	21.95	102.36	5.01
MeOH	SANA	2.10	24.473	8.23	27.24
MeOH	DAÑADA	8.14	21.597	54.67	26.47

Tabla 8.2.2. Rendimiento (%) de los extractos de hexano (HX), acetona y metanol (MeOH) de las hojas de *V. mexicana*.

8.3.- Análisis de los extractos por CCF

Los extractos obtenidos se analizaron por cromatografía en placa fina (CCF). Para ello se usaron cromatofolios de sílica gel de 0.25 mm de espesor (Merck). Se prepararon soluciones de los extractos a una concentración de 40 mg/ml, aplicando 5 µl de cada extracto en el cromatofolio. Como fase móvil (FM) se emplearon diferentes mezclas de disolventes, para visualizar los compuestos se empleó; luz ultravioleta (254 y 366 nm) y como revelador vainillina. Esta fue una combinación de 2 soluciones:

Solución I. Acido Sulfúrico al 5% etanólico

Solución II. Vainillina al 1% etanólico

Para visualizar las fracciones el cromatofolio fue revelado por aspersión con la solución I, e inmediatamente después con la solución II, después la placa es calentada a 110 °C de 3 a 5

minutos, posteriormente es sometida a cuidadosa observación. Este tratamiento permite revelar principalmente aceites esenciales (terpenos, derivados de fenilpropanos, fenoles, etc. (Wagner, Bladt y Zgainsky 1984). Cabe señalar que la solución de vainillina fue la mejor de una serie de reveladores previamente probados, a saber: sulfato sérico, azul rápido, hidróxido de potasio, cloruro férrico, entre otros.

Los extractos de hexano de las hojas dañadas y sanas se compararon con un extracto hexánico de los frutos (Septiembre de 2003) de *V. mexicana* por ccf como antes se señaló, encontrando similitudes en el perfil cromatográfico de las hojas sanas y dañadas con el de los frutos (fig 8.3.1). Debido a la baja cantidad disponible de extracto de hojas dañadas, se decidió trabajar en la separación de los compuestos con el extracto de frutos.



Fig 8.3.1 CCF de los frutos y hojas de *V. mexicana*; FM: Hx /AcOET 9:1.

8.3.1 Aislamiento e identificación los compuestos químicos (Extracto hexánico de frutos).

La separación de los diversos compuestos químicos del extracto hexánico de los frutos de *V. mexicana* se realizó por cromatografía en columna (CC). Para ello se empleó Silica Gel 60, malla 70-230. Se aplicaron 5.61 g del extracto de hexano de los frutos de *V. mexicana* colectadas en septiembre de 2005, usando como eluyentes Hexano/Acetato de etilo, obteniendo un total de 170 fracciones (Tabla 8.3.1.1). Con el fin de observar el comportamiento químico de las diversas fracciones obtenidas se sometieron a CCF (fig 8.3.1.1) usando el procedimiento descrito en el párrafo previo. Las fracciones con perfil cromatográfico similar se reunieron y de ser el caso se sometieron nuevamente a CC o bien a cromatografía en capa fina preparativa (CCFp), para lo cual se emplearon cromatoplasas de silica gel de 2 mm de espesor (Merck).

Fracción	Volumen ml	Color	F.M.Hx/AcOEt
1-15	150	Transparente	100/0
16-32	75	Transparente	100/0
33-54	75	Amarillo	100/0
55-58	150	Amarillo	100/0
59-82	250	Amarillo	100/0
83-84	250	Transparente	100/0
85-87	250	Amarillo	100/0
88-89	250	Amarillo	90/10
90-92	250	Rojo-Naranja	90/10
93-114	250	Amarillo	90/10
115-127	250	Amarillo	80/20
128-137	250	Amarillo	70/30
138-144	250	Rojo oscuro	50/50
145-149	250	Amarillo	30/70
150/162	250	Rojo	0/100
163-167	250	Rojo oscuro	MeOH/AcOEt 30/70
168-170	250	Rojo oscuro	50/50

Tabla 8.3.1.1 Elusión de la Columna I (Extracto de hexano de los frutos) VMFRH.

Fracciones 1 a 14.

La fracción 1 analizada mediante CCF con una F.M. Hx/AcOEt (9:1) (fig.8.3.1.1), usando como reveladores las soluciones I y II mostró una mancha de color morado, mientras que las fracciones 2 a 6 una mancha de color azul/morado. De la fracción 7 (VMFRH7) se obtuvo una cera transparente (5.7 mg) revelando en ccf de color azul, y se analizó por EM. Las fracciones 8-13 mostraron en ccf una mancha azul/ morado.

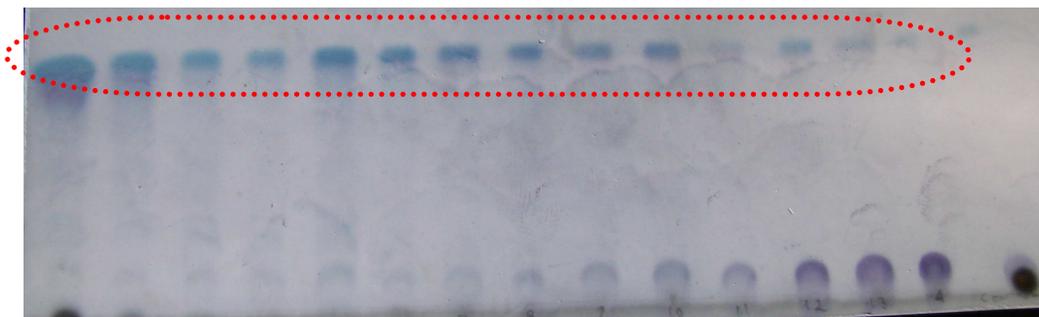


Fig. 8.3.1.1 CCF de las fracciones 1- 14 de la columna del extracto hexánico

Fracciones 3-14

Las fracciones 3 a 14 (excepto la fracción 7 que fue usada para análisis de EM) se juntaron por su similitud química tal como lo reveló la ccf con una FM Hx/ AcOEt (95:5), (fig.8.3.1.2) obteniendo 57.0 mg. Después se realizó una CCFp con una F.M. Hx/ AcOEt (99:1) recuperando 5 fracciones, de las cuales solo tres fueron de interés:

Subfracción 1 (VMFRH 3-14 (1)). Se obtuvo un aceite incoloro (20.8 mg) que reveló en CCF como una mancha de color azul/morado y se analizó su espectro de RMN¹H .

Subfracción 3. Se obtuvo una cera incolora (8.2 mg) que reveló en CCF como una mancha de color azul/morado

Subfracción 4 (VMFRH 3-14 (4)). De este se obtuvo una cera incolora (16.9 mg) que reveló en CCF como una mancha de color azul y se analizó por RMN¹H.

Dichas fracciones se juntaron con el fin de obtener una mayor cantidad (45.9 mg) y se les nombró VMFRH F3-14(1, 3, 4). Después de ser analizadas por RMN¹H, RMN¹³C y DEPT, se observó que se habían contaminado con ftalatos. Para purificarlas y sobre todo proceder

al aislamiento del compuesto que revelaba como una mancha azul, se realizó una CC (Silica Gel 60, malla 70-230) eluyendo con Hx/AcOET obteniéndose 6 fracciones de 75 ml. c/u, las cuales presentaban la “mancha azul” que se buscaba obteniendo:

Subfraccion 1 VMFRH2 (1). Se obtuvo 16.4 mg Reveló de color azul, se realizó RMN¹H, RMN¹³C, DEPT, IR

Subfraccion 4 VMFRH2 (4). Se obtuvo 6.6 mg reveló de color azul, se realizó RMN¹H, IR, EM Dichas subfracciones además se analizaron por CG-EM identificándolas como una mezcla de alcanos.

Fracciones 23-35

De estas fracciones se obtuvo un aceite color naranja (94.7 mg) que reveló en CCF como una fracción compleja incluyendo una mancha de color rosa (Rf= 0.81) (fig 8.3.1.2) que también se observó en los extractos del fruto, así como en las hojas sanas y dañadas de las dos colectas (octubre 2008 y enero 2009). Posteriormente estas fracciones se sometieron a CC (Silica Gel 60, malla 70-230) eluyendo con Hx/Acoet obteniendo 40 subfracciones, de las cuales solo dos subfracciones (12 y 13) presentaron la manchas rosa VMFRF 23-35 (12) y VMFRF 23-35 (13) (fig 8.3.1.2). Ambas subfracciones fueron un aceite de color naranja e insolubles en MeOH; este material se reunió (74.8 mg) y se realizó una CC (Silica Gel 60, malla 70-230) eluyendo con Hx/AcOET, observando por ccf que la mancha rosa esta presente en las subfracciones 6-11, las cuales se analizaron por CG-EM, indicando mediante la base de datos de la biblioteca interna del cromatografo de gases- que se trataba de una mezcla de esteres de ácidos grasos, triterpenos, alcoholes.



Fig 8.3.1.2. CCF Fracciones 23-25

Fracciones 36-45

De esta fracción se obtuvieron 180 mg, este material se sometió a CC (Silica Gel 60, malla 70-230) eluyendo con Hx/AcOEt. De las subfracciones 9-10 se formó un precipitado en forma de cristales (6.8 mg) con punto de fusión 250-254 °C el cual se analizó por su espectro de RMN¹H y de EM indicando que se trataba de un triterpeno. El sobrenadante o aguas madres (81.5 mg) se sometió a CC (Silica Gel 60, malla 70-230) eluyendo con Hx/AcOEt, de las subfracciones VMFRSF9-10(2-6) (fig 8.3.1.3) se obtuvieron cristales incoloros (15 mg), que analizados por RMN¹H y EM se pudo concluir que era el triterpeno friedelina.

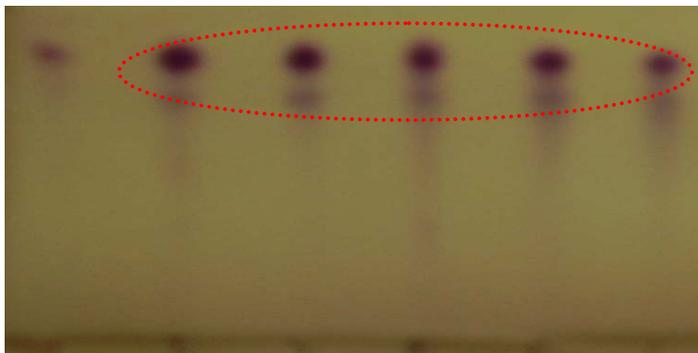


Figura 8.3.1.3. CCF de las subfracciones 2-6 (FM Hx/ AcOEt 9:1).

Fracciones 90-92

Estas fracciones (fig 8.3.1.5) se reunieron y presentaron una consistencia aceitosa de color rojo, mediante un proceso de decantación se separó un precipitado (7.3 mg) y un sobrenadante (196.2 mg). Este último (VMFRFHF 90-92 Sb1) mostró en CCF una mancha (Rf= 0.35) de color morada, por lo que se realizó una CC (Silica Gel 60, malla 70-230) eluyendo con Hx/AcoEt el cual arrojó diversas subfracciones. La subfraccion 20-22 (fig

8.3.1.4) fue un aceite de color rojo (15.3 mg), el cual se le analizaron sus espectros de UV, RMN¹H y RMNC¹³, IR, HETCOR sugiriendo un compuesto con 40 átomos de carbono al cual no se le determino su estructura definitiva.

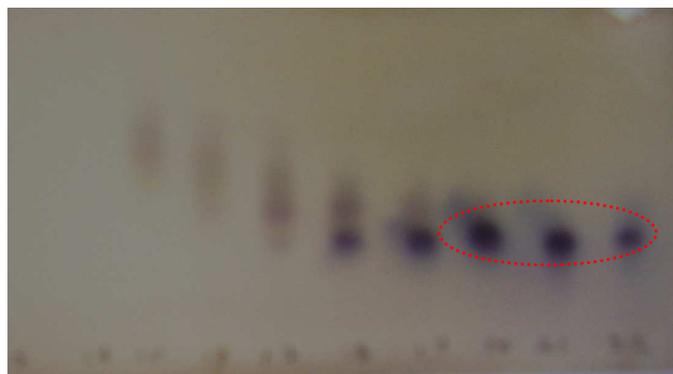
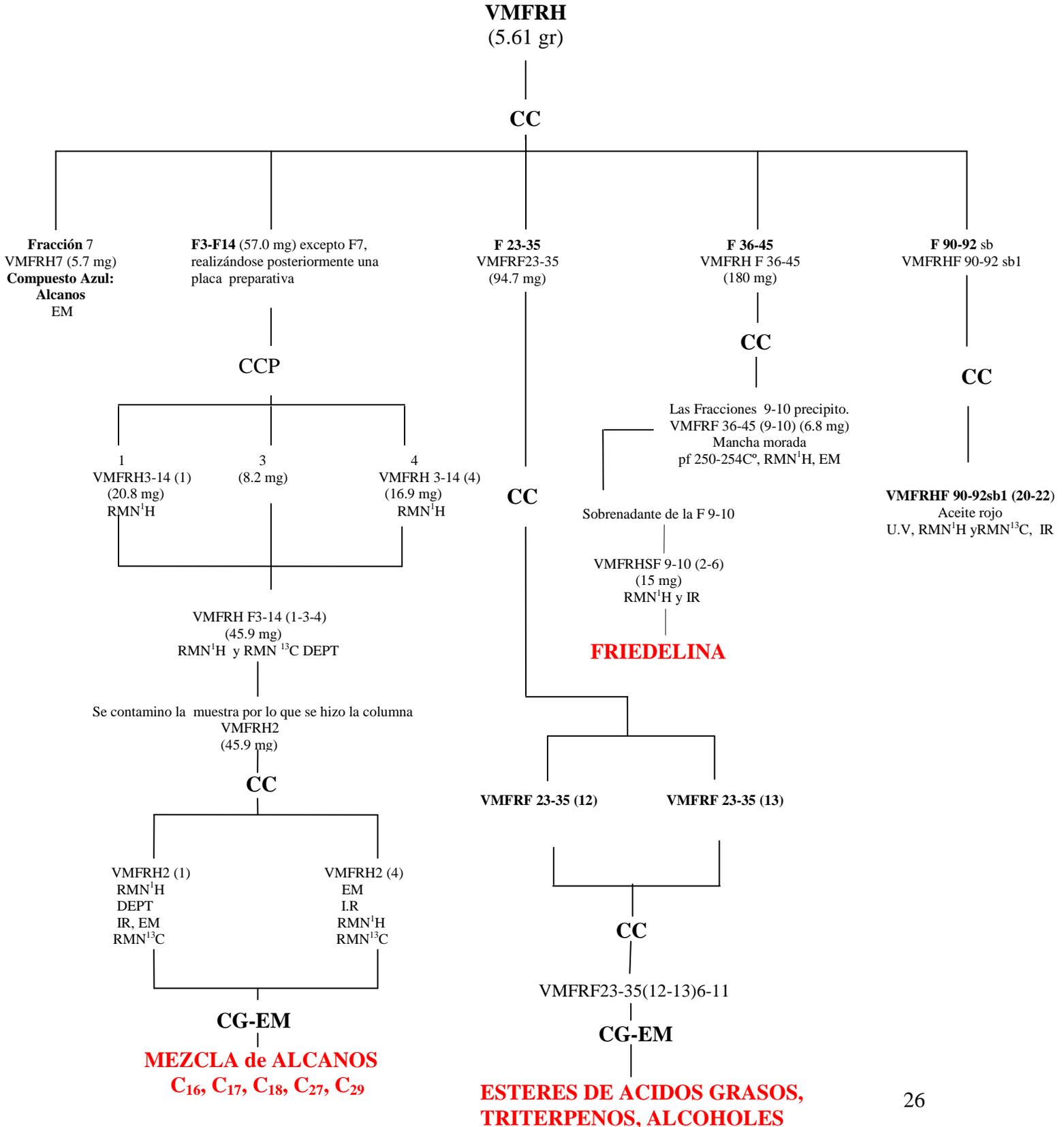
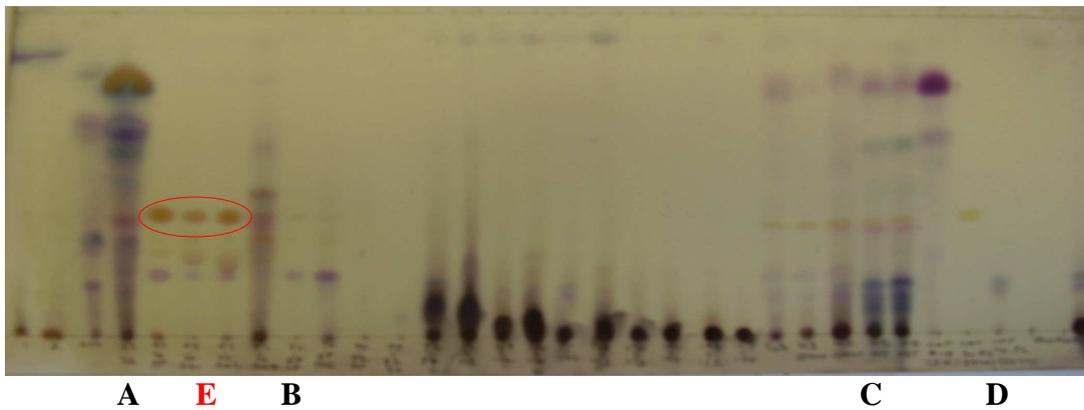


Fig 8.3.1.4. CCF de las fracciones 90-92 (subfrac. 20-22) (FM Hx/ AcOET 9:1)

Figura 8.3.1.5 Separación de los componentes del Extracto Hexánico de los Frutos de *V. mexicana* (VMFRH)





- A. Fracciones 23-35
- B. Fracciones 90-92
- C. Fruto extracto hexánico de *V. mexicana*
- D. Fracciones 36-45 (9-10)
- E.** Fracciones que contienen posibles vismionas ($R_f = 0.46$), sin embargo no se analizaron químicamente (Reyes-Chilpa 2010, comunicación personal)

Fig 8.3.1.6. CCF de las fracciones reunidas del extracto hexánico (FM Hx/ AcOET 9:1)

9.- Bioensayos

Se evaluó el efecto de los extractos de hexano de las hojas de *V. mexicana* sobre la alimentación de un insecto generalista *Spodoptera frugiperda* (Smith). Se realizaron dos tipos de bioensayo con esta plaga del maíz.

9.1.-Bioensayo de elección

Se utilizó la metodología descrita por Valencia 2000; citado por Rodríguez (2008). Para ello se adiciona agar al 3 % en un vaso de precipitado de 1 L después se esteriliza en un autoclave a 15 libras/10 min, inmediatamente se vacían aproximadamente 10 ml en cajas Petri de 8.5 cm de diámetro. El agar se deja enfriar a temperatura ambiente y después con la ayuda de un sacabocados (área: 1.68 cm²) se hacen 4 perforaciones ubicadas a 90° unas a otras de distancia una de otra. Posteriormente se coloca sobre cada perforación un círculo de hoja de “acelga” orgánica comestible (*Beta vulgaris* var. cicla (L) K. Koch) con el envés hacia arriba, el disco se corta con el mismo sacabocados. Sobre cada círculo de hoja se colocan 10 µl de extracto a una concentración de 1,000 ppm, se deja evaporar el disolvente aproximadamente 30 min para después poner en cada caja Petri dos larvas de *S. frugiperda* en quinto estadio (aproximadamente 17.2 mm de largo 2.0 mm de ancho de capsula cefálica). Estas larvas se dejan en ayuno aproximadamente 8 horas antes del bioensayo (la preparación de su dieta artificial se describe en el apéndice 1). El bioensayo se suspende retirando las larvas, cuando estas han consumido el 75% de las hojas; sin embargo no se detiene el bioensayo si consumen solo una hoja de cualquier tratamiento. (Ver apéndice I).

Se evaluó el área foliar no consumida de los círculos de acelga impregnadas con los siguientes extractos hexánicos de hojas de *V. mexicana* o sustancias:

- A. Acelga intacta vs Acelga tratada con disolvente (hexano) (10 repeticiones x duplicado): SHx vs CHx

- B. Acelga tratada con extracto de hojas sanas vs. hojas dañadas, ambas de octubre (5 repeticiones). SO vs DO
- C. Hojas sanas de enero vs Hojas dañadas de enero (5 repeticiones) SE vs DE
- D. Hojas sanas de enero vs Hojas sanas de octubre (5 repeticiones) SE vs SO
- E. Hojas dañadas de Enero vs Hojas dañadas de octubre (5 repeticiones) DE vs DO

Se calculó el promedio de cada tratamiento. Antes de proceder al análisis estadístico se usó la prueba de Levene para determinar si los datos presentan una distribución normal y homogeneidad de varianzas (SPSS V.15). En caso positivo se empleó una prueba de T-student para datos pareados (dos tratamientos en cada caja petri) usando el programa SPSS versión 15.0 tomando un valor de $p \leq 0.05$ como significancia. En caso negativo se usó una prueba Kruska-Wallis.

9.1.1 Evaluación del área foliar consumida

Una vez concluido el bioensayo, los restos de cada disco de hoja fueron adheridas a una hoja en blanco, posteriormente se digitalizaron y fueron guardadas como archivo TIFF, para después analizarlas con un software de libre acceso llamado Scion Image, calculándose así el área no consumida, la cual fue restada del área total, para finalmente sacar el área consumida por *S. frugiperda*.

Se calculó el promedio de cada tratamiento; antes de proceder al análisis estadístico se usó la prueba de Levene para determinar si los datos presentan una distribución normal y homogeneidad de varianzas. En caso positivo se empleó una prueba de T-student para datos pareados usando el programa SPSS versión 15.0 tomando un valor de $p \leq 0.05$ como significancia. En caso negativo se usó una prueba Kruska-Wallis y/o C de Dunnet para datos con distribución no paramétrica.

9.2 Bioensayo de alimentación forzada

Se evaluó el efecto de los extractos de hexano de *V. mexicana* sobre la alimentación de *S. frugiperda* mediante un ensayo de alimentación forzada con 5 repeticiones por tratamiento. El material y procedimientos fueron los mismos que el anterior bioensayo, pero solo se realizó una perforación al agar colocando un círculo de acelga con 40,000 ppm (10 µl) con cada extracto y/o compuesto puro.

El disolvente se dejó evaporar durante 30 min, para después colocar en cada caja Petri 1 larva de *S. frugiperda* en quinto estadio (aproximadamente 17.2 mm de largo y 2.0 mm de ancho de capsula cefálica). Las larvas se dejaron previamente en ayuno 8 horas. El bioensayo se detuvo hasta que ya no hubo más actividad alimentaria de la larva. Al igual que en el ensayo previo, los restos de las hojas se digitalizaron y guardaron en archivo TIFF y se usó el programa “Scion image” para determinar el área foliar no consumida. Previo al análisis estadístico se aplicó una prueba de Levene para determinar la normalidad de los datos, y decidir si se usa la prueba de ANOVA o Kruska-Wallis.

Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- Hoja sin hexano
- Hoja con hexano
- Hoja sana de enero 2009
- Hoja dañada de enero 2009
- Hoja sana de octubre 2008
- Hoja dañada de octubre 2008
- Friedelina
- Mezcla de alcanos

10.- Resultados

10.1.- Evaluación de la Herbivoria

Los registros efectuados en el campo indican que la herbivoria en árboles de *Vismia mexicana* muestreados en dos fechas de colecta es diferente, esto es hay mayor herbivoria en octubre que en enero (Tabla 10.1.1). Sin embargo, en cada fecha de colecta se encontró que no hay preferencia por algún estrato en específico, es decir los herbívoros consumen de igual forma la hojas de estratos inferior, medio y alto (Tabla 10.1.2) (apéndice II).

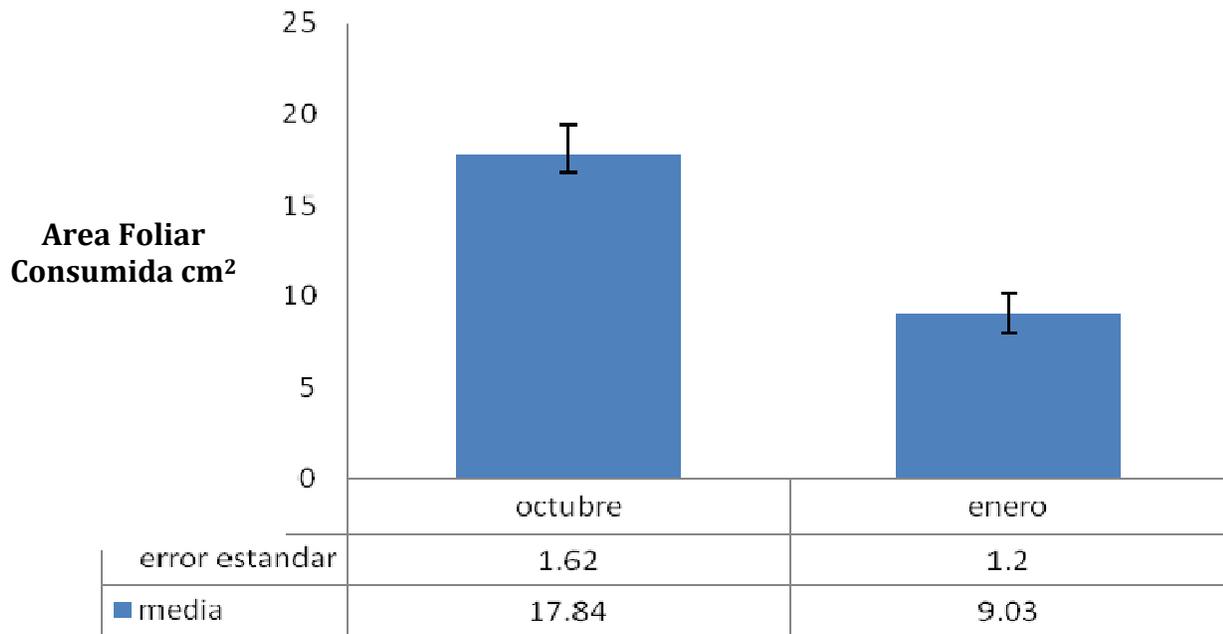


Tabla 10.1.1 Área foliar consumida (cm²) en árboles de *V. mexicana* en dos fechas de colecta. Levenne $p \leq 0.05$. *Diferencias estadísticamente significativas, T-student $p < 0.05$.

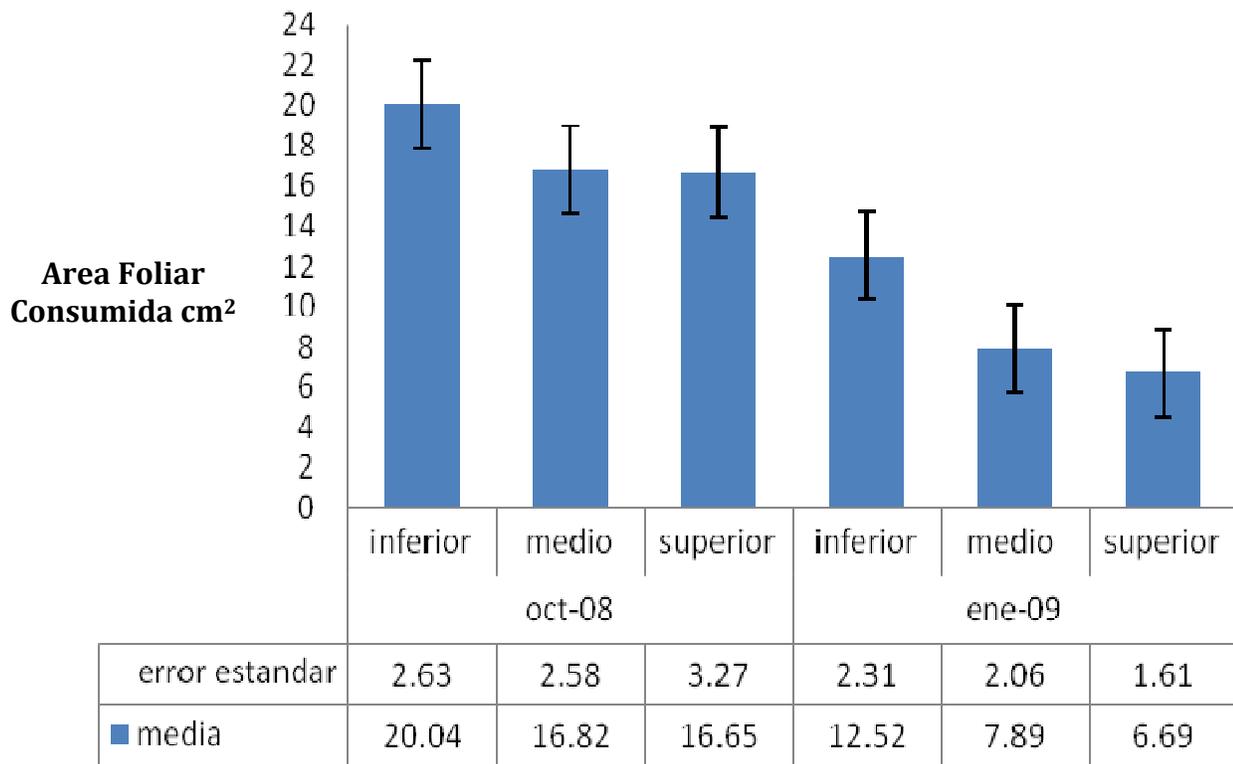


Figura 10.1.2. Porcentaje de área foliar consumida en tres estratos de árboles de *V. mexicana* al interior de cada fecha de colecta. (Media \pm error estandar, n= 15) (octubre 2008 y enero 2009 Levenne: $p < 0.05$; ANOVA: $p < 0.05$. No hay diferencias estadísticamente significativas (Apéndice II).

10.2.- Climatología

Se tomaron las temperaturas y precipitación pluvial reportadas por la estación Tembladeras ubicada en Xico, Veracruz (datos facilitados por la CONAGUA), cabe recalcar que la toma de la temperatura fue siempre a las 8 hrs; de igual manera, no hubo presencia de nieve ni niebla tanto en octubre del 2008 y enero del 2009 pero si nubosidad en dichos meses.

En lo que respecta a las condiciones climatológicas los días de colecta, la primera se realizó el viernes 3 de octubre del 2008 a las 10 hrs, dicho día presentó las siguientes condiciones: temperatura a las 8 hrs fue de 6 °C, temperatura máxima 12°C; temperatura mínima 3°C; precipitación total (de 8 a 20 hrs) 4 mm³, evaporación total (de 8 a 20 hrs) 0 mm³, no se observó tormenta eléctrica, truenos o relámpagos, granizo, niebla o neblina, nieve; el día fue muy nublado; la velocidad del viento estimada de acuerdo a Beaufort fue un viento débil (entre 0.3 a 3.3 m/seg); y finalmente la dirección del viento fue de SW (Sureste) (CONAGUA).

De igual manera se obtuvieron los datos de la segunda colecta realizada el jueves 31 de enero del 2009 con las siguientes condiciones: Temperatura a las 8 hrs fue de 3 °C; temperatura máxima del día 11°C; temperatura mínima del día 1°C; precipitación total del día (de 8 a 20 hrs) 0 mm³; evaporación total del día (de 8 a 20 hrs) 2.1 mm³; no se observó tormenta eléctrica, truenos o relámpagos; no se observó presencia de granizo, niebla o neblina, ni nieve; el día fue altamente nublado; la velocidad del viento estimada de acuerdo a Beaufort fue un viento débil (entre 0.3 a 3.3 m/seg); y finalmente la dirección del viento fue de N (Norte) (CONAGUA)

La temperatura media mensual a las 8 hrs para enero 2009 fue de 6.77 °C, y para el mes de octubre 2008 que fue de 6.77 °C mostrando gran similitud (fig 10.2.1).La precipitación media mensual para el mes de octubre 2008 fue de 5.08 mm³, mientras que para el mes de enero 2009 fue de 1.80 mm³, por lo que la precipitación pluvial fue mayor para el mes de octubre 2008 con respecto a enero 2009 (fig 10.2.1).

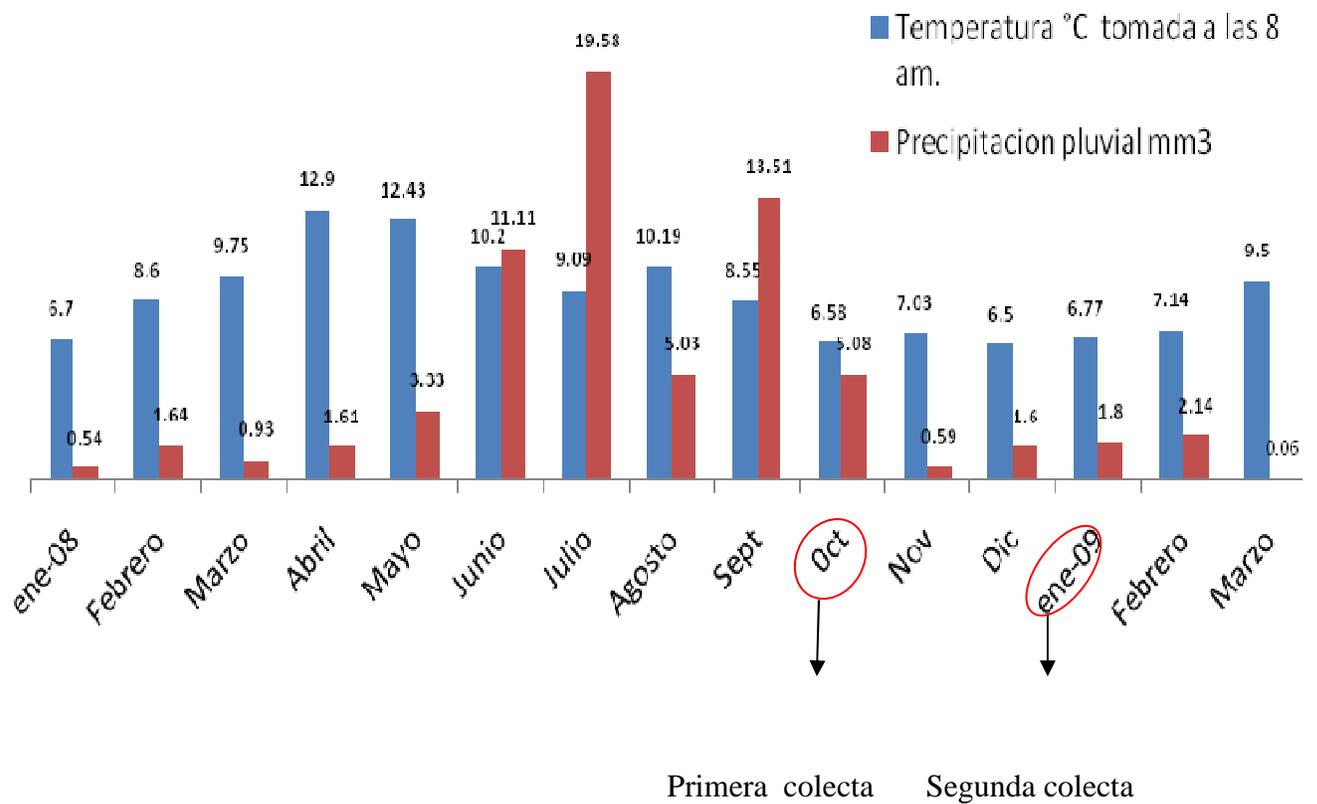


Fig 10.2.1 Datos de Temperatura y Precipitación pluvial tomadas a las 8 hrs en la estación climatológica de Tembladeras en Xico, Veracruz de Enero 2008 a Marzo 2009 (Datos facilitados por la CONAGUA).

10.3.- Estudio químico

El extracto de hexano de los frutos de *V. mexicana* (VMFRH) (5.61 g) se sometió a CC usando como fase estacionaria Silica Gel.

Fracciones 3-14

Se obtuvieron las subfracciones VMFRH2 (1) y VMFRH2 (4), las cuales analizadas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se encontró que contienen una mezcla de alcanos de cadena larga; Hexadecano (C_{16}), Heptadecano (C_{17}), Octadecano (C_{18}), Heptaeicosano, (C_{27}), Nonacosano (C_{29}) (Fig 10.3.1).

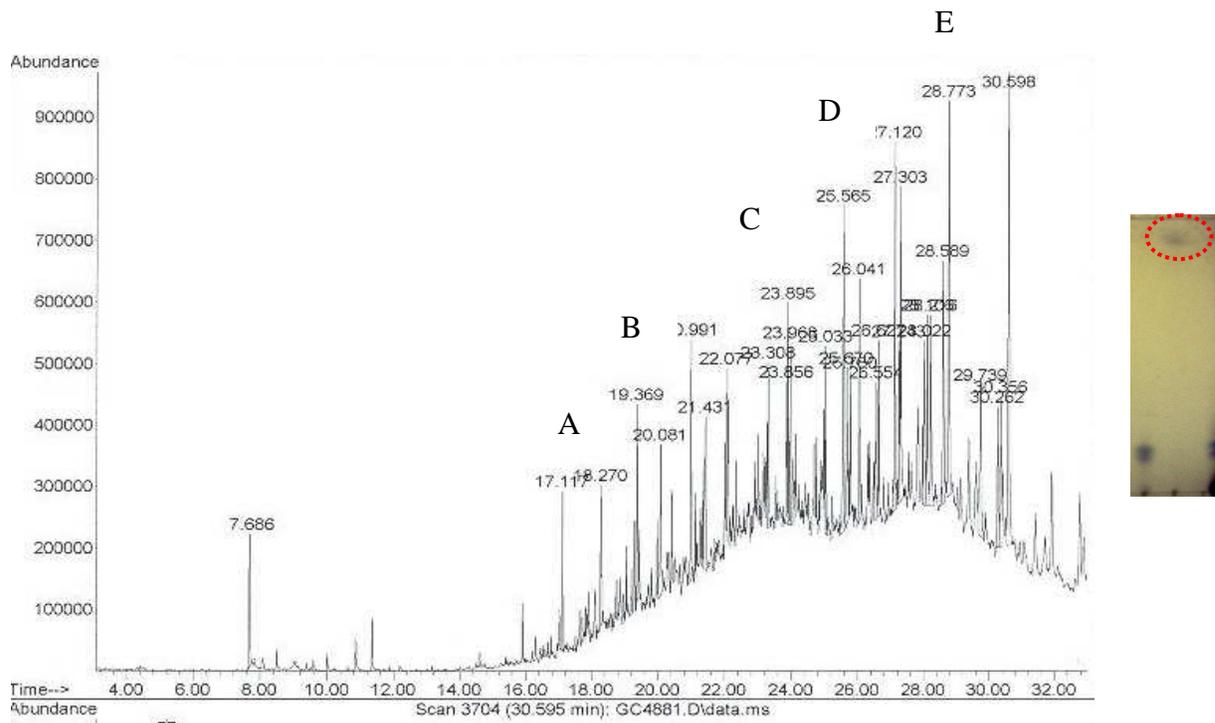


Fig 10.3.1. Arriba: Cromatograma de la fracción VMFRH2 (1) y VMFRH2 (4) el cual arrojó una mezcla de alcanos de cadena larga. A). C_{16} : Hexadecano, B). C_{17} : Heptadecano, C). C_{18} : Octadecano, D). C_{27} : Heptaeicosano, E). C_{29} : Nonacosano.

Fracciones 23-35

De estas fracciones se obtuvieron las subfracciones 12 y 13, estas fueron analizadas por cromatografía de gases acopladas a espectrometría de masas mostró un cromatograma complejo con 12 compuestos; de los cuales cuatro fueron los más abundantes: Metil ester del ac. hexadecanoico, Etil ester del ac. hexadecanoico, Metil ester del ac. 15 tetracosenoico, Lup-20(29)-en-3-ol, acetato, (3alfa) (Fig 10.3.2 y 10.3.3, tabla 10.3.1).

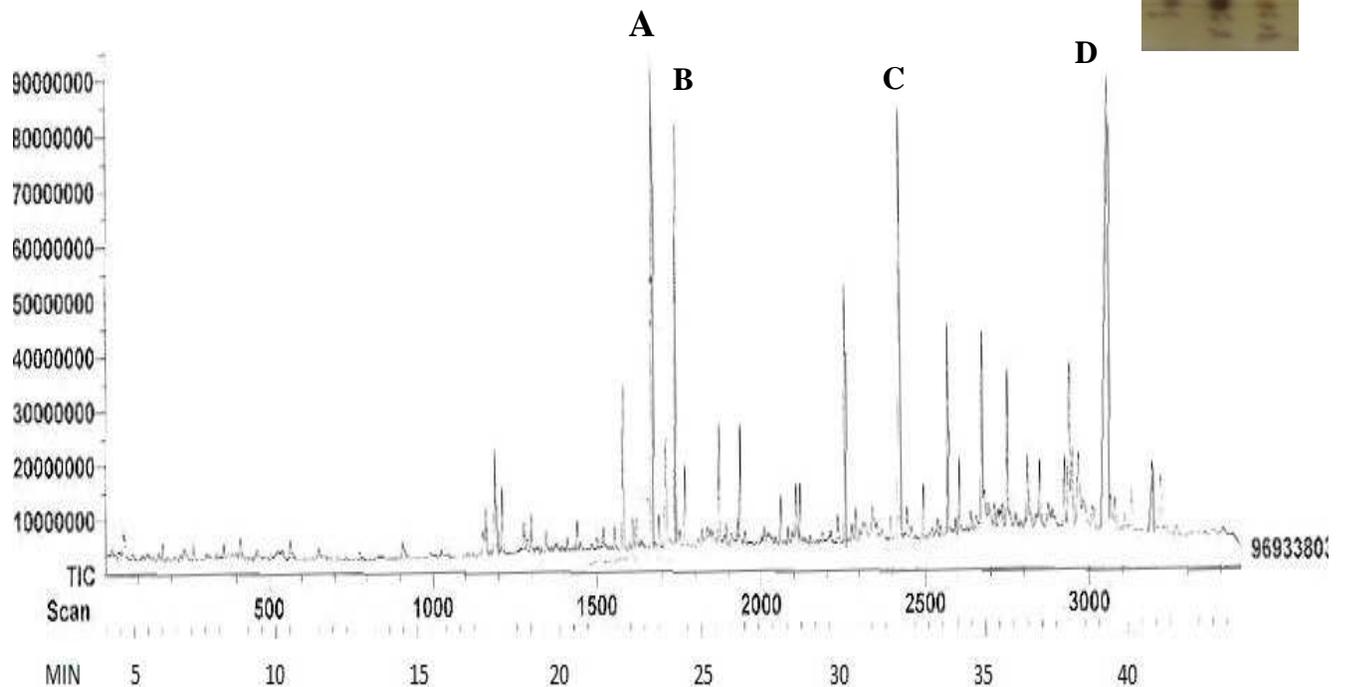


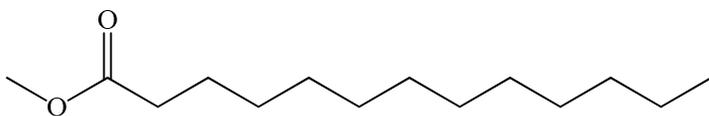
Figura 10.3.2. CCF (arriba) y Cromatograma (abajo) de la fracción VMFRF23-35 (12 y 13). A) Metil ester del ac. hexadecanoico B) Etil ester del ac. hexadecanoico C) Metil ester, del ac. 15 tetracosenoico D) 3 alfa acetato de Lup-20(29)-en.

T.R. (min)	Compuesto	Pm	FS %(Factor similitud)	Abundancia	Observaciones
17.75	Shybutona	220	10.1	+	Sesquiterpeno
22.24	Trimetil 6,10,14- pentadecanona	250	27.2	+	Cetona terpenica C-18
23.27	Metil ester del ac. Hexadecanoico,	270	99.9	++++	Ester de ácido graso
24.09	Etil ester del ac. Hexadecanoico	284	99.9	++++	Ester de ácido graso
25.62	metil ester del ac. Octadecanoico,	298	34.3	++	Ester de ácido graso
26.36	etil 15 metil ester del ac. Heptadecanoico	314	28.1	++	Ester de ácido graso
30.07	Ac. Erucico	338	21.8	+++	Acido graso insaturado
31.96	Metil ester del ac. 15 tetracosenoico,	368	32.1	++++	Ester de ácido graso
33.68	Metil, ester 15-acido tetracosenoico	376	17.8	++	Triterpeno
34.89	Lup-20(29)-en-ol, acetato, (3alfa)	408	12.4	++	Triterpeno
35.78	Octaonasol	392	14.1	++	Alcohol de cadena larga
37.96	1-Triacontanol	429	12.8	++	Alcohol de cadena larga
39.29	Lup-20(29)-en-3-ol, acetato, (3alfa)-	454	18.5	++++	Triterpeno

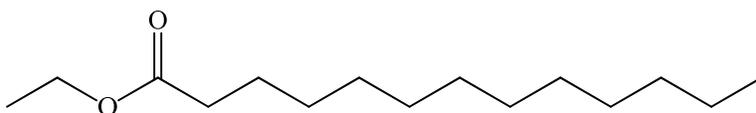
+. Escaso
 ++. Poco abundante
 +++. Abundante
 +++++. Muy abundante

Tabla 10.3.1. Compuestos presentes en la fracción VMFRF23-35 (12 y 13) analizados por CG-EM.

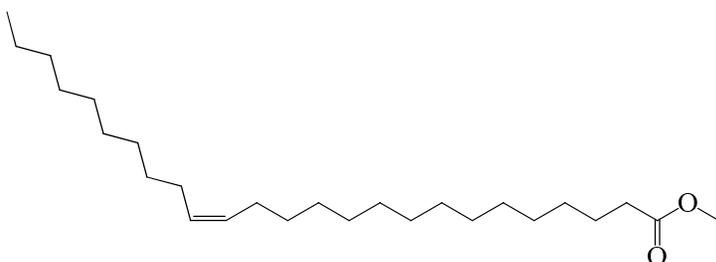
A) Metil ester del ac. Hexadecanoico,



B) Etil ester del ac. hexadecanoico



C) Metil ester del ac. 15 tetracosenoico,



D) 3 alfa acetato de Lup-20(29)-en.

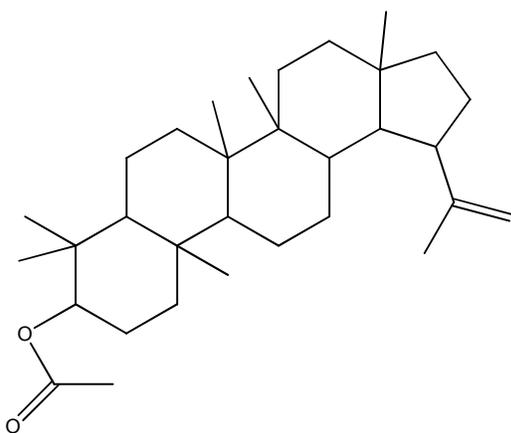


Fig. 10.3.3. Algunos compuestos presentes en la fracción VMFRF23-35 (12 y 13) analizados por CG-EM

Fracciones 36-45

Se sometieron a CC y de las subfracciones 9-10 se obtuvieron cristales incoloros, los cuales mediante análisis de los espectros de RMN¹³C (fig 10.3.5), RMN¹H , DEPT (fig 10.3.6 y tabla 10.3.2) fue identificada como el triterpeno **friedelina** (fig 10.3.4) . Sus datos espectroscópicos fueron comparados con los previamente reportados en la literatura. El compuesto se aisló como un sólido de color blanco con $pf = 250-254\text{ }^{\circ}\text{C}$ (reportado).

Friedelina

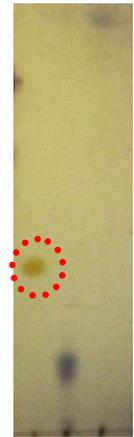
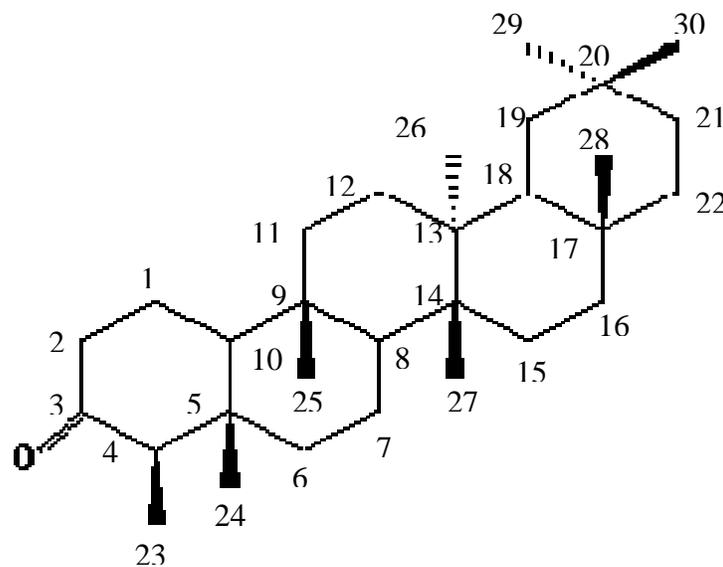


Fig 10.3.4 Estructura de la Friedelina, el cual muestra en triángulos negros sus metilos, y su carbonilo con doble ligadura.

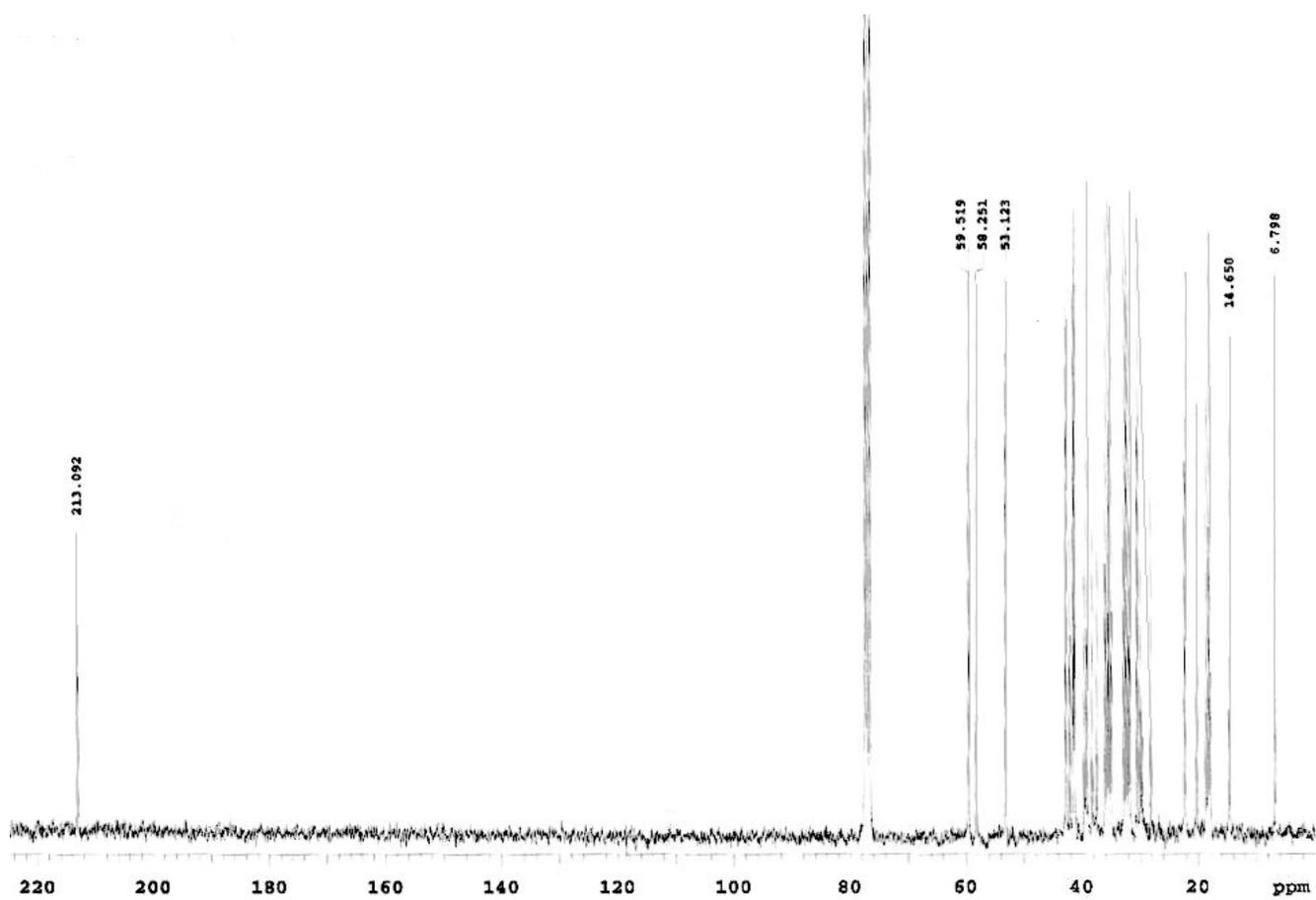


Fig. 10.3.5 Espectro de RMN ^{13}C de Friedelina. (Fracción VMFRHSF9-10(2-6))

C	¹³ C		¹ H
1	22.28	CH ₂	1.69 (1H, m), 1.97 (1H; m)
2	41.52	CH ₂	2.38 (1H, m), 2.31 (1H, m)
3	213.09	C=O	-----
4	58.25	CH	2.24 (1H, c, J = 6.6 Hz)
5	42.13	C	-----
6	41.32	CH ₂	1.29 (1H, m), 1.75 (1H, m)
7	18.24	CH ₂	1.39 (1H,m), 1.49 (1H, m)
8	53.12	CH	1.42 (1H, m)
9	37.47	C	-----
10	59.51	CH	1.55 (1H, m)
11	35.64	CH ₂	1.26 (1H, m), 1.46 (1H, m)
12	30.51	CH ₂	1.34 (2H, m)
13	39.70	C	-----
14	38.32	C	-----
15	32.43	CH ₂	1.31(1H, m) 1.51(1H, m)
16	36.03	CH ₂	1.59(1H, m) (1.39, 1H, m)
17	30.00	C	-----
18	42.83	CH	1.55 (1H. m)
19	35.36	CH ₂	1.22 (1H, m), 1.37(1H, m)
20	28.16	C	-----
21	32.80	CH ₂	1.28 (1H, m), 1.43(1H, m)
22	39.25	CH ₂	1.53 (1H, m), 0.95 1H,m)
23	6.79	CH ₃	0.87 (3H, d, J = 6.6 Hz)
24	14.65	CH ₃	0.72 (3H, s)
25	17.94	CH ₃	0.87 (3H, s)
26	20.24	CH ₃	1.00 (3H, s)
27	18.64	CH ₃	1.05 (3H, s)
28	32.08	CH ₃	1.18 (3H, s)
29	35.00	CH ₃	0.95 (3H, s)
30	31.78	CH ₃	1.01 (3H, s)

*Datos comparados con Akihisa *et al* (1992)

Tabla 10.3.2 *RMN H (300 Mhz, CDCL₃), *RMN¹³C de la Friedelina (74.4 MHz, CDCL₃, δ (ppm))

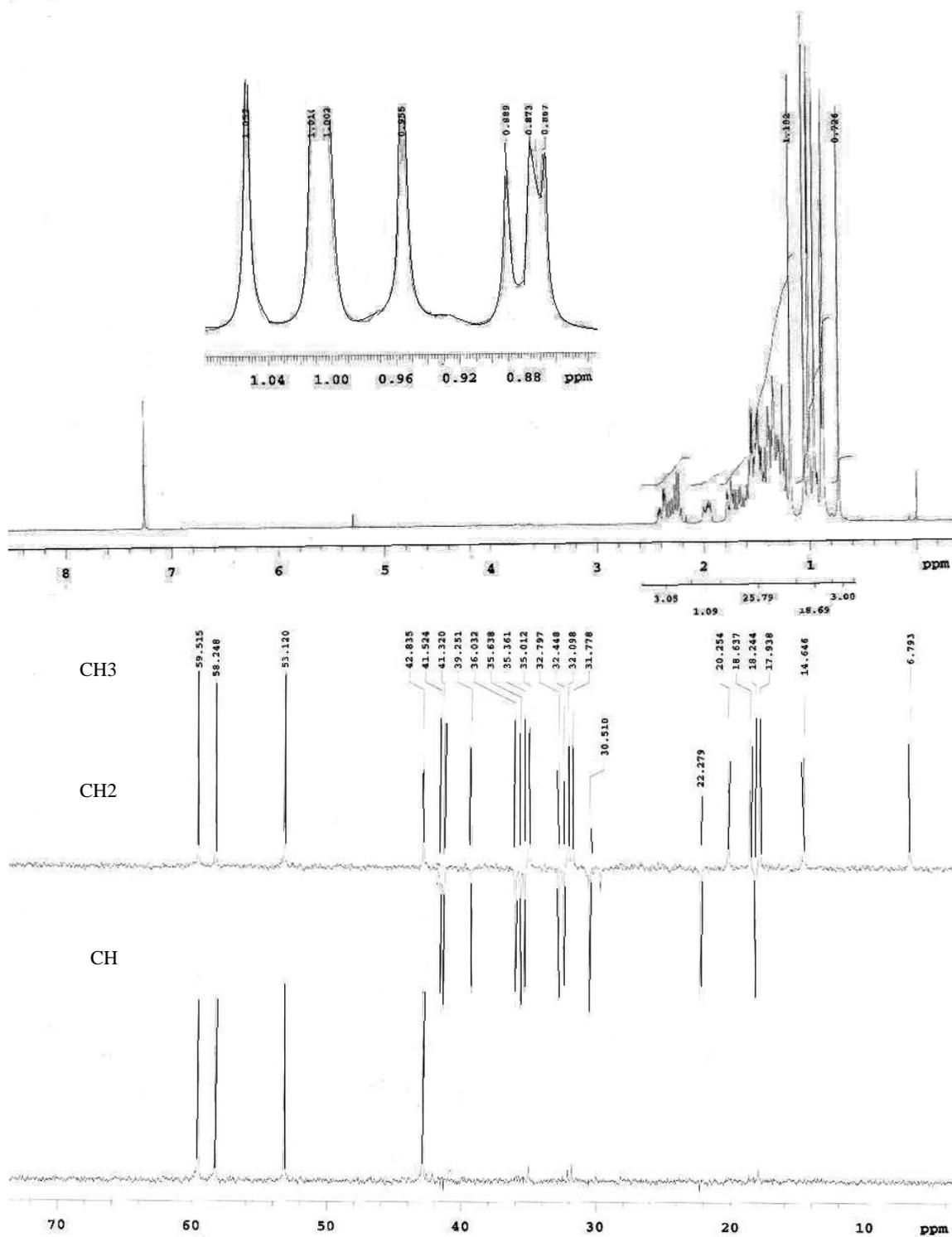


Fig. 10.3.6 RMN¹H y DEPT de Friedelina. (Fracción VMFRHSF9-10(2-6))

Fracciones 90-92

Se sometieron a CC y de las subfracciones 20-22 se obtuvo un aceite de color rojizo insoluble en MeOH, el cual mostró absorción al UV (254 y 366 nm) como una mancha de color naranja. De acuerdo a su espectro de RMN¹³C (fig 10.3.7) se trata de un compuesto C₄₀, pero su identidad no se determinó.

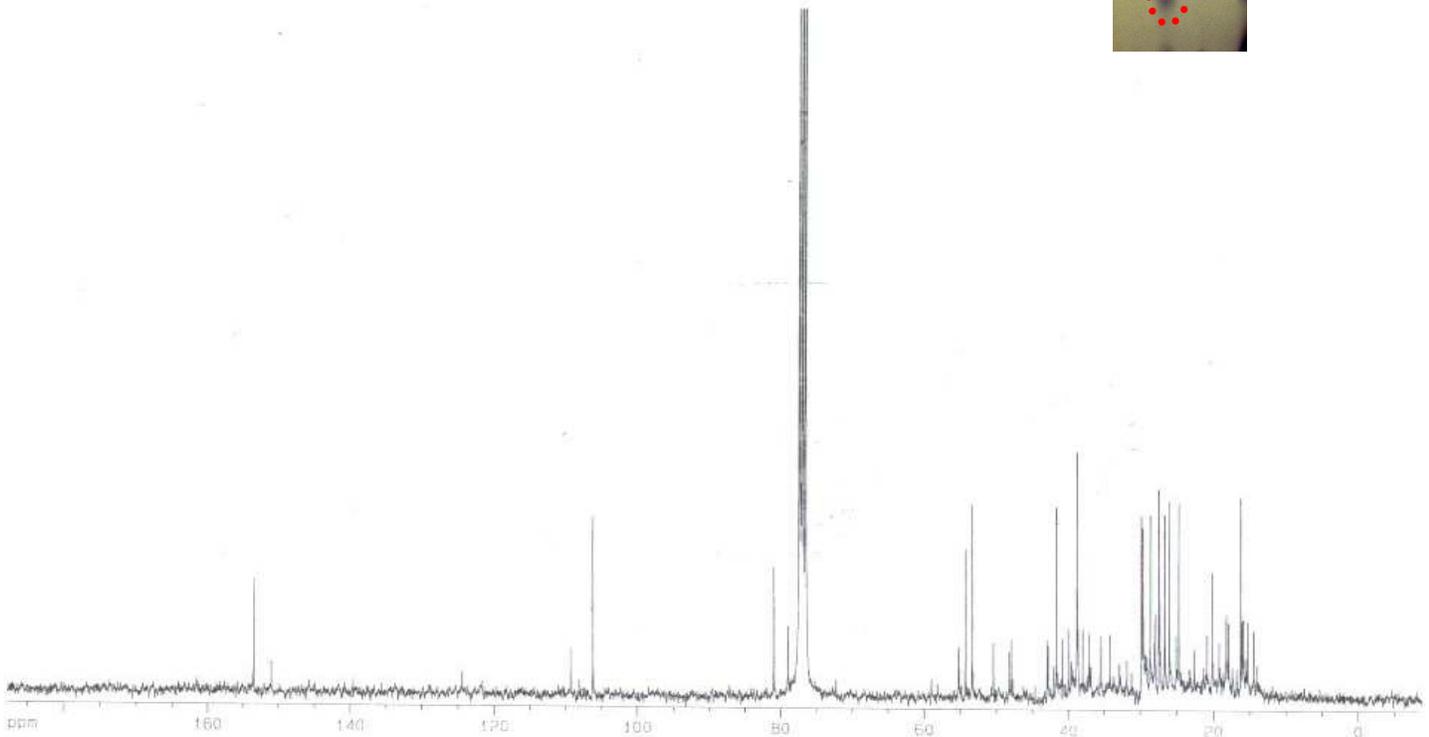


Fig 10.3.7. RMN¹³C de la subfracción 20-22 obtenida a partir del sobrenadante de las Fracciones 90-92, el cual muestra uno o varios compuestos C₄₀

10.4. Bioensayos

10.4.1 Bioensayo de elección

Se evaluó el área foliar consumida de discos de hojas de acelga (1.68 cm^2) ofrecidas a *Spodoptera frugiperda* con los siguientes experimentos:

- A. Acelga intacta vs acelga tratada con disolvente (hexano) (10 repeticiones x duplicado): SHx vs CHx.
Acelga impregnada con extractos de hexano de hojas de *Vismia mexicana*
- B. Hojas sanas vs. Hojas dañadas de octubre (5 repeticiones). SO vs DO
- C. Hojas sanas de enero vs Hojas dañadas de enero (5 repeticiones) SE vs DE
- D. Hojas sanas de enero vs Hojas sanas de octubre (5 repeticiones) SE vs SO
- E. Hojas dañadas de Enero vs Hojas dañadas de octubre (5 repeticiones) DE vs DO

En el caso del experimento A se encontró que los discos de acelga tratadas con hexano fueron mas consumidas que aquellas sin disolvente alguno, (fig 10.4.1.1) (apéndice II), dichas diferencias fueron estadísticamente significativas. (Levenne $p < 0.05$; $p = 0.001$; $X^2 = 145.040$). En el experimento D también se observaron diferencias significativas en el consumo de acelga tratada con hojas de *V. mexicana* sanas de enero vs sanas de octubre; (Levenne $p \leq 0.05$). En el caso de los experimentos B, C, E se observó que no existen diferencias significativas en la herbivoria sufrida por la acelga impregnada con los diversos extractos (Levenne $p \leq 0.05$) (fig 10.4.1.1). (apéndice II).

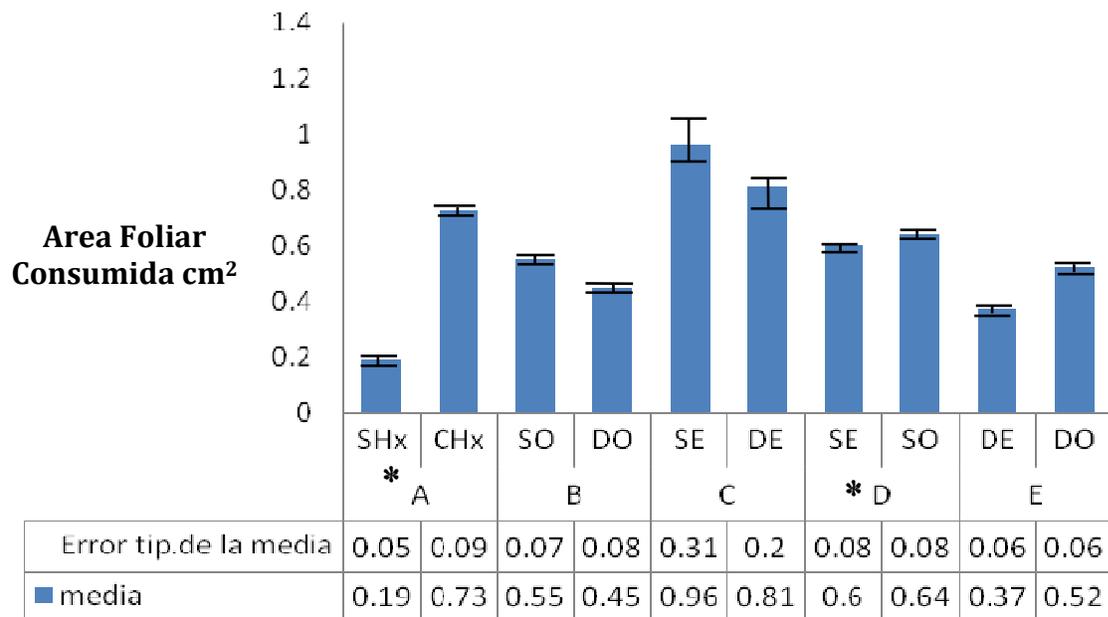


Fig 10.4.1.1 Área foliar (cm²) consumida por *S. frugiperda* de discos de acelga (Levenne $p \leq 0.05$) Tratamientos A, (Levenne $p \leq 0.05$; X^2 $p \leq 0.05$) B,C,E (Levenne $p \leq 0.05$ - student $p \leq 0.05$), D (Levenne $p \leq 0.05$; t-student $p \leq 0.05$). *Diferencia estadísticamente significativa (SPSSV.15) (apéndice II).

10.4.2 Bioensayo de alimentación forzada

Se evaluó el efecto de los extractos de hexano de hojas sanas y dañadas de *V. mexicana* colectadas en dos fechas sobre la alimentación de *S. frugiperda* mediante un ensayo de alimentación forzada. Los extractos se aplicaron en discos de hoja de acelga orgánica. Los discos tratados con el extracto de las hojas de *Vismia mexicana* dañadas de enero 2009 fueron menos consumidas que los discos control. También fueron menos comidas los discos tratados con el extracto hexánico del fruto de *V. mexicana*, así como los tratados con friedelina y mezcla de alcanos. Los otros tratamientos no mostraron diferencias respecto al control (fig. 10.4.2.1) (apéndice II)

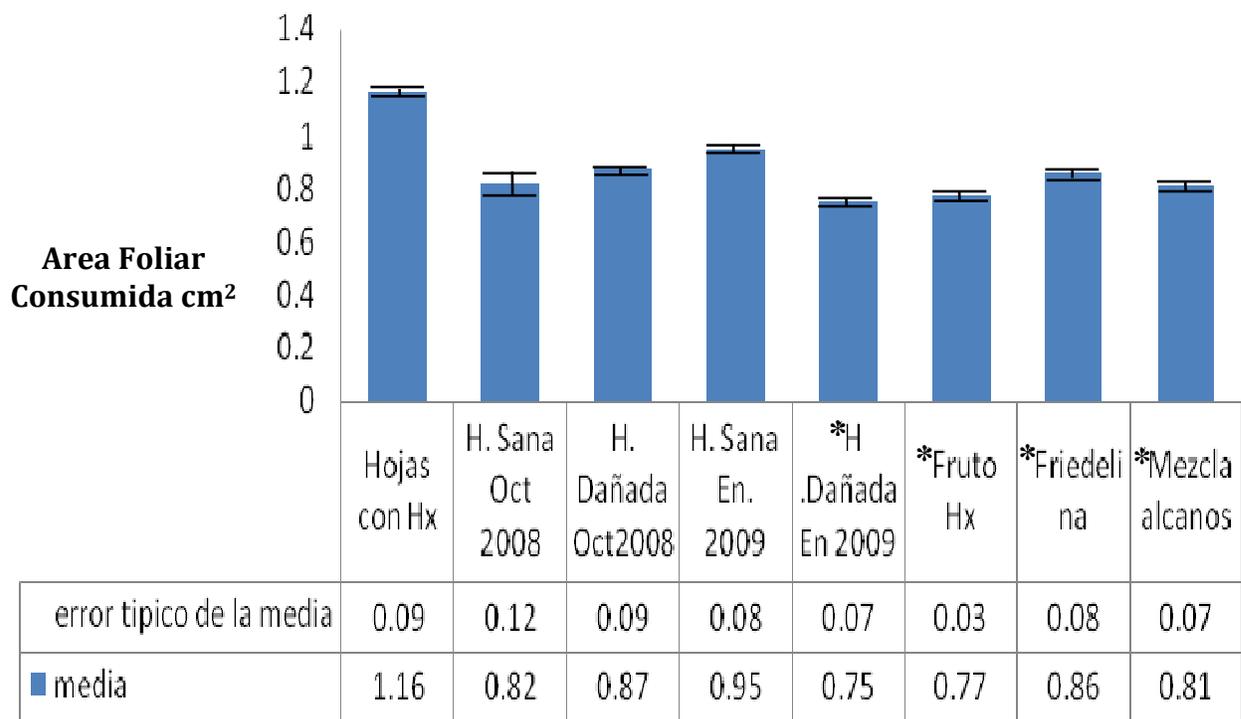


Tabla 10.4.2.1 Efecto de diversos extractos y compuestos de *Vismia mexicana* sobre la alimentación de *S. frugiperda*. Cinco repeticiones por tratamiento. Levenne $P < 0.05$; Kruska-Wallis $p \leq 0.05$. *Diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) (Prueba C de Dunnet) (apéndice II) (SPSS V.15).

11.- Discusión

El extracto hexánico de las hojas de *V. mexicana* dañadas por herbivoría (colectadas en enero 2008) presentaban en ccf una mancha adicional respecto a las hojas no dañadas, motivó que se intentara su caracterización química. Por la baja cantidad de extracto, esto se realizó con el extracto hexánico del fruto, que también contenía dicha mancha. Esta se encontró en las primeras fracciones no polares (3 a 14). Se procedió a su caracterización química y de acuerdo a varios análisis químicos como EM, RMN¹H, RMN¹³C, DEPT, IR y CG-EM se estableció que se trata de una mezcla de alcanos de cadena larga C₁₆: hexadecano, C₁₇: heptadecano, C₁₈: octadecano, C₂₇: Heptaecosano, C₂₉: nonacosano. Aún cuando se trata de moléculas simples, diversos autores han mostrado que los alcanos poseen propiedades biológicas interesantes por su localización en el exterior de los órganos vegetales (cutícula) e intervienen en la protección contra el stress hídrico y la herbivoría.

En efecto, Müller y Riederer (2005) mencionan que las ceras cuticulares de las plantas están compuestas por alcanos de cadena larga (C₂₁-C₃₅), así como también por alcoholes primarios (C₂₂-C₄₀), ácidos grasos (C₂₀-C₂₄), aldehídos (C₂₄-C₃₆), alcoholes secundarios (C₂₁-C₃₅), cetonas (C₂₁-C₃₅), beta dicetonas (C₂₂-C₃₆) y alquil esterés (C₃₆-C₆₀) resultado de la combinación de alcoholes primarios y ácidos grasos. La síntesis de estos compuestos puede ser afectada por varios factores ambientales. Se sabe que el stress hídrico incrementa la velocidad de deposición de ceras en las hojas, así como el cierre de estomas y fallas en el sistema de conducción (xilema y floema). (Sheperd y Griffiths 2006). Cabrera et al (1995) mencionan que la infestación de áfidos (*Graminum schizaphis*) en hojas de *Hordeum vulgare* provoca efectos similares a los provocados por una sequía prolongada como pérdida en el contenido de clorofila, pero también afecta el desarrollo del áfido debido a los efectos del estrés sobre la composición química de la planta.

Woodhead (1983) encontró que eliminando la cera superficial con cloroformo de las hojas de las plántulas de *Sorghum bicolor* cv. 65D eran rechazadas por ninfas de

Locusta migratoria. Al analizar la cera mediante métodos cromatográficos notó que algunos de sus constituyentes químicos, como el para-hidroxi-benzaldehído, alcanos y ésteres tenían efectos disuasorios hacia *Locusta migratoria*. Sandeep et al (2009) reportaron que *Euphorbia hirta* Linnel contiene alcanos de cadena larga (heptacosano, nonacosano) y que el extracto de éter de petróleo de esta especie tiene efectos larvicidas sobre *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegyptii*. Por otra parte, Atkin y Hamilton (1982) estudiaron dos variedades de *Sorghum bicolor*, encontrando que *Locusta migratoria* no mostraba aceptabilidad por las ceras de las hojas jóvenes; al fraccionar la cera, los ésteres resultaron menos apetecibles, pero no los alcanos.

Los registros en campo de *Vismia mexicana* indican que ocurrió mayor herbivoría en octubre del 2008 que en enero del 2009. De acuerdo a los registros climatológicos de la CONAGUA, se presentó una precipitación pluvial tres veces mayor en la primera fecha comparada con la segunda. La disponibilidad de agua pudo favorecer la palatabilidad y calidad alimenticia de las hojas, por otra parte la menor disponibilidad de agua en enero, pudo inducir la síntesis de alcanos en la cutícula y menor herbivoría, lo cual podría ser una hipótesis para futuros estudios.

En los experimentos de laboratorio de elección de dieta por *Spodoptera frugiperda* se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las hojas tratadas con hexano y sin hexano, encontrando que las primeras son más consumidas que las segundas; esto podría deberse a que el hexano disuelve las ceras que protegen el envés de las hojas permitiendo que sean más apetecibles.

En los experimentos de elección con *Spodoptera frugiperda*, la acelga tratada con el extracto de las hojas sanas de *V. mexicana* de octubre 2008 fue más consumida que la tratada con extractos de enero 2009, lo cual coincide con los registros en el campo, aunque en condiciones naturales deben tratarse de otra(s) especie(s) de insecto(s) aún no determinadas. En los bioensayos de alimentación forzada también hay menos preferencia de *S. frugiperda* hacia las hojas de acelga impregnadas con la mezcla de alcanos, friedelina

así como con los extractos de las hojas sanas de enero 2009 y fruto extraído con hexano de *V. mexicana*. Lo anterior sugiere que los tejidos con mayor cantidad de alcanos son menos susceptibles a la herbivoría, ya sea en condiciones naturales y con el insecto modelo; sin embargo no se cuantificó el contenido de alcanos en hojas integra y dañadas.

Además de los alcanos, otros compuestos, como el triterpeno friedelina también podrían tener un papel disuasivo en la alimentación de los insectos. Howard et al (1987) aisló friedelina de *Virola calophylla* (Myristicaceae) mostrando alta actividad antialimentaria hacia gorgojo del algodón *Anthonomus grandis*. Hernández et al (1999) estudiaron el extracto metanólico de *Vitex trifolia* (Verbenaceae) –el cual contiene Friedelina entre otros compuestos- y presentó gran actividad antialimentaria hacia *Spodoptera frugiperda*, también mostró gran inhibición del hongo *Fusarium sp.* Kuete et al (2007) evaluaron el extracto metanólico de hojas, ramitas y raíces *Vismia laurentii* contra bacterias gram-positivas (6 especies), gram-negativas (12 especies) y dos especies de *Candida* encontrando que fue activo contra todos estos organismos, siendo la Friedelina el compuesto más activo.

De *V. mexicana* también se identificaron ácidos grasos y derivados, entre ellos metilhexadecanoato. Ramsewalk et al (2001) encontró gran actividad insecticida de ácidos grasos (ac. Oleico, ac. Linoleico) del extracto hexánico de *Dirca palustris* (Thymelaeaceae) hacia las larvas de *Helicoverpa zea*, *Lymantria dispar*, *Orgyia leucostigmata* y *Malacosoma disstria*. Mallavadhani et al (2003) encontraron gran actividad antialimentaria hacia *Spodoptera litura* de derivados de triterpenos (ursólico y oleanólico) esterificados con ácidos grasos.

Pinheiro et al (1984) estudiaron los frutos de *V. mexicana* colectados de la misma área que la de nuestro proyecto (Xico, Veracruz), encontrando antranoides prenilados. Simmonds et al (1985) quien extrajo antranoides lipofílicos de árboles del género *Vismia* encontró que tienen un efector inhibitorio sobre la alimentación de las larvas de *Spodoptera* y *Heliothis* y *Locusta migratoria*. Este tipo de compuestos, como la

vismiaquinona A y D han sido aislados de las hojas de *V. mexicana* (Ramírez, 2005), y fueron detectados en este trabajo en las fracciones de mediana polaridad del extracto hexánico del fruto, pero no se aislaron ni caracterizaron.

Además de los factores químicos, la mayor herbivoría sobre *Vismia mexicana* presentada en octubre podría deberse a la abundancia de uno o varios insectos herbívoros, e incluso a la ausencia de depredadores de insectos que defiendan al árbol de los herbívoros, incluyendo otros insectos. Gonçalves (2008) hace notar que *Vismia japurensis* posee un sistema para atraer hormigas del género *Crematogaster*) a través de sus peciolo florales provocando que estas defiendan a la planta de cualquier ataque de algún herbívoro, permitiéndole contar con mas recursos energéticos para la creación de nuevas hojas y el crecimiento.

Oki et al (2002) encontraron que no existen diferencias en la tasa de herbivoría sufrida por hojas jóvenes y maduras de *Vismia japurensis* al ser ofrecidas en experimentos de selección a saltamontes y sugieren que por ser una especie pionera sintetiza menos defensas que las plantas persistentes. Vasconcelos (1999) estudió un bosque de vegetación secundaria en la Amazonía Central, en Manaus, Brasil dominado por especies de árboles del género *Vismia* sp. Este autor encontró en ensayos de preferencia en el campo que los árboles pioneros (como *Vismia* sp) son mas apetecibles a las hormigas *Atta laevigata*, en particular las hojas maduras.

Lou et al (2005) menciona que las plantas de arroz dañadas intencionalmente y a las cuales se les aplicó ácido jasmónico, emiten compuestos volátiles, entre ellos mencionan el n-heptadecano (punto de fusión 22 °C, de acuerdo a Carey y Smith, 1993) que atraen a las hembras del saltamontes *Nilaparvata lugens* (Stal.) la cual oviposita en la planta. Estos compuestos volátiles también atraen a *Anagnrus nilaparvatae*, parasitoide del saltamontes como estrategia de defensa de la planta ante la presencia del herbívoro. El n-heptadecano está presente en los frutos de *V. mexicana* pero lo encontramos como parte de una cera y no como compuesto volátil.

Como reflexión personal final, también es importante el estudio de *Vismia mexicana*, ya que Hussein et al (2003) estudiando otras especies del genero *Vismia* (*V. baccifera*, *V. jefensis*, *V. macrophylla*) encontró compuestos con gran actividad contra células cancerosas del pulmón y mama. *V. mexicana* podría tener similitud de acción parecidas a otras especies del mismo género, así lo hace destacar Cassinelli y Geroni (1986) el cual en diferentes líneas cancerosas encontró gran citotoxicidad de la antraquinona del tipo vismionas. (fracciones no estudiadas químicamente en este proyecto; sin embargo presumiblemente presentes en el fruto extraído con hexano de *Vismia mexicana* tal como lo muestra la fig 8.3.1.6.)

12.-Conclusiones

- 1.- Hay mayor herbivoría de las hojas de *V. mexicana* en el mes de octubre del 2008 que en enero del 2009. La precipitación fue mayor en la primera fecha.
- 2.- En las dos fechas de colecta las hojas de los estratos (bajo, medio y alto) no mostraron diferencia alguna en cuanto a la herbivoría sufrida.
- 3.- El extracto de hexano del fruto, así como de las hojas dañadas de *V. mexicana*, así como, contiene alcanos de cadena larga (C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₂₇, C₂₉) que no se encuentra en las hojas sin herbivoría.
- 4.- El extracto del fruto de *V. mexicana* contiene además friedelina y mezclas de esteres (Metil ester ac. hexadecanoico, Etil ester ac. hexadecanoico, Metil ester 15-acido tetracosenoico) y otros compuestos como el triterpeno lup-20(29)-en-3-ol, acetato, (3alfa) y alcoholes de cadena larga.
- 5.- En los bioensayos de elección los discos de acelga tratadas con hexano fueron más consumidas por *Spodoptera frugiperda* que aquellas no tratadas. También fueron más consumidas los discos tratados con el extracto de hojas sanas de *V. mexicana* de octubre que las de enero.
- 6.- En los bioensayos de alimentación forzada *S. frugiperda* consumió menos los discos de acelga impregnados con la mezcla de alcanos, friedelina, extracto hexánico del fruto y de las hojas sanas de *V. mexicana* colectadas en enero 2009.
- 7.- Los resultados obtenidos sugieren que los frutos y hojas de *V. mexicana* sintetizan alcanos en condiciones de estrés hídrico (enero), los cuales poseen propiedades antialimentarias ocasionando un menor consumo por insectos en condiciones de laboratorio y posiblemente también en el campo.

13.- Bibliografía

- Agrios, G. 1997. Plant Pathology. Cuarta Edic., Academic Press. EE.UU. pp. 390-395.
- Aguilar Bañuelos E. 2005. Efecto de los metabolitos secundarios de *Calophyllum brasiliense* en los hongos colonizadores de las hojas: estudio in vitro”. Tesis de Biólogo. UNAM. pp.63.
- Akihisa et al. 1992. Triterpenoid ketones from *Lignania chungii* McClure: Arborine, Friedelin and Glutinone. Chem. Pharm. Bull. 40(3) 789-791.
- Anaya, A.L. et al. 2001. Relaciones químicas entre organismos: Aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. Plaza y Valdes. México. Pp. 406.
- Arnett, R. 1993. American insects: a handbook of the insects of America North of Mexico. The Sandhill Crane Press, Inc., EE.UU. pp. 54, 484.
- Atkin D.S. and Hamilton, R.J. 1982. The effects of plant waxes on insects. Journal of natural products , Vol. 45, no. 6: 694-696.
- Barbosa, P. et al. 1991. Microbial mediation of plant-herbivore interactions. John Wiley and Sons, Inc. EE.UU. pp. 2
- Begon, M. et al. 1996. Ecología: Individuos, poblaciones y comunidades. Omega. España. pp. 227.
- Cabrera Marino, Argandoña Victor, Zuñigab Gustavo y Zuñigab Luis. (2006). Effect of infestation by aphids on the wáter status of barley and insect development. Phytochemistry. Vol. 40, no. 4: 1083-1088.

- Carey, Peggy Y Smith C. 1993. Higher aliphatic compounds V. systems with heptadecyl alcohol and heptadecane. Polymorphism of octadecane. *Journal of the Chemical Society*.1348-1351.
- Cassinelli Giuseppe y Geroni Cristina.1986. Cytotoxic and antitumor activity of Vismiones isolated from *Vismieae*. *Journal of natural Products*, Vol. 49, no. 5, pp: 929-931.
- Chaves M.M., Pereira J.S., Maroco J., Rodrigues M.L., Ricardo C.P.P., Osorio M.L., Carvalho I., faria T. y Pihneiro C. 2002. How plants cope with wáter stress in the field. Photosynthesis and growth. *Annals of botany*, 89: 907-916.
- Comité sobre plaga de plantas y animales. 1991. Manejo y control de plagas de insectos (Volumen III). Séptima impresión. LIMUSA. México. pp. 91-123.
- CONAGUA. Estructura de las bases de datos y códigos utilizados en el Sistema CICLOM datos diarios. Estado 30, Estación 30175 (Tembladeras), Xico, Ver., Mex.
- Crombie, L., Games, D. E., & Mc Cormick, A.. *J. Chem. Soc.* 1967. 2553-2559.
- Cseke L, et al. 2006. Natural products from plants .2a. Edic. CRC Press. EE.UU. pp. 109, 237, 476, 395.
- Davidson, R. y Lyon, W. 1992. Plagas de insectos agrícolas y del jardín. LIMUSA. México, pp. 177-178.
- Dicke M. y Sabelis M. W. 1988. Infochemical Terminology: Based on Cost-Benefit Analysis Rather than Origin of Compounds? *Functional Ecology*, Vol. 2, No. 2, pp: 131-139.

- Dirzo, et al. Within- and among-year variation in the levels of herbivory on the foliage of trees from a Mexican Tropical deciduous forest. 1995. *Biotropica* 27(1): 78-86
- Durbin, R. D. 1981. *Toxins in plant Disease*. Academic Press. Wisconsin, EE.UU. pp 496.
- Fontana, H y Gonzales C. 2000. *El maíz en Venezuela*. Cap. 6 Protección y sanidad vegetal. Sección 2 Insectos plagas del maíz. Fundación Polar. Venezuela.
- Freeland W. J. y Janzen D. H. Strategies in Herbivory by Mammals: The Role of Plant Secondary Compounds. *The American Naturalist*, Vol. 108, No. 961 (May - Jun., 1974), pp. 269-289.
- Gist L. y Pless C.: *The Florida entomologist*: Vol. 68, No. 2 (Jun., 1985), pp. 312-315.
- Gómez Magda. 1991. *Atlas Climático del Municipio de Xico (Estado de Veracruz)*. Instituto de Ecología. Jalapa, Veracruz, México. PP. 1, 6-7.
- Goncalves Fernando. 2008. Plantas que oferecem maior quantidade de recurso para formigas sao mais protegidas contra herbivoria. Brasil.
- Haynes K y Millar J. 1998. *Methods in Chemical Ecology*. Kluwer Academic Publishers. EE.UU. pp.181.
- Hernandez M.M., Heraso C., Villareal M.L., Vargas-Arispuro, Aranda E. 1999. Biological activities of crude plant extract from *Vitex trifolia* L. (*Verbenacea*). *Journal of ethnopharmacology*. 67, 37-44.
- Herrera, C y Pellmyr O. 2002. *Planta- Animal Interactions*. Blackwell Sciences. UK. pp. 4, 9-10.

- Howard Miles, Ly Ana Maria, Randle Shirley, Hedin Paul, Burks Marcus. 1987. Alkaloidal insect antifeedant from *Virola caliphylla* warb. J. Agric. Food Chem. 35, 794-797.
- Huang J.G., Zhou L.J., Xu H.H. y Li W.O. 2009. Insecticidal and cytotoxic activities of extracts of *Cacalia tangutica* and its two active ingredients against *Musca domestica* and *Aedes albopictus*. J. Econ. Entomology. 102(4): 1444-1447
- Huerta M., Basualdo M. C., Abe F., Jiménez-Estrada M., Soler C., Reyes-Chilpa R. 2004. Biological and Pharmaceutical Bulletin 27(9):1471-1475.
- Hunter, M. et al. 1992. Effects of resource on Distribution on Animal- Plant Interactions. Academic Press. San Diego, California, EE.UU. pp. 77.
- Hussein Ahmed, Bozzi Berena, Correa Mireya, Capson Todd, Kursar Thomas, Coley Phyllis, Solis Pablo y Gupta Mahabir. 2003. Bioactive constituents from three *Vismia* species. Journal of Natural Products., 66: 858-860.
- INEGI. 1988. Síntesis Geográfica, nomenclator y anexo cartográfico del Estado de Veracruz. INEGI. México. pp. 3, 6, 31, 61.
- Jolivet P. 1992. Insects and plants: Parallel evolution and Adaptations. 2 edic., Sandhill Crane Press, Inc., Florida, EE.UU. pp. 12.
- Kashman, Y., Gustafson, K. R., Fuller, R. W., Cardellina, J. H. II, McMahon, J. B., Currens, M. J., Buckheit, R.W., Hughes, S.H., Cragg, G.M. & Boyd, M. R. 1992. Journal of Medicinal Chemistry. 35(15): 2735-2743.
- Kuete Victor, Nguemeving Robert, Penlap Beng Veronique, Guy Blaise Anatole, Etoa Francisco, Meyer Michele, Bodo Bernard, Ephrem Agustin. 2007. Antimicrobial

- activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild.
Journal of ethnopharmacology. Volumen 109,3. 372-379.
- Lara F. y Márquez C. 1996. Plantas medicinales de México: Composición, usos y actividad Biológica. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp.7.
- Lei Guo, Jin-zhong Wu, Ting Han, Tong Cao, Khalid Rahman y Lu-ping Qin. 2008.
Chemical composition, antifungal and antitumor properties of ether extracts of *Scapania verrucosa* Heeg, and its endophytic fungus *Chaetonium fusiforme*.
Molecules. 13, 2114-2125.
- Levin, A. The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. Anm Rev. EcoL Syst. 1976. 7. 121-59.
- Lou Y.G., Du M.H., Turling T.C., Cheng J.A. y Shan W.F. 2005. Exogenous application of jasmonic acid induces volatile emissions in rice and enhances parasitism of *Nilaparvata lugens* eggs by the parasitoid *Anagrus nilaparvatae*. J. chemical ecol. 31(9): 1985-2002.
- Mallavadhani Uppuluri, Mahapatra Anita, Sabitha Raja y Mandula. 2003. Antifeedant activity of some pentacyclic triterpene acids and their fatty acid ester analogues. Journal of Agriculture and Food Chem. 51: 1952-1955.
- Martínez M. Catalogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México. 1994; pp. 184.
- Maxwell F. y Jennings P. 1984. Mejoramiento de plantas resistentes a insectos. LIMUSA. México. pp. 136-149.

- Mostacedo, Bonifacio y Fredericksen, Todd S. 2000. Manual de Métodos Básicos de Muestreo y Análisis en Ecología Vegetal. Proyecto de Manejo Forestal sostenible (BOLFOR), Santa Cruz, Bolivia
- Mora E., Mora P., Francisco J.A. , Basurto F.A., Patrón R., and Martinez-Alfaro M.A. 1985. Nota Etnolingüística sobre el Idioma Nahuatl de la Sierra Norte de Puebla. La Nomenclatura Florística. Amerindia 10:73-92.
- Moura Pinheiro, R., Marquina, Mac-Quhae, M., Marini Bettolo, G.B., and Delle Monache, F. 1984. Prenylated anthranoids from *Vismia* species. *Phytochemistry* 23:1737-1740.
- Müller Caroline and Riederer Markus. 2005. Plant surface properties in chemical ecology. *Journal of chemical ecology*, vol. 31, no. 11.
- Odum, E. 1972. Fundamentals of Ecology. W.B. Saunders Company. EE.UU.234
- Olf, H. et al. 1999. Herbivores: Between plants and predators. Blackwell Press. UK. Pp 169, 176.
- Oki Yumi, Pedrosa Paula, Vasconcelos Eduardo, Carmignotto Ana Paula y Camargo George. 2002. Ecologia da floresta Amazonica. A idade foliar a herbivoria em *Vismia japurensis* (*Clusiaceae*). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia-INPA. Brasil.
- Pare P.W. and Tumlinson .J.H. 1997. *Nature* 385: 30–31.
- Pinheiro R.M. et al. 1984. Prenylated anthranoids from *Vismia* species. *Phytochemistry*, vol. 23, no. 8: 1737-1740.

- Gómez Pompa A. 1977. Ecología de la vegetación del Estado de Veracruz. Continental. México. pp. 88-89.
- Ramírez Alvares Yadira Alejandra. 2005. Estudio fitoquímico de *Vismia baccifera*. Tesis de Químico Fármaco Biólogo. UNAM. Mexico
- Ramsewak Russel, Muraleedharan Nair, Sorimuthu Murugesan, Mattson William y Zasada John. 2001. Insecticidal fatty acids and triglycerides from *Dirca palustris*. Journal of agriculture chemical. 49: 5852-5856.
- Ratnayake, R. M., Ranjith, H., Dharmaratne, H., Sotheeswaran, S. & Balasubramaniam, S. 1986. *Phytochemistry*. 25 (2): 425-428.
- Reboucas Genimar, Machado Paula, Chaves Daniela, Flavio Jose, Garcia Patricia et al. 2002. Ecologia da floresta Amazonica. Herbivoros selecionam folhas compostas. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia-INPA. Brasil.
- Reyes-Chilpa, R., Estrada-Muñiz E., Ramírez Apan T., Amekraz B., Aumelas A, Jankowski C.K., and Vazquez-Torres M. 2004. Life Sciences 75:1635-1647.
- Reyes-Chilpa, R., Jiménez Estrada, M. and Estrada Muñiz E. 1997. Journal of Chemical Ecology 23(7):1901-1911.
- Ricklefs, R.E., y Miller G.L. 1999. Ecology. Fourth edition. W.H. Freeman and Company. EE.UU. pp.384.
- Rodríguez Castañeda Armando Silvestre. Aislamiento y caracterización estructural de metabolitos secundarios de *Sapium macrocarpum* (*Euphorbiaceae*) Evaluación de su actividad insecticida e implicaciones ecológicas. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. México, UNAM. Junio 2008.

- Romo de Vivar, A. 1985. Productos naturales de la flora Mexicana. LIMUSA. México. pp. 178-179.
- Rosenthal G. y Janzen D. 1979. Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites. Academic Press. Londres, Inglaterra. pp. 4- 12.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. LIMUSA. México. pp. 73-74.
- Rzedowski, J. 1986. Vegetación de México. Tercera Edic. LIMUSA. México. pp. 315-326.
- Santamaría, FJ 1978. Diccionario de Mejianismos, 3^a ed. Editorial Porrúa, SA, México, DF, México
- Sandeep Patil, Nilofar S. y Magdum Chandrakant et al. 2009. Review on phytochemistry and pharmacological aspects of *Euphorbia hirta* Linn. Vol. 1. No. 1. 113-133.
- Schowalter T. 2000. Insect Ecology: An Ecosystem Approach. Academic Press. EE.UU. pp. 311-312.
- Sheperd Tom y Griffiths D. Wynne. 2006. The effects of stress on plant cuticular waxes. *New phytologist*. 171: 469-499.
- Simmonds M.S.J., Blaney W.M., delle Monache F., Marquina Mac-Quhae y Marini Bettolo. 1985. Insect antifeedant properties of anthranoids from genus *Vismia*. *Journal of chemical ecology*. Vol. 11. No. 12
- Singh G. 2004. Plant Sistematics and Integrated Approach. Science Publishers, Inc. Plymouth, UK. pp. 456.

- Standley, P. C. 1923. Clusiaceae In: *Trees and Shrubs of Mexico*. Contributions from the United States National Herbarium. Vol 23, part 3. pp. 824-827.
- Stevens, P. F. 1980. *Journal of the Arnold Arboretum*. Vol. 61(2): 117-171.
- UNAM. 2007. *Nuevo Atlas Nacional de México*. Instituto de Geografía UNAM. México. pp. NA IV.
- Vasconcelos, H. 1999. Levels of leaf herbivory in Amazonian trees from different stages in forest regeneration. *Acta Amazonica* 29(4): 615-623.
- Vester Hans. 1997. *The trees and forest: The role of the tree architecture in canopy development; a case study in secondary forest (Araracuara, Colombia)*. Ponsen and Looijen B.V, Wageningen. Netherlands. pp. 5-7
- Vivanco Jorge, Cosio Erick, Loyola Vargas Victor Flores Hector. *Mecanismos químicos de defensas en las plantas*. *Investigación y Ciencia*. Febrero 2005. pp. 68-76.
- Wagner, Blatt, Zgainsky. 1984. *Plant drugs analysis*. Springer-Verlag. pp. 304
- Webster J., y Weber R. 2007. *Introduction to fungi*. Tercera edic., University Press, Cambridge. United Kingdom. pp. 594-597.
- Woohead Susan (1983). Surface chemistry of *sorghum bicolor* and its importance in feeding by *Locusta migratoria*. *Physiological entomology*, Vol. 8; tomo 3: 345-352

Apéndice I

Bioensayo de elección

Se prepara el agar al 3% y se vierten en cajas petri aproximadamente 10 mm a cada uno dejándose enfriar hasta solidificar.



Después se hacen 4 perforaciones con un sacabocados a 90° de distancia una con respecto a otra y se colocan las hojas con 10 ml de extracto a 1000 ppm (ya previamente evaporadas durante 30 min), después se colocan dos larvas en su quinto estadio



Se detiene el bioensayo cuando las larvas consuman el 75% de cualquiera de los dos grupos experimentales. Se realizó cinco bioensayos con cinco repeticiones cada uno (González y Coloma, et al, 1995; citado por Rodríguez S. 2008)

Bioensayo de alimentación forzada

Se prepara el agar al 3% y se vierten en cajas petri aproximadamente 10 mm. A c/u dejándose enfriar.



Después se hace una única perforación con un sacabocados y se coloca la hoja con 10 ml de extracto a 40,000 ppm (ya previamente evaporada el disolvente 30 minutos antes), después se coloca una larva en su quinto estadio y se detiene el bioensayo hasta que ya no exista actividad del herbívoro.



Nota: Como recomendación y/u observación personal, los bioensayos se recomiendan realizarlos entre las 9 y 15 hrs; ya que la larva presenta mayor actividad durante ese lapso de tiempo.

Preparación de la dieta artificial

En la preparación de la dieta se siguió el método de Toledo (2001) citado por Rodríguez S. (2008). En un recipiente de 1l se disuelve agar en 500 ml de agua destilada caliente y se agita para evitar que se formen grumos. Se hierve a fuego lento durante 10 min y se le adicionan los componentes señalados la tabla 1 (excepto la solución vitamínica) y se licua. Posteriormente, se agregan 600 ml de agua destilada fría y se adiciona la solución vitamínica descrita a en la tabla 2.

Componente	Cantidad
Acido acético (25%)	12 ml
Acido ascórbico	4.3 g
Acido sórbico	1 g
Aureomicina (14%)	1.2 ml
Agar	14 g
Cloruro de colina (15%)	7.3 ml
Formalina (10%)	4.4 ml
Germen de trigo	31.7 g
Harina de soya	71.1 g
Metilparabén	1.6 g
Sacarosa	13 g
Sales Wesson	10.6 g
Solución vitamínica	3.5 ml

Tabla 1. Ingredientes de la dieta artificial de *Spodoptera frugiperda*

Componente	Cantidad
Acido fólico	0.525 g/35 ml
Biotina	0.0042 g/35 ml
Complejo B12	0.875 ml
Niacimida	2.31 g/35 ml
Pantotenato de calcio	0.42 mg/35 ml
Riboflavina	0.1057 g /35 ml
Tiamina	0.0525 g/35 ml

Tabla 2. Componentes de la solución vitamínica de *Spodoptera frugiperda*

Apéndice II

Estrato	N	Media	D.E.	D.E.	α	g.l.	Valor T	Valor P	Conclusión
		Medias							
Bajo	30	3.42	3.60	0.93	0.05	28	1.78	0.086	No hay diferencias
Medio		1.56	1.86	0.48					
Bajo	30	3.42	3.60	0.93	0.05	28	0.94	0.357	No hay diferencias
alto		2.34	2.63	0.68					
Medio	30	1.56	1.86	0.48	0.05	28	0.94	0.353	No hay diferencias
alto		2.34	2.63	0.68					

Herbivoria en árboles de *V. mexicana* Octubre 2008 (t- student) (SPSS V.15)

Parámetro (estrato)	N	Media	D.E.	D.E.	α	g.l.	Valor T	Valor P	Conclusión
		Medias							
bajo	30	3.70	3.91	1.0	0.05	28	0.56	0.578	No hay diferencias
medio		2.76	5.18	1.3					
Bajo	30	3.70	3.91	1.0	0.05	28	1.80	0.083	No hay diferencias
alto		1.57	2.40	0.62					
Medio	30	2.76	5.18	1.3	0.05	28	0.81	0.426	No hay diferencias
alto		1.57	2.40	0.62					

Herbivoria en árboles de *V. mexicana* . Enero 2009 (t- student) (SPSS V.15)

Tratamiento	Expto.	media	Error típico de la media	Desviación estándar	Levenne (p<0.05) Significancia	Correlación significancia
*A	SHx	0.19	0.05	0.41	0.001	0.00
	CHx	0.73	0.09	0.68		
B	SO	0.55	0.07	0.55	0.97	0.93
	DO	0.45	0.08	0.56		
C	SE	0.96	0.31	2.24	0.84	0.54
	DE	0.81	0.20	1.45		
*D	SE	0.60	0.08	0.56	0.68	0.002
	SO	0.64	0.08	0.58		
E	DE	0.37	0.06	0.44	0.60	0.81
	DO	0.52	0.06	0.48		

Área foliar (cm²) consumida (bioensayo de elección) por *S. frugiperda* de discos de acelga (Levenne p<0.05; p≥0.14) Tratamientos A, (Levenne p<0.05; p=0.001; X²= 145.040, gl= 1, p=0.00); B, C, E (t≥0.19, gl= 49, p≥0.54), D (t≥0.19, gl= 49, p≥0.002).

*Diferencia estadísticamente significativa (SPSSV.15).

Tratamientos	Media del Area foliar consumida (cm ²)	D.E.
Control (Hojas con Hx)	1.16	0.26
H. Sana Oct 2008	0.82	0.54
H. Dañada Oct2008	0.87	0.39
H. Sana En. 2009	0.95	0.35
H .Dañada En. 2009	0.75*	0.23
Fruto Hx	0.77*	0.46
Friedelina	0.86*	0.32
Mezcla alcanos	0.81*	0.26

Efecto de diversos extractos y compuestos de *Vismia mexicana* sobre la alimentación de *S. frugiperda*. Cinco repeticiones por tratamiento. Levenne P<0.05; P=0.00; Kruska-Wallis p<0.05 (P=0.03). *Diferencias estadísticamente significativa al nivel 0.05. (Prueba C de Dunnet) (SPSS V.15)

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)		Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior	Límite superior	Límite inferior
Hojas con Hx	H. Sana Oct 2008	.33640	.12143	-.0658	.7386
	H. Dañada Oct2008	.29440	.09518	-.0208	.6096
	H. Sana En. 2009	.20840	.08850	-.0847	.5015
	H .Dañada En 2009	.41120(*)	.07139	.1748	.6476
	FrutoHxV.mexicana	.38960(*)	.10676	.0360	.7432
	Friedelina	.30360(*)	.08418	.0248	.5824
	Mezcla alcanos	.35280(*)	.07523	.1036	.6020
Hoja Sana Oct2008	Hojas con Hx	-.33640	.12143	-.7386	.0658
	H. Dañada Oct2008	-.04200	.13434	-.4869	.4029
	H. Sana En. 2009	-.12800	.12969	-.5575	.3015
	H .Dañada En 2009	.07480	.11868	-.3182	.4678
	FrutoHxV.mexicana	.05320	.14278	-.4197	.5261
	Friedelina	-.03280	.12678	-.4527	.3871
	Mezcla alcanos	.01640	.12103	-.3844	.4172
H. Dañada Oct2008	Hojas con Hx	-.29440	.09518	-.6096	.0208
	Hoja Sana Oct 2008	.04200	.13434	-.4029	.4869
	H. Sana En. 2009	-.08600	.10552	-.4355	.2635
	H .Dañada En 2009	.11680	.09165	-.1867	.4203
	FrutoHxV.mexicana	.09520	.12125	-.3064	.4968
	Friedelina	.00920	.10193	-.3284	.3468
	Mezcla alcanos	.05840	.09468	-.2552	.3720
H. Sana En. 2009	Hojas con Hx	-.20840	.08850	-.5015	.0847
	Hoja Sana Oct 2008	.12800	.12969	-.3015	.5575
	H. Dañada Oct2008	.08600	.10552	-.2635	.4355
	H .Dañada En 2009	.20280	.08469	-.0777	.4833
	FrutoHxV.mexicana	.18120	.11608	-.2032	.5656
	Friedelina	.09520	.09572	-.2218	.4122
	Mezcla alcanos	.14440	.08795	-.1469	.4357
H .Dañada En 2009	Hojas con Hx	-.41120(*)	.07139	-.6476	-.1748
	Hoja Sana Oct 2008	-.07480	.11868	-.4678	.3182
	H. Dañada Oct2008	-.11680	.09165	-.4203	.1867
	H. Sana En. 2009	-.20280	.08469	-.4833	.0777
	FrutoHxV.mexicana	-.02160	.10363	-.3648	.3216
	Friedelina	-.10760	.08017	-.3731	.1579
	Mezcla alcanos	-.05840	.07071	-.2926	.1758
FrutoHxV.mexicana	Hojas con Hx	-.38960(*)	.10676	-.7432	-.0360
	Hoja Sana Oct 2008	-.05320	.14278	-.5261	.4197
	H. Dañada Oct2008	-.09520	.12125	-.4968	.3064
	H. Sana En. 2009	-.18120	.11608	-.5656	.2032
	H .Dañada En 2009	.02160	.10363	-.3216	.3648
	Friedelina	-.08600	.11282	-.4596	.2876
	Mezcla alcanos	-.03680	.10631	-.3889	.3153
Friedelina	Hojas con Hx	-.30360(*)	.08418	-.5824	-.0248
	Hoja Sana Oct 2008	.03280	.12678	-.3871	.4527
	H. Dañada Oct2008	-.00920	.10193	-.3468	.3284
	H. Sana En. 2009	-.09520	.09572	-.4122	.2218
	H .Dañada En 2009	.10760	.08017	-.1579	.3731
	FrutoHxV.mexicana	.08600	.11282	-.2876	.4596
	Mezcla alcanos	.04920	.08361	-.2277	.3261
Mezcla alcanos	Hojas con Hx	-.35280(*)	.07523	-.6020	-.1036
	Hoja Sana Oct 2008	-.01640	.12103	-.4172	.3844
	H. Dañada Oct2008	-.05840	.09468	-.3720	.2552
	H. Sana En. 2009	-.14440	.08795	-.4357	.1469
	H .Dañada En 2009	.05840	.07071	-.1758	.2926
	FrutoHxV.mexicana	.03680	.10631	-.3153	.3889
	Friedelina	-.04920	.08361	-.3261	.2277

*Estadísticamente significativa

Tabla de C Dunnet del segundo bioensayo (de alimentación forzada) (SPSS V.15).