



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

Relación Química Entre

Ageratina mairiana DC.

(Compositae)

Y *Empoasca sp.* (Cicadellidae).

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA).

PRESENTA

M. EN C. MIGUEL ÁNGEL MIRANDA NAVARRETE.

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALFREDO ORTEGA HERNÁNDEZ

MÉXICO D.F.

ABRIL 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi esposa Lin con amor.

A mis hijos:

Sergio David, Miguel Ángel, y Gabriel Alejandro.

A mis padres:

**Sr. D. Bonifacio Miranda Martínez y
Sra. Dña. Bertha Navarrete de Miranda†**

El Cisne... es un sueño hecho realidad.

La presente tesis se pensó, desarrolló, y llevó a término, en parte con una beca del Sistema Nacional de Investigadores como Ayudante de Investigador nivel III del:

Dr. Alfredo Ortega Hernández.

En el Instituto de Química y

La Facultad de Ciencias de la

Universidad Nacional Autónoma de México.

Índice.

1.-	Resumen	5
2.-	Abstract	7
3.-	Introducción	9
	3.1- Ecología Química	16
	3.2- Antecedentes Ambientales	20
	3.3- Relación de la Vegetación con el Ambiente	25
	3.4- Descripción de la Planta (<i>Ageratina mairेतiana D. C.</i>)	28
	3.5- Consideraciones sobre los Cicadellidae	32
	3.6- Ciclo de vida de <i>Empoasca sp.</i>	37
	3.7- Aspectos Químicos de la Interacción <i>Ageratina mairेतiana D.C. vs Empoasca sp</i>	40
4.-	Objetivos	45
5.-	Materiales y Método.	46
	5.1- Lugar de Estudio	46
	5.2- Densidad Poblacional vs. Área foliar.	47
	5.3- Extracción de Estándares de Lactonas Sesquiterpénicas.	49
	5.4.- Separación de Lactonas Sesquiterpénicas y Cuantificación por Medio de HPLC.	53
	5.5- Separación de Diterpenos y Cuantificación por medio de HPLC.	55
6.-	Resultados	58
7.-	Discusión y Conclusiones	123
8.-	Bibliografía	130

Relación Química Entre *Ageratina mairetiana* D. C. (Compositae) Y *Empoasca* sp. (Cicadellidae).

Resumen.

Son pocos los estudios de ecología química que se han realizado con insectos chupadores, sobre todo en condiciones naturales. En este contexto solo se puede especular en lo que respecta a la interrelación herbívoro-planta. Al recolectar material vegetal para aislar sustancias del metabolismo secundario de ***Ageratina mairetiana* D. C.** Se observó la presencia de chicharritas sobre las hojas, las cuales no estaban permanentemente en la planta sino que lo hacían de manera discontinua. Por lo cual, surgió el interés de estudiar la interrelación herbívoro-planta y como intervienen los metabolitos secundarios de la planta en este proceso.

La ***Ageratina mairetiana*** (D. C.) King et Robinson 1970, pertenece a la Tribu ***Eupatoriae*** de la Familia ***Asteraceae***. Es una planta arbustiva que en su estado adulto mide de 1.5 a 4.5 m. de altura, es perene y habita asociada a bosques mixtos de ***Pino*** y ***Oyamel*** (Heywood, 1977).

En años recientes se han hecho estudios con los cuales se determinó que ***Ageratina mairetiana* D. C.** contiene distintos metabolitos secundarios a lo largo de la sucesión estacional anual, algunos de los cuales son: ácido mairetiano (Macías, 1979), que está presente en febrero durante la época de floración, y lactonas sesquiterpénicas con esqueleto de pseudoguayano y guayano, en la etapa vegetativa de la planta de agosto a septiembre (Mancera, 1982).

Por observación directa sobre la planta, se notó que de abril a noviembre una chicharrita (***Empoasca* sp.**: Cicadellidae) se hospeda en

las hojas de ***Ageratina mairiana* D. C.** siendo muy marcada la aparición de este huésped sobre la planta después de la época de floración.

Dada la poca evidencia del papel que desempeñan muchos de los metabolitos secundarios, y la compleja matriz de variables que interactúan en la interface planta-herbívoro (Dirzo, 1985), se estudió la relación química entre ***Ageratina mairiana* D. C.** y ***Empoasca sp.***, en especial de las lactonas sesquiterpénicas; Burrodina, Mairetiolida, 8-epi-Inuviscolida, 8-10-bis-epi-Aromaticina y Confertina, presentes en la planta

Los resultados observados indican que la 8-10-bis-epi-Aromaticina y Burrodina tienen una correlación inversamente proporcional entre su concentración y la densidad poblacional de las ninfas de ***Empoasca sp.***, lo mismo se observa con las variaciones de concentración de la 8-epi-Inuviscolida, y Mairetiolida, de lo que se deduce un efecto biomodulador.

Las variaciones de concentración de la Confertina no tienen acción alguna en los estadios ninfales, ni sobre los adultos de ***Empoasca sp.***

La Burrodina, 8-epi-Inuviscolida, y Mairetiolida tienen una correlación inversamente proporcional entre su concentración y la densidad poblacional sobre los adultos de ***Empoasca sp.*** lo que evidencia un efecto repulsivo.

Palabras clave; defensa vegetal, herbivoría, metabolitos secundarios.

Chemical Relation Between
***Ageratina mairiana* D. C.** (Compositae)
and ***Empoasca sp.*** (Cicadellidae).

Abstract.

Ageratina mairiana (D. C.) King et Robinson 1970., belong to the tribe Eupatorieae, of the Family Asteraceae. Is an arbustive plant which growth between 1.5 to 4.5 m., it is a perennial strub and live associate to forest of Pine and Fir (Heywood, 1977).

In recent years some observations suggest that ***Ageratina mairiana* D. C.** produced different secondary metabolites trough the annual season, some of these are: mairianic acid (Macias, 1979), in February when flowering, pseudoguayane and guayane sesquiterpene lactones (Mancera, 1982), from August to September during its vegetative season.

In the other hand, direct observation in a specific season of the year, shows a leafhopper, ***Empoasca sp.*** from the family Cicadellidae taking lodge on the leaves of ***Ageratina mairiana* D. C.**

Given the few evidence of the role that secondary metabolites and the complex lattice of variables that they play in the herbivorous-plants interactions (Dirzo, 1985), lead to undertake the study of the chemical relation between ***Ageratina mairiana* D. C.** and ***Empoasca sp.***, specifically the action of the sesquiterpene lactones; Burrodin, 8-epi-Inuviscolide, Mairiolide, 8-10-bis-epi-Aromaticin and Confertin.

The gathered information suggest that 8-10-bis-epi-Aromaticin and Burrodin showed a biomodulator effect on nymphal stages of ***Empoasca sp.*** and the same effect was observed with 8-epi-Inuviscolide and Mairiolide, The Confertin dit not showed any action on nymphals

and adults of ***Empoasca sp.*** Burrodin, 8-epi-Inuviscolide and Mairetiolide produced a repulsive effect on the adults of ***Empoasca sp.***

Keywords; chemical defenses, herbivory, secondary metabolites.

3.- INTRODUCCIÓN.

Hay pocos trabajos que describen interacciones en el medio natural de insectos chupadores con plantas de la familia de las Compuestas y menos aún trabajos que describan relaciones insecto-planta a un nivel químico con los metabolitos de la planta en condiciones naturales.

Esto es debido a la gran cantidad de variables que interactúan en la relación insecto-planta para describirlos, además de que no hay una metodología útil para su estudio y las que existen no dan resultados concluyentes, pues el seguimiento de dicha interacción, debe realizarse a lo largo de un periodo prolongado, es decir que incluya los ciclos de vida de los participantes, o por lo menos los periodos en los que se manifiestan los síntomas de la interacción de dicha relación.

El hombre se ha interesado por la ecología desde los primeros tiempos de su historia. En la sociedad primitiva, para sobrevivir, cada individuo necesitaba conocer su medio ambiente, esto es, las fuerzas que mueven la naturaleza, las plantas y los animales que lo rodeaban (Odum, 1959).

La historia evolutiva de plantas y animales, desde el punto de vista de la taxonomía, así como el establecimiento de los reinos y sus principales subdivisiones, se nos manifiesta como una serie de respuestas biológicas a las oportunidades que presentaba el ambiente.

Las nuevas formas de vida consiguen a veces un éxito espectacular, sobre todo cuando su adaptación les da acceso a un nicho relativamente distinto.

Cuando estos grupos biológicos no encuentran el nicho apropiado tienden a desaparecer y no son sustituidos por otros grupos totalmente nuevos, sino por ramas salidas de las líneas anteriores. Por

consiguiente, conforme el tiempo transcurre, baja la cantidad de tipos de organismos distintos, en tanto que los grupos que permanecen, tienden a diversificarse más, y se extienden en el hábitat.

La interacción observada entre organismos permite que deduzcamos los caminos a lo largo de los cuales la materia y energía son transportadas en las cadenas alimenticias y redes tróficas. En la parte abiótica del ecosistema, la circulación de materia y energía es complementada por procesos como la evaporación, precipitación, erosión y deposición (Price, 1984).

Además, existen razones de valor intrínseco que hacen que el estudio de poblaciones de organismos constituya, hoy en día, un aspecto central en el campo de la ecología. Es bien conocido que los animales ó las plantas pueden reproducirse tan rápido que prácticamente cualquier especie podría cubrir la superficie de la tierra en un tiempo relativamente corto; sin embargo, esto no ocurre. La mayoría de las especies permanecen muy por debajo del tamaño poblacional que sus capacidades reproductoras les permitirían alcanzar. ¿Qué es lo que regula el tamaño de las poblaciones? ¿Qué factores intervienen para que el rápido y activo aumento en el número de individuos que observamos en casi todas las poblaciones, bajo condiciones apropiadas, no continúe indefinidamente?. ¿Qué es lo que caracteriza a las especies que muestran fluctuaciones regulares en el número de individuos que componen sus poblaciones, mientras existen otras que son casi permanentemente raras y muy escasas en el número de sus integrantes?

Los ecólogos que estudian el comportamiento de insectos, han estado interesados por encontrar la forma en que se podría obtener una reducción en el número de individuos de las muchas plagas de insectos que destruyen los cultivos ó un aumento en el número de los que sirven

de alimento, o de los que producen sustancias colorantes u otras de interés antropocéntrico (Rabinovich, 1980).

Más allá de la pregunta sobre el número total de especies que habitan una región dada, pueden formularse preguntas más precisas acerca de los modelos de organización de una comunidad. ¿Qué es lo que explica la abundancia relativa de los individuos de distintas especies en una región determinada? ¿Por qué algunas comunidades están formadas por varias especies muy comunes junto a unas cuantas raras, mientras que en otras comunidades los individuos se distribuyen en un número aproximadamente igual para cada especie? ¿Por qué prácticamente todas las comunidades tienen muchas más especies de animales pequeños que de animales grandes?

Las respuestas a estas preguntas no son únicamente interesantes por sí mismas, sino que además son importantes para la conservación y el manejo de los recursos biológicos.

A pesar de que las pruebas empíricas se acumulan y se sistematizan cada vez más, no existe hoy un consenso sobre la respuesta adecuada a las preguntas formuladas anteriormente.

Al estudiar la historia natural de los organismos podemos identificar casos donde las interacciones entre insectos y plantas, establecen una relación ecológica y evolutiva más estrecha, por lo que las consecuencias poblacionales o demográficas de los interactuantes no se manifiestan inmediatamente, o no son tan conspicuas.

Las pruebas de que existen pautas coherentes en lo que respecta al número de especies asociadas a una región determinada, se han obtenido del estudio de las fuentes que van desde la enorme extensión del registro fósil hasta experimentos controlados sobre la fauna (May, 1978).

Como ejemplo tenemos que "siempre hubo (quizá con la excepción de periodos de tiempo muy cortos) herbívoros y carnívoros, formas grandes y pequeñas, y gran variedad de adaptaciones menores distintas, todas en una proporción razonable entre sí. Las distintas formas de fauna actual muestran el mismo equilibrio. Esto no puede deberse al azar." (Darlington, 1976).

Generalmente se supone que la capacidad de los participantes de la interacción herbívoro-planta para responder a los efectos del medio, depende por un lado, de la variabilidad genética individual de los miembros de la población, y por otro lado de los patrones de comportamiento general de las especies. Dichas respuestas se expresan a través de cambios cuantitativos y cualitativos en las características inherentes a su crecimiento y reproducción.

El estudio de estos cambios puede ser útil para entender cuáles fueron los pasos evolutivos que permitieron el establecimiento de estas interrelaciones. Dentro de este juego ecológico-evolutivo, podemos encontrar que:

- A.- Los insectos determinen en gran medida el comportamiento de las plantas (en términos de crecimiento, reproducción y metabolismo).
- B.- Las plantas presenten respuestas que amortigüen los efectos causados por los insectos.
- C.- Los insectos muestren características que contrarresten las respuestas de las plantas.

Por ejemplo algunos datos (Southwood, 1978) demuestran que en la fauna Británica más del 90% de las especies entre los Lepidópteros, Hemípteros y Ortópteros son Fitófagas.

A lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado toda suerte de defensas para tratar de mantener el equilibrio en la interacción planta-herbívoro. Por su parte, en los herbívoros han ido apareciendo adaptaciones fisiológicas y etológicas que han permitido reducir el efecto perjudicial de las defensas de las plantas, principalmente de los compuestos secundarios.

En las plantas existe una enorme diversidad de compuestos secundarios fruto, tal vez, de su imposibilidad de huída frente a las agresiones (Harborne, 1993; Cheeke, 1995).

Erlich y Raven (1964) revisaron los hábitos alimenticios de una superfamilia de mariposas (***Papilionidea***), y encontraron que algunos grupos específicos de mariposas están asociados a grupos particulares de plantas. Ejemplo de ello son las mariposas del grupo ***Pierinae*** que se alimentan de plantas de la Familia ***Capparidaceae*** y ***Cruciferae***. Así mismo observaron una similitud en cuanto a metabolitos secundarios de las plantas que son utilizadas como alimento por grupos específicos de mariposas y que además existen grupos de plantas que no tienen ninguna asociación con mariposas. Esta especificidad se ha logrado por medio de la colonización y los mecanismos de especiación, denso dependencia y competencia.

Ahora bien, debido al elevado coste energético que implica su síntesis, las plantas encauzan su metabolismo hacia un tipo u otro de compuestos secundarios, esto dependerá de los recursos de que disponga (Bryant et al., 1992).

Una característica importante en la estrategia de defensa de las plantas es la distribución variable de los compuestos secundarios en los diferentes tejidos vegetales, lo cual depende de su valía para la planta,

así como su redistribución según avanza el desarrollo fenológico (Price et al., 1979; Johnson et al., 1985; Makkar et al., 1988b, 1991).

Las yemas en crecimiento de arbustos, las hojas jóvenes, los órganos reproductores y de dispersión y, en general, todas las partes en crecimiento anual, tienen una mayor concentración de compuestos secundarios o reactividad de éstos, que en los tejidos viejos (Rhoades, 1979). En las que intervienen los metabolitos secundarios en los que se encuentran moléculas biológicamente activas con posibles funciones de defensa.

Por otra parte en las relaciones de mutualismo: atracción de los polinizadores y dispersores de semillas (Rhoades, 1979); como ejemplo de ello tenemos la fragancia de las orquídeas que atraen a polinizadores específicos. Dodson et. al., (1969) realizaron una serie de investigaciones que condujeron al descubrimiento de los productos naturales de un grupo de orquídeas, que atraen a los machos de abejas de la tribu **Euglossine** de la subfamilia **Bombinae** que son sus polinizadores específicos.

En este aspecto Cruger fue el primero que reportó las visitas de **Euglossine** a las orquídeas (Cruger, 1865); a lo largo de muchos años se propusieron diversas hipótesis de esta relación, pero hasta que Dodson, Dressler y colaboradores demostraron mediante investigaciones interdisciplinarias realizadas durante más de diez años, que las abejas absorbían algunas sustancias mediante los "cepillos" tarsales de las patas delanteras; estas mismas observaciones las hizo Vogel, (1963), demostrando de esta manera la interrelación de plantas y animales, en lo que hoy llamamos ecología química.

Por otra parte la herbivoría impacta el desempeño vegetativo y/o reproductivo de las plantas con repercusiones ecológicas y evolutivas

(Dirzo, 1984; Coley et al., 1985; Begon et al., 1986). En forma de moléculas como los metabolitos secundarios relacionados con posibles funciones defensivas (Stafford, 1988).

Por la presencia de esos metabolitos secundarios es que el patrón de crecimiento, la inversión energética en defensa, la longevidad y recambio foliar se encuentran correlacionados, pues la planta está en la disyuntiva constante de crecer y reproducirse o defenderse como ha argumentado la hipótesis de la disponibilidad de recursos (Coley et al., 1985). Además también hay una relación positiva entre el tiempo de vida de las hojas y la defensa química, que se incrementan con el tiempo (Coley, 1987).

Se ha analizado la interacción entre la diversidad de metabolitos secundarios y su papel en la defensa vegetal, aunque sin considerar el papel de la asignación de recursos energéticos a la defensa (Jones y Lawton, 1991; Jones y Firns, 1991). Para lograr un mejor entendimiento (Langenheim, 1994) sugiere considerar la cantidad de recursos energéticos a la defensa y variación cuantitativa y cualitativa de los metabolitos secundarios.

3.1- Ecología Química.

La ecología química es la disciplina que estudia las interacciones a nivel químico entre los organismos, así los ecólogos químicos estudian el papel que desempeñan los productos naturales, sobre todo los metabolitos secundarios, y como propician o mantienen la relación entre dichos organismos. Algunas de estas relaciones se dan entre plantas superiores e insectos que se alimentan de ellas, las primeras pueden emplear defensas no solo físicas (espinas, hojas tomentosas, etc.), sino también químicas para protegerse del ataque de los herbívoros.

Gotfried S. Frankel (1959), sugiere que no son los metabolitos primarios de las plantas (sustancias que son esenciales para su crecimiento y reproducción) los que las hacen adecuadas o inadecuadas como fuente de alimento. Esa relación entre individuos depende en gran medida de sus metabolitos secundarios; compuestos metabólicos que no están involucrados en procesos comunes de la vida y que varían de una especie de planta a otra dando características únicas a cada especie.

En 1971 Robert Wittaker y Paul P. Feeny, agregaron un nuevo nivel de precisión al concepto de Frankel; ellos sugirieron que los metabolitos secundarios producidos por los individuos de una especie y que son capaces de afectar el crecimiento, salud, biología poblacional y conducta de otra especie, pueden ser llamados aleloquímicos, entre los que encontramos; atrayentes, repelentes, alergénicos y toxinas, con ellos interactúan los integrantes del ecosistema.

A partir del metabolismo primario y específicamente del Acetil Coenzima A, se producen lípidos insaponificables llamados "Terpenos", los cuales están constituidos por unidades múltiples del hidrocarburo de cinco átomos de carbono denominado isopreno (2-metil-1,3-butadieno). A los terpenos que contienen tres unidades isoprenicas se les llama

sesquiterpenos y los que contienen cuatro diterpenos, (Lenhninger, A. 1980).

Las lactonas sesquiterpénicas (LST) son una clase de terpenóides que son sintetizados por algunas Familias de plantas y se forman a partir de la condensación total cabeza-cola, de tres unidades isoprenicas y la subsecuente ciclización y transformación oxidativa, produciendo cis o trans lactonas y son clasificadas con base a su esqueleto carbocíclico en; germanocranólidos, eudedesmanólidos, xantanólidos, guayanólidos y pseudoguayanólidos. El sufijo "olido" se refiere a la función lactona.

Las lactonas sesquiterpénicas constituyen un amplio y diverso grupo de productos químicos los que se han analizado buscando su actividad biológica y que han sido identificados en varias familias de plantas. Estos compuestos son constituyentes característicos de la Familia **Compositae**, la que contiene el mayor número de compuestos de esta naturaleza con estructuras diferentes, se conocen más de 6,000 estructuras reportadas (Fisher 1991, Fraga, 1995).

Por otro lado tenemos una gran variedad de metabolitos secundarios que han sido identificados causan una serie de alteraciones fisiológicas sobre los organismos que se alimentan de ellas (ver la siguiente tabla).

Metabolitos Secundarios y sus Efectos en los Herbívoros

Tipo de compuesto	Actividad Fisiológica
Aminoácidos tóxicos no proteicos	Efectos tóxicos. y neurofisiológicos Inhibidores del crecimiento
Glucósidos cianogénicos	Envenenamiento. por HCN, que es un inhibidor de la cadena respiratoria

Alcaloides	Influyen en los mecanismos de replicación de ADN, de transcripción de ARN inhibe síntesis de proteínas. Altera procesos celulares, etc.
Glucosinolatos	Influyen en el funcionamiento de la tiroides. Producen sabor amargo y áspero
Monoterpenos	Reducen la división celular (Müller, 1965). Inhiben el consumo de oxígeno en coleóptilos de soya (Peñuelas <i>et. al.</i> 1996), inhiben la actividad de la ATPasa (Cruz Ortega <i>et. al.</i> 1991).
Diterpenos	Muestran propiedades tóxicas, que inhiben la alimentación, e influyen en el desarrollo de insectos
Lactonas sesquiterpénicas	Tienen sabor amargo y propiedades alergénicas, como irritación de ojos, nariz y tracto gastrointestinal de mamíferos.
Triterpenos limonoides	Presentan propiedades tóxicas, que inhiben la alimentación, e influyen en el desarrollo de insectos
Cucurbitacinas	Tienen propiedades tóxicas, que inhiben la alimentación, e influyen en el desarrollo de insectos
Saponinas	Sabor amargo que inhibe la alimentación. Inflamación del abdomen. Inhibición de la respiración y de actividad enzimática, como toxinas disuelven paredes celulares
Flavonoides	Producen sabor amargo que inhiben la alimentación. Propiedades tóxicas. Efectos indirectos sobre la capacidad reproductora de los mamíferos
Taninos	Reducen las proteínas solubles de las plantas disminuyendo el valor nutricional. Inhiben la digestibilidad. Inhiben crecimiento de bacterias y hongos, algunos tienen actividad sobre la

	fracción microsomal del hígado.
Ligninas	Similar a los taninos
Fitohemaglutininas	Dañan células epiteliales de intestino
Inhibidores de proteinasas	Inhiben enzimas digestivas.

Oyama, K. y F. Espinosa, 1986.

Dentro de una población, la diversidad química puede llevar a la hiper-especialización, de tal manera que se pueden formar individuos de la misma especie, con genotipos distintos, que viven en la misma localidad y se encuentran adaptados a una variación particular del ambiente.(Karban, 1989; Van Zand y Mopper, 1998).

Así la defensa individual puede estar determinada más por el perfil químico que por una mezcla de metabolitos secundarios. Además de los efectos de los compuestos aislados o mezclas entre ellos sobre los consumidores en el tiempo ecológico, también puede tener consecuencias evolutivas en las plantas y en sus consumidores (Espinosa-García, 2001).

La diversidad química en las plantas puede determinar la diversidad de consumidores ya sea como una defensa "multifacética" (Kubo y Hanke, 1985) o una resistencia compleja (Schultz, 1983) que resulta muy difícil, mas no imposible de superar evolutivamente (Berenbaum y Zangerl, 1993).

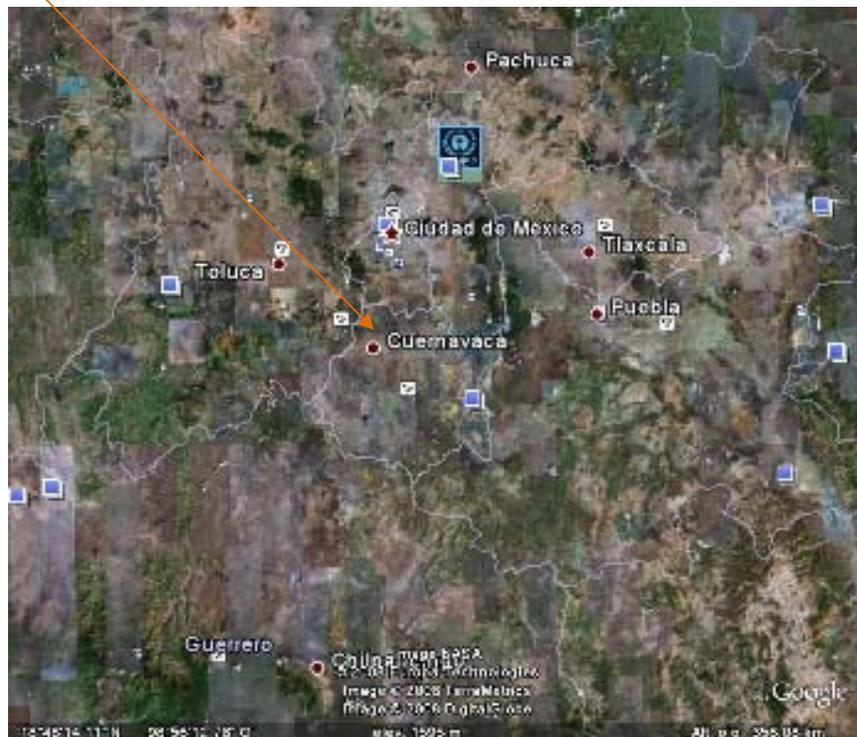
Como contraparte, el conjunto de herbívoros que atacan a una planta pueden inducir la promoción o mantener la diversidad química dentro de una población de plantas.

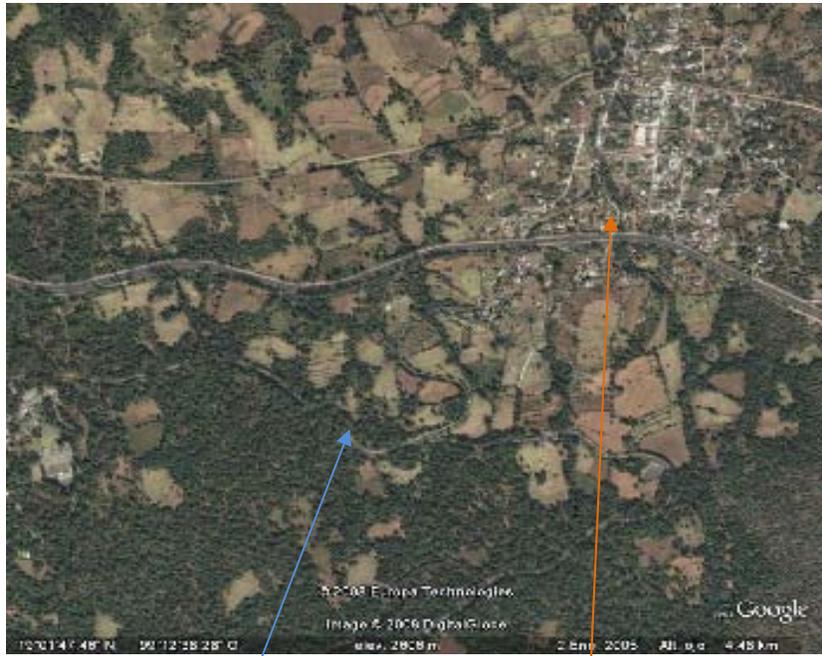
3.2- Antecedentes Ambientales.

La zona donde se estudió esta relación huésped-hospedero, se ubica en el borde norte de la zona Neotropical, en el Estado de Morelos



A 27 km al suroeste de la Ciudad de México.





Lugar de Estudio

A 250 m de la desviación al pueblo de Coajomulco, al noroeste de la Cd. de Cuernavaca, a un costado de la carretera federal México-Cuernavaca (en el Km. 57.5 México-Cuernavaca)



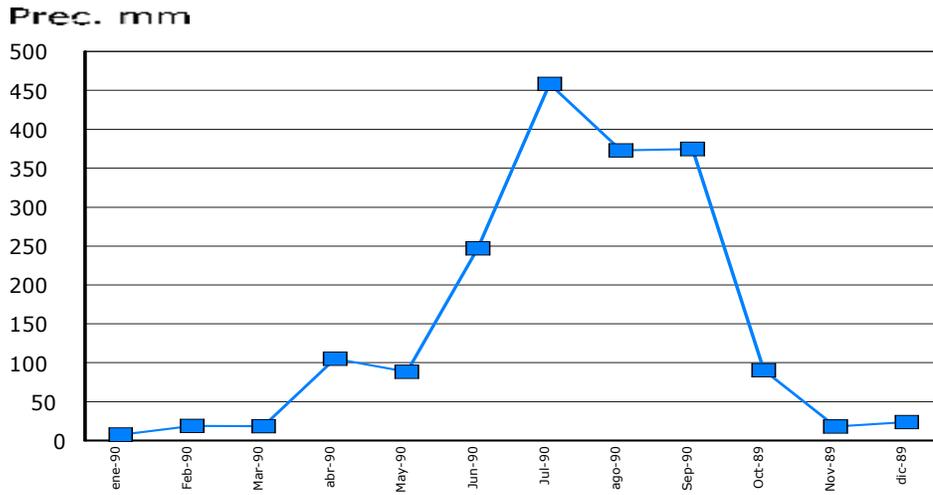
Esta zona es cruzada por el paralelo $19^{\circ}01'38.00''$ de latitud norte y el meridiano $99^{\circ}12'44.50''$ de longitud oeste. El área se encuentra a una altitud de 2,865 msnm., (ver mapas anteriores).

El suelo en la zona es producto de una enorme actividad volcánica que dió lugar a la formación de la Cuenca Endorreica del Valle de México, la cual muestra una compleja variedad de formas volcánicas originadas en tres ciclos de efusión ígnea a partir del Terciario Medio (Mooser, 1956 y 1957). Durante el tercer y más reciente ciclo ocurrido durante el Pleistoceno, se originó la llamada Serie Basáltica Chichinautzin (Fries, 1956). Por lo tanto esta Sierra es una zona de múltiples corrientes de lava, formadas en distintas épocas a partir del Pleistoceno.

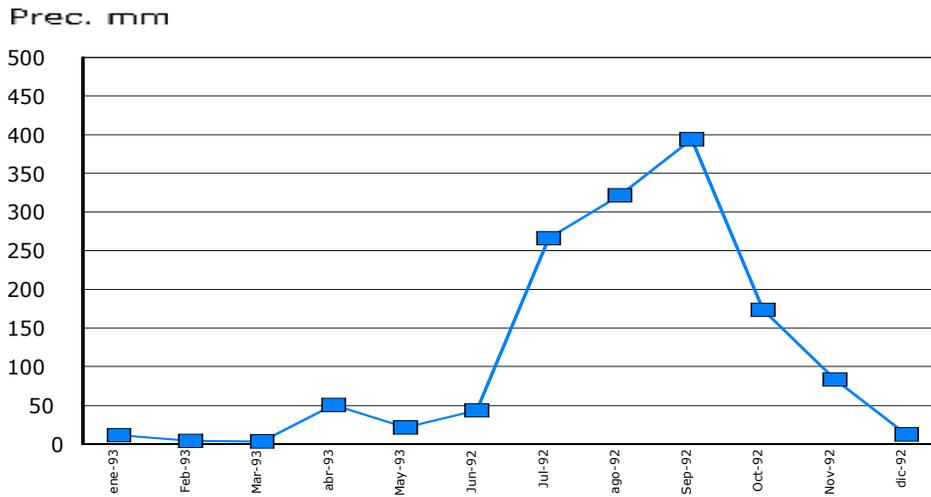
Los datos climáticos son escasos, ya que la única estación meteorológica más o menos próxima es la de Huitzilac que está a 5.8 km en línea recta en la latitud $19^{\circ} 01' 57''$ y longitud $99^{\circ} 16' 05''$ a una altitud de 2613 msnm y cuyos datos se utilizaron para la elaboración de las graficas de precipitación pluvial y temperatura. La de Cuernavaca que ha venido funcionando con regularidad, está a 12 Km al sureste y con una altitud de 1560 msnm, 1000 metros menor que el lugar de estudio, y la temperatura es más cálida. Las estaciones de Tres Cumbres y Tres Marías tienen condiciones muy distintas, y hasta el momento no están disponibles todos los datos.

De los datos útiles se infiere que la precipitación en el lugar es bastante desigual, ya que en los meses de mayo a octubre se acumula el mayor porcentaje del total de la lluvia durante el año, teniendo en promedio 95.5 % para los meses citados y sólo el 4.5 % para el resto del período 1989-1990. En los meses de mayo a octubre del período 1992-1993 se acumula el mayor porcentaje del total de la lluvia anual, teniendo en promedio 92.5 % para esos meses y sólo el 7.5 % para el resto del año (ver las siguientes gráficas).

Precipitación Pluvial, Periodo 1989-1990

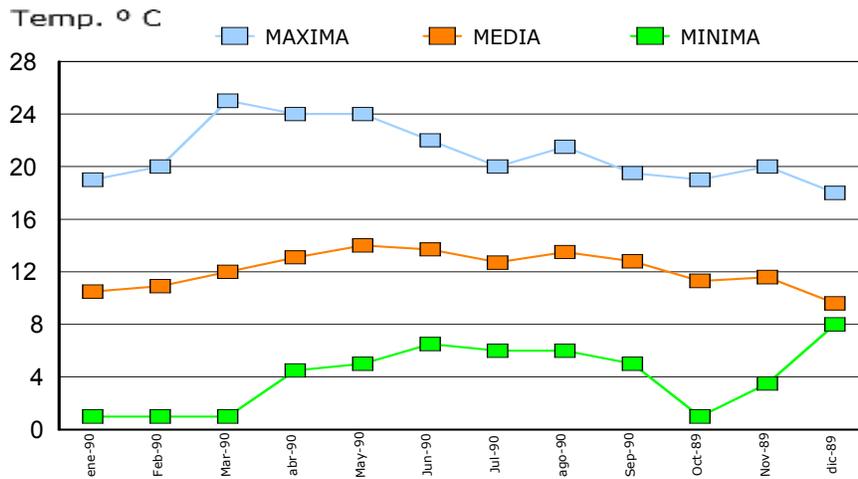


Precipitación Pluvial, Periodo 1992-1993

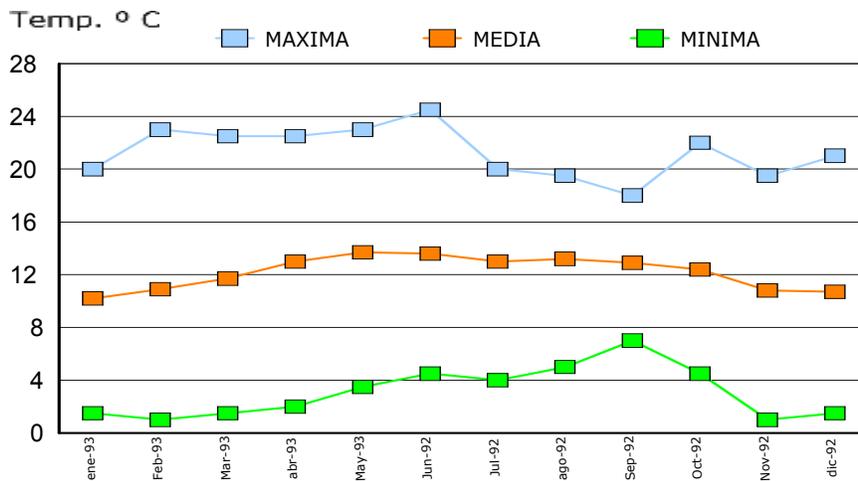


La temperatura media mensual en el lugar muestra una variación de poca significación, dado que la diferencia entre la temperatura media del mes más caliente y del mes más frío es de 4.4 °C, en el período 1989-1990 y 3.5 °C en el período 1992-1993. Es de notar que la diferencia promedio mensual entre la temperatura máxima y mínima es de 17°C (ver siguientes gráficas).

Temperatura, Periodo 1989-1990



Temperatura, Periodo 1992-1993



Considerando los datos de las dos gráficas de precipitación pluvial y las dos de temperatura, el clima corresponde a la clasificación $Cw_2(w)$ (según García, E. 2004), templado subhúmedo con régimen pluvial en verano.

3.3- Relación de la Vegetación con el Ambiente.

Además del clima, son varios los factores que ejercen influencia sobre la vegetación en el área; entre ellos podemos citar, la altitud (2865 msnm) y la cantidad de suelo en el que se nota una escasez acentuada del mismo, que es limitante para el desarrollo de formas arbóreas, sin embargo existen enclavadas en esta zona algunas áreas en forma de hondonadas o depresiones, que por sus condiciones y topología han permitido una mayor acumulación de suelo en ellas, cosa que ha facilitado el desarrollo de bosque mixto de **Pino** y **Abies**



En seguida se da una parte del listado florístico de la zona según Espinoza G.J., 1962, las especies están ordenadas por familias:

Fagaceae

Quercus aculifolia Née

Quercus castanea Née

Quercus conglomerata
Treal.

Quercus diversifolia Née

Quercus laurina H. et B.

Quercus obtusata H. et B.

Quercus rugosa Née.

Pinaceae

Pinus moctezumae Lamb.

Pinus pseudostrobus Lindl



Convolvulaceae

Cuscuta oorymbosa R. et P.

Ipomoea emetica Choisy

Ipomoea murucoides R. et
Schult.

Ipomoea ursina Brandeg.

Quaroclit coccinea

Moench.

Rubiaceae

Bouvardia ternifolia Schlo

Crusea brachyphylla Cho et
Schl.

Crusea subulata Gray





Gramineae

Aegopogon cenchroides H. et B.
Aegopogon tenellus Trin.
Andropogon feensis Fourn.
Avena fatua L.
Avena sativa L.
Epicampes robusta Fourn.
Festuca myuros L.
Heteropogon contortus Beauv.
Muhlenbergia sp.
Trisetwn deyeuxioides Kunth.

Labiatae

Lepechinia caulescens Epl.
Salvia lavanduloides H.B.K.
Salvia leptostachys Benth.
Salvia mexicana L.
Salvia polystachya Ort.
Salvia purpurea Cav.
Salvia sessei Benth.

Campanulaceae

Lobelia nelsoni Fern.
Palmerella debilis Gray
Palmereila tenera Gray

Compositae

Ageratum corymbosum Zucc.
***Ageratina mairetiana* D.C.**
Ambrosia artemisiaefolia L.
Eupatorium conspicuum K. et B.
Brickellia pacayensis Coult.
Montanoa frutescens Hemsl.
Stevia jaliscensis Rob.
Stevia monardaefolia R.B.K.
Stevia subpubescens Lag.
Tagetes micrantha Cav.
Tagetes patula L.



3.4- Descripción de la Planta (***Ageratina mairetiana* D. C.**).

Según la clasificación actual más aceptada la Familia más grande del reino vegetal es la de las **Compositae** o **Asteraceae**, pues cuenta con 13 tribus divididas en aproximadamente 1,620 géneros y 25,000 especies. La Tribu **Eupatorieae** pertenece a las **Compositae** siendo una de las más diversas desde el punto de vista morfológico. A esta tribu pertenecen los géneros **Eupatorium** y **Ageratina** cuyo origen posiblemente esté en México (Heywodd, 1981).

La distribución de **Ageratina mairetiana D. C.** según el Jardín Botánico de Missouri (BGM) de EUA, esta se encuentra en; Guatemala, México, Panamá y El Salvador, para México los estados donde se ha identificado su presencia son; Chiapas, Durango, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Sinaloa, Tamaulipas, Tlaxcala y Veracruz.

Anteriormente **Ageratina mairetiana** (D. C.) King et Robinson 1970, estaba clasificada como **Eupatorium mairetianum D. C.**, pero al hacerse revisiones morfológicas y anatómicas, entre otras, se reclasificó como **Ageratina mairetiana D. C.** en la misma Tribu **Eupatorieae** de la Familia **Compositae**.

Algunos de los nombres comunes que recibe **Ageratina mairetiana D. C.** son: Hierba del golpe, San Marcos, San Marcos yooxi (en tepehuán).

Los sinónimos botánicos de **Ageratina mairetiana D. C.** reportados por el Jardín Botánico de Missouri son;

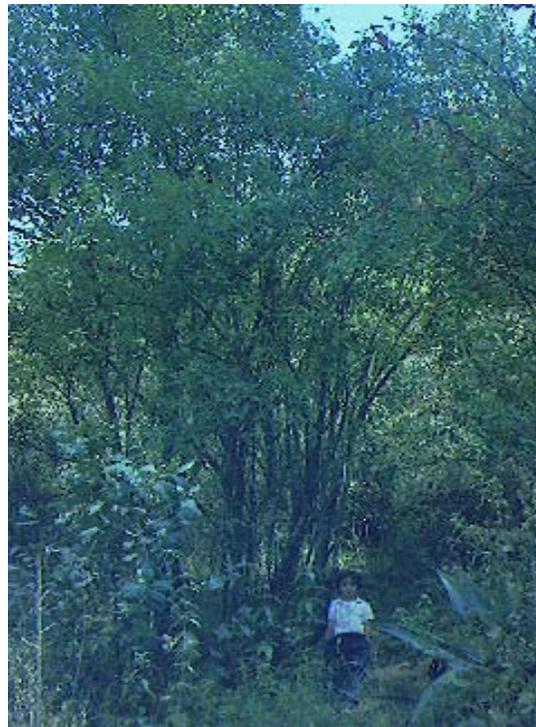
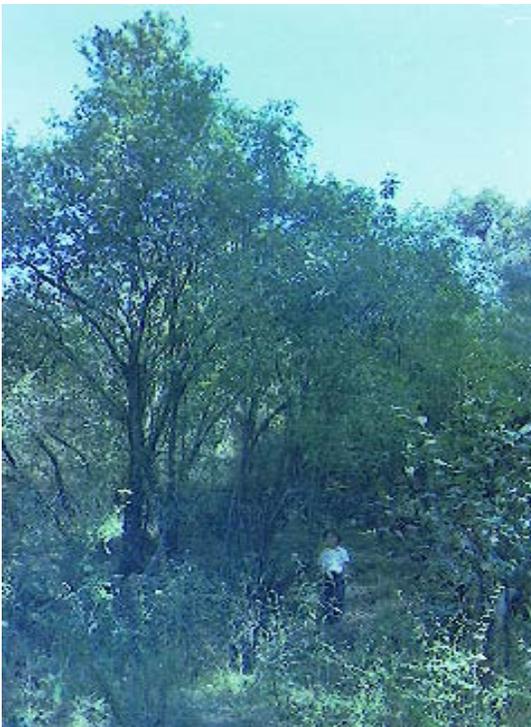
- **Ageratina multiserrata** (Sch. Bip.) R.M. King & H. Rob.
- **Ageratina rafaensis** (J.M. Coult.) R.M. King & H. Rob.
- **Eupatorium cognatum** Kunth & Bouché.
- **Eupatorium mairetianum** DC.
- **Eupatorium mairetianum** fo. *elucens* McVaugh
- **Eupatorium multiserratum** Sch. Bip.

- ***Eupatorium ranse*** J.M. Coult.

Recientemente la especie se ha dividido en dos variedades que son;

- ***Ageratina mairiana*** var *eluscens* y
- ***Ageratina mairiana*** var *mairiana*

La morfología de ***Ageratina mairiana*** D. C. var. *mairiana* es; arbusto perenne, que mide, cuando es adulto, entre 1.5 y 4.5 m de altura, con tronco delgado y ramificado



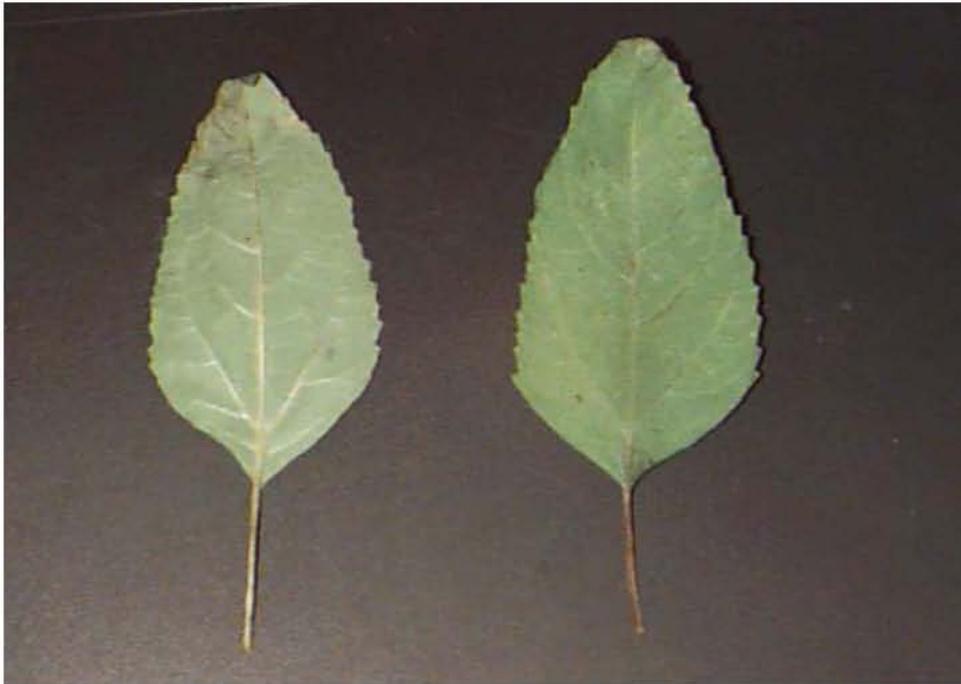


***Ageratina mairetiana* D. C.**

flores blancas ligeramente rosadas. Su época de floración es de principios de febrero a finales de marzo (Heywood, 1977).



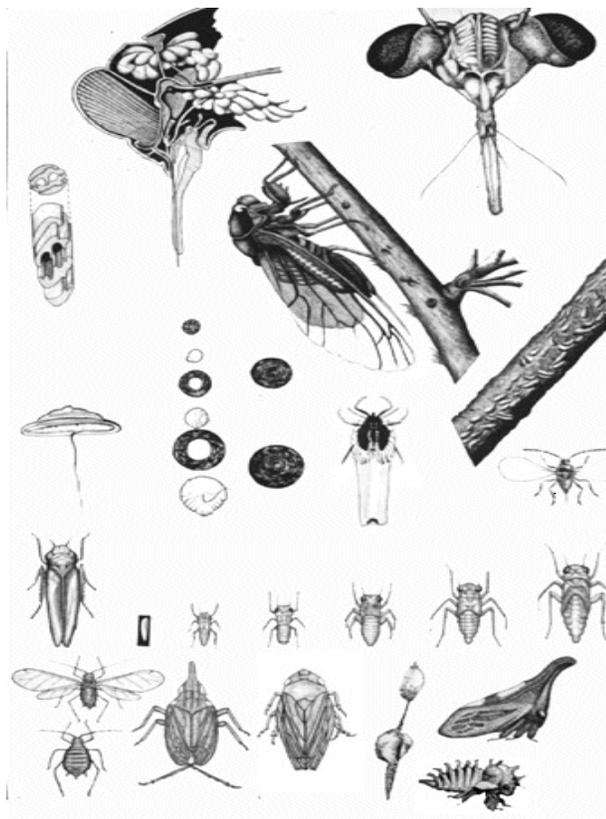
Sus hojas son lanceoladas y miden entre 5 y 17 cm de largo, con sus bordes ligeramente serrados (ver siguientes fotos)



Según datos del Jardín Botánico de Missouri, EUA, el hábitat de la planta es el bosque de **Pino-Encino** en altitudes de entre 800 a 3050 msnm,

3.5- Consideraciones Sobre los Cicadellidae.

La Clase Insecta o Hexápoda, es la más amplia Clase de animales que actualmente habitan la tierra, pues cuenta con 750,000 especies descritas, lo cual indica que tienen una gran radiación adaptativa, y aún cuando son animales esencialmente terrestres, han ocupado virtualmente todos los nichos ambientales del orbe, (Barnes, 1977). Hay que señalar que los insectos tienen una gran importancia ecológica en el ambiente terrestre, ya que dos terceras partes de todas las plantas que florecen dependen de los insectos para su polinización.



Orden Homóptera, tomado de Borrór

Los insectos vivientes se clasifican en 26 Ordenes (Borrór y Delong 1964) y es al Orden Homóptera al que pertenecen las cigarras y chicharritas, estas se caracterizan por ser herbívoros, principalmente

chupadores, cuyo pico succionador emerge desde la parte posterior de la cabeza. Las alas suelen aparecer sobre el cuerpo en posición lateral inclinada, como de tienda de campaña y son típicamente membranosas, además sufren metamorfosis gradual.

Los **Homópteros** se dividen en 43 subfamilias según la clasificación de (Oman et al. 1990.), una de las familias más grandes es la de los **Cicadellidae** (con 22,000 especies descritas), que comúnmente son llamados chicharritas por lo que la ubicamos entre las 10 Familias más grandes de insectos (Hamilton 1984).

La subfamilia **Cicadellinae** que pertenece a la familia **Cicadellidae**, posee una tremenda diversidad taxonómica, además de su presencia en todos los ecosistemas terrestres y una sustancial importancia económica, también tienen alta especificidad con su planta hospedera, lo que puede ayudar a explicar la enorme diversidad del grupo; Janzen (1976), esto constituye para los expertos en este grupo de insectos un reto mayúsculo para su clasificación. En esta subfamilia ubicamos a la tribu **Drikraneurini** a la que pertenece el enorme género **Empoasca** (para el que hay descritas 212 especies) que son esencialmente inidentificables dado que no hay claves de identificación completas por ello el tratamiento individual de las especies en la literatura es dispersa y segmentada. De hecho, existen pocas guías para este grupo, además de que son incompletas o en esencia inexistentes, la identificación de las especies requiere de registros, y cientos de descripciones e ilustraciones (Ruppel 1987).

El género **Empoasca** incluye plagas como la de la chicharrita del frijol (**Empoasca fabae** Harris) que son de talla pequeña (miden entre 2 y 4 mm).

La coloración de los individuos del genero ***Empoasca*** es muy variada, a veces son verdes pero pueden ser amarillos, cafés, grises, negros y también anaranjados, rojos o violetas.

Muchas especies de ***Empoasca*** son de importancia económica, por ser plagas que se alimentan de la savia de las hojas lo que causa amarillamiento de ellas por la reducción de nutrientes (Borrer *et. al.*, 1976), pero más que todo, por ser vectores de enfermedades. (Maes, J. M. *et. al.*, 1993)

Las características que diferencian al género ***Empoasca*** de los demás ***Cicadellinae*** es la forma alargada del cuerpo, con los lados subparalelos; su talla rara vez excede los 13 mm y presentan una o dos hileras de espinas pequeñas a lo largo de las tibias posteriores.



Algunas especies del género ***Empoasca*** son plagas, como ya se mencionó en el caso de ***Empoasca fabae***, Harris 1841 (***Tettigonia***) que es importante en los Estados Unidos, ya que causa la enfermedad conocida como "quemado del saltador" producto del ataque de las chicharritas a las hojas de la de las papas, tapando el tejido conductivo y por lo que las hojas se pliegan iniciando el oscurecimiento del ápice, lo que seca eventualmente toda la hoja.

Aproximadamente 5 o 6 millones de chicharritas pueden contarse por acre de tierra cultivada, (Carlson, O.V., 1962).

Empoasca vitis (Goethe, 1875), es vector causante de la enfermedad viral de la vid, conocido como el rizado de hojas en la uva. Otras chicharritas que son consideradas como plaga incluyen a las que causan el daño, de las rosas y las manzanas en el Oeste de los Estados Unidos, (Enciclopedia Electrónica de la Universidad de Columbia 2005), www.cc.columbia.edu/cu/cup/, tréboles y frijoles.

El daño causado por ***Empoasca fabae*** Harris, sobre plantas de haba especie muy cercana a ***Empoasca kraemeri*** Ross and Moore, se conoce como "quemado del saltahoja" y es producido por los adultos y las ninfas del insecto cuando punzan las hojas en los pecíolos y los tallos de la planta para succionar los jugos que le sirven de alimento. Si el ataque del insecto es intenso, las plantas son afectadas en su desarrollo disminuyendo notablemente su rendimiento (Wilde, G., et al. 1976).

La naturaleza del daño no está bien establecida, aunque la mayoría de las evidencias sugieren que es producido por la interferencia en el transporte de alimentos y agua, debido a la destrucción de las células del floema y a la perforación de las células del xilema durante el proceso de alimentación (De Long, D. M. 1971).

En México ***Empoasca kraemeri*** Ross and Moore 1957; ataca a ***Phaseolus vulgaris*** L., frijol común produciendo enormes pérdidas económicas (Maya-Hernández V. et. al., 2000) ***Empoasca kraemeri*** Ross and Moore es el insecto plaga más importante que actúa sobre las diferentes variedades de ***Phaseolus*** en Latinoamérica (Schoonhoven, A. Van, et al. 1978).



Empoasca spp. Ninfas
de *Empoasca recurvata*.

Distribución geográfica:

Empoasca está presente en toda la región centroamericana, pero realmente se encuentra diseminada en casi todos los suelos fértiles del mundo generalmente en alturas inferiores a los 1300 msnm.

3.6- Ciclo de vida de *Empoasca sp.*

Algunas chicharritas tienen una generación por año, pero pueden presentarse varias. Los huevecillos son depositados uno o unos pocos por vez en los peciolos y las hojas. Los adultos se presentan en el invierno en el sur de los Estados Unidos; cuando migran al norte causan muchos daños, pero mueren por el frío.

No obstante el reconocido status de plaga primaria que se le reconoce a *Empoasca kraemeri* Ross and Moore, ha sido poco estudiada. Solamente se han publicado cinco artículos que describen algunos aspectos del ciclo de vida de esta especie en dos variedades de *Phaseolus vulgaris L.*, Wilde et al., en 1976 y Leite Filho y Ramalho en 1978.

Wilde et al, determinaron que los huevos *E. kraemeri* Ross and Moore 1957 son alargados y ligeramente curvos. La longitud promedio obtenida para una muestra de 580 huevos fue de 0.79 + 0.09 mm. La hembra ovoposita en las hojas y en los peciolos, introduciendo los huevos dentro del tejido vegetal. La totalidad de los huevos observados en las hojas usadas en los ensayos de ovoposición se encontraron en el envés y más del 90% fue colocado en la unión de las nervaduras y la lámina foliar.

En otro experimento realizado por Segnini y A. Montagne en 1986, el ciclo de vida de *Empoasca kraemeri* sobre *Phaseolus vulgaris L.*, fue estudiado bajo condiciones controladas de temperatura (25 °C) y de humedad relativa (50-70%), con un fotoperíodo de luz artificial de 12 horas (6 am. - 6 pm.), midieron el tiempo promedio para la incubación de 225 huevos fértiles, que es de 6.94 días, ocurriendo el 95% de la eclosión entre los 6.5 y 8.0 días y para el desarrollo ninfal de 8.45 días.

La longevidad promedio de los adultos fue relativamente larga, 42.4 días, mientras que la tasa diaria de oviposición fue baja y sostenida en el tiempo, entre 2.13 y 3.28 huevos/hembra/día.

El valor promedio de incubación obtenido es muy similar al encontrado por Leite Filho y Ramalho en 1979 para esta misma especie en otro cultivar.

Los resultados presentados por Wilde et al. 1976, difieren de los de Segnini y Montagne A. 1986, El tiempo promedio de incubación encontrado por estos autores está entre los 8 y 9 días bajo las condiciones de una jaula-vivero (20-35°C) y entre 9 y 10 días bajo condiciones de laboratorio (18-22°C). Posiblemente la amplitud de variación de la temperatura bajo la cual estos autores realizaron sus ensayos sea el factor determinante en estas diferencias.

Segnini y Montagne A. 1986, midieron el tiempo que dura ***Empoasca kraemeri*** Ross and Moore 1957 en el estado de ninfas, que no obstante de ser móviles, tienden a permanecer quietas en un mismo lugar de la hoja, preferentemente en los ángulos que forman las nervaduras al unirse. Ellos encontraron que el desarrollo ninfal se efectuó a través de cinco instares que pueden caracterizarse por el ancho de la cápsula cefálica incluyendo las órbitas de los ojos. Cada estadio se diferencia significativamente de los otros ($P < 0.05$), lo cual permite diferenciar cada uno de los instares de esta especie.

También observaron la duración de cada uno de los estadios ninfales, los estados de ninfa para las hembras y para los machos no difieren significativamente, por lo cual los analizaron como uno solo, incluyéndolos dentro de la población total. El tiempo promedio requerido para el desarrollo de las ninfas fue de 8.45 días. Este resultado concuerda con el presentado por Leite Filho y Ramalho 1979, para 66

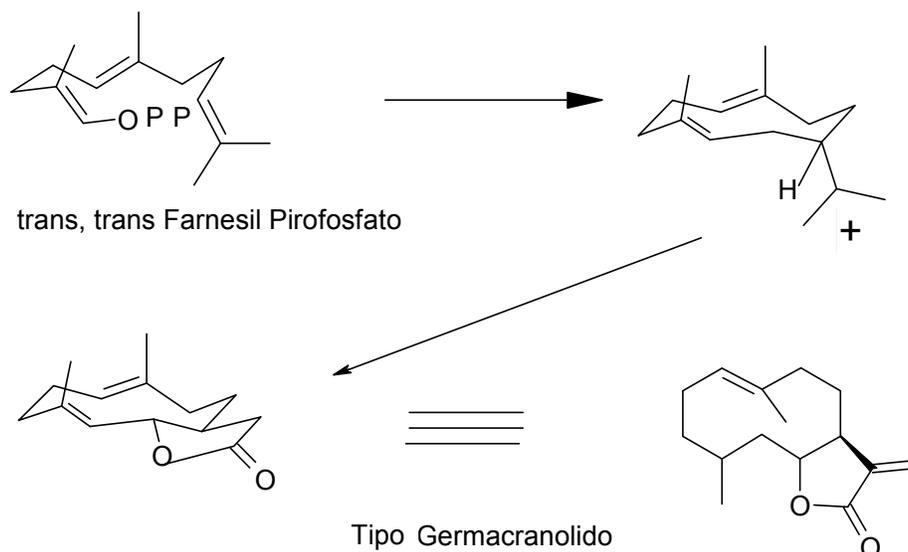
ninfas de este mismo insecto, pero difiere del valor obtenido por Wilde et al., quienes al seguir el crecimiento de 20 ninfas de ***E. kraemeri*** Ross and Moore 1957 encontraron que para el desarrollo total, la duración promedio es de 9.45 y 9.90 días, en las condiciones de una jaula-vivero (20-35°C) y de laboratorio (18-22°C). El V instar fue el de mayor duración promedio, el cual se alargó por más de un día en relación a los instares más próximos en duración (I y IV). El II y el III instares presentaron el menor tiempo promedio de desarrollo. Resultados similares obtuvieron Wilde et al. 1976 y Leite Filho y Ramalho 1979.

En cuanto a longevidad, sobrevivencia y fecundidad, estos autores reportan que la longevidad promedio de una población iniciada con 48 adultos de ***E. kraemeri*** Ross and Moore 1957 y mantenida en el laboratorio con distintas condiciones de temperatura, fue de 40, 42 y 72 días, no encontraron diferencias significativas para la longevidad promedio entre machos y hembras.

3.7- Aspectos Químicos de la Interacción *Ageratina mairiana* D.C. vs. *Empoasca* sp.

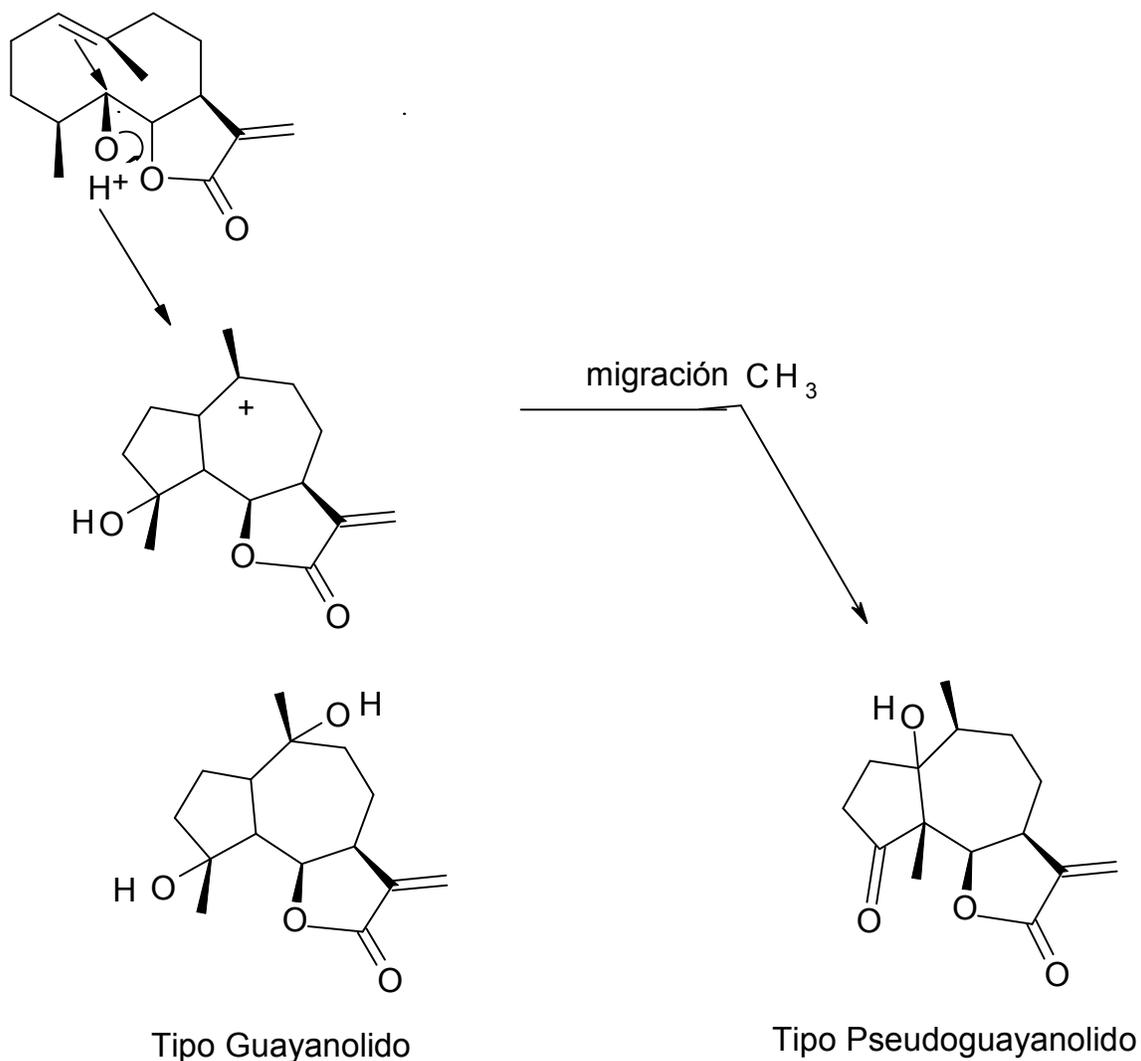
De las aproximadamente 6,000 lactonas sesquiterpénicas que se conocen, la gran mayoría pertenecen al metabolismo secundario de la familia Compositae, su presencia es poco frecuente en otras familias verbigracia *Magnoliaceae*, *Lauracea* y *Umbelliferae*; hongos superiores del Género *Frullaria* y *Diplophylum*, así como en los basidiomicetes *Lactarius vellereus*.

Como ya se mencionó en el inciso 3.4 (Descripción de la planta) las Compositae están constituidas por 1,620 Géneros y 25,000 especies, (según **The International Compositae Alliance**), en las cuales la presencia de las lactonas sesquiterpénicas son producto de su metabolismo secundario que tienen como precursor al Farnesil pirofosfato el cual es transformado mediante la acción de enzimas específicas a estructuras del tipo de los Germacranólidos

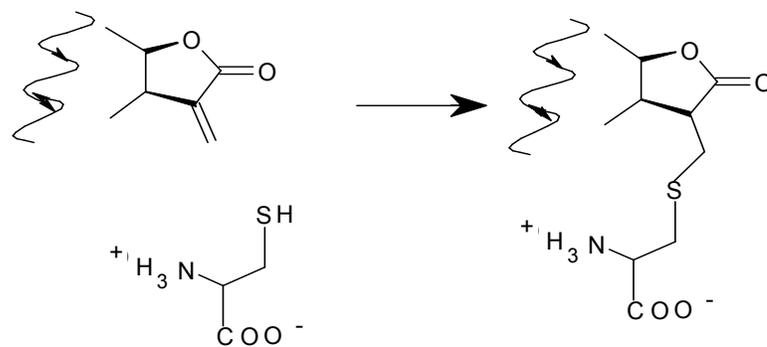


y por la subsecuente modificación por ciclización interna de esos compuestos carbocíclicos de 10 miembros se generan sistemas en

anillación 5/6 y 6/6 que dan lugar a estructuras tipo guayanólido, con la migración de un metilo se transforman a pseudoguayanólidas (Herout, 1974 y Herz 1977).



Comúnmente las lactonas sesquiterpénicas son referidas como principios activos, que mediante adiciones de Michael pueden formar enlaces con proteínas. El mecanismo de reacción más aceptado que intenta explicar esta actividad se representa en el esquema siguiente.

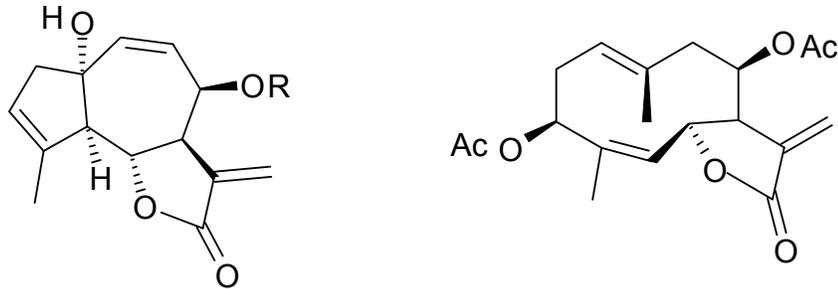


Cisteína

Las funciones sulfidrilo, hidroxilo y amino juegan un papel importante en la interacción con el sistema carbonílico α,β insaturado presente en las lactonas sesquiterpénicas, que son deletéreos en la alimentación de mamíferos.

Es por esta propiedad que se les atribuyen las características nocivas como alimento para los herbívoros, y además pueden conferirles, propiedades antibióticas (Mathur 1975) ó de alergenicidad (Rodríguez 1977), actividad alelopática (Sequeira 1968), insecticida (Betskouski 1975) o citotóxica (Kupchan 1968, 1971).

Mediante una revisión bibliográfica Emerciano y colaboradores en 1997 encontraron que la tribu ***Eupatorium*** y en especial en el Género ***Ageratina*** contiene lactonas sesquiterpénicas con esqueletos de guayano y pseudoguayano. Las estructuras de las lactonas revisadas son del artículo que publicaron Fang N. y T. J. Mabry 1988, ver estructuras siguientes.



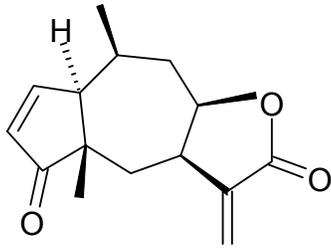
Lactonas Sesquiterpénicas de *Ageratina tomentella*

En trabajos anteriores (Mancera, 1982) se estableció que ***Ageratina mairetiana*** D. C., contiene 8-10-bis-epi-Aromaticina, Burrodina, Confertina, 8-epi-Inuviscolida, y Mairetiolida, por observaciones de la planta se sabe que una chicharrita es huésped de esta especie y que su presencia en ella sufre variaciones poblacionales a lo largo del año.

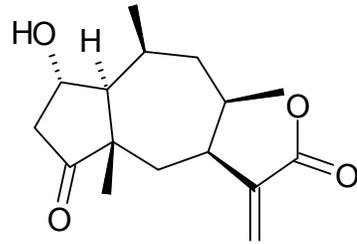
Considerando estos hechos, se planteó el proyecto de estudiar la posible relación químico-ecológica entre ***Ageratina mairetiana*** D. C. y ***Empoasca sp.***

En particular se propone estudiar el posible efecto de las lactonas sesquiterpénicas: **Pseudoguayanolidas;** 8-10-bis-epi-Aromaticina, Burrodina, y Confertina, **Guayanolidas;** 8-epi-Inuviscolida, y Mairetiolida, que produce ***Ageratina mairetiana*** D. C., sobre la densidad poblacional de los insectos, y conocer en qué estadio del ciclo de vida de ***Empoasca sp.*** tienen ese efecto.

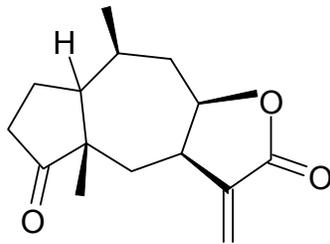
Pseudoguayanolidas



8-10-bis-epi-Aromaticina

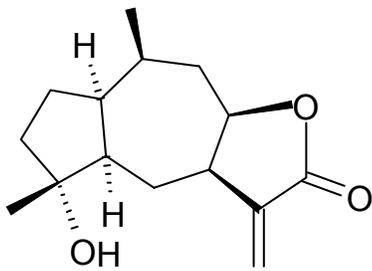


Burrodina

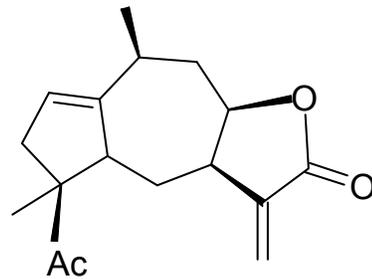


Confertina

Guayanolidas



8-epi-Inuviscolida



Mairetiolida

4.- Objetivo General.

Establecer si alguno de los metabolitos secundarios de ***Ageratina mairetiana*** D. C., específicamente las lactonas sesquiterpénicas: **Pseudoguayanolidas;** 8-10-bis-epi-Aromaticina, Burrodina, y Confertina, **Guayanolidas;** 8-epi-Inuviscolida, y Mairetiolida, tienen efecto aleloquímico sobre los cicadélidos en algún estadio de su ciclo de vida o sólo coinciden espacio-temporalmente, sin que la química de la planta intervenga en ello.

Objetivos Particulares.

- ✓ Determinar el Taxon al que pertenece la chicharrita.
- ✓ Obtener datos poblacionales (censos) en dos períodos anuales, no consecutivos, para observar la fenología de ***Ageratina mairetiana*** D. C., y comparar la química asociada en cada estadio.
- ✓ Censar a los cicadélidos para saber si su densidad poblacional se ve afectada en algún momento de su ciclo de vida, por la variación química de ***Ageratina mairetiana*** D. C.
- ✓ Determinar si los metabolitos secundarios (lactonas sesquiterpénicas: **Pseudoguayanolidas;** 8-10-bis-epi-Aromaticina, Burrodina, y Confertina, **Guayanolidas;** 8-epi-Inuviscolida, y Mairetiolida, que produce ***Ageratina mairetiana*** D. C. muestran alguna variación en concentración que afecte la densidad poblacional de los Cicadélidos.

5- Materiales y Método.

Para la realización de los análisis químico-ecológicos de metabolitos secundarios e insectos chupadores en condiciones naturales, se procedió a implementar una metodología para censar la población de los insectos sobre un área foliar específica de ***Ageratina mairiana*** D. C. y que nos permitiese la toma de muestras vegetales para su análisis en el laboratorio.

Previamente se estableció el modelo matemático que describe la relación del largo y ancho de las hojas de ***Ageratina mairiana*** D. C. con el área foliar, lo cual también ayudo en la determinación del tamaño mínimo del área foliar sobre la que se realizarían los censos y la toma de muestras en campo, midiendo con un vernier el largo y ancho de las hojas de ***Ageratina mairiana*** D. C. y al mismo tiempo censar los individuos de ***Empoasca sp.***

5.1.- Lugar de Estudio.

La zona elegida donde se estudió la posible relación química entre ***Ageratina mairiana*** D. C. y el Cicadélido, se ubica a orillas de la carretera federal México-Cuernavaca, en el Km. 57.5 cerca de la desviación al pueblo de Coajomulco, en el estado de Morelos. En el meridiano 99° 12' 44.50" de longitud Oeste y el paralelo 19° 01' 38.00" de latitud Norte. A 2865 msnm. En dicha zona hay una pequeña cañada, donde se encuentra un manchón de diez individuos de ***Ageratina mairiana*** D. C. sobre los que se estudió esta relación.

5.2.- Densidad Poblacional vs. Área foliar.

Para iniciar el trabajo de campo, se realizaron algunas salidas al lugar seleccionado para el estudio y obtener datos preliminares entre ellos, determinar el área foliar sobre la cual se debía censar la población del insecto, esto se hizo midiendo con un vernier el largo y ancho de 100 hojas de distinto tamaño y estado fenológico de ***Ageratina mairेतiana*** D C. para relacionarlo con la medida del área foliar de cada una de esas 100 hojas, estas dimensiones tienen una correlación lineal directamente proporcional al área foliar. Con estos valores se estableció el modelo matemático que permite conocer las medidas de largo y ancho de hoja que corresponden a un área foliar determinada. Con este método indirecto, establecemos el área foliar sobre la que se hará el censo de insectos y la cantidad de material vegetal que habrá de colectarse, este proceso se repitió en toda la planta (a lo alto y ancho). Durante el proceso se observó una distribución homogénea de los insectos sobre las hojas de las plantas en estudio.

Por la densidad de individuos en las hojas se dedujo que el área mínima de muestreo para realizar los censos es de $1.2 \pm 0.1 \text{ dm}^2$ y hacer colectas no destructivas de los individuos de ***Ageratina mairेतiana*** D. C. Se puede medir el área foliar *in situ* fácil y rápidamente (al medir largo y ancho de hojas con un vernier) para a la vez, realizar el censo de los individuos y observar el estadio de desarrollo del Cicadélido.

La identificación del insecto partió del supuesto que este pertenecía al género ***Acanalonia***, para completar su estudio se colectaron 9 individuos en distintos estadios ninfales, además de dos machos y una hembra adultos que se preservaron en una solución alcohol-agua 70% de

alcohol para mantener su morfología y trasladarlos al laboratorio para su correcta clasificación, la cual fue hecha por la Dra. Julieta Ramos-Elorduy, en el Instituto de Biología de la UNAM. Siendo rectificado a género ***Empoasca***



Para el primer muestreo y censo, se seleccionaron tres individuos de ***Ageratina mairiana*** D. C., de cada uno de los cuales se colectaron hojas con un área foliar de $1.3 \pm 0.1 \text{ dm}^2$ sobre las que se realizaron los censos de los cicadélidos, dicho material se tomó como muestra vegetal para el análisis químico de metabolitos secundarios. Este primer ciclo de muestreo se realizó del 10 de septiembre de 1989 al 28 de noviembre de 1990 con un intervalo de siete días entre cada muestreo. En el segundo ciclo de muestreo se tomaron los diez individuos que habitan la hondonada y un área foliar de $1.5 \pm 0.1 \text{ dm}^2$ sobre las cuales nuevamente se censaron los insectos a intervalos de catorce días del 7 de junio de 1992 al 2 de mayo de 1993.

5.3-Extracción de Estándares de Lactonas Sesquiterpénicas.

Para obtener los estándares de las lactonas sesquiterpénicas: **Pseudoguayanolidas;** 8-10-bis-epi-Aromaticina, Burrodina, y Confertina, **Guayanolidas;** 8-epi-Inuviscolida, y Mairetiolida, mismas que en trabajos anteriores se habían aislado e identificado en ***Ageratina mairetiana*** D. C. (Mancera, 1982), se colectaron 5.0 Kg. de hojas frescas en el periodo vegetativo (11 de octubre de 1992), dichos estándares se utilizaron para hacer el análisis químico cuantitativo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de los extractos de las hojas sobre las que se realizaron los censos poblacionales de ***Empoasca sp.***

La extracción de los estándares de los metabolitos secundarios, se hizo dejando secar el material vegetal recolectado, en una estufa de secado a 50°C, a continuación se molió hasta un tamaño de 200 mallas.

El material seco y molido se empaca en una columna, que consiste en tubo de vidrio de 10 cm. de diámetro por 70 cm. de largo que termina en forma de pico en uno de sus lados, lugar donde se coloca un copo de algodón para retener el material vegetal molido, el copo de algodón sirve como filtro para dejar pasar el disolvente. Después de ello se empieza a lixiviar la columna con hexano, en fracciones que se colectan en matraces erlenmeyer de 1 lt. hasta agotar el material botánico, las fracciones se ponen en un matraz de bola para evaporar el disolvente (hexano) en un rotavapor, esto hasta llegar a la sequedad, al producto de ello se le llama "Extracto Hexánico".

El material montado en la columna se sigue extrayendo con acetato de etilo como eluyente y se procede a colectar las fracciones y concentrarlo de igual manera que se hizo con el hexano, a este

concentrado se le llama "Extracto de Acetato de Etilo", esta fracción tiene la polaridad adecuada para extraer las lactonas arriba mencionadas.

Del extracto de acetato de etilo se hacen percolaciones en "tonsil", que es una arcilla del grupo de los Silicatos, del subgrupo Filosilicatos, llamada Montmorillonita.

Las percolaciones en tonsil se hacen con el fin de eliminar ceras y clorofilas además de otros productos que interfieren en el proceso de separación y purificación de los metabolitos buscados; esta percolación se realiza de manera rápida (auxiliándonos de presión reducida) y con 3 gr de tonsil por gramo de extracto, el exceso y prolongado tiempo de contacto propician transformaciones en las estructuras moleculares de las muestras.

Después de la percolación se concentra el "Extracto de Acetato de Etilo" (que es donde se encuentran los metabolitos mas polares comparados con los del extracto hexánico) y se somete a una cromatografía en columna abierta, con gel de sílice, Kieselgel 60 de Merck (tamaño de partícula, 0.063- 0.200 mm, 70-230 mesh ASTM). La columna se eluye con hexano al 100% y progresivamente se aumenta la polaridad con acetato de etilo, 80:20, 50:50, 30:70 hasta llegar al 100%, se colectan pequeñas fracciones de la elusión (50 ml.), y se verifica la composición de cada fracción mediante cromatografía en capa fina (TLC), las fracciones más puras se cristalizan y purifican por recristalización, cuando no es posible su purificación por cristalización se procede a hacer una recromatografía de donde se obtienen pequeñas fracciones con las sustancias separadas.

La cromatografía en capa fina (TLC), se hace utilizando cromatoplasmas de gel de sílice marca Merck F-254, para dar seguimiento a lo composición de las fracciones que se obtienen de la cromatografía

en columna abierta y las cristalizaciones, ayudándonos de una sustancia cromógena como el sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2 N. y /o vainillina, que reacciona con las lactonas sesquiterpénicas las cuales revelan en color rojo y los diterpenos en color morado ó azul oscuro al calentar las cromatoplacas, desarrolladas en la mezcla apropiada de disolventes (hexano-acetato de etilo). Para ello nos auxiliamos con sustancias tipo, obtenidas en estudios previos (Mancera, 1972), las cuales tomamos como referencia.

Los agentes cromógenos se preparan con las proporciones que se anotan en la siguiente tabla.

Agente Cromógeno	Composición	Referencia
Sulfato Cérico- H ₂ SO ₄	Sulfato Cérico 12g Ácido Sulfúrico (c) 22.5 ml. Hielo 350 g	Stahl,1969
Agente Cromógeno	Composición	Referencia
Vainillina	Vainillina 0.5 g. Etanol 100 ml. Ácido clorhídrico (c)	Markham, 1982

Para el desarrollo del color es necesario calentar la cromatoplaca en una plancha caliente a 110 °C durante dos minutos.

Cuando se tienen las sustancias puras y cuando son sólidas, se procede a la determinación de sus puntos de fusión, para lo cual se emplea un aparato Fisher-Johns.

En seguida se procede a obtener cada uno de los espectros de infrarrojo (IR), y de resonancia magnética nuclear (NMR), para determinar su estructura molecular. Las moléculas aisladas fueron; las **Pseudoguayanólidas**; 8-10-bis-epi-Aromaticina, Burrodina, y Confertina, y las **Guayanólidas**; 8-epi-Inuviscolida, y Mairetiolida.

Estas sustancias servirán de referencia para que por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), comprobemos la presencia y concentración de las lactonas en las muestras de hojas tomadas durante los censos poblacionales.

5.4.- Separación de Lactonas Sesquiterpénicas y Cuantificación por Medio de HPLC.

La técnica de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) por sus siglas en español, se eligió por que nos permite conocer la cantidad de cada componente en una muestra muy pequeña de material vegetal (100 mg de material vegetal seco), lo que ayuda para hacer análisis no destructivos de las plantas, tomando solo 5 hojas.

Por otro lado la cantidad de reactivos para preparar las muestras y obtener los cromatogramas son pequeños, lo cual da un ahorro de recursos y tiempo, sin disminuir la precisión de los análisis cuantitativos que se asocian a esta técnica.

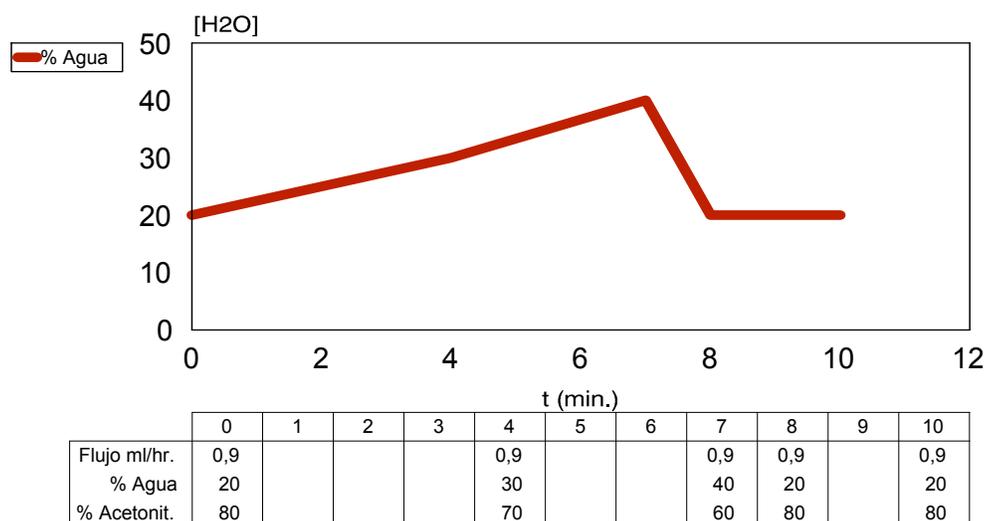
Además depurando las condiciones de separación en una sola corrida se obtienen los tiempos de retención de los picos que representan las sustancias de interés (lactonas sesquiterpénicas y diterpenos) en un cromatograma, por cada muestra de hojas colectadas.

Para lograr esto, se procedió a establecer el método de separación y análisis de las lactonas sesquiterpénicas y diterpenos por medio de cromatografía de alta resolución (HPLC), empleando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Waters modelo 4000, portacolumna Waters Delta 4000 y detector Waters 486, con detección en el espectro ultravioleta-visible. Se montó una columna MCH-10 C₁₈ de 300 X 10 mm., precolumna de inyección de 10 µl, los eluyentes que dieron la mejor resolución en el procesamiento de los estándares y muestras fueron acetonitrilo-agua a un flujo de 0.9 ml/min con gradiente de elusión preprogramado, la concentración inicial es de 20% de agua y 80% de acetonitrilo, a los 4.0 minutos 30% de agua 70% de acetonitrilo, a los 7.0 minutos la concentración de agua es de 40% y 60% de acetonitrilo, para llegar a los 8.0 minutos a una polaridad 20% agua 80%

de acetonitrilo además de 2 minutos para el restablecimiento de las condiciones iniciales, lo que da un tiempo total de corrida de 10 minutos. La longitud de onda se seleccionó en el ultravioleta a una $\lambda=212$ nm., dado que el grupo lactona tienen absorción característica a esta longitud de onda.

Todo ello se programa y ordena al HPLC desde una estación de datos con el software Máxima 820 de Millipor. Una síntesis de las instrucciones del gradiente de elusión y los tiempos se muestra en la siguiente gráfica y tabla de elusión.

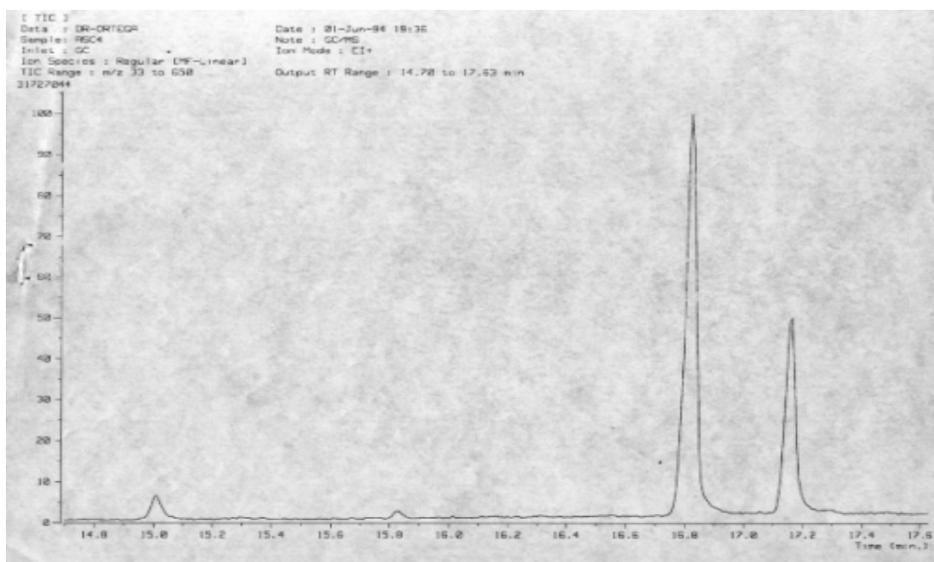
Condiciones de Separación de Lactonas Sesquiterpénicas



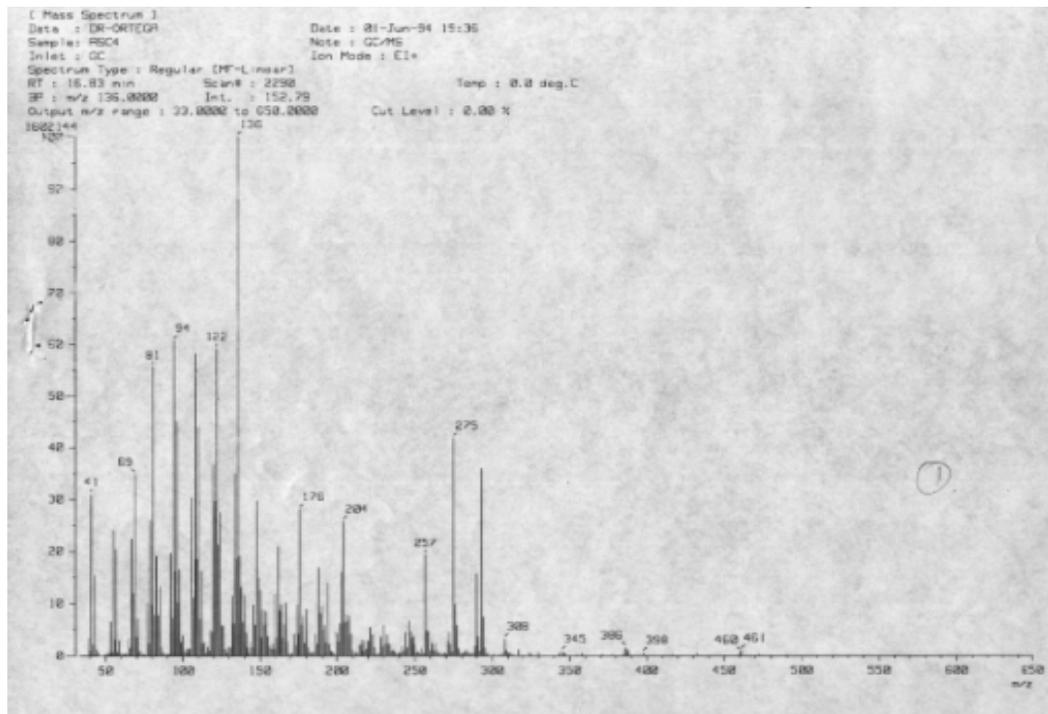
5.5- Separación de Diterpenos y Cuantificación por medio de HPLC.

El 17 de febrero de 1991, se colectó material vegetal con el fin de aislar los diterpenos, 160 g de material vegetal seco se extrajeron con dicloro metano (CH_2Cl_2) como disolvente, se obtuvieron 7.27 g de extracto, que se procedió a separar mediante cromatografía en columna abierta, de manera similar a como se hizo con las lactonas sesquiterpénicas *vide supra* (inciso 5.3 Extracción de Estándares de Metabolitos Secundarios.), de donde se obtuvieron y cristalizaron 5 mg del diterpeno denominado A y 3.5 mg del diterpeno B, para la purificación se uso el cromatógrafo de líquidos HPLC con columna preparativa, la cual es de mayor diámetro que la analítica, lo que permite obtener en mayor cantidad y separados los dos diterpenos que se mencionan arriba de manera rápida y eficiente.

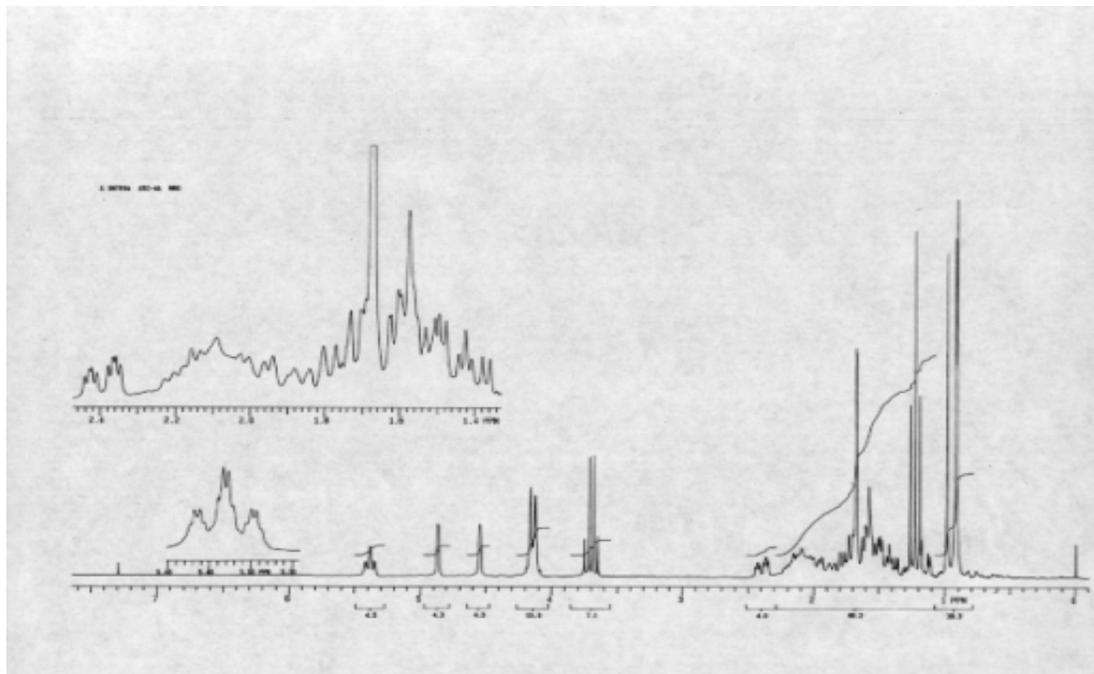
Mediante Cromatografía de Gases (CG) acoplada a Espectrometría de Masa (EM) se determinó el peso molecular de cada uno de los dos diterpenos. (ver espectros CG-EM).



Cromatograma de Gases de Diterpenos A y B.



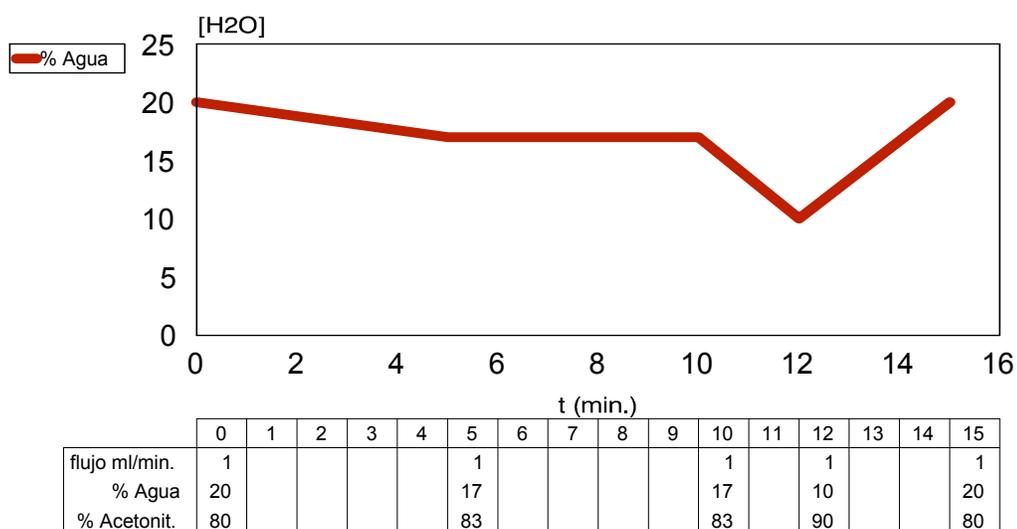
Espectro de Masas de Diterpeno A.



Espectro de NMR`H de Diterpeno A.

Las condiciones para separar los diterpenos en HPLC son; flujo de 60 ml/hr. Selección del detector en $\lambda = 244$ nm., la columna analítica empleada fue la MCH-10 que también se uso en la separación de las lactonas sesquiterpénicas, el tiempo de corrida total 15 minutos, la concentración inicial de los disolventes usados son 20% de agua y 80% acetonitrilo, el gradiente de elusión se programa para que a los 5 minutos la polaridad llegue a 17% de agua 83% de acetonitrilo y se mantenga isocrática hasta los 10 minutos, a los 12 minutos la concentración es de 10% agua 90% de acetonitrilo y a los 15 minutos se regresa a las condiciones iniciales. Como referencias para obtener los tiempos de retención se emplearon los dos diterpenos aislados, las condiciones de separación en el HPLC se muestra en la siguiente gráfica.

Condiciones de Separación de Diterpenos



6.- RESULTADOS.

La identificación taxonómica se realizó a partir de dos machos y una hembra adultos y nueve individuos en distintos estadios ninfales colectados en las hojas de *Ageratina mairiana* D. C. El taxón al que pertenece la chicharrita queda de la siguiente forma:

Familia	Cicadellidae
Subfamilia	Cicadellinae
Tribu	Drikraneurini
Género	<i>Empoasca sp.</i>

A partir de los datos obtenidos al medir el largo y ancho de cada una de 100 hojas en distintos estadios de crecimiento y medir las áreas foliares correspondientes con un medidor de área foliar marca Shimatsu, se estableció un modelo matemático de trabajo.

El modelo matemático que determinamos es una relación lineal con las constantes que se dan a continuación:

$$A = (L \times a) 6.4 \times 10^{-1} + 13.05$$

Donde **A** es el área foliar total de la hoja

L es el largo de la hoja en cm

a es el ancho de la hoja en cm

El coeficiente de correlación de esta relación fue de 8.97×10^{-1} , y al aplicarlo en la práctica de campo, encontramos que en estadios tempranos, las hojas tiernas y las hojas pequeñas maduras así como las hojas de mayor tamaño se desvían de la relación lineal, es decir, que al

multiplicar el largo por el ancho de estas hojas se tiene mayor variación del área foliar. Es por ello que para los censos se toman hojas de tamaño mediano.

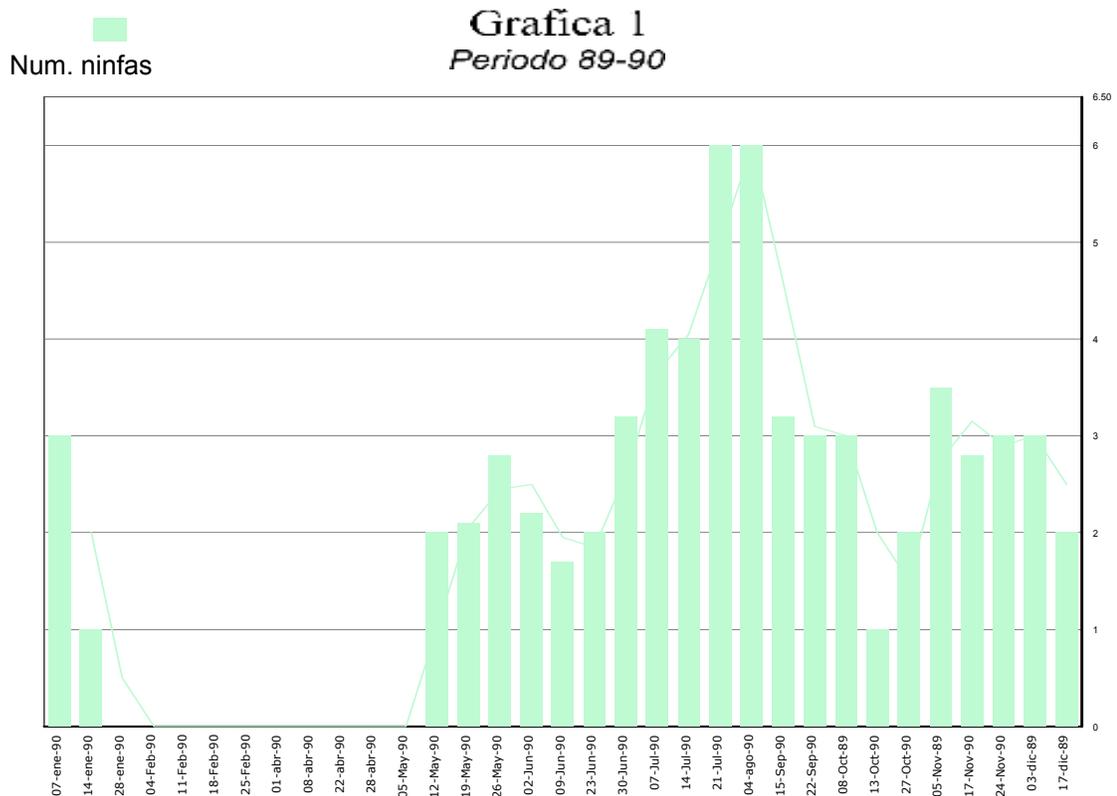
El área foliar se midió en campo con un vernier, utilizando como patrón el modelo matemático que se obtuvo como resultado del análisis de los datos del largo y ancho de hojas de ***Ageratina mairiana*** D. C. en distintos estados fenológicos relacionándolos con el área foliar.

El área mínima para censar a ***Empoasca sp.***, tiene que ser una área foliar de $1.3 \pm 0.1 \text{ dm}^2$, esto se cumple colectando 5 hojas con un largo de $7.85 \pm 0.30 \text{ cm}$, y ancho de $3.30 \pm 0.13 \text{ cm}$, esto incluye la restricción de hacer colectas no destructivas, así como el no tomar en cuenta la cota inferior donde se pierde la linealidad de la relación que describe la ecuación arriba mencionada.

Ante la posibilidad de un error en el primer período de muestreo y también para verificar la reproducibilidad de los datos de los censos y concentración de metabolitos, en el segundo período de muestreo se decidió ampliar un 10% el área foliar, con respecto al primer período de muestreo, la cual queda en $1.5 \pm 0.1 \text{ dm}^2$, para lo que se requieren cinco hojas con un largo de $8.45 \pm 0.3 \text{ cm}$, y $3.55 \pm 0.13 \text{ cm}$ de ancho.

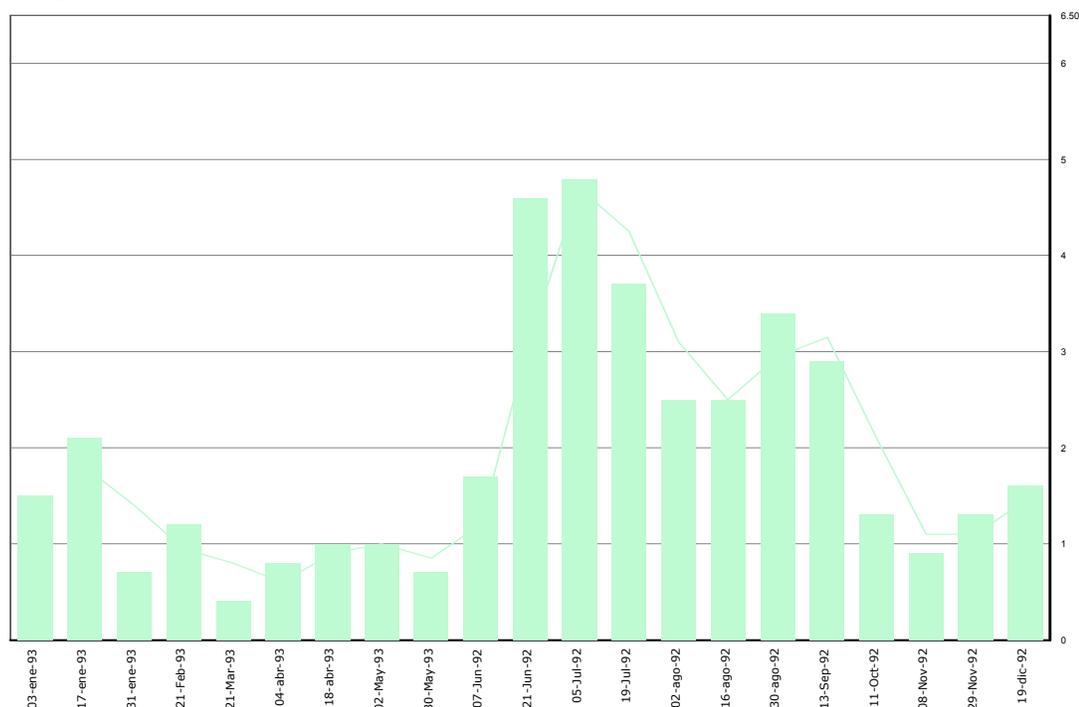
Estadios Fenológicos de *Empoasca sp.*

Se realizaron censos poblacionales de ninfas de *Empoasca sp.* en dos períodos anuales no consecutivos, un período es del 8 de octubre de 1989 al 24 de noviembre de 1990 con muestreos semanales, y el segundo periodo del 7 de junio de 1992, al 30 de mayo de 1993 con muestreos cada catorce días. Al procesar los datos se tienen las siguientes gráficas;



■
Num. prom ninfas

Grafica 2
Periodo 92-93



De los conteos censales de chicharritas hechos en el área foliar determinada, se obtuvieron los números de ninfas y adultos. De los sitios de anidación y oviposición solo se hicieron anotaciones producto de observaciones someras.

La densidad poblacional de las ninfas, en cada uno de los dos periodos de muestreo, tienen un comportamiento anual similar. A lo largo de estos periodos, se observan tres grupos de estadios ninfales (ver graficas 1 y 2), con algunas diferencias pequeñas entre los dos periodos trabajados, las cuales pueden ser producto de las diferencias de la amplitud de los intervalos entre muestreos, área foliar y el promedio de individuos de *Ageratina maireriana* D. C., sobre los cuales se realizó el censo de *Empoasca sp.*

Al censar cada semana en el ciclo 89-90, los valores obtenidos son más conspicuos que en el ciclo 92-93, observándose que cuando ***Ageratina mairiana* D.C.** defolia (de principios de enero a finales de abril) no hay ninfas. En el periodo 92-93 el promedio de individuos en el mismo intervalo (de enero a abril) fue de menos de 0.5 individuos.

En la gráfica 1 se aprecia que la densidad poblacional de las ninfas aumenta en tres intervalos; uno de principios de mayo a mediados de junio, otro de los últimos días de junio a finales del mes de septiembre y otro más de mediados de octubre a mediados de enero, previo a cada uno de estos tres periodos en el envés de las hojas se aprecian sitios de oviposición.

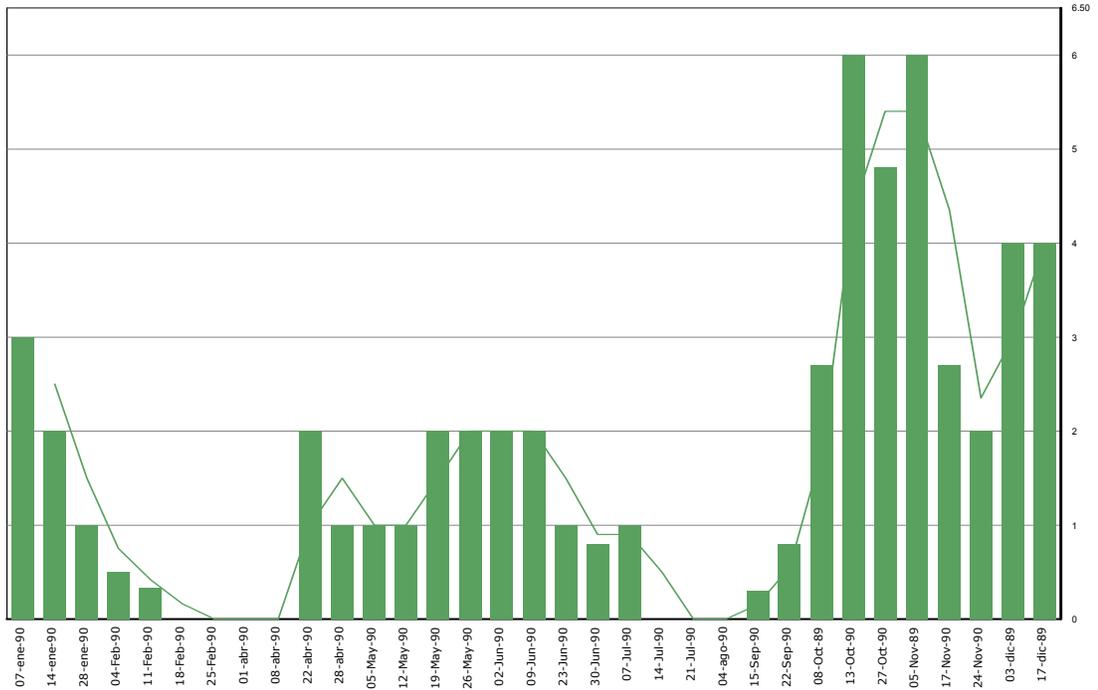
En la gráfica 2 se observan los tres intervalos pero desfasados; uno de mediados de mayo a finales de junio, otro de mediados de julio a mediados de septiembre y otro de principios de noviembre a mediados de enero.



Envés de hoja de ***Ageratina*** con nidos de oviposición.

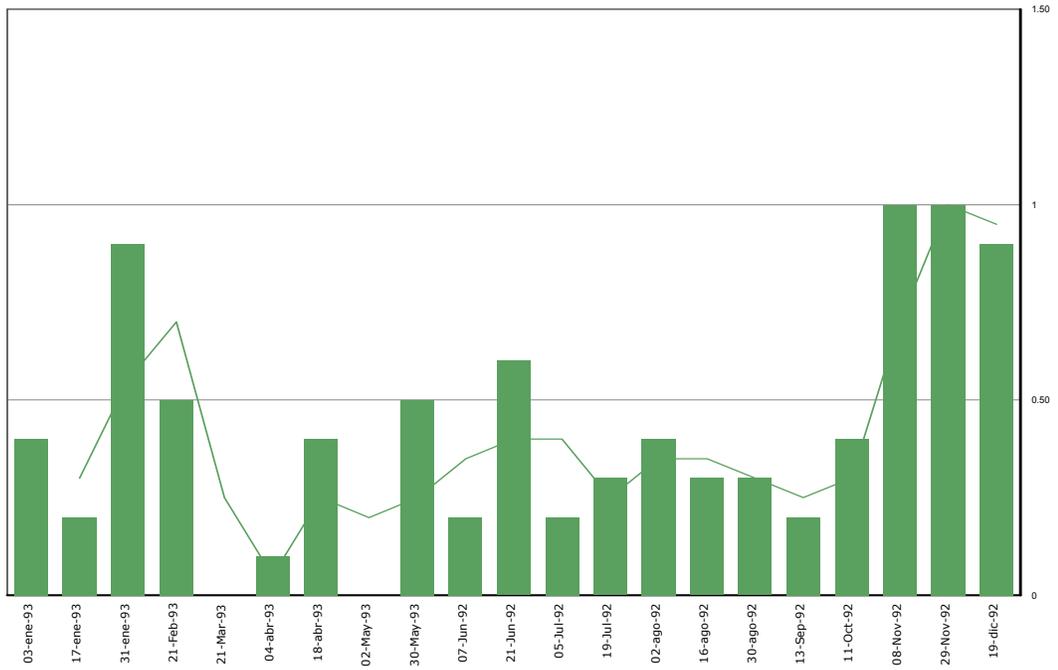
■
Num. adultos

Grafica 3
Periodo 89-90



■
Num. prom adultos

Grafica 4
Periodo 92-93



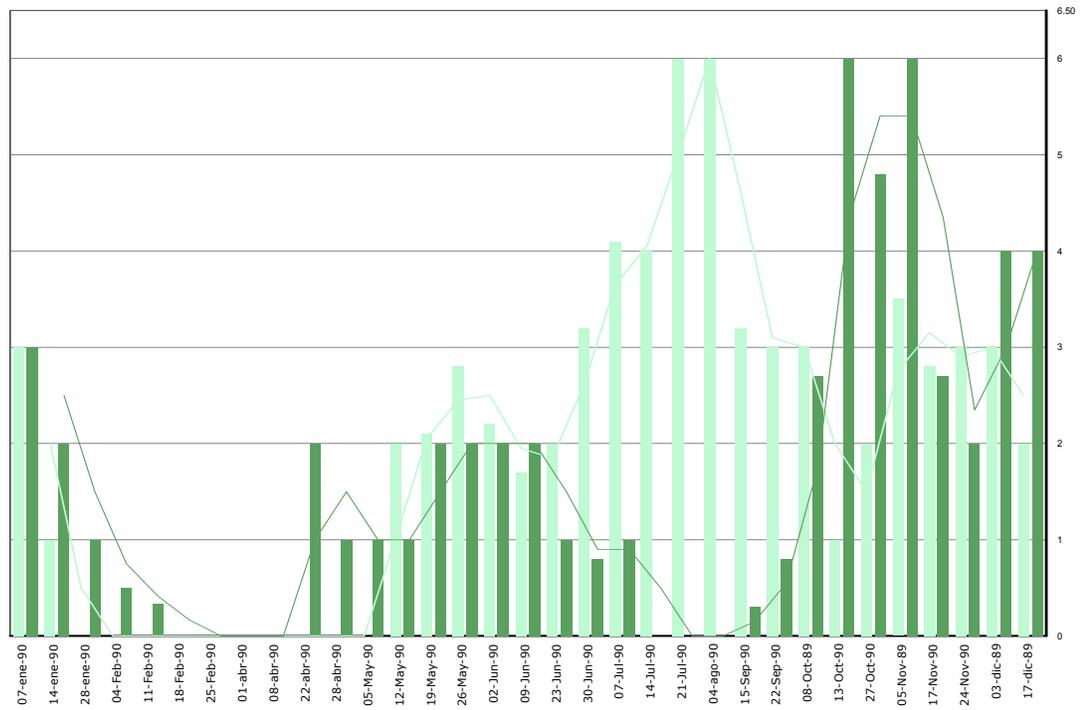
En las gráficas 3 y 4 se observan dos periodos donde el número de adultos llega a cero; uno que coincide con la época de floración que se presenta de finales de febrero a mediados de abril, estadio fenológico en el cual la planta defolia y otro periodo que en el ciclo 89-90 ocurre de mediados de julio a mediados de septiembre y en el ciclo 92-93 se desfasa de mediados de agosto a fines de octubre bajando considerablemente la densidad poblacional (casi llegando a cero), el cual coincide con el periodo vegetativo de ***Ageratina mairiana*** D. C.

En el período 89-90 (gráfica 3); hay tres períodos en que aumenta el número de individuos a lo largo de la sucesión anual estacional, siendo notorio que de mediados de febrero a mediados de abril no hay adultos de ***Empoasca sp.*** sobre ***Ageratina***. Como los adultos de ***Empoasca sp.***, son individuos alados, no son hospederos obligados de ***Ageratina mairiana*** D. C., por ello el número de individuos descende en este periodo, cabe mencionar que al revisar la flora secundaria al derredor de los especímenes elegidos en el estudio, se observan adultos de los insectos sobre esta vegetación.

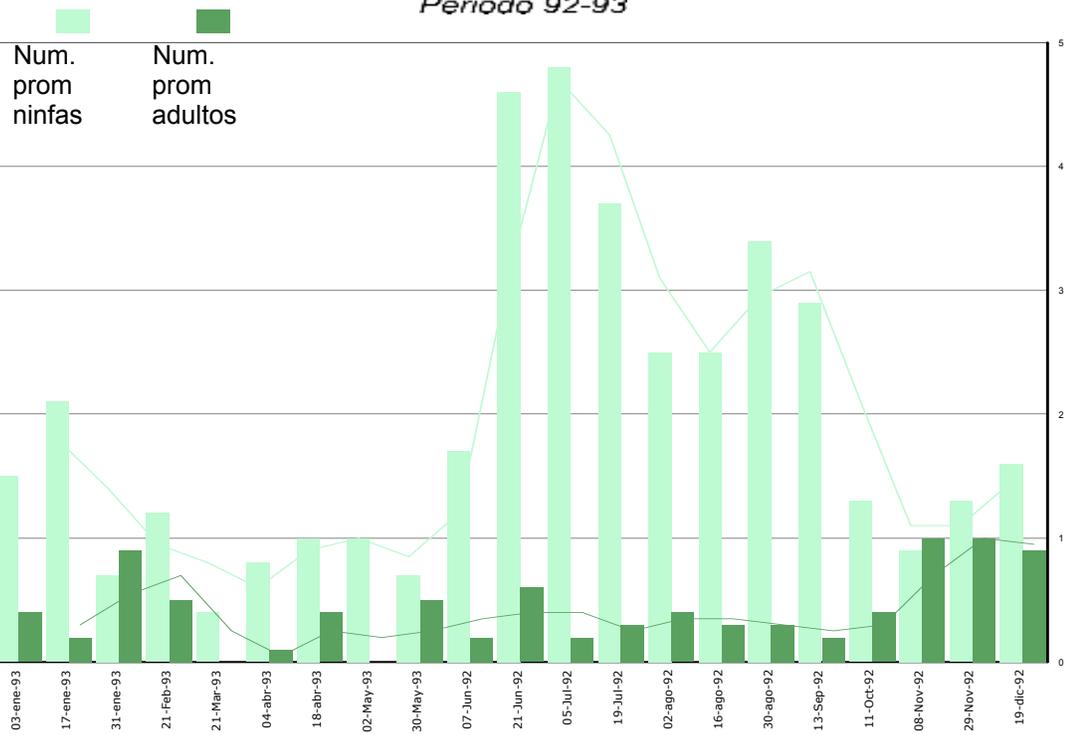
Estos datos se repiten en el periodo 92-93, véanse gráficas 3 y 4. De forma general podemos decir que el ciclo de vida es reproducible y se mantiene el perfil de las curvas de los censos en los dos ciclos de colecta.

■ Num. ninfas
■ Num. adultos

Grafica 5
Periodo 89-90



Grafica 6
Periodo 92-93



Comparando la fluctuación de la densidad poblacional de ninfas con la de adultos a lo largo del año (gráficas 5 y 6), los intervalos con número máximo de adultos están desfasados con respecto a los de las ninfas, los adultos aparecen primero, en esta etapa las hembras ovipositan en el envés de las hojas de **Ageratina mairiana** D. C. junto a la nervadura central y hacia los peciolos que es donde forman los nidos.

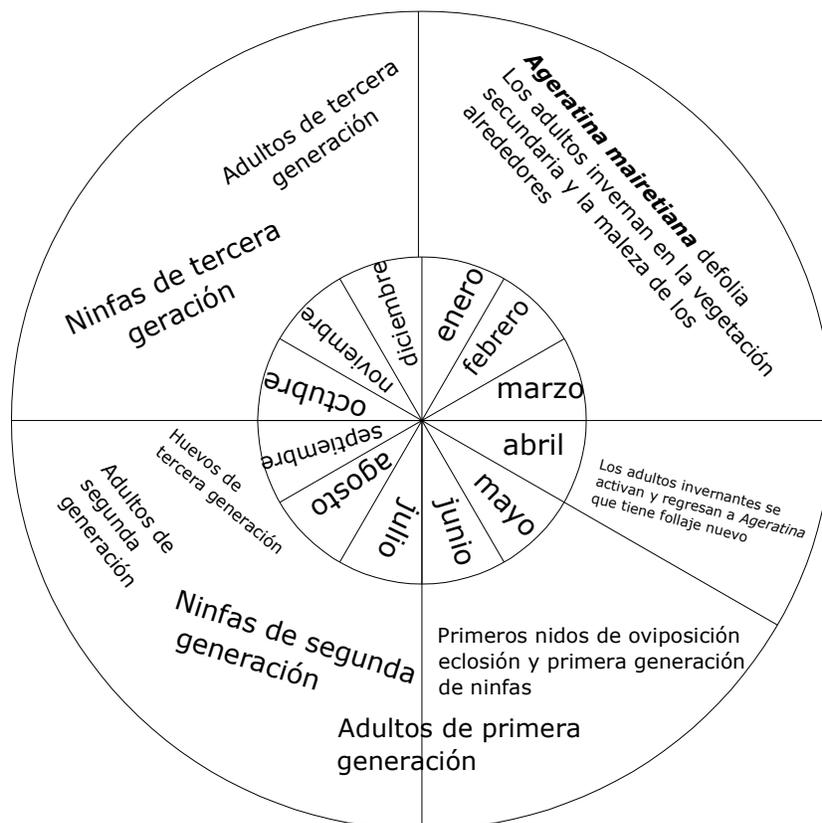
Cuando los huevos eclosionan las ninfas nacen para habitar en el envés de las hojas, la primera camada de ninfas, sale en los meses de mayo a junio en el período 89-90 y de finales de febrero a mediados de abril en el periodo 92-93, la segunda camada de ninfas aparece de finales de junio a mediados de septiembre en el periodo 89-90 y de mediados de julio a mediados de septiembre en el periodo 92-93, la tercera camada de ninfas sale en los últimos días de octubre hasta los primeros días de enero en el ciclo 89-90, para el ciclo 92-93 esto sucede de mediados de octubre a fines de enero.

Los análisis de la densidad de los adultos de **Empoasca sp.**, indican tres picos máximos en cada uno de los periodos en los que se efectuaron los censos. De mediados de abril a mediados de julio surge una generación que podemos llamar fundadora para el periodo 89-90 que es la que pone los huevecillos después de la época de defoliación de **Ageratina mairiana** D. C. y de mediados de marzo a mediados de junio en el periodo 92-93. Después hay un intervalo comprendido entre mediados de julio a mediados de septiembre en que la población de adultos es cero en el periodo 89-90 y de finales de junio a finales de agosto en el periodo 92-93, la siguiente generación de adultos inicia a mediados de septiembre y sobrevive hasta finales de noviembre.

En los dos periodos de muestreo (89-90 y 92-93), esta segunda generación de adultos proviene de las ninfas que han eclosionado en los primeros meses después de la defoliación de **Ageratina mairेतiana** D. C., el tercer grupo de mayor densidad de adultos se genera de principios de diciembre a mediados de febrero, que son los que invernarán en la vegetación secundaria durante la defoliación de **Ageratina mairेतiana** D. C. y darán pie a la siguiente generación de **Empoasca sp.** sobre la planta.

Con estos datos podemos esbozar el siguiente esquema que explica el ciclo biológico anual de **Empoasca sp.**

Ciclo de Vida de *Empoasca sp*

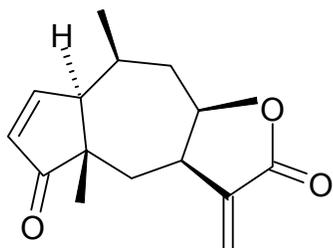


Extracción de Estándares de Lactonas Sesquiterpénicas.

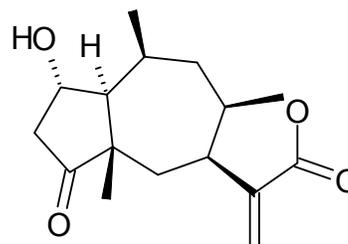
Del material vegetal colectado el 11 de octubre de 1992 se obtuvieron los estándares de las **Pseudoguayanolidas**; 8-10-bis-epi-Aromaticina, Burrodina, y Confertina, así como las **Guayanolidas**; 8-epi-Inuviscolida, y Mairetiolida.

Las estructuras de los estándares fueron confirmadas por sus espectros de infrarrojo (IR), y resonancia magnética de protones (NMR`H), las estructuras se muestran a continuación:

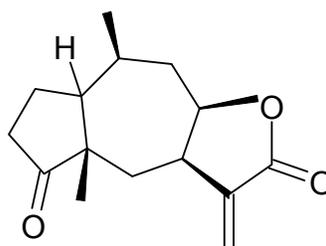
Pseudoguayanolidas



8-10-bis-epi-Aromaticina

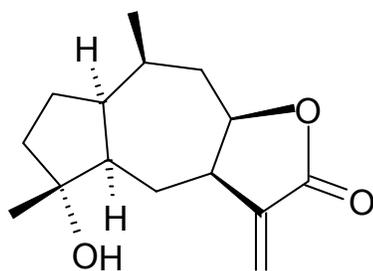


Burrodina

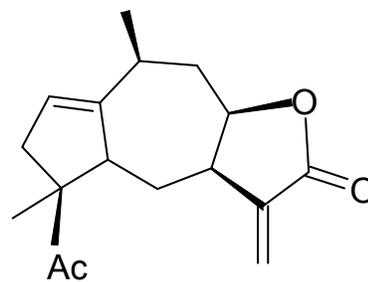


Confertina

Guayanolidas

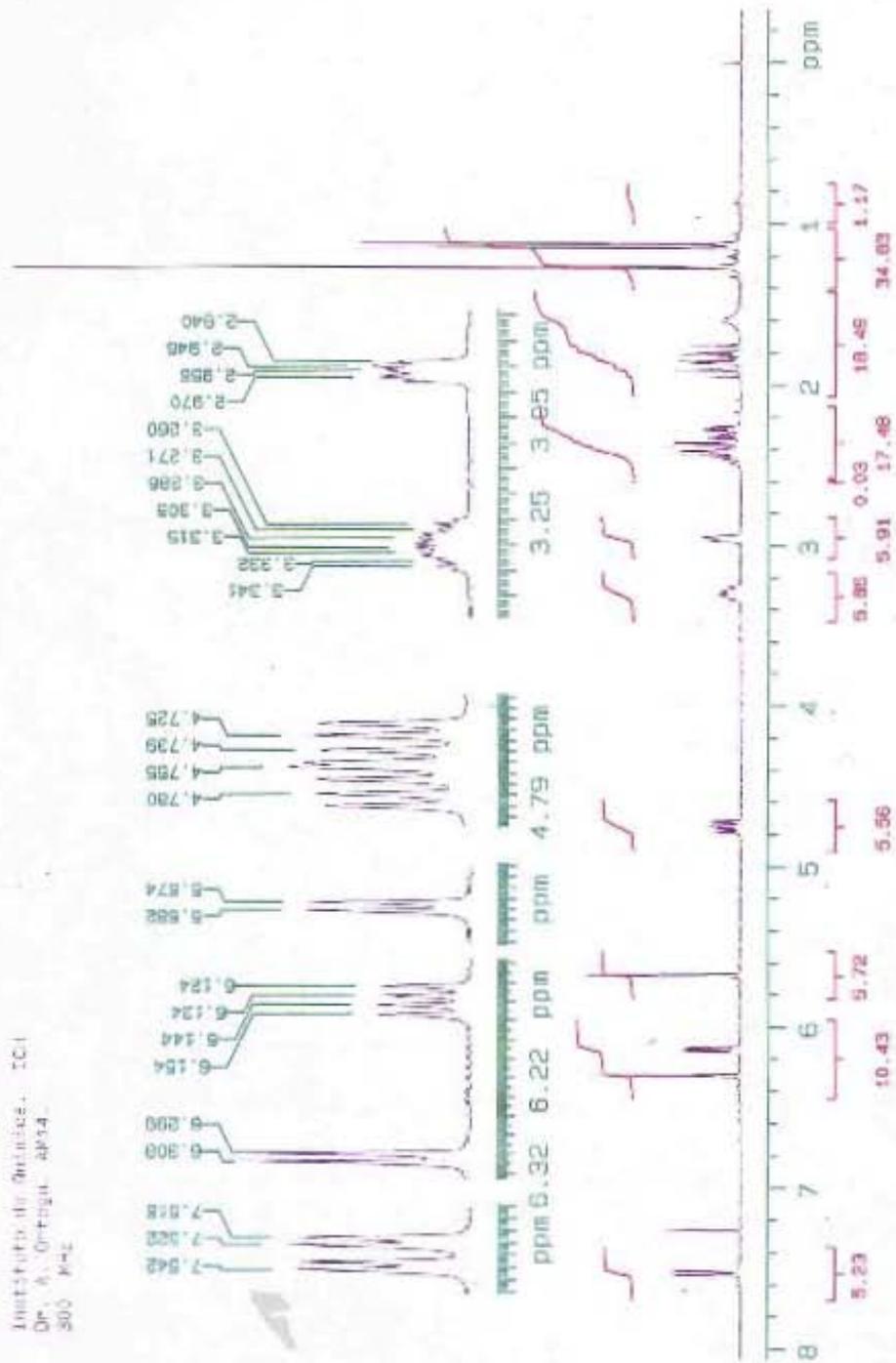


8-epi-Inuviscolida

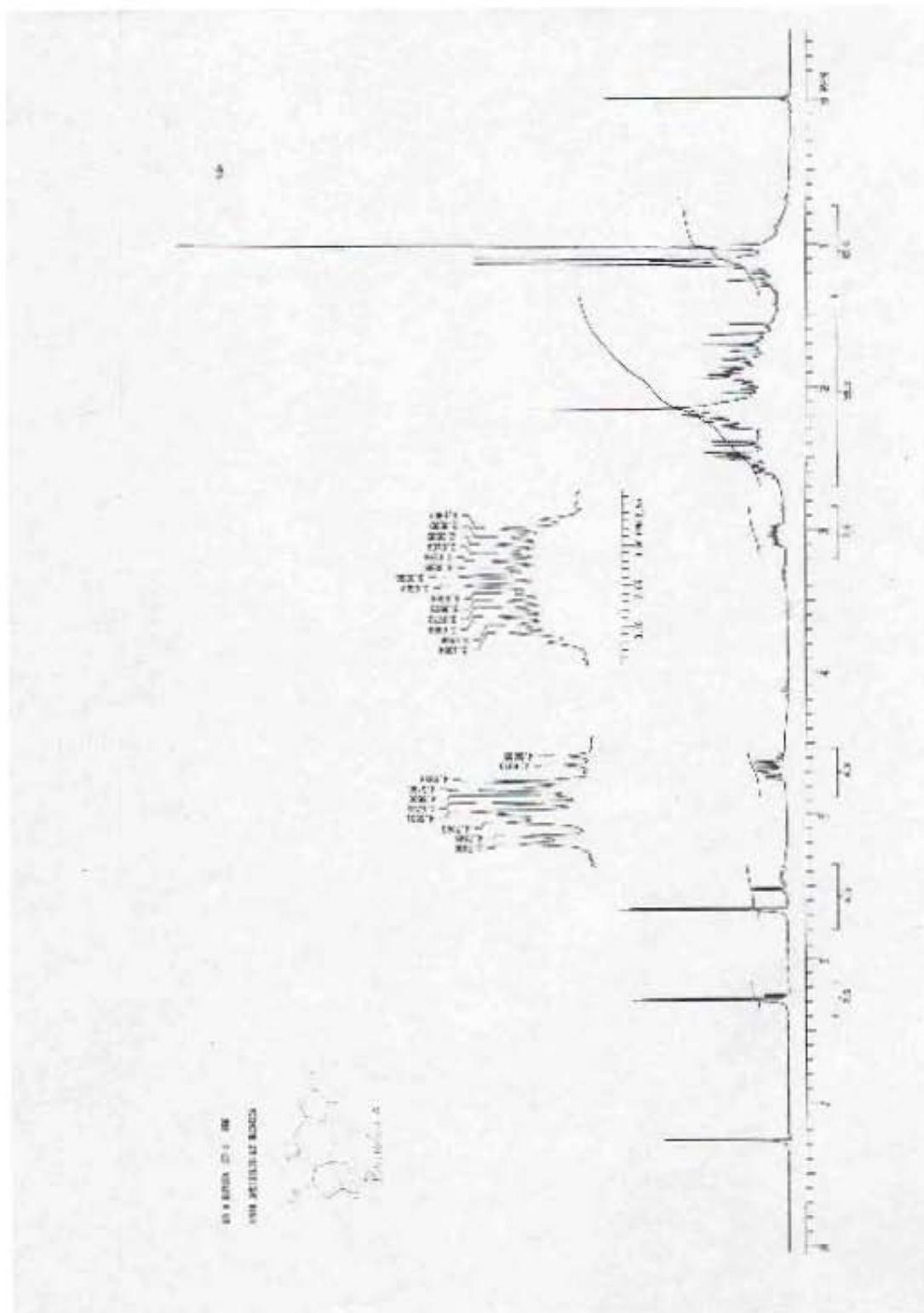


Mairetiolida

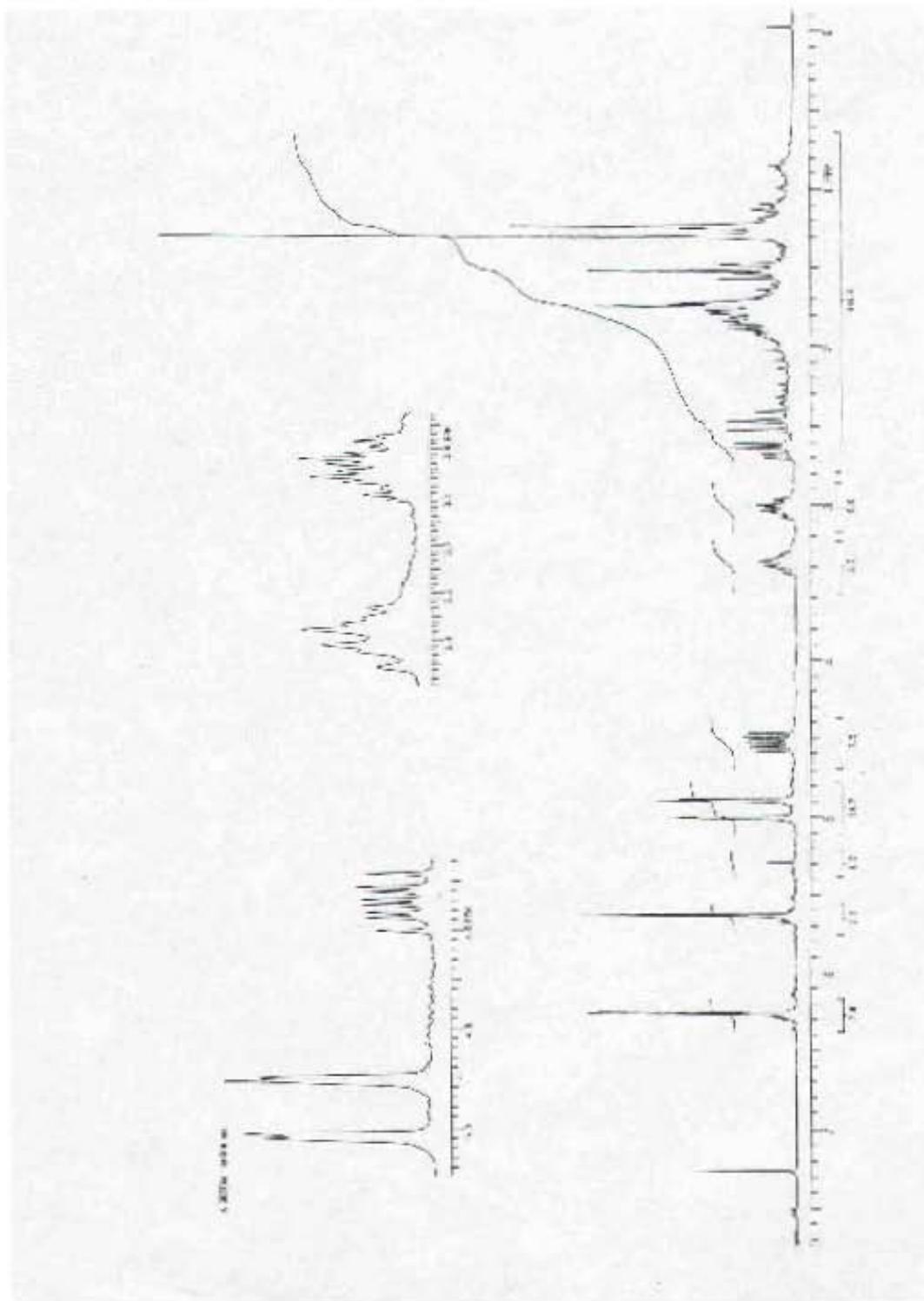
Los Espectros obtenidos se muestran en seguida.



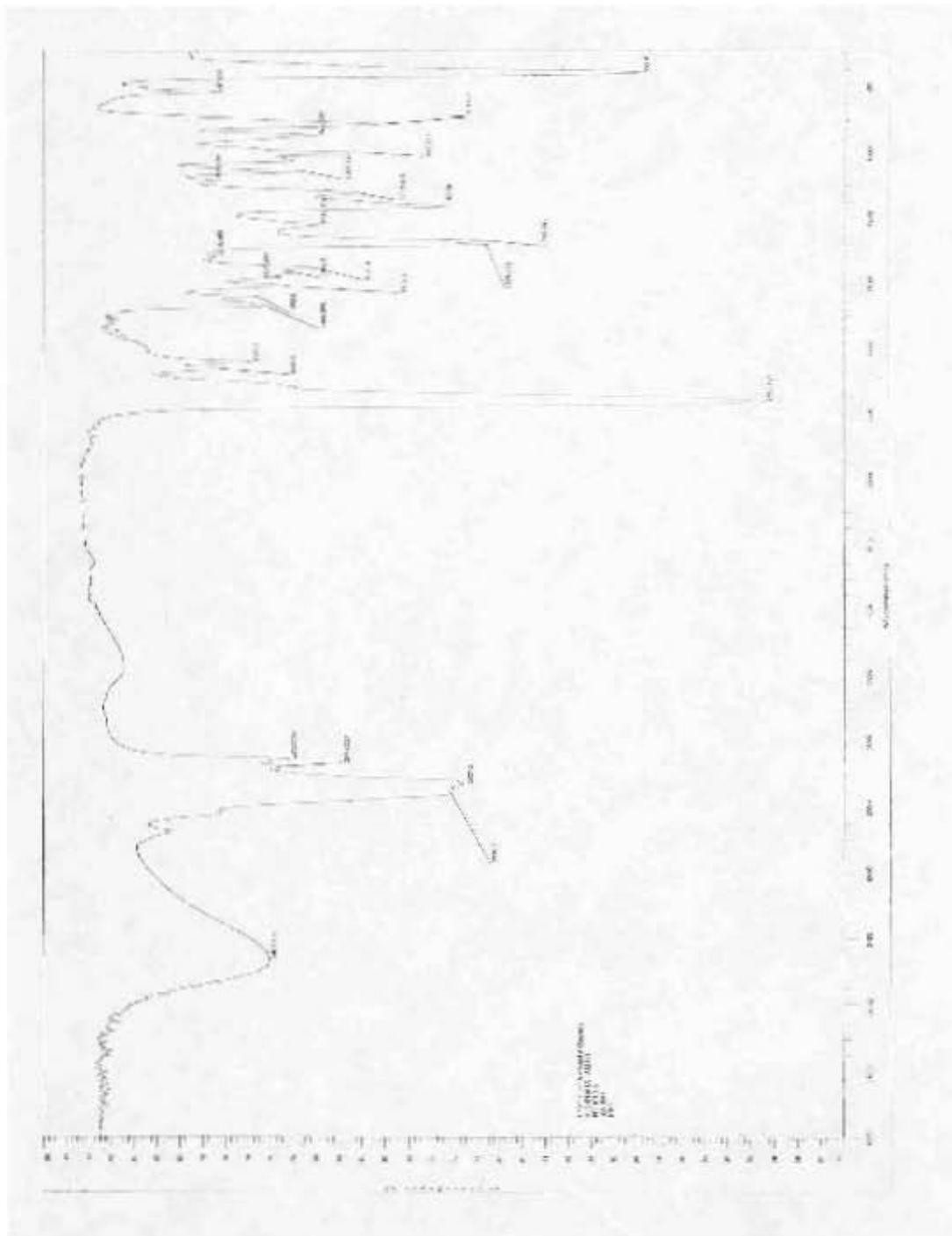
Espectro de RMN de Protones de la 8-10-bis-epi-Aromaticina



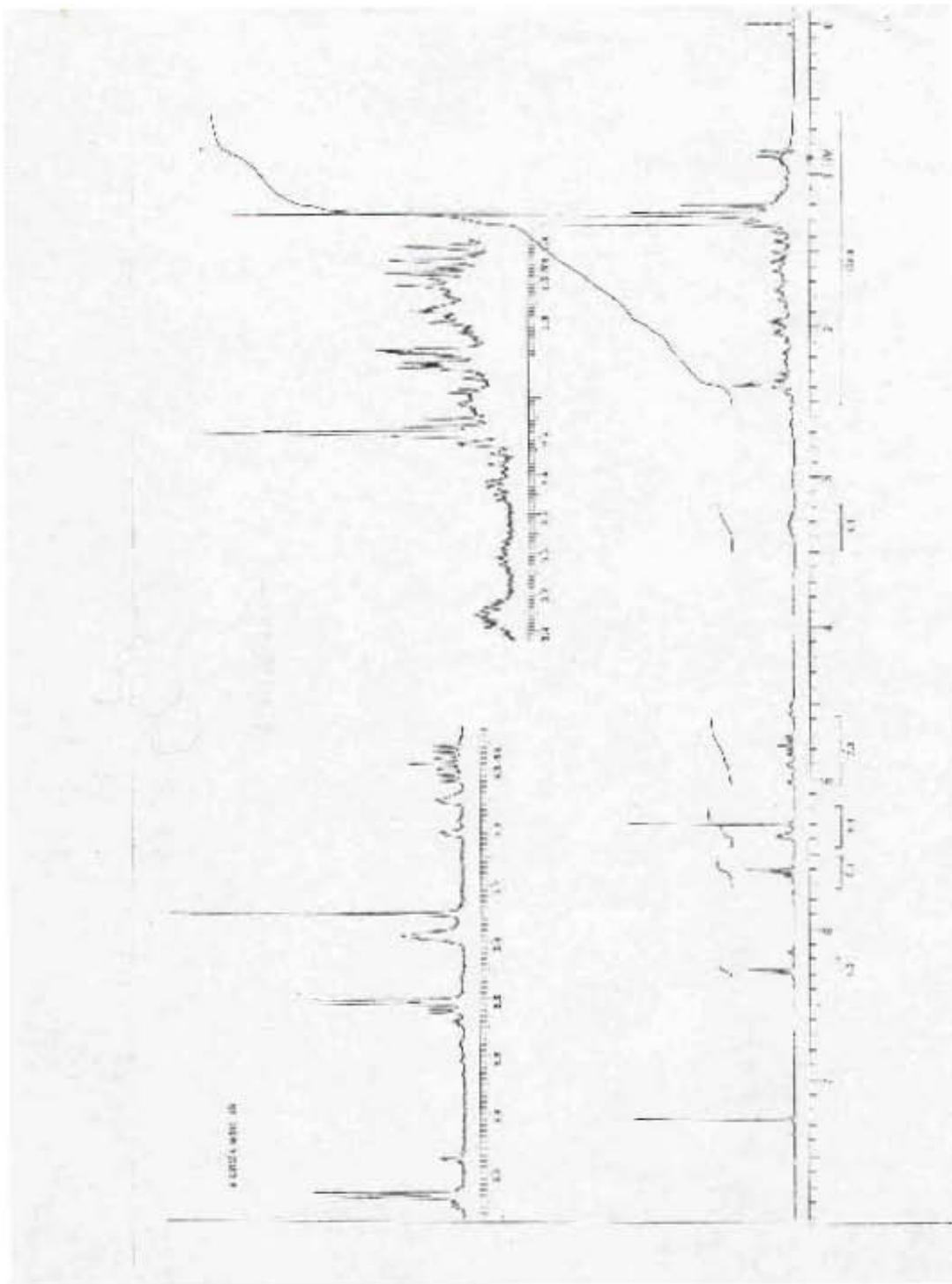
Espectro de RMN de Protones de la Burrodina



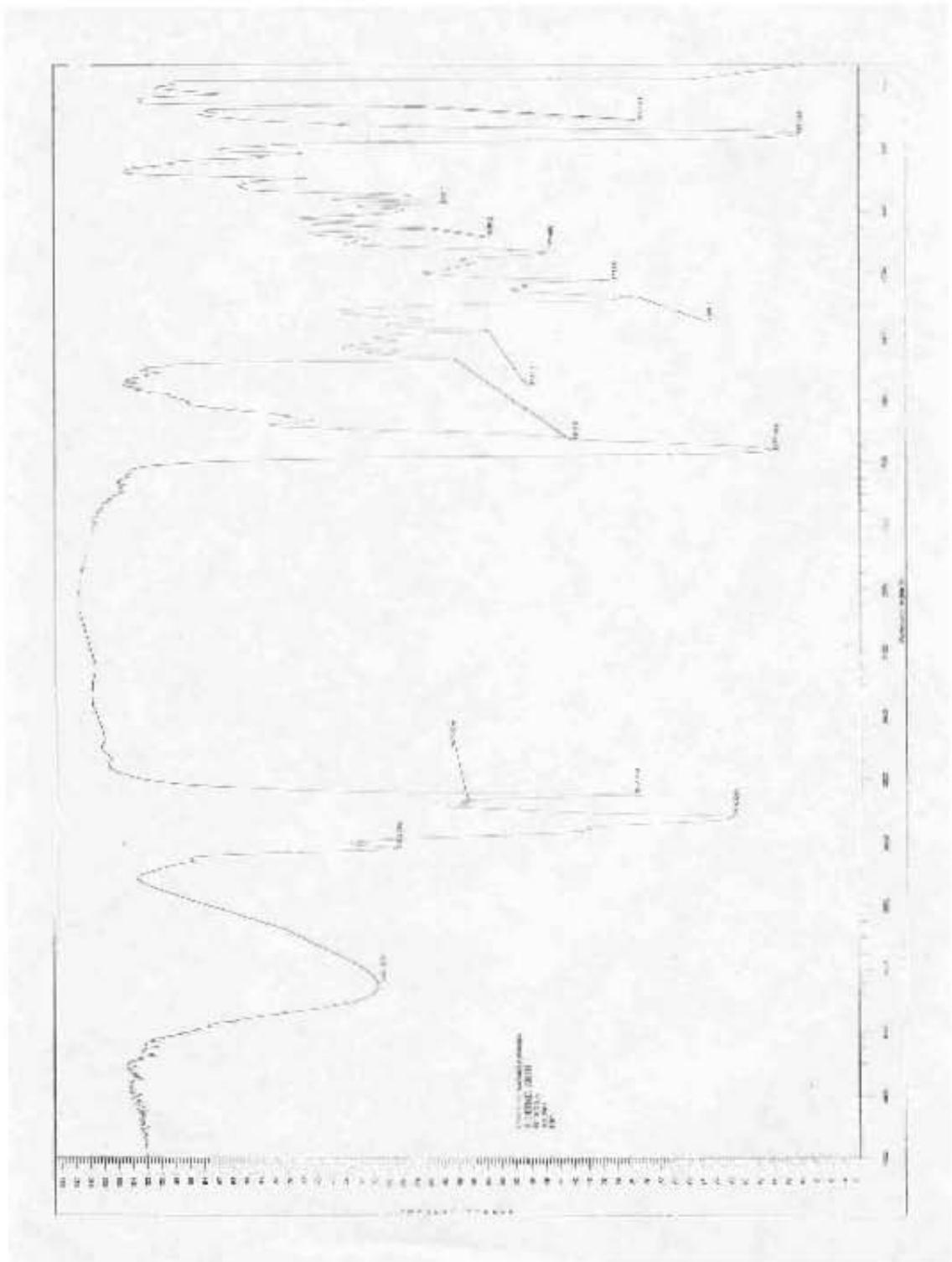
Espectro de RMN de Protones de la 8-epi-Inuvicolida



Espectro de Infrarrojos de la 8-epi-Inuvicolida



Espectro de RMN de Protones de la Mairiitolida



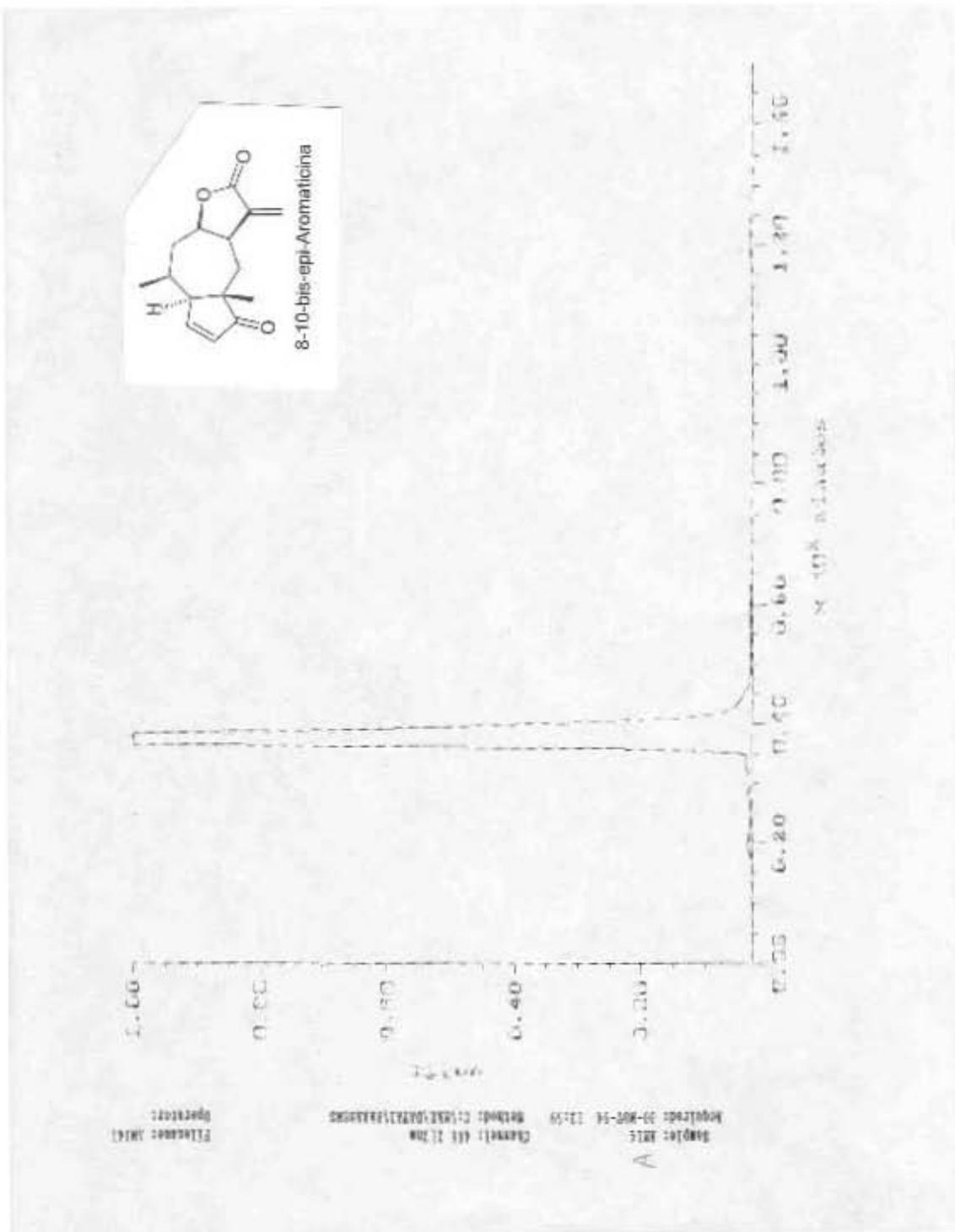
Espectro de Infrarrojos de la Mairioliolida

Para el análisis de los metabolitos secundarios seleccionados de la planta (lactonas sesquiterpénicas), se utilizó la cromatografía de HPLC; en los cromatogramas se determinaron la presencia y concentración relativa de las **Pseudoguayanolidas**; 8-10-bis-epi-Aromaticina, Burrodina, y Confertina, y **Guayanolidas**; 8-epi-Inuviscolida, y Mairetiolida, en ***Ageratina mairetiana*** D. C., a lo largo de la sucesión estacional anual.

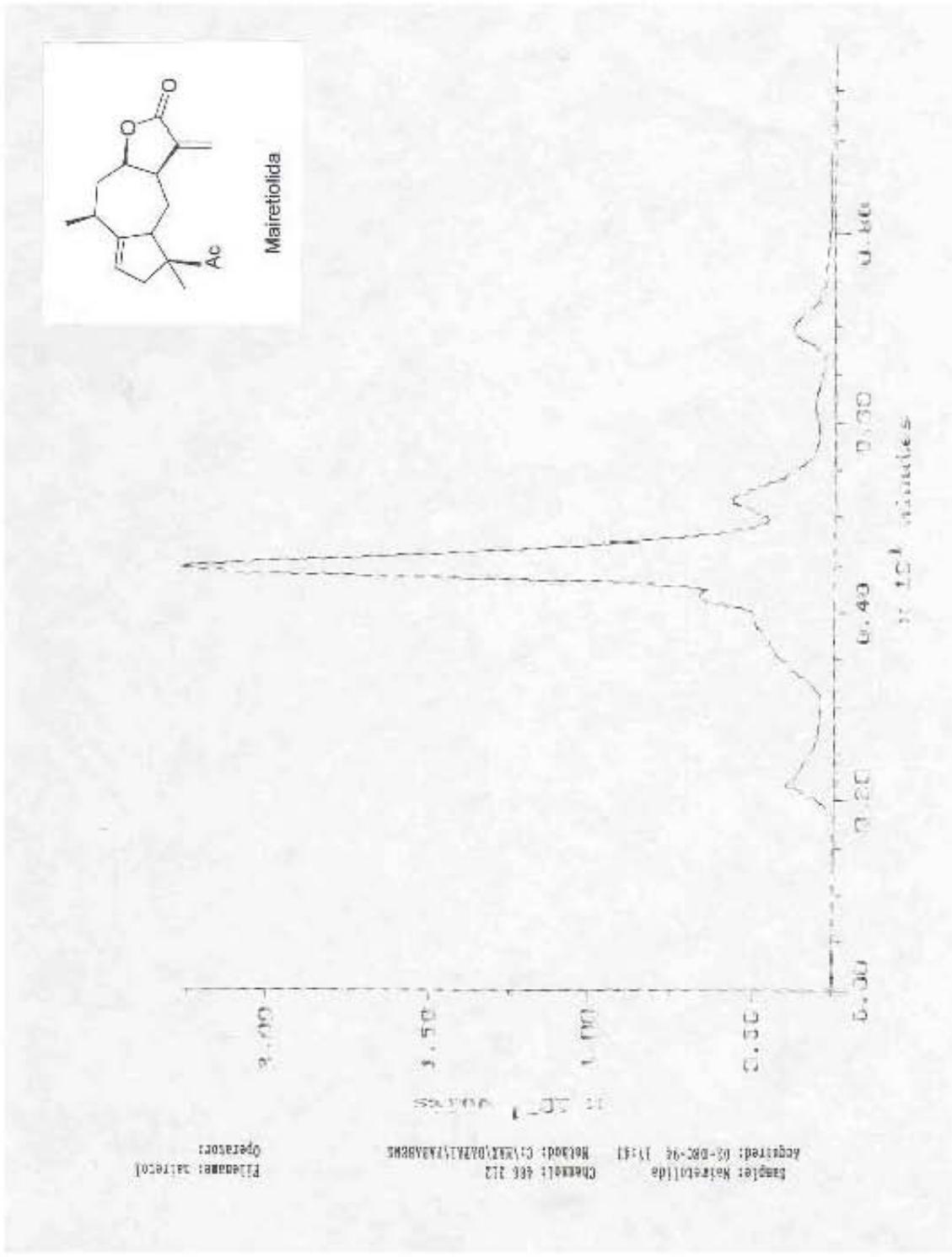
Para ello, primero se determinaron los tiempos de retención de los estándares aislados que son los siguientes:

Nombre del Compuesto	Tiempo de retención (min)
8-10-bis-epi-Aromaticina	3.90
Mairetiolida	4.30
8-epi-Inuviscolida	4.55
Burrodina	5.00
Confertina	5.25

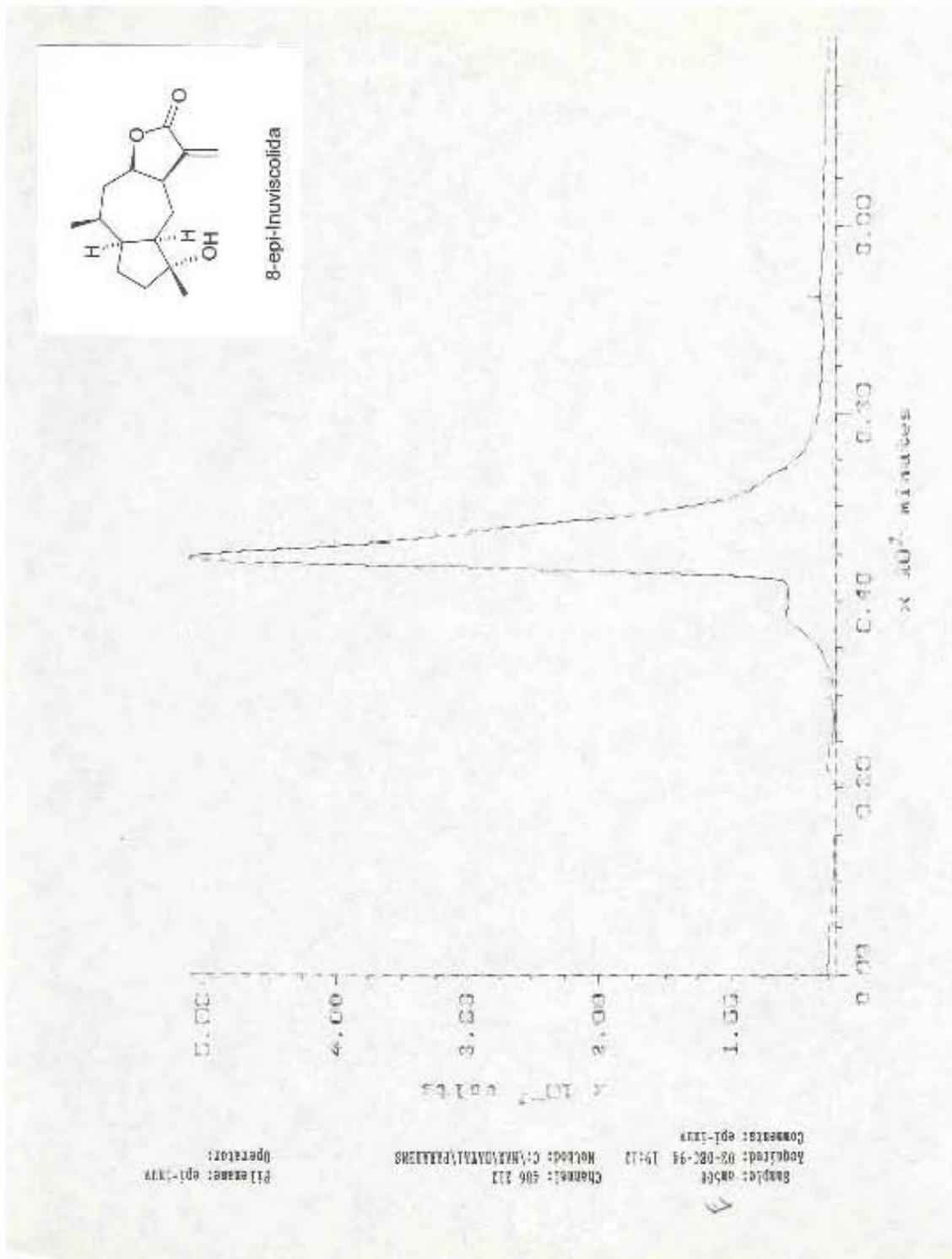
Los tiempos de retención fueron utilizados para identificar en los cromatogramas los picos máximos de cada una de las lactonas sesquiterpénicas y medir cuantitativamente su concentración en las muestras recolectadas durante el año.



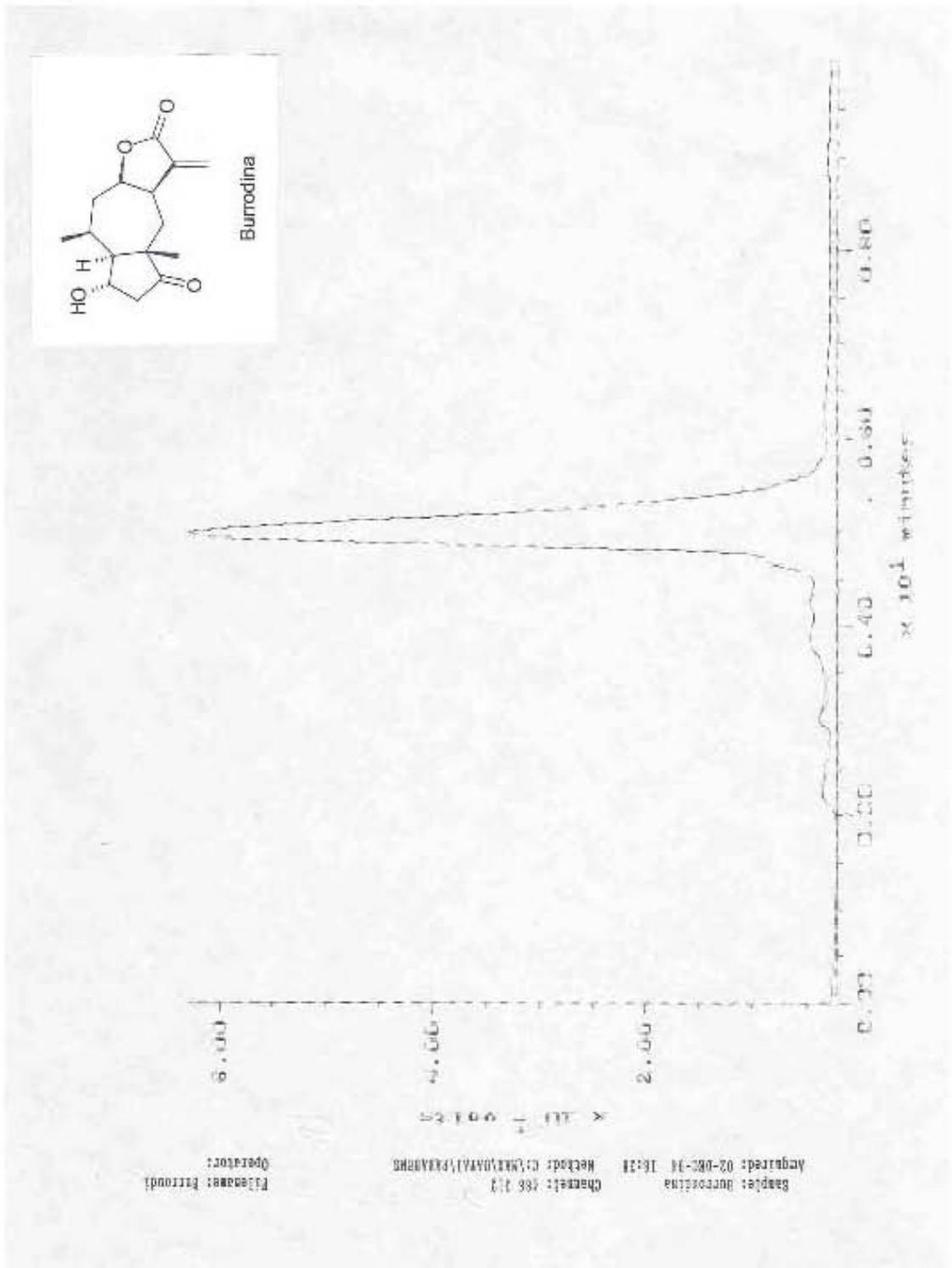
Cromatograma de la 8-10-bis-epi-Aromaticina



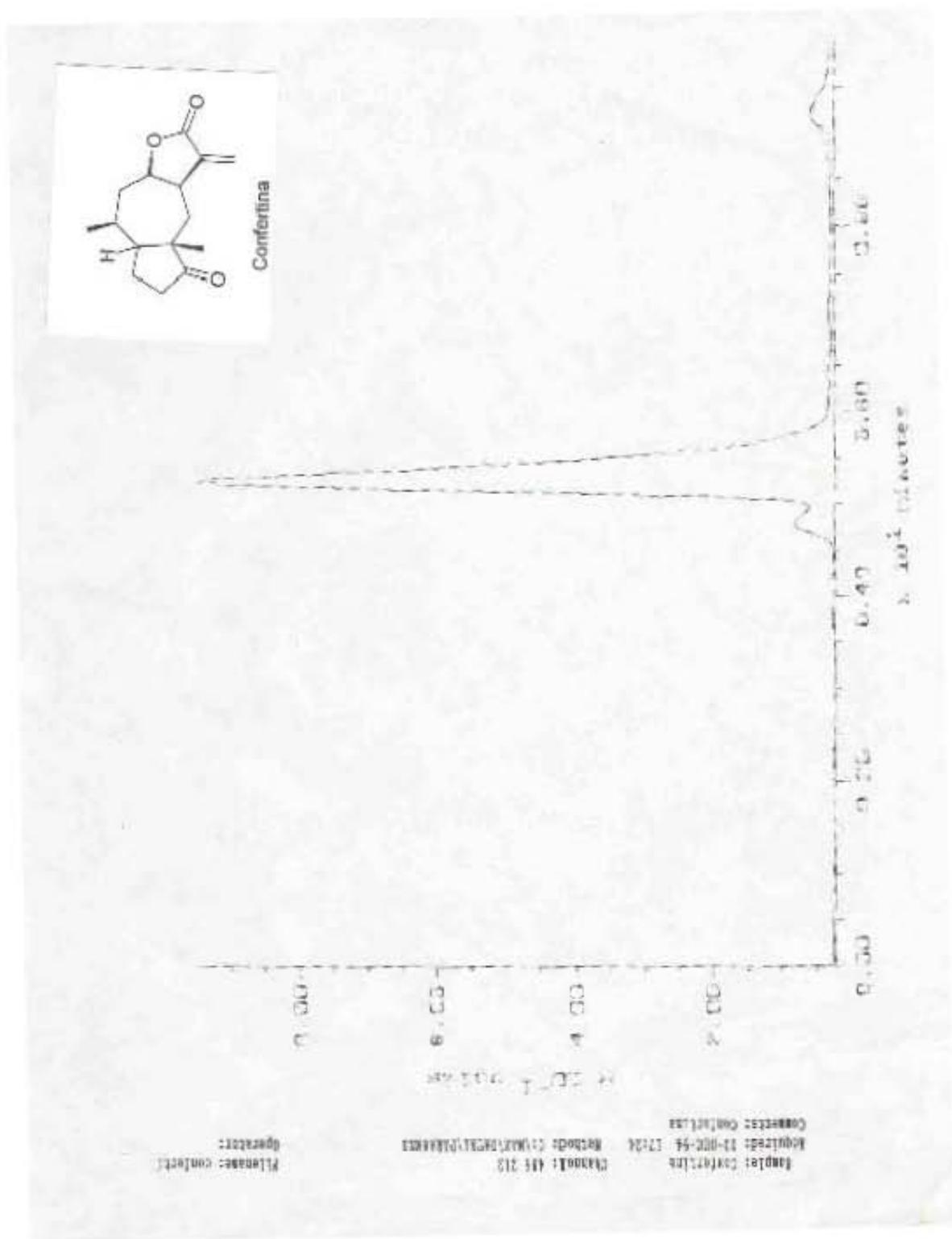
Cromatograma de la Mairetiolida



Cromatograma de la 8-Epi-Inuviscolida

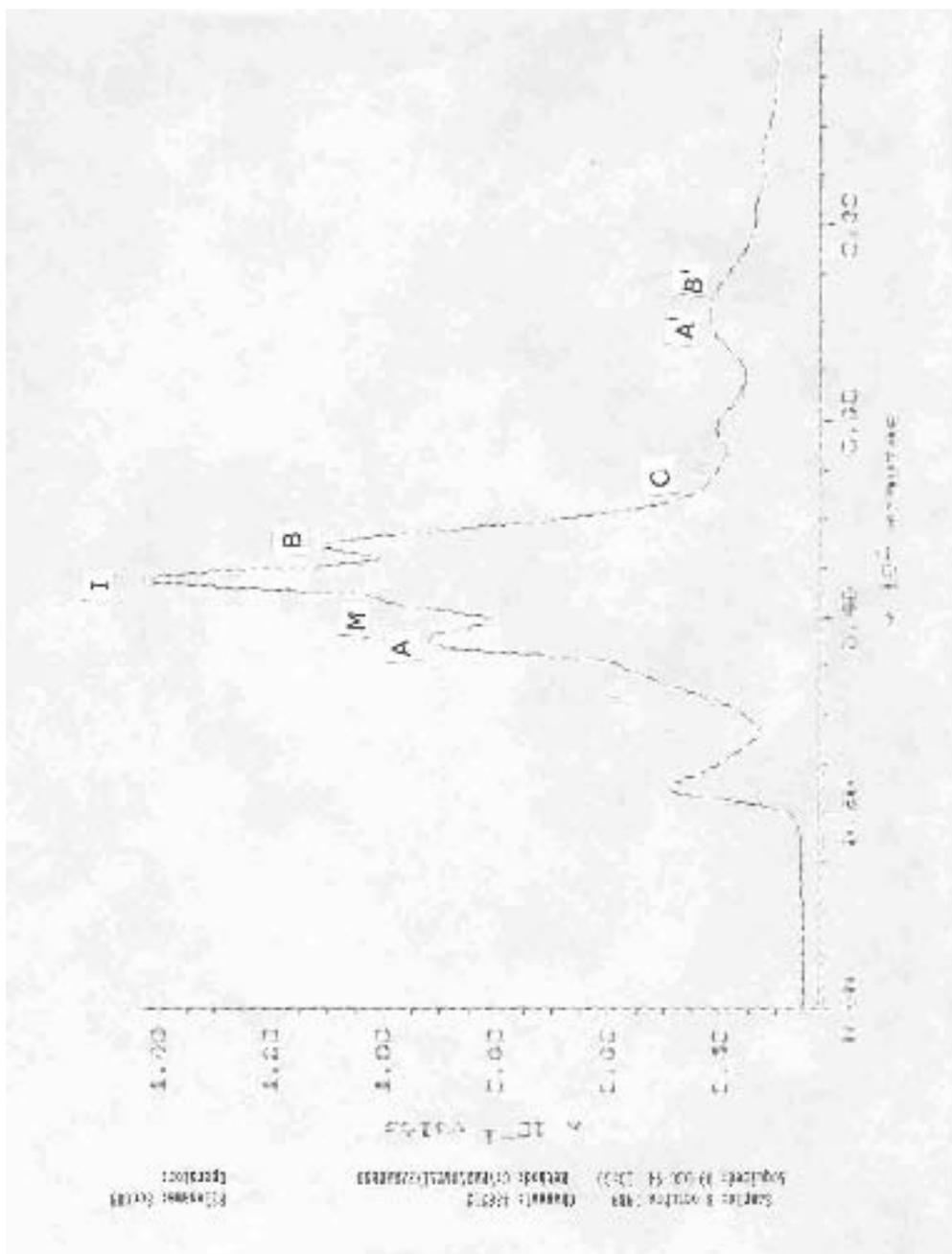


Cromatograma de la Burrodina

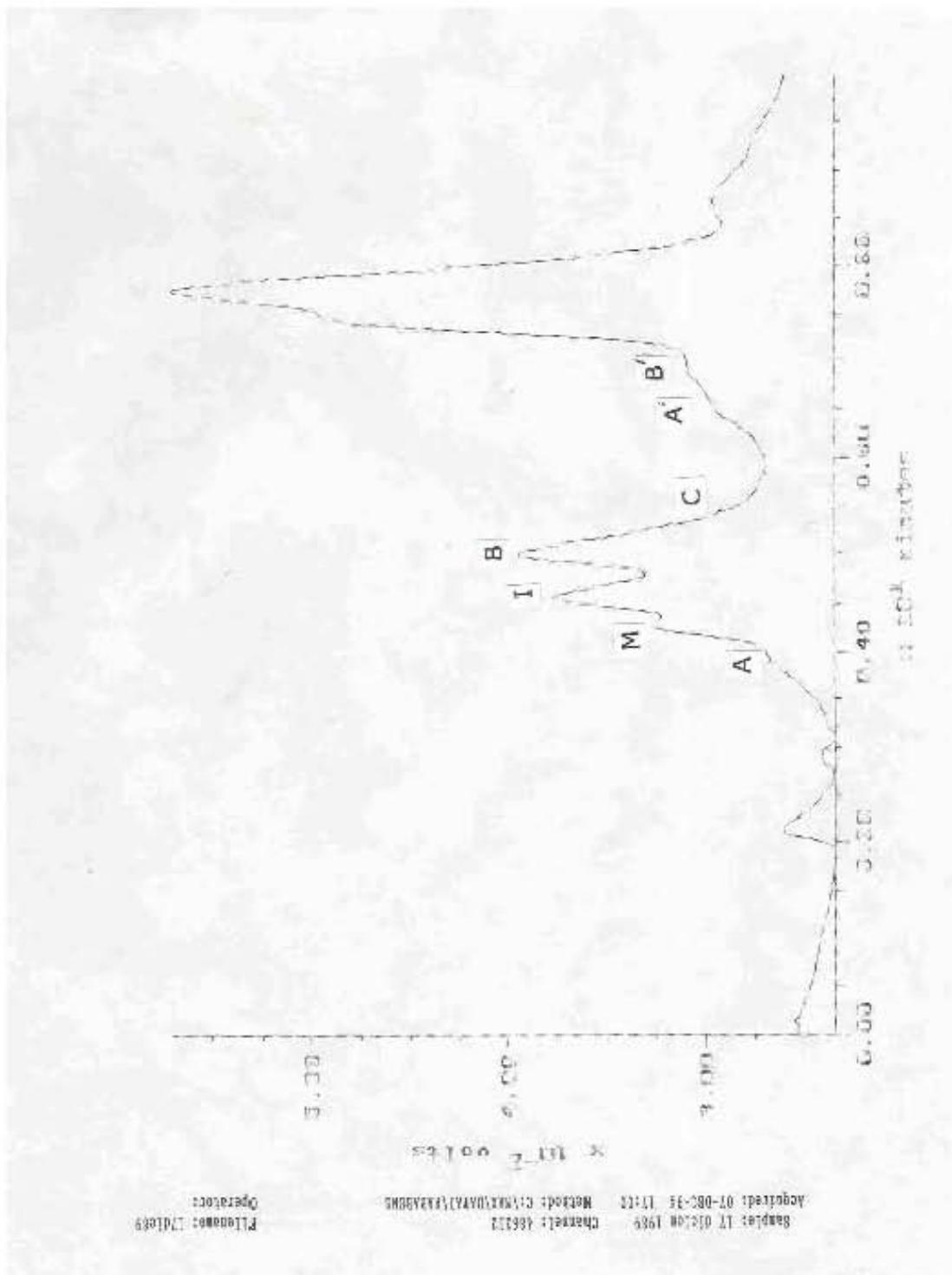


Cromatograma de la Confertina.

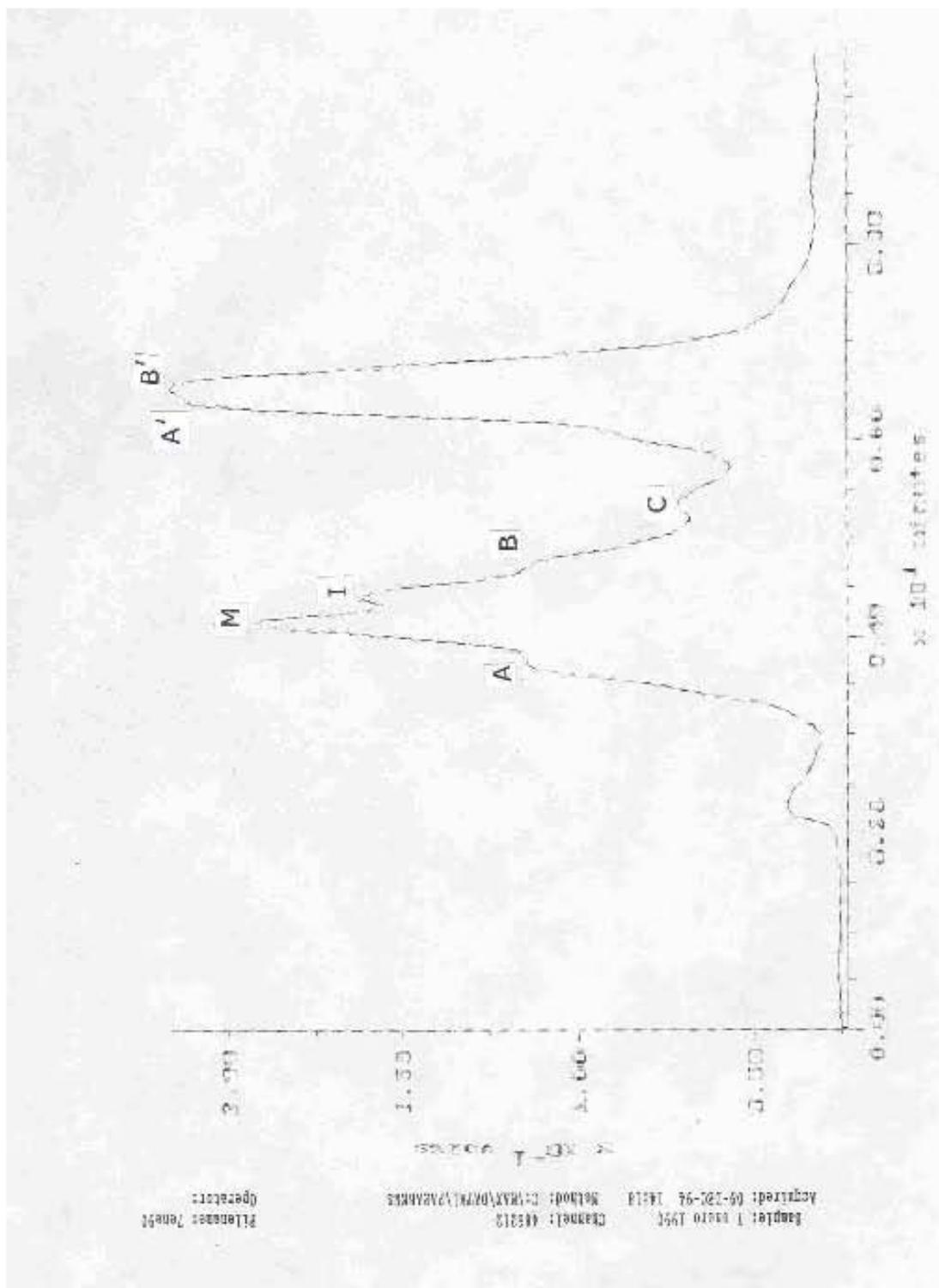
Algunos de los cromatogramas obtenidos de los dos periodos de muestreo se presenta a continuación, las abreviaturas son 8-10-bis-epi-Aromaticina (A), Mairetiolida (M), 8-epi-Inuviscolida (I), Burrodina (B), Confertina (C), Diterpeno A (A`) y Diterpeno B (B`):



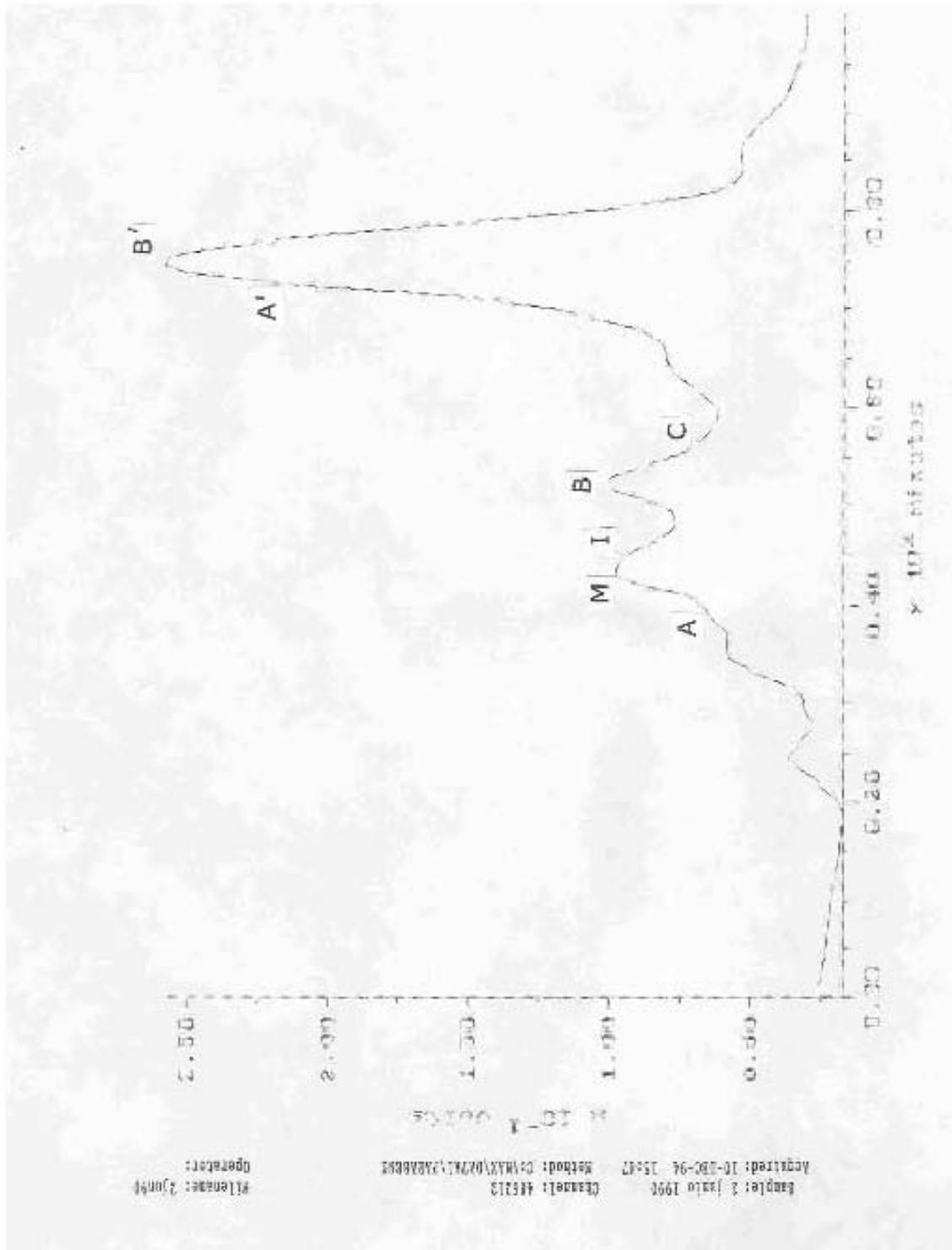
Cromatograma de la muestra del 8 de octubre de 1989.



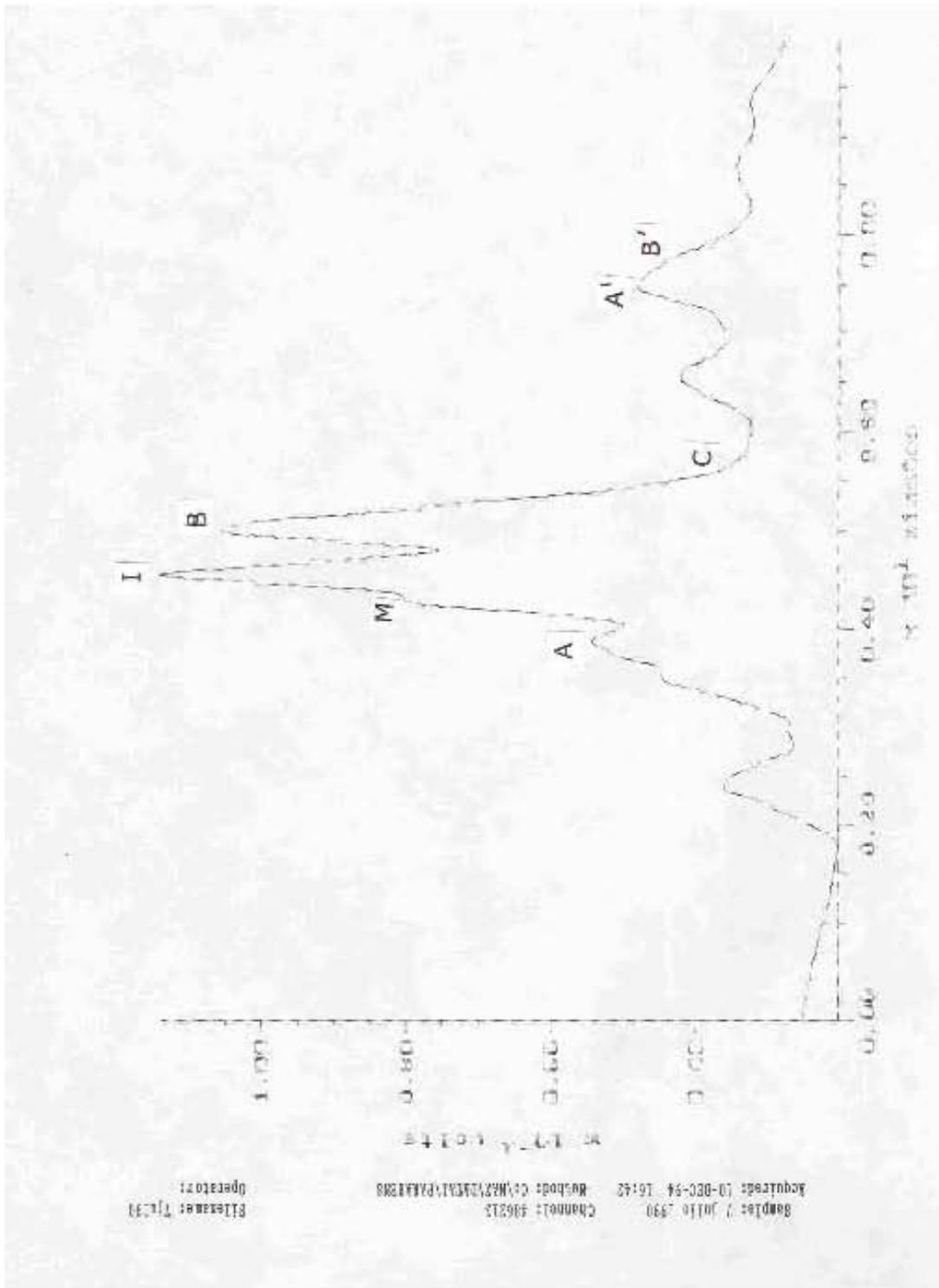
Cromatograma de la muestra de hojas colectada el 17 de diciembre de 1989.



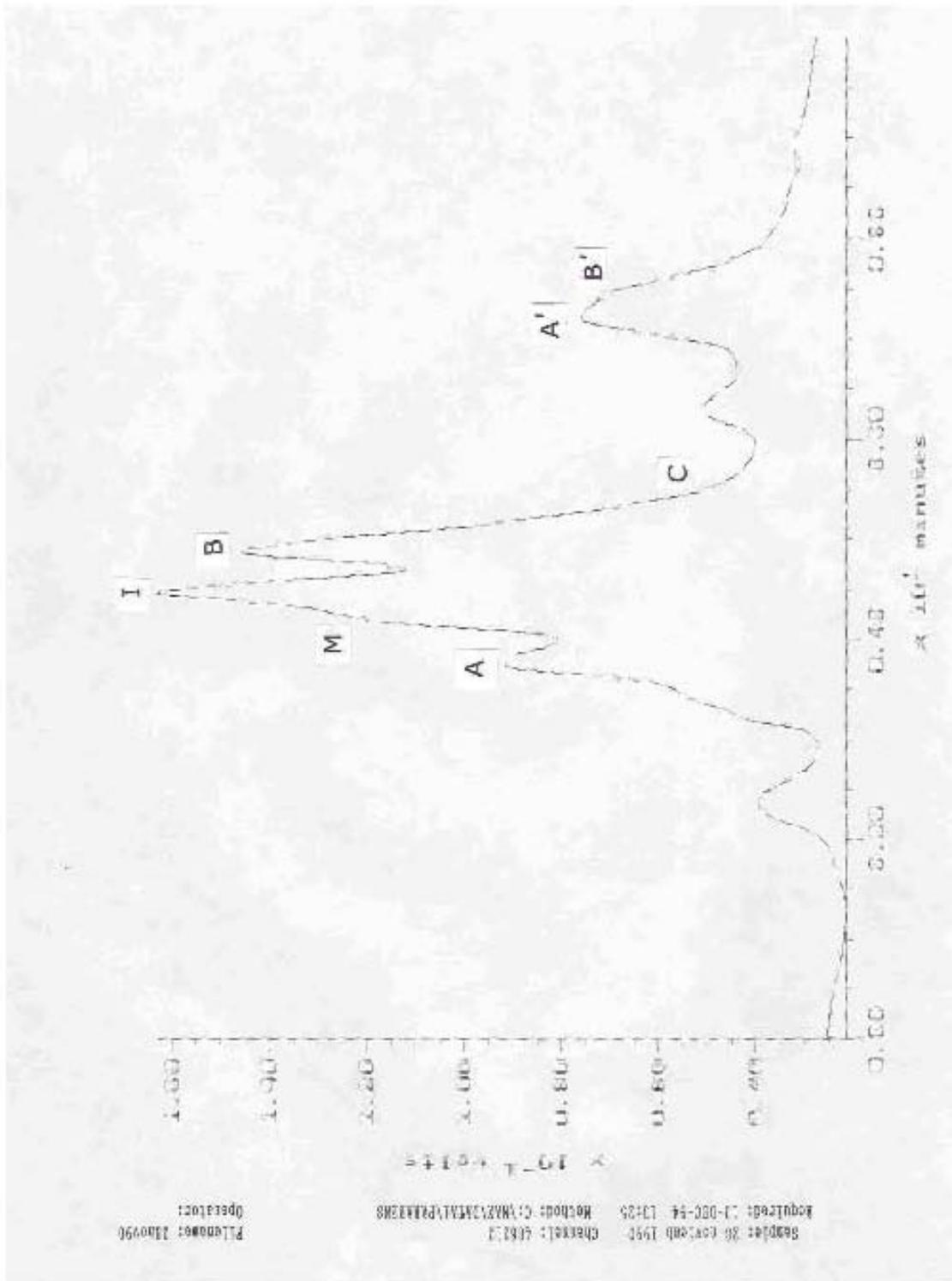
Cromatograma de la muestra del 7 de enero de 1990.



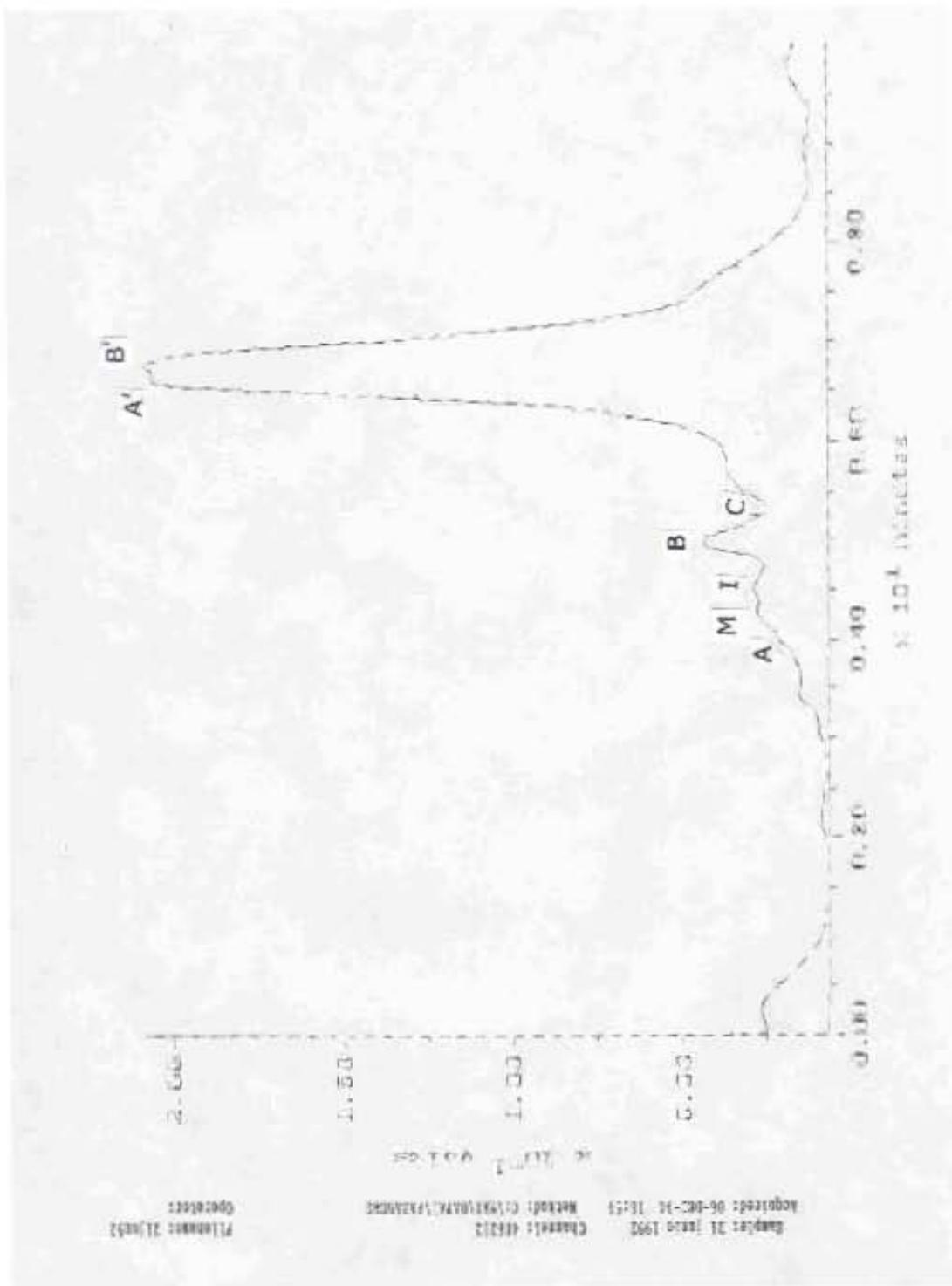
Cromatograma correspondiente a la muestra del 2 de junio de 1990.



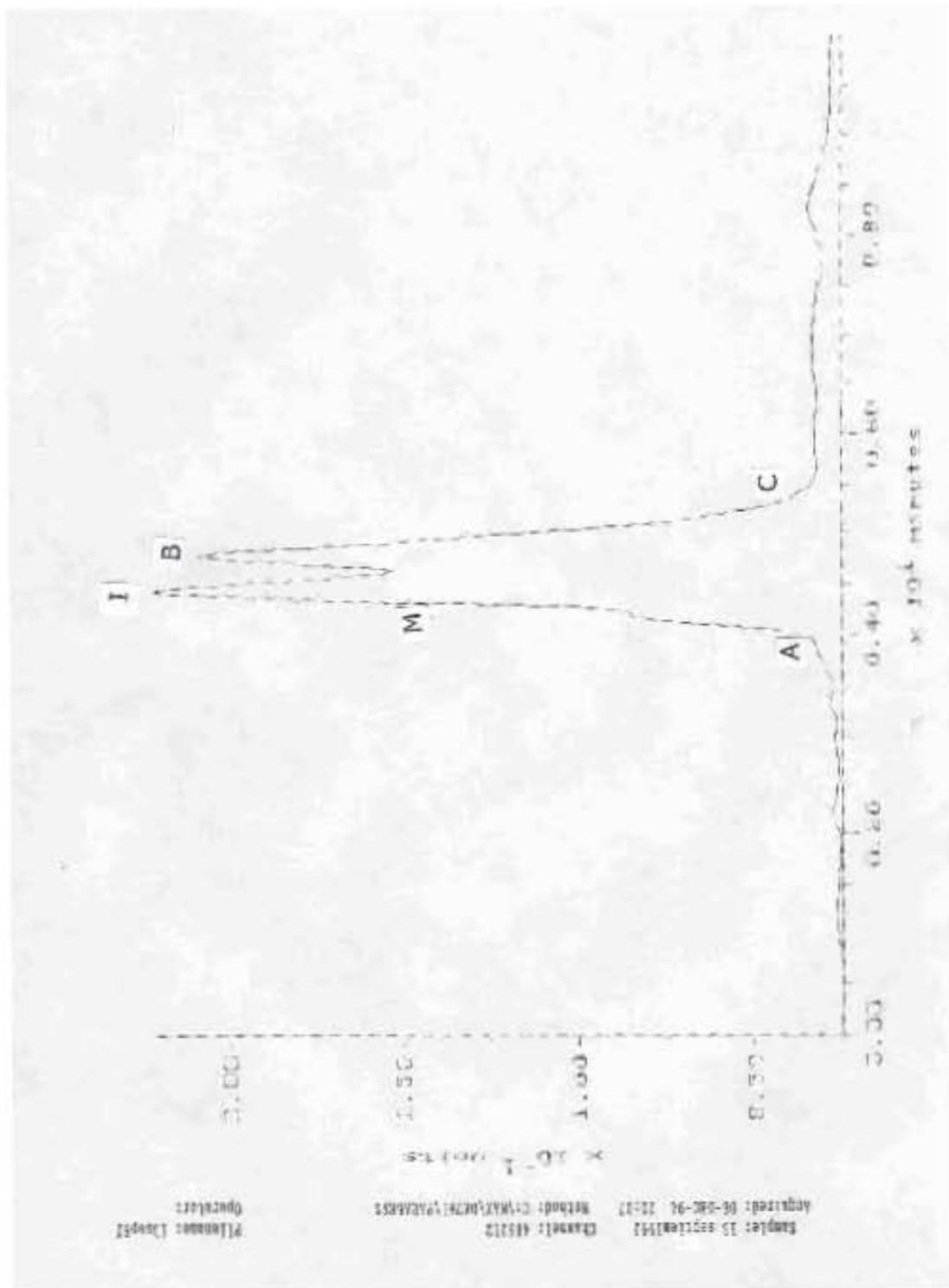
Cromatograma de la muestra del 7 de julio de 1990.



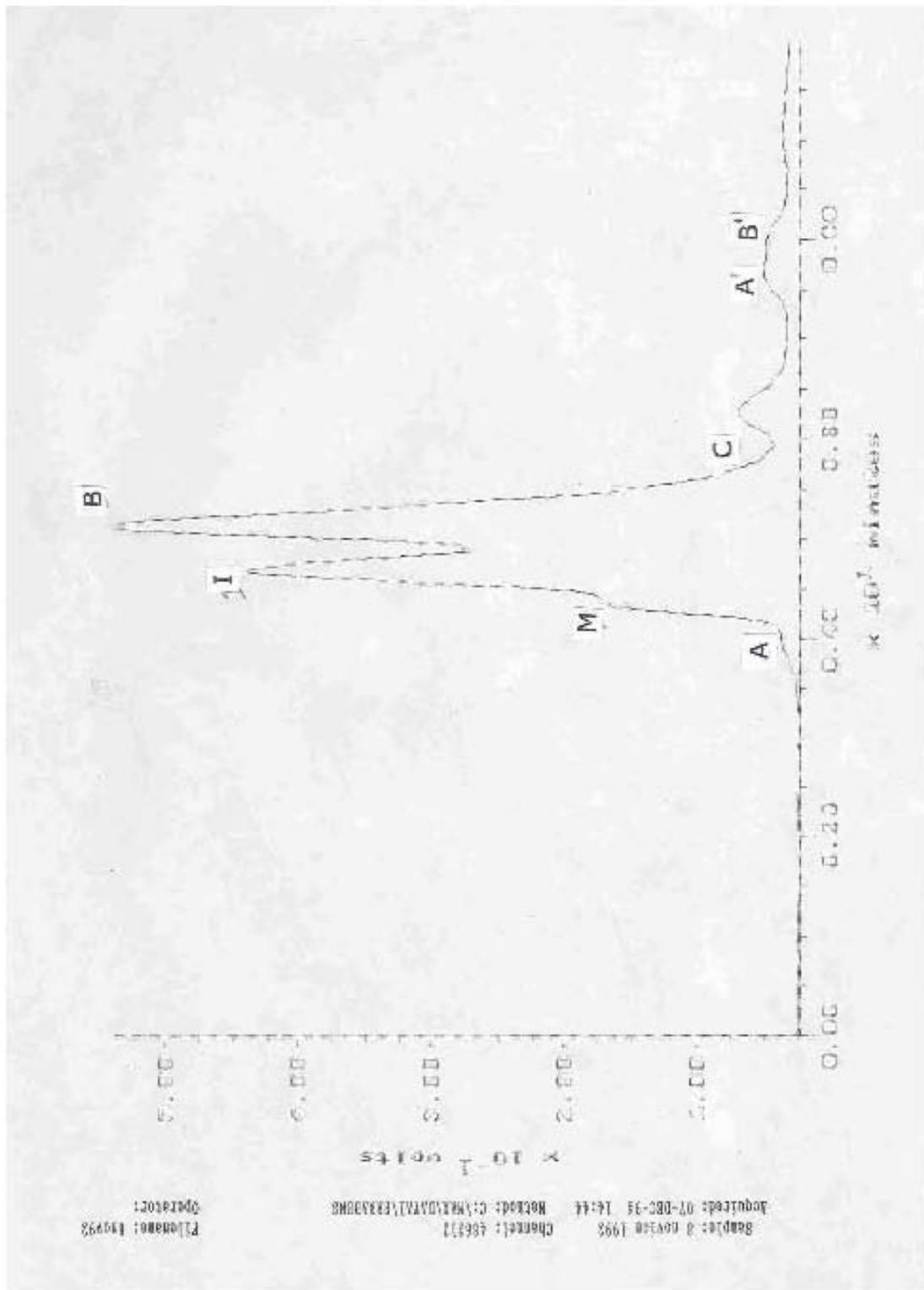
Cromatograma de la muestra del 28 de noviembre de 1990.



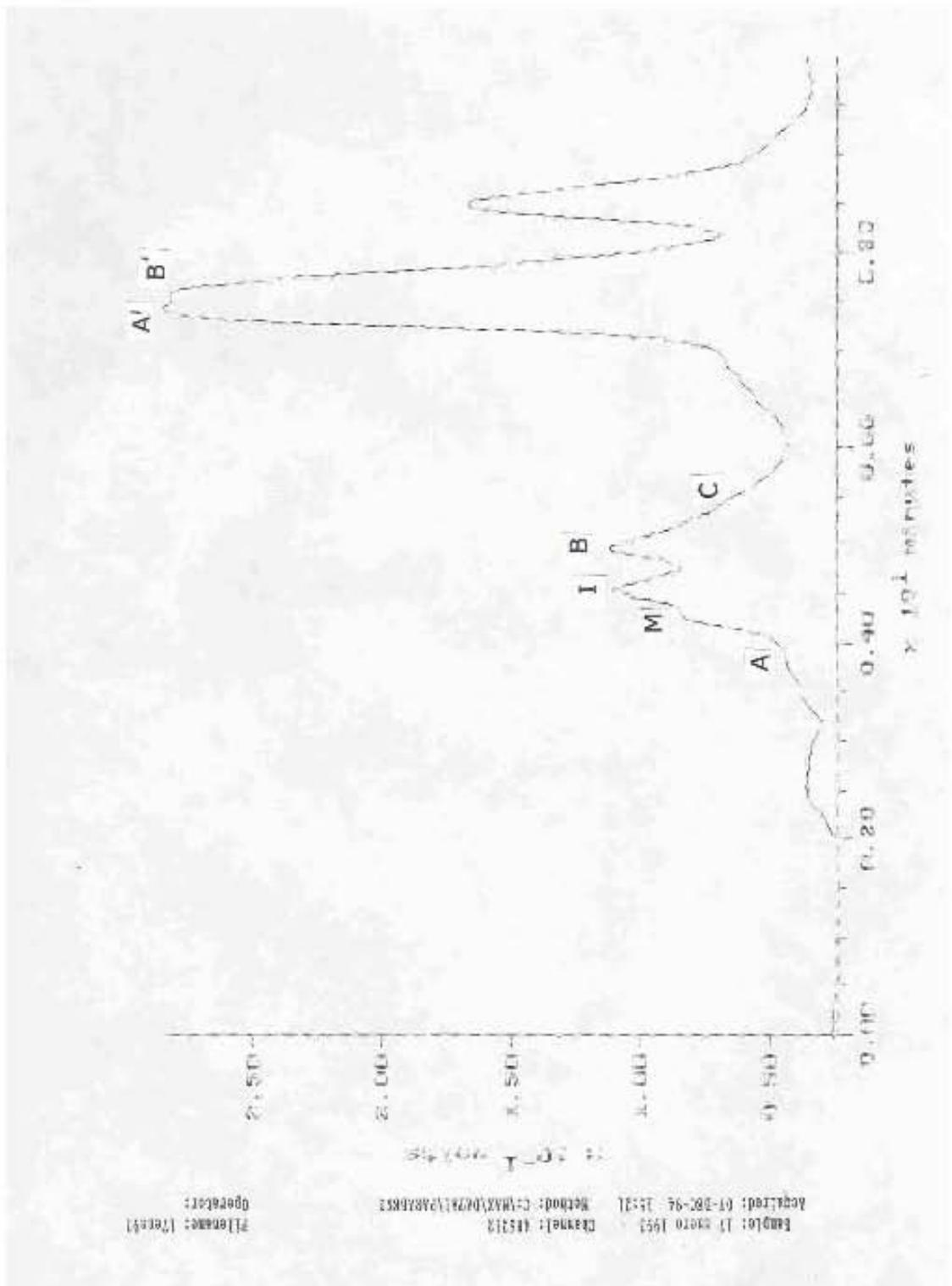
Cromatograma de la muestra del 21 de junio de 1992.



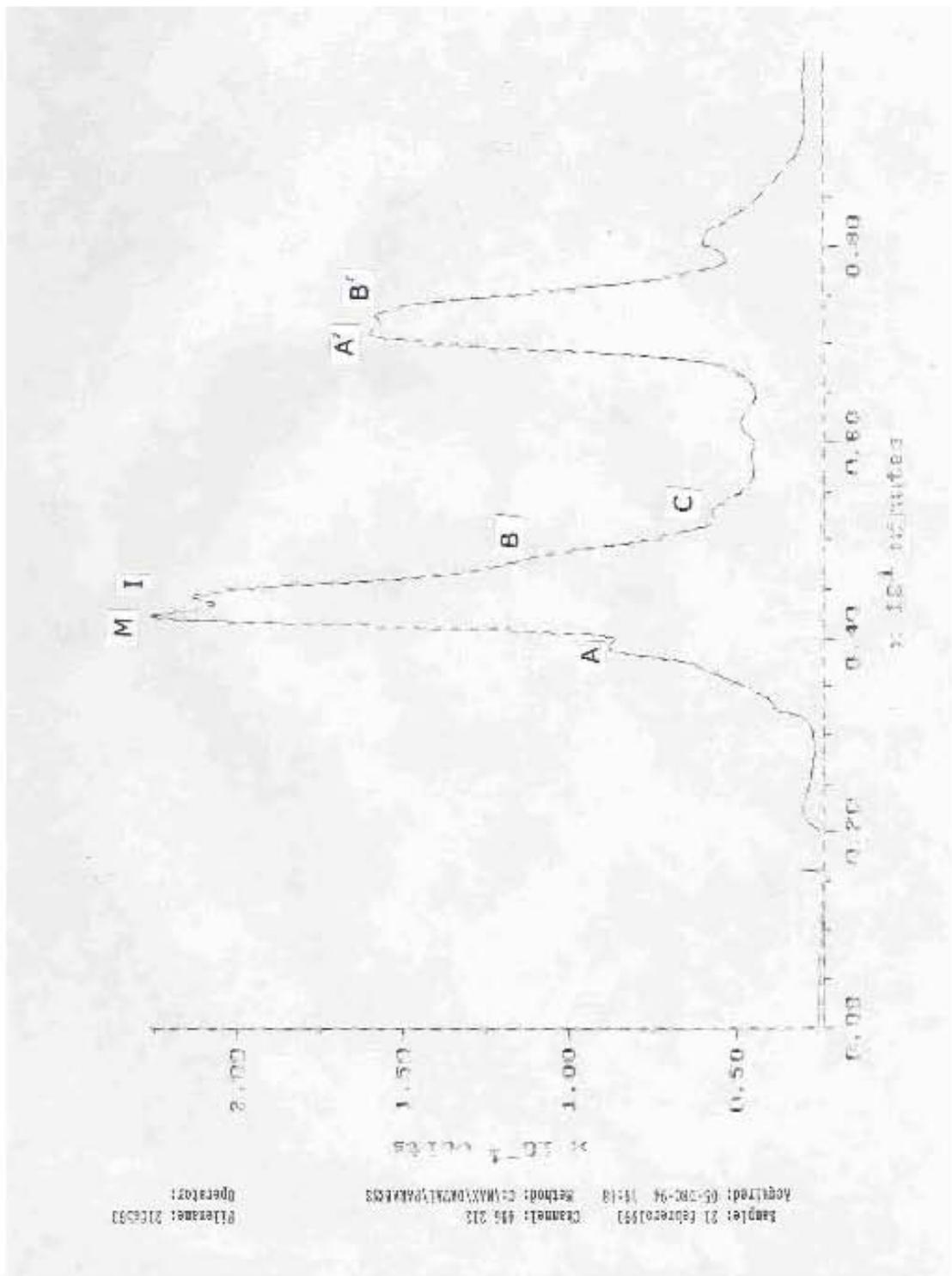
Cromatograma de la muestra del 13 de septiembre de 1992.



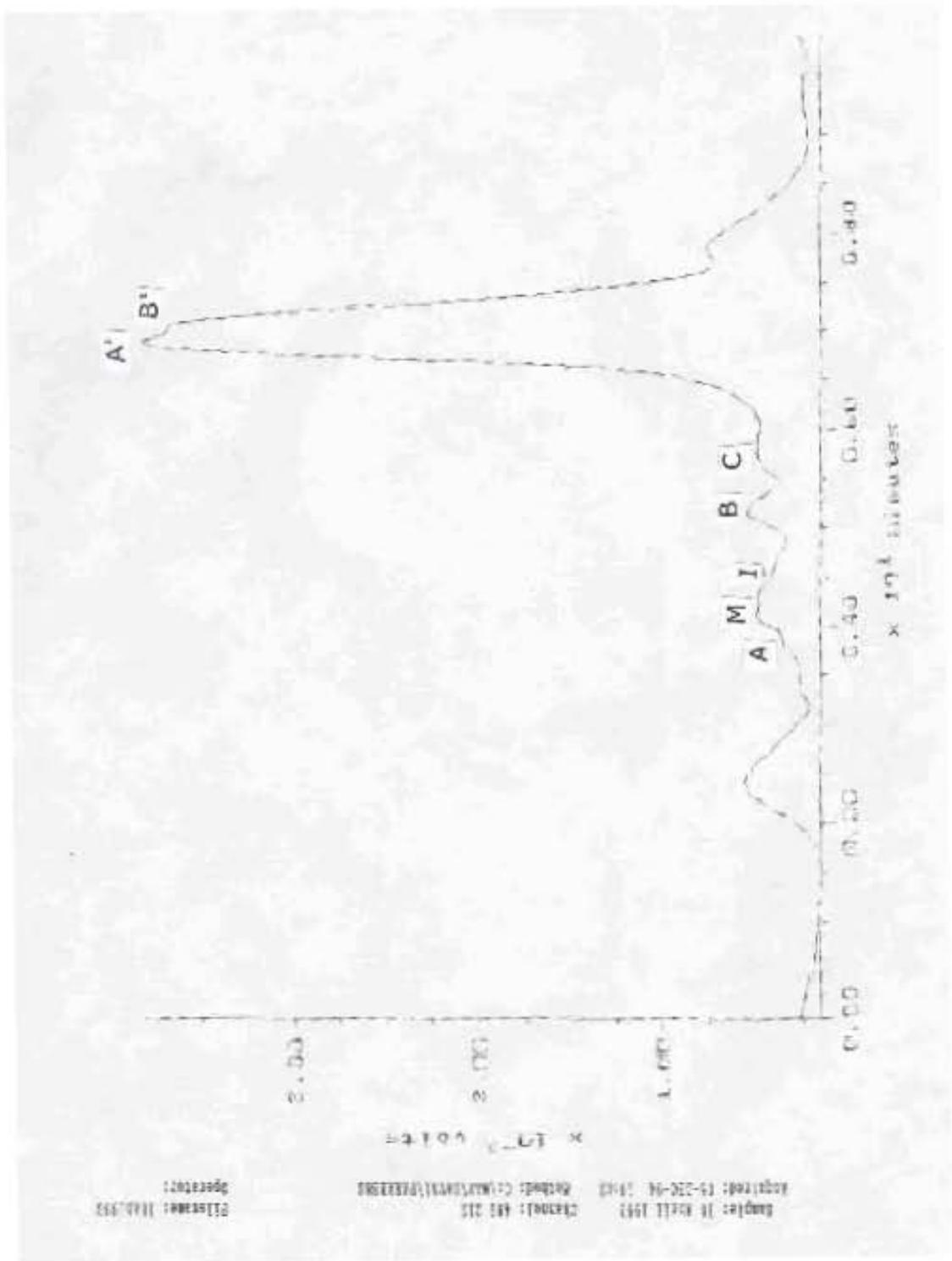
Cromatograma de la muestra del 8 de noviembre de 1992.



Cromatograma de la muestra del 17 de enero de 1993.

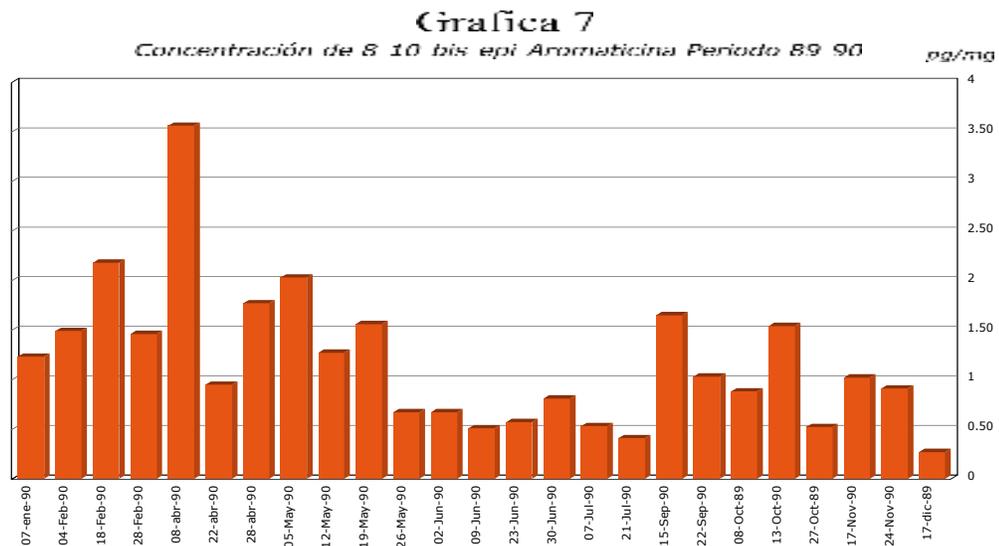


Cromatograma de la muestra del 21 de febrero de 1993.



Cromatograma de la muestra del 18 de abril de 1993.

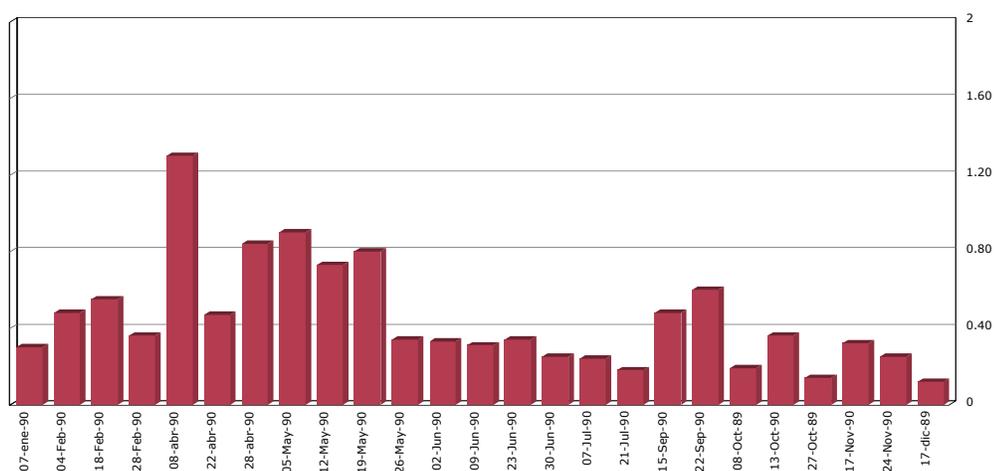
Con los datos de la concentración de cada una de las lactonas determinadas por HPLC (del período 1989-1990) se realizaron las siguientes gráficas:



Las concentraciones están dadas en picogramos por miligramo de hoja seca.

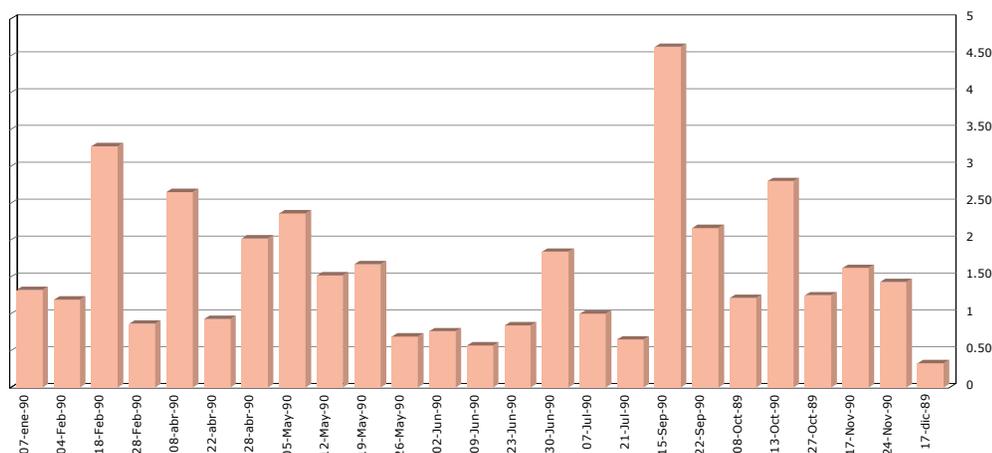


Gráfica 9
Concentración de Confertina Periodo 89-90 pg/mg

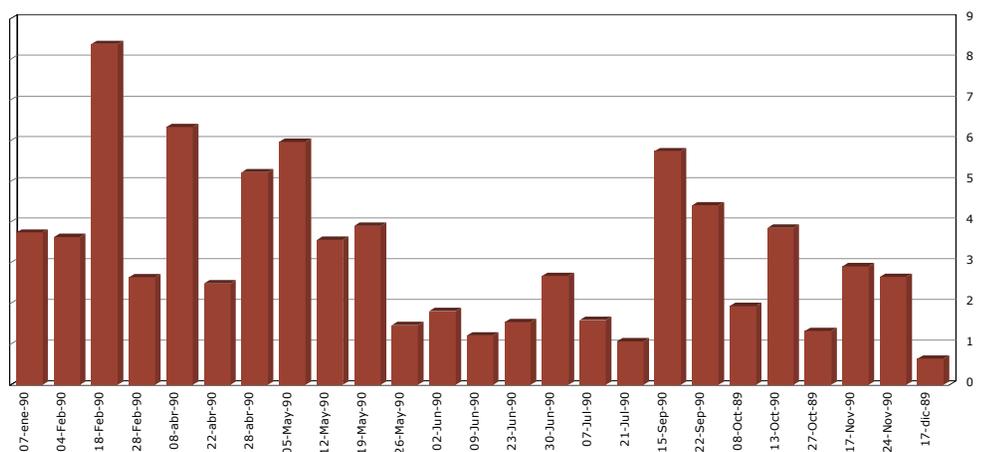


De la concentración de las tres Pseudoguayanolidas tenemos que las dos primeras (ver gráficas 7 y 8), 8-10-bis-epi-Aromaticina y Burrodina se presentan en el periodo 89-90, en mayor cantidad que la Confertina (ver gráfica 9), los picos de maxima concentración para la 8-10-bis-epi-Aromaticina y la Confertina se dan el 8 de abril de 1990 con 1.2 pg/mg, para la Burrodina 3.9 pg/mg el 22 de septiembre de 1990, el segundo pico de mayor concentración para esta lactona es de 2,8 pg/mg y se tiene el 8 de abril de 1990.

Grafica 10
Concentración de 8-epi-Inuviscolida Período 89-90 $\mu\text{g}/\text{mg}$



Grafica 11
Concentración de Mairetiolida Período 89-90 $\mu\text{g}/\text{mg}$



De las gráficas 10 y 11 que corresponden a la concentración de las dos guayanolidas, se observa que la maxima concentración de la 8-epi-Inuviscolida se presenta el 15 de septiembre de 1990 con 4.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ y para la Mairetiolida el 18 de febrero de 1990 con 8.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

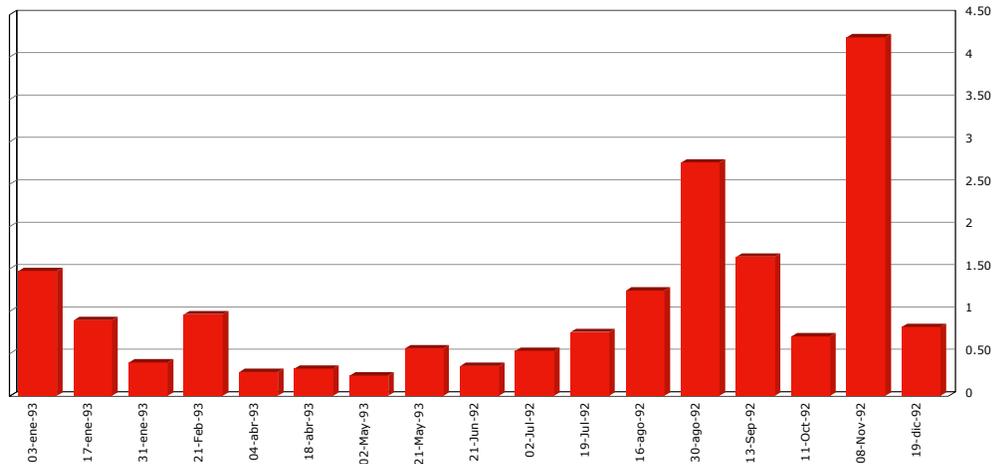
Como se puede observar en las gráficas 7 y 9, la 8-10-bis-epi-Aromaticina y la Confertina son las lactonas de menor concentración a lo largo de todo el período 1989-1990, y las tres de mayor concentración son la pseudoguayanolida Burrodina y las dos guayanolidas; 8-epi-Inuviscolida y Mairetiolida.

Para el período 1992-1993 tenemos las siguientes gráficas, con las concentraciones correspondientes a las Pseudoguayanolidas (gráficas 12, 13 y 14).



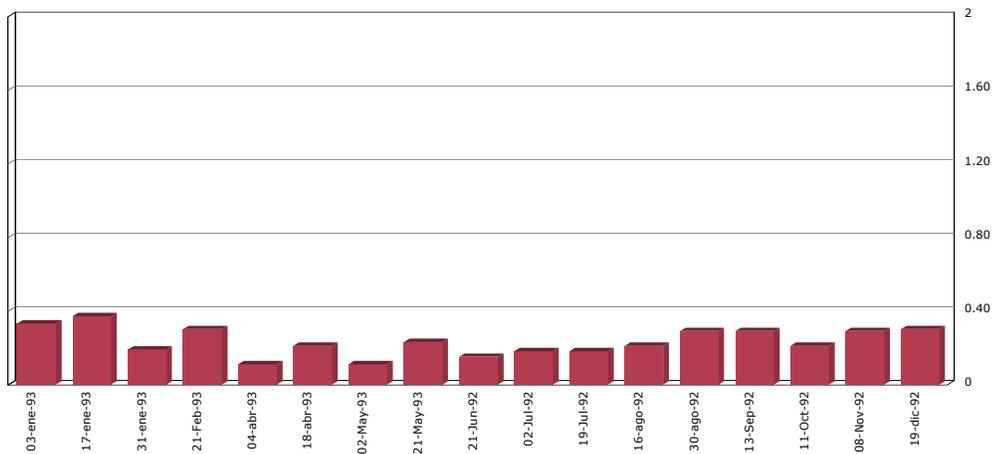
La máxima concentración (0.9 pg/mg) de la 8-10-bis-epi-Aromaticina se presenta el 21 de febrero de 1993.

Grafica 13
Concentración de Burrodina Periodo 92-93 pg/mg



La mayor concentración de la Burrodina para el periodo 1992-1993 se tiene el ocho de noviembre de 1992 con 4.1 pg/mg y el 30 de agosto de 1992 el segundo punto de mayor concentración (2.7 pg/mg) para esta lactona.

Grafica 14
Concentración de Confertina Periodo 92-93 pg/mg



La máxima concentración de Confertina se tiene el 17 de enero de 1993 (<0.5 pg/mg). Así tenemos que la Pseudoguayanolida con mayor

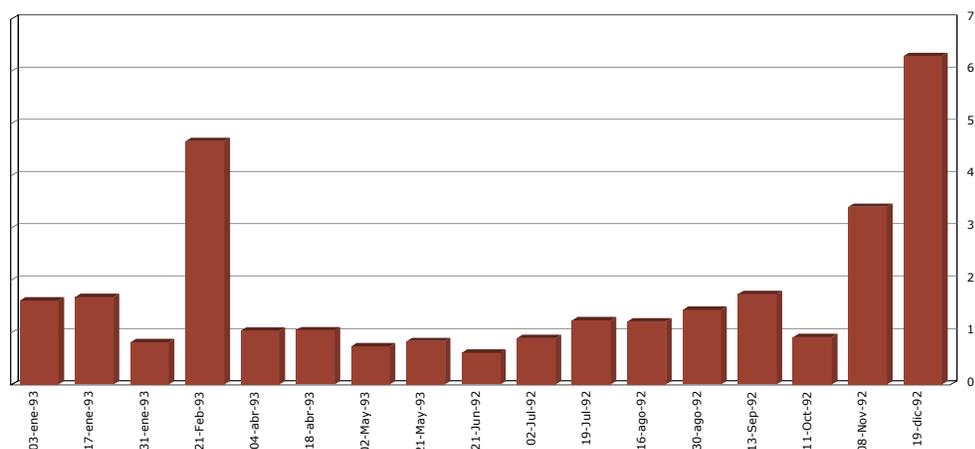
concentración en el período 92-93 es la Burrodina, seguida por la 8-10-bis-epi-Aromaticina.

Las gráficas 15 y 16 muestra la concentración de las guayanolidas 8-epi-Inuviscolida y Mairetiolida.



La 8-epi-Inuviscolida presenta su máxima concentración en las hojas de ***Ageratina mairetiana D. C.***, el 8 de noviembre de 1992 con 3.8 pg/mg.

Grafica 16
Concentración de Mairetiolida Período 92-93 *pg/mg*

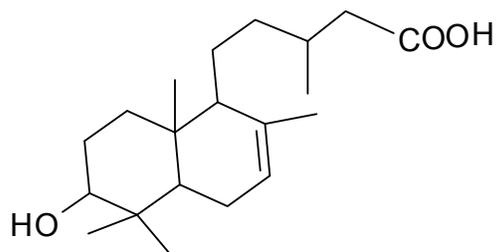


La Mairetiolida presenta el máximo de concentración para el período 92-93, el 19 de diciembre de 1992 con 6.2 pg/mg y el segundo pico de mayor concentración el 21 de febrero de 1993 con 4.7 pg/mg.

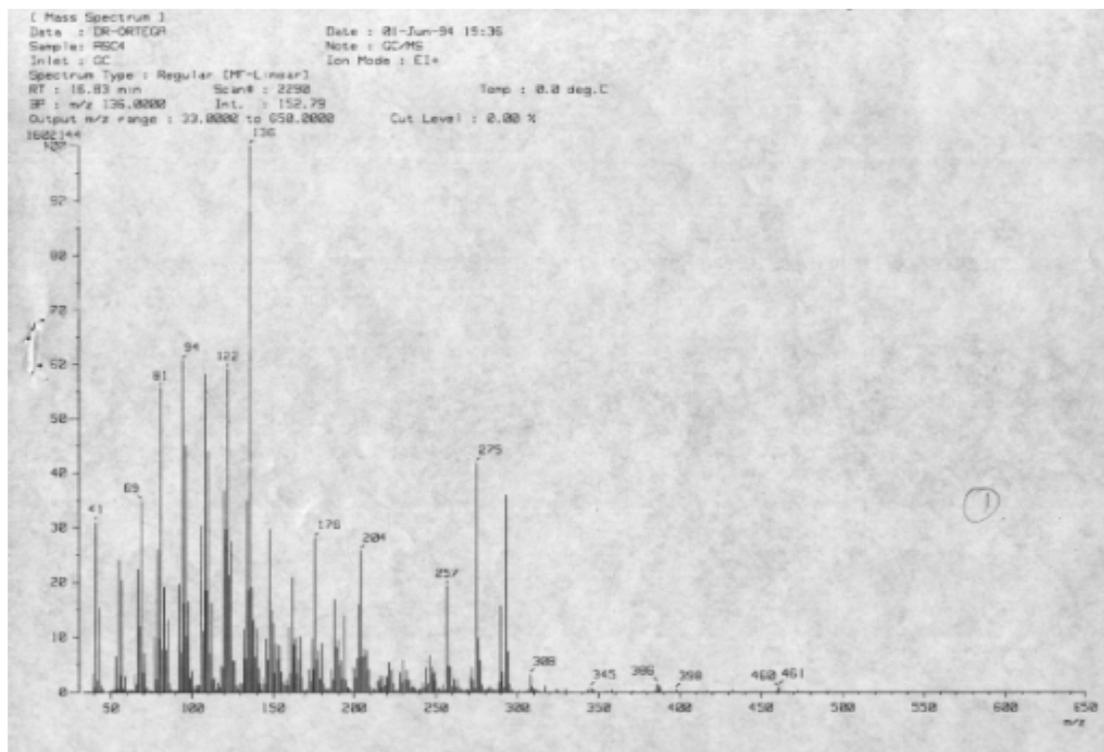
Adicionalmente aparecieron en los cromatogramas dos señales que no correspondían a las lactonas identificadas en la planta, estos metabolitos se aislaron, purificaron y cuantificaron, identificándolos como diterpenos.

Un segundo experimento se realizó utilizando 160 g de material vegetal seco, a partir del material vegetal que se colectó el 17 de febrero de 1991. Al extraer el material colectado con CH_2Cl_2 se obtuvieron 7.27 g de extracto de donde se aislaron y cristalizaron 5 mg del diterpeno denominado A y 3.5 mg del diterpeno llamado B.

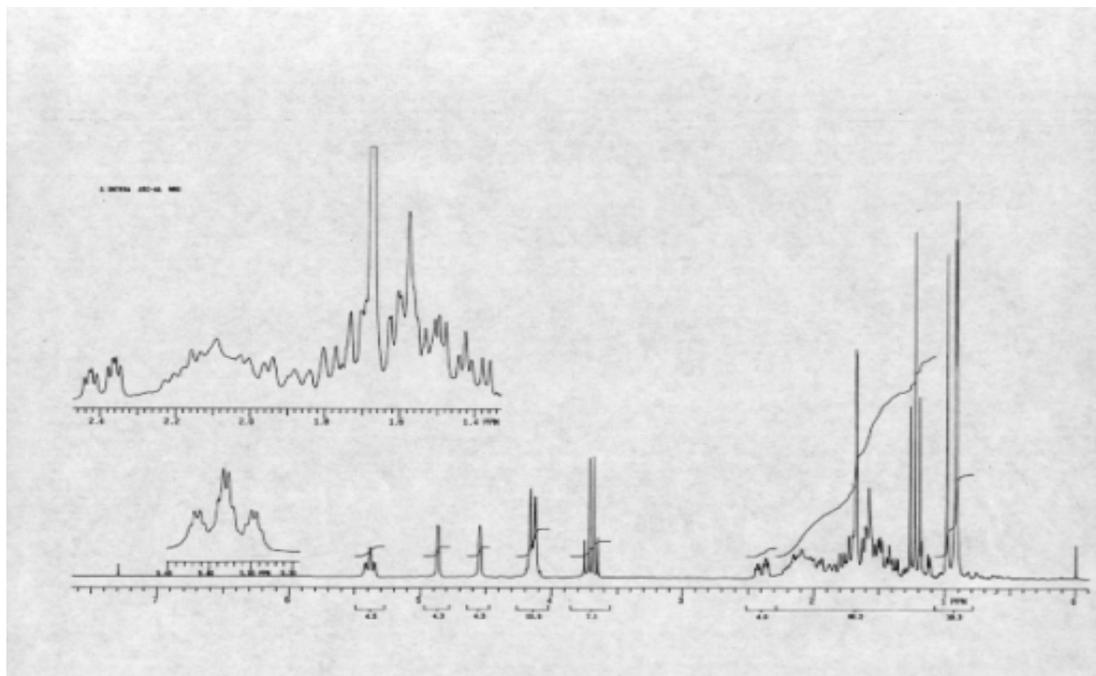
Para el aislamiento y purificación se utilizó la misma técnica cromatográfica de HPLC, obteniendo estos dos diterpenos que son distintos al ácido mairetiánico, lo cual se determinó auxiliándonos de la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de Masas, que permite obtener los pesos moleculares de los diterpeno A y B. El ácido mairetiánico aislado e identificado en un trabajo anterior de la misma planta (Macías G., 1979), no se aisló en este estudio.



Acido Mairetianoico



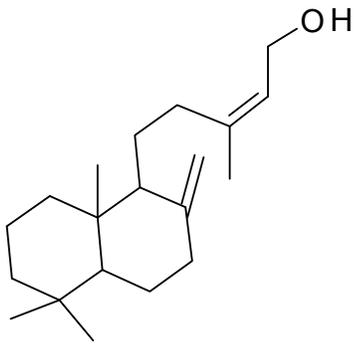
Espectro de Masas de Diterpeno A.



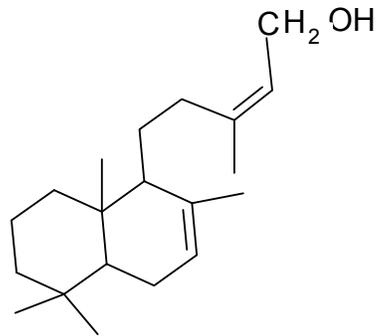
Espectro de NMR`H de Diterpeno A.

Las estructuras propuestas a partir de sus espectros de masas y resonancia magnética de protones son:

Diterpenos



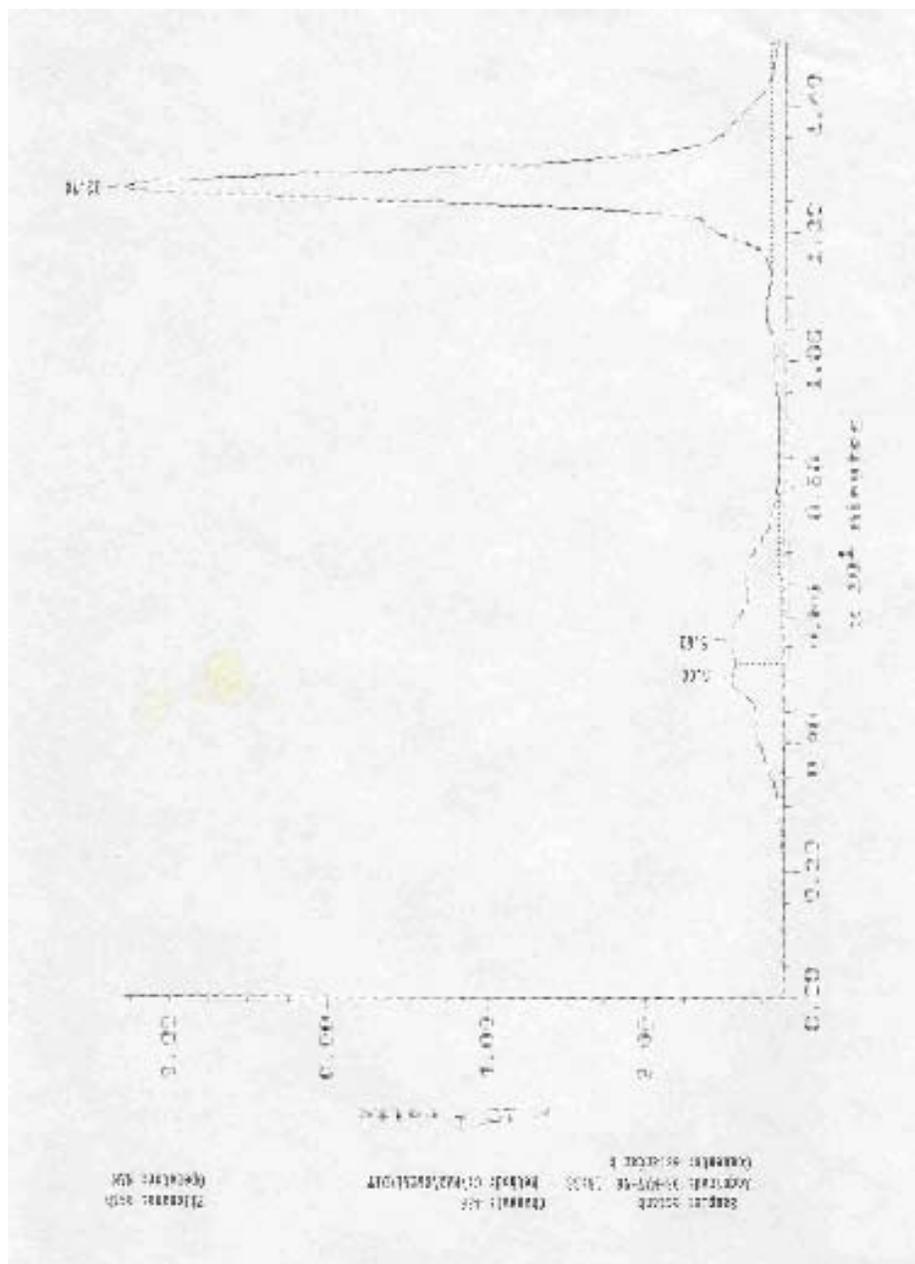
Diterpeno A



Diterpeno B

Estructuras probables propuestas para los diterpenos A y B

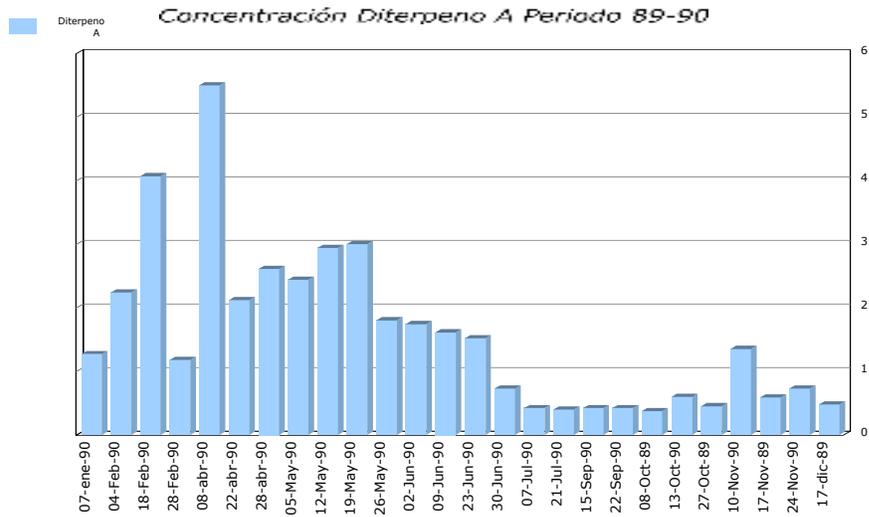
Por medio de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), se determinaron los tiempos de retención de los estándares del diterpeno A y B. Además la concentración relativa en las muestras vegetales colectadas, en los cromatogramas de los extractos mostrados de la página 87 a 98 y que están marcados como A` y B` respectivamente.



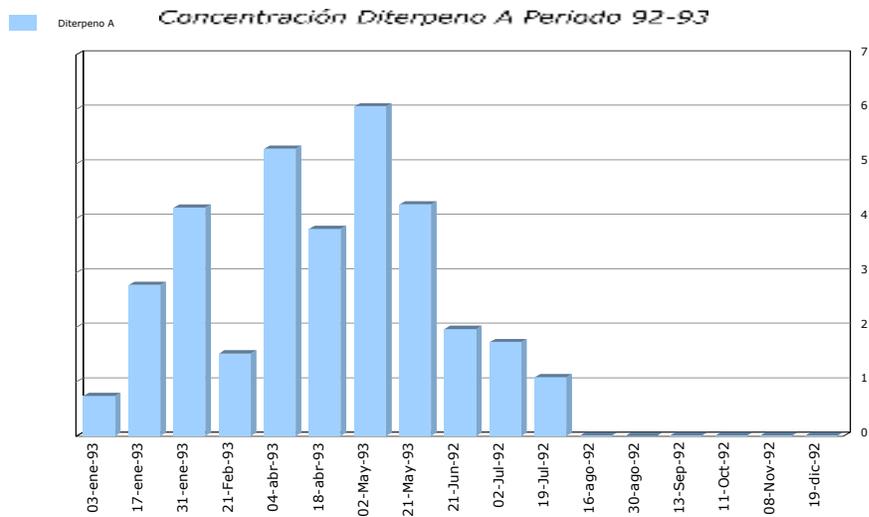
Cromatograma del estándar del diterpeno B

Se realizaron los análisis de los diterpenos en los cromatogramas de las muestras y se da la concentración relativa, lo que nos da información de la fluctuación a lo largo de los dos periodos analizados, de ello se generaron las siguientes gráficas:

Grafica 17

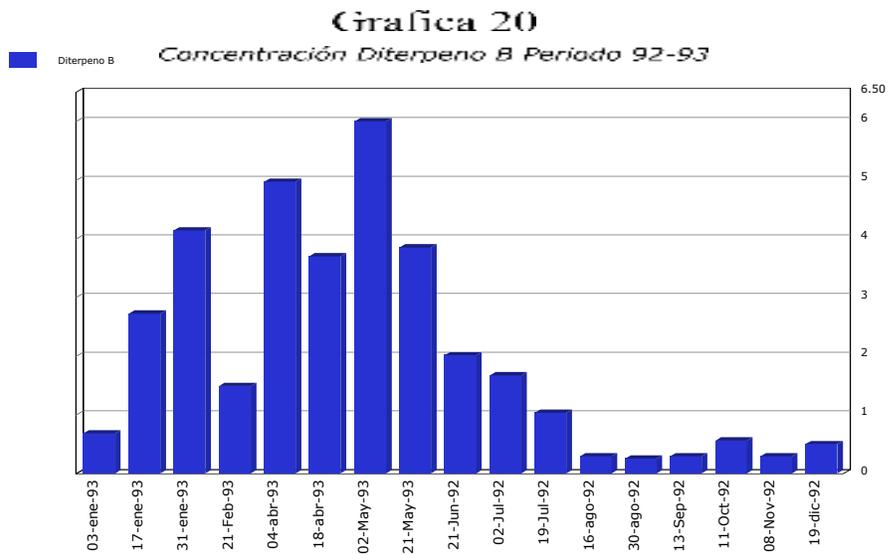
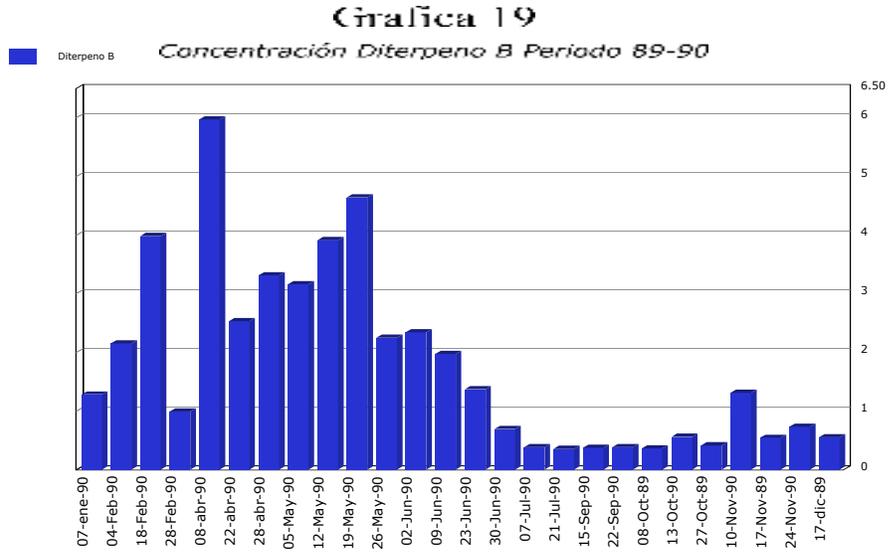


Grafica 18



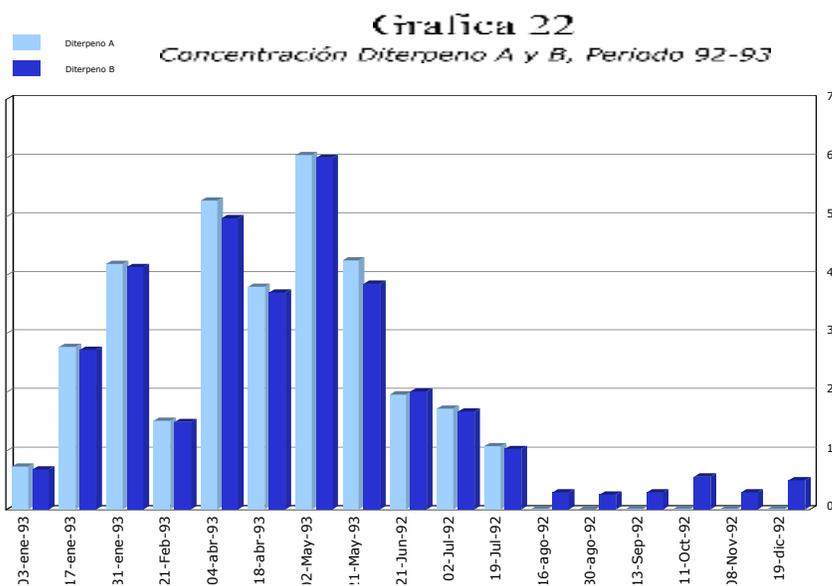
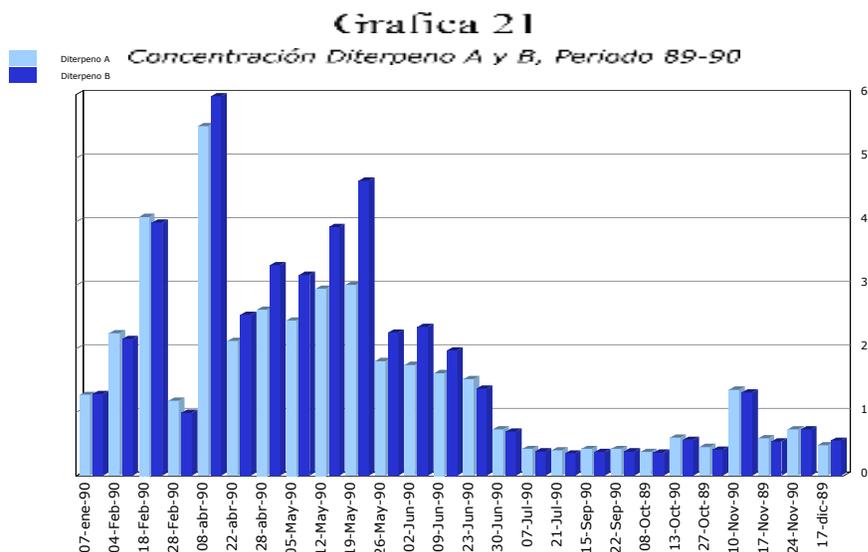
En las gráficas 17 y 18 se observa que la concentración relativa del diterpeno A en los dos periodos de colecta tienen un patrón de variación similar, en el mes de abril se tiene el máximo de concentración en el período 89-90 y en el período 92-93 se da ligeramente desfasado entre finales de abril y principios de mayo, en los dos periodos la concentración disminuye de julio a diciembre.

Para el caso del Diterpeno B la variación de concentración es parecido al del Diterpeno A como se observa en las gráficas 19 y 20.



El máximo de concentración ocurrió el 8 de abril, pero el segundo pico máximo es el 19 de mayo en el periodo 89-90, para el periodo 92-93 el pico máximo del diterpeno B es el 2 de mayo de 1993 y el segundo pico máximo es el del 4 de abril de 1993.

A partir de los datos de la concentración de los dos Diterpenos A y B en un mismo período, se generaron las gráficas 21 y 22 que se muestran a continuación:

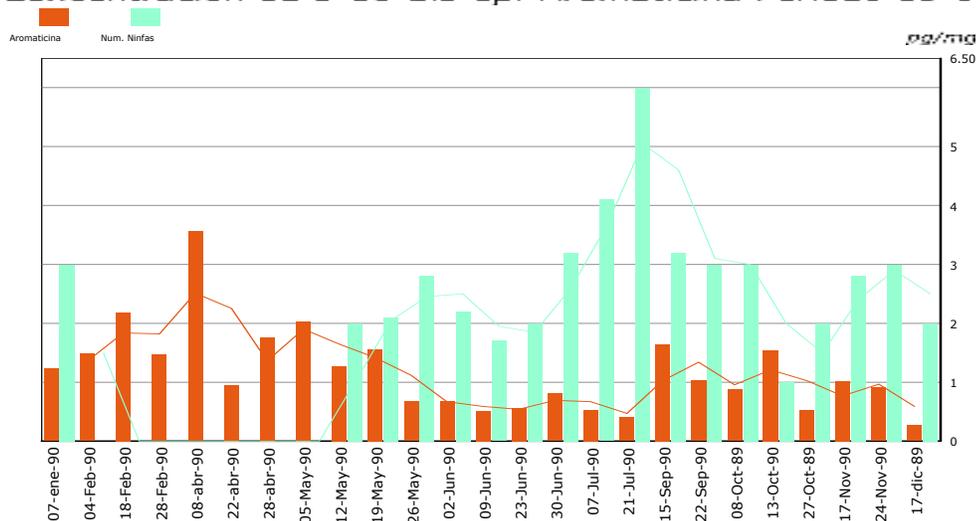


En las dos gráficas (21 y 22) se observa que los dos diterpenos siguen un patrón de variación de la concentración en las hojas de

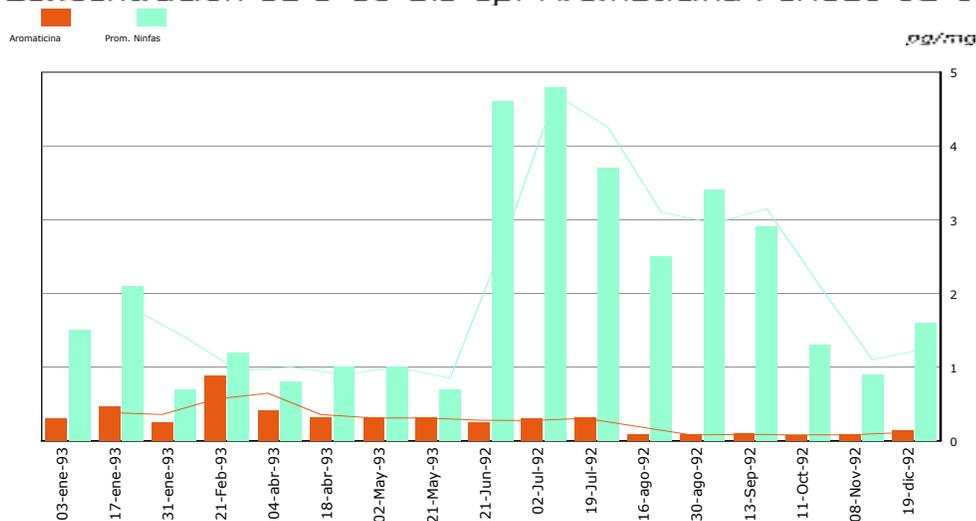
Ageratina maireriana D. C., prácticamente igual a lo largo de cada uno de los dos periodos. Resaltando que entre los picos del 18 de febrero y 8 de abril, en el periodo 89-90, hay una baja de concentración de los dos diterpenos y lo mismo sucede entre el 31 de enero y 4 de abril en el periodo 92-93, el valle de descenso de la concentración entre ambos periodos llega aproximadamente al 30% en relación a los puntos máximos señalados.

Al comparar los datos de concentración de cada una de las lactonas sesquiterpénicas con la densidad de ninfas de *Empoasca sp.*, para cada uno de los dos periodos de muestreo se tienen las siguientes gráficas.

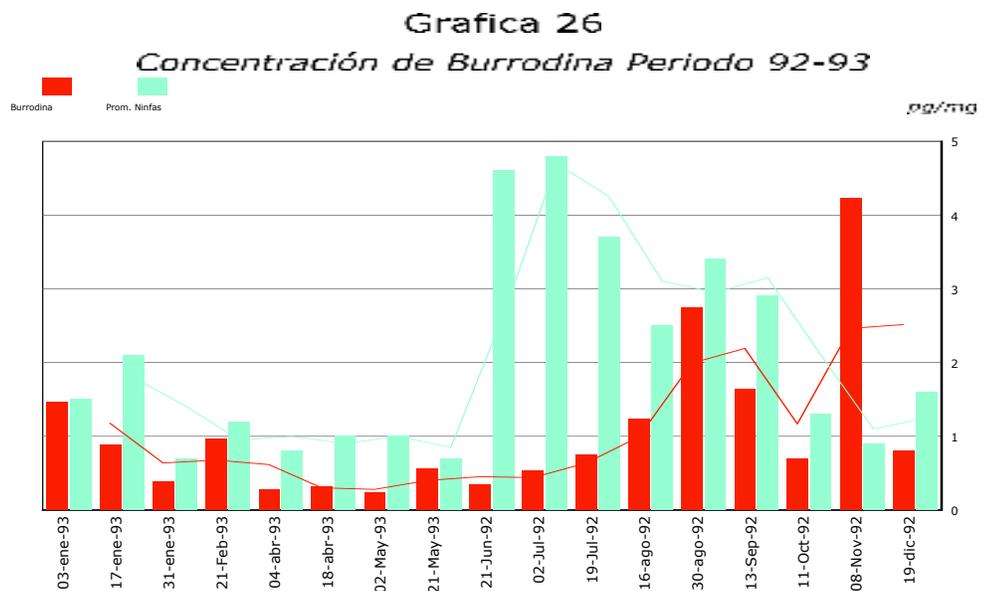
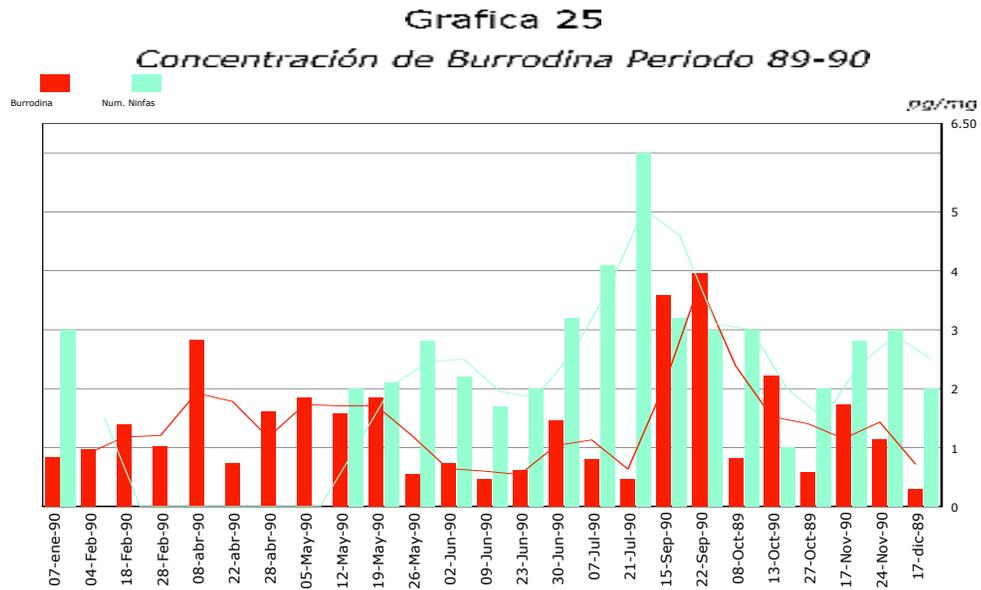
Grafica 23
Concentración de 8-10-bis-epi-Aromaticina Periodo 89-90



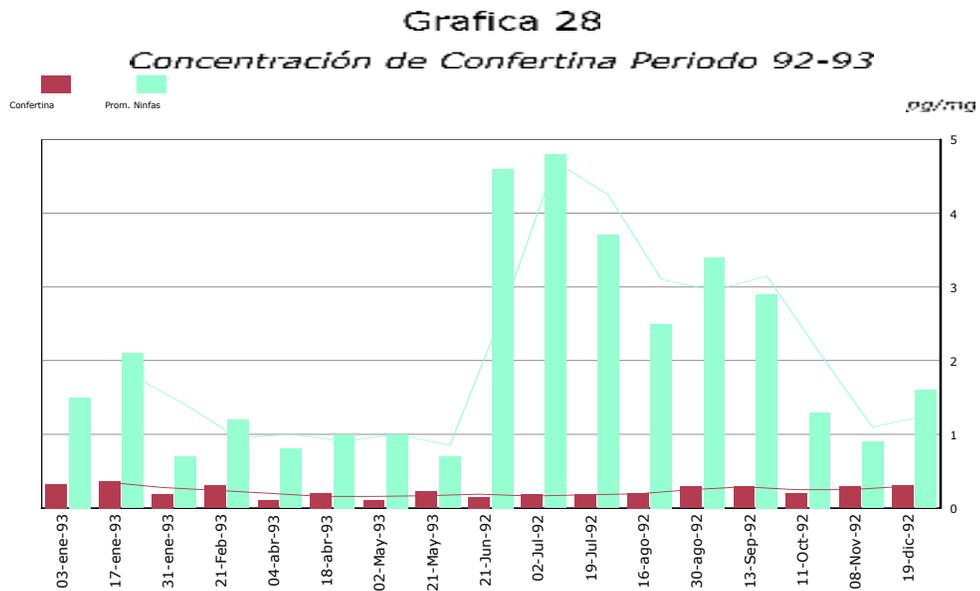
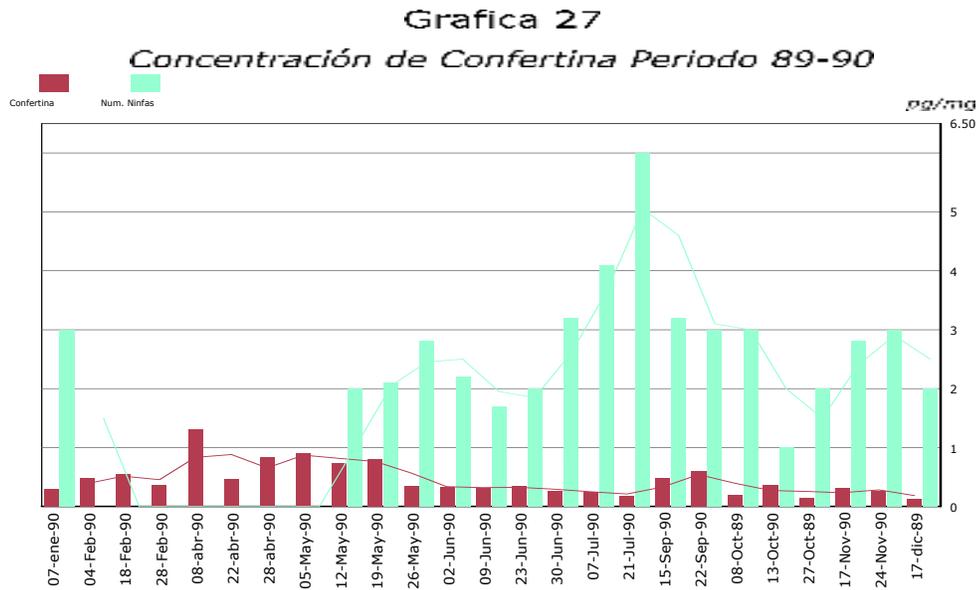
Grafica 24
Concentración de 8-10-bis-epi-Aromaticina Periodo 92-93



En las graficas 23 y 24 se observa que la 8-10-bis-epi-Aromaticina en los dos periodos de muestreo no afecta la densidad poblacional de ninfas de *Empoasca sp.*

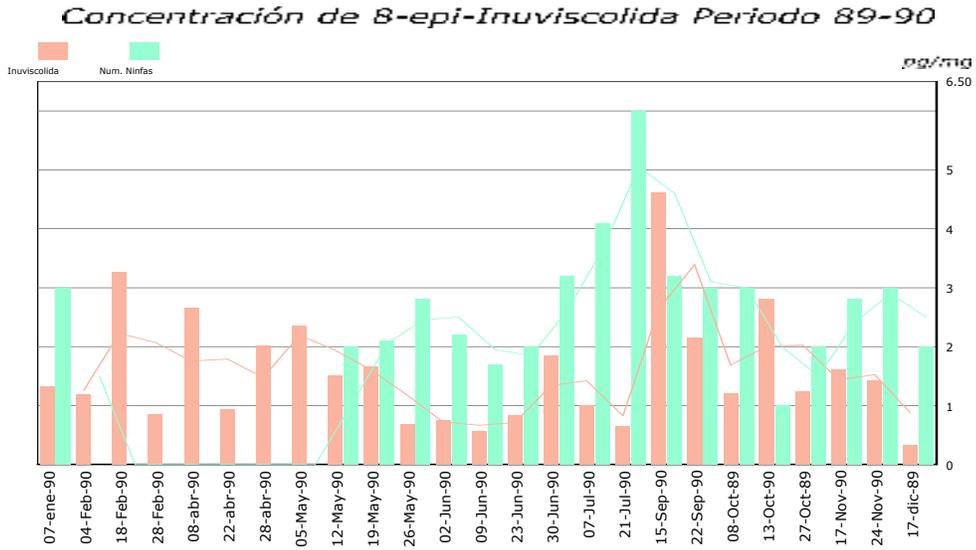


En las gráficas 25 y 26 se observa que a mayor concentración de Burrodina menor es el número de ninfas sobre las hojas de ***Ageratina mairiana*** D. C., y cuando baja la concentración de Burrodina la densidad poblacional de las ninfas de ***Empoasca*** aumenta, tanto en el periodo 89-90, como en el 92-93.

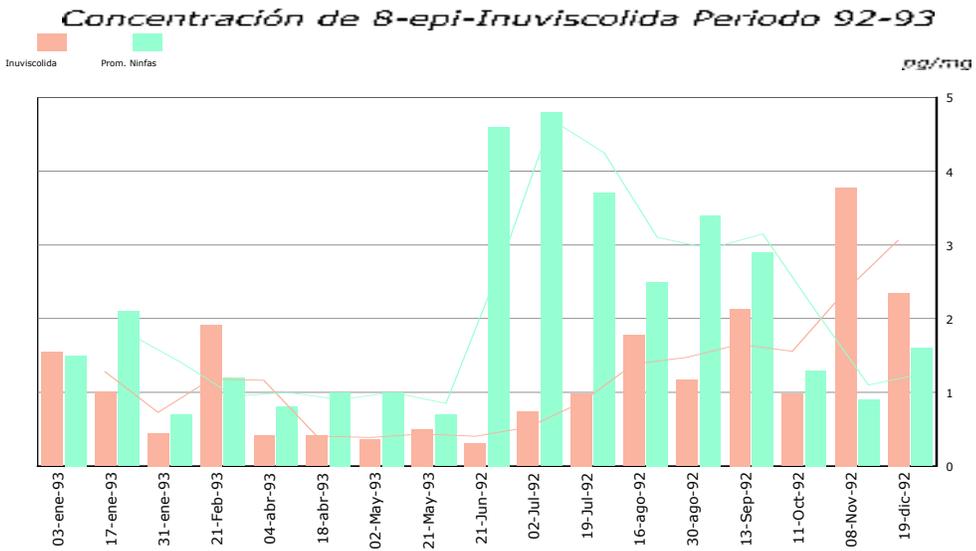


En las gráficas 27 y 28 se observa que la Confertina en los dos períodos de muestreo no afecta la densidad poblacional de ninfas de ***Empoasca sp.***

Grafica 29

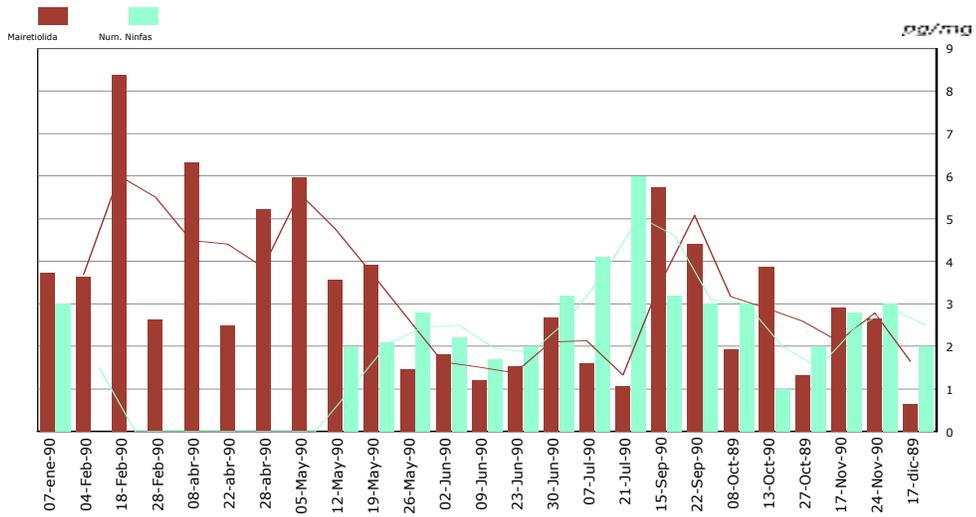


Grafica 30

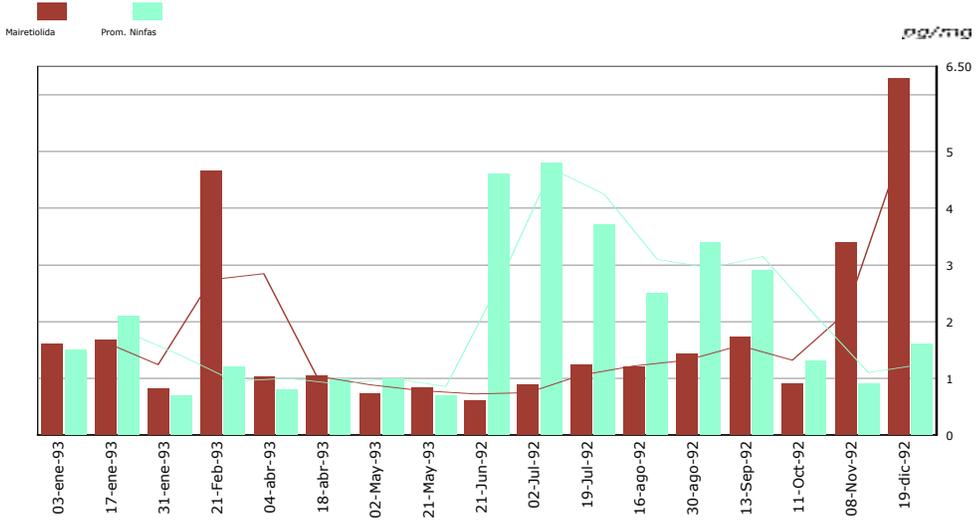


Para el caso de 8-epi-Inuviscolida en las gráficas 29 y 30, se ve que cuando aumenta la concentración, la densidad poblacional de ninfas disminuye y cuando disminuye la concentración de la lactona la población de ninfas aumenta.

Grafica 31
Concentración de Mairetioida Periodo 89-90



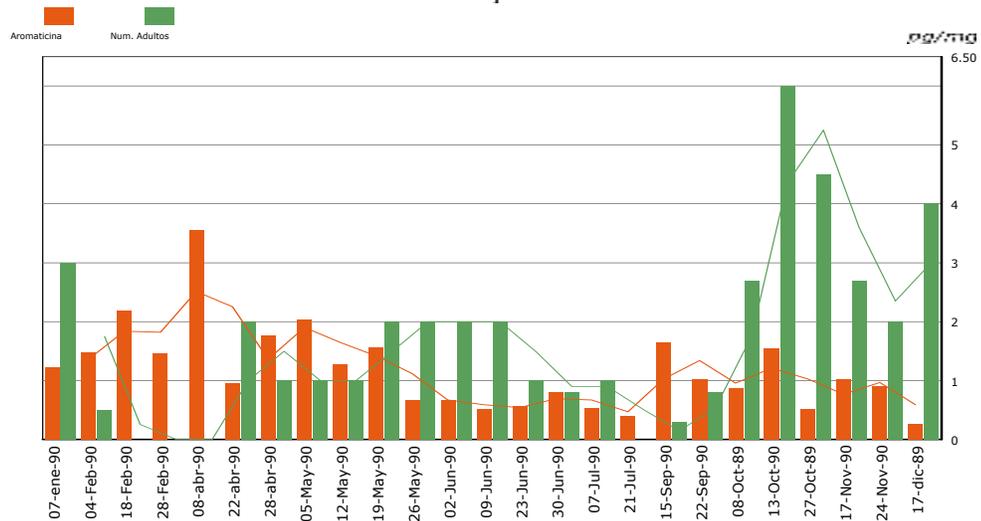
Grafica 32
Concentración de Mairetioida Periodo 92-93



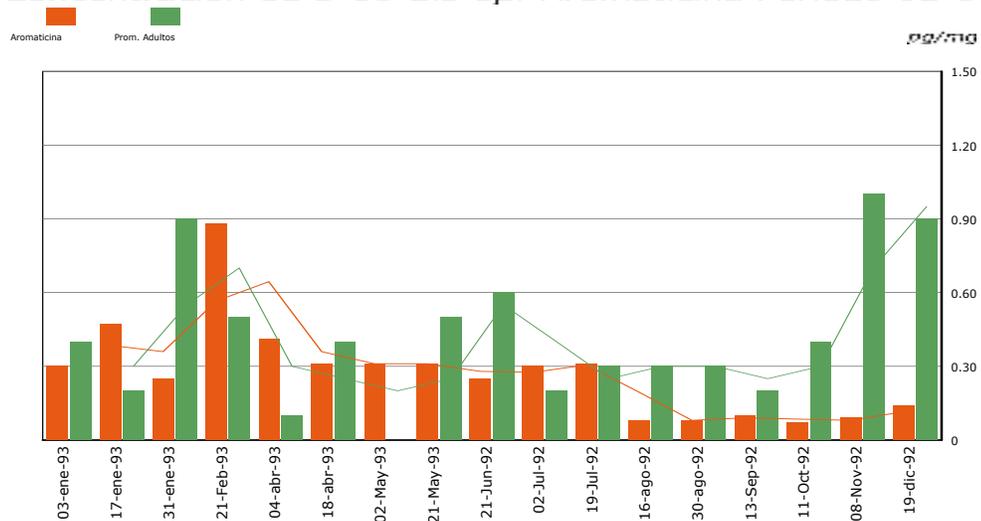
En las gráficas 31 y 32 se ve que la concentración de Mairetioida muestra una relación inversa a la densidad poblacional de las ninfas de ***Empoasca sp.***, en los dos períodos de colecta.

Al comparar los datos de concentración de cada una de las lactonas sesquiterpénicas con la densidad de adultos de *Empoasca sp.*, para cada periodo de muestreo se tienen las siguientes gráficas.

Grafica 33
Concentración de 8-10-bis-epi-Aromaticina Periodo 89-90

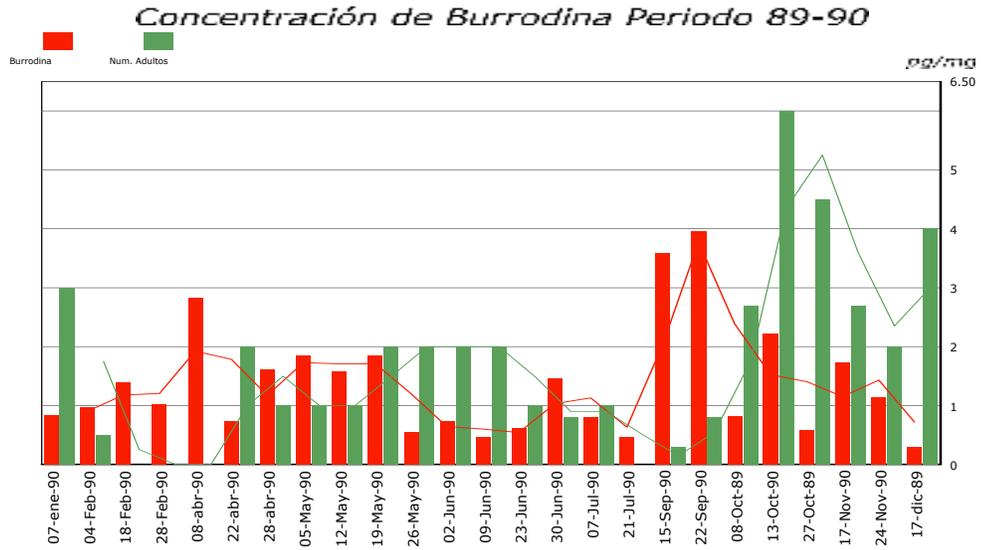


Grafica 34
Concentración de 8-10-bis-epi-Aromaticina Periodo 92-93

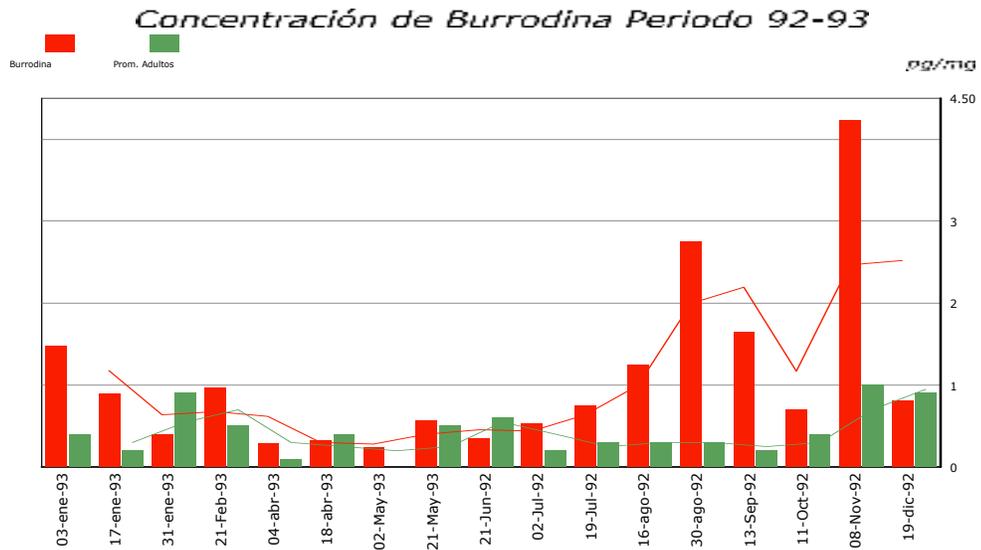


En las gráficas 33 y 34 se observa que la 8-10-bis-epi-Aromaticina tiene una relación inversa entre su concentración y la densidad poblacional de adultos, a menor concentración de 8-10-bis-epi-Aromaticina mayor cantidad de adultos de *Empoasca sp.*

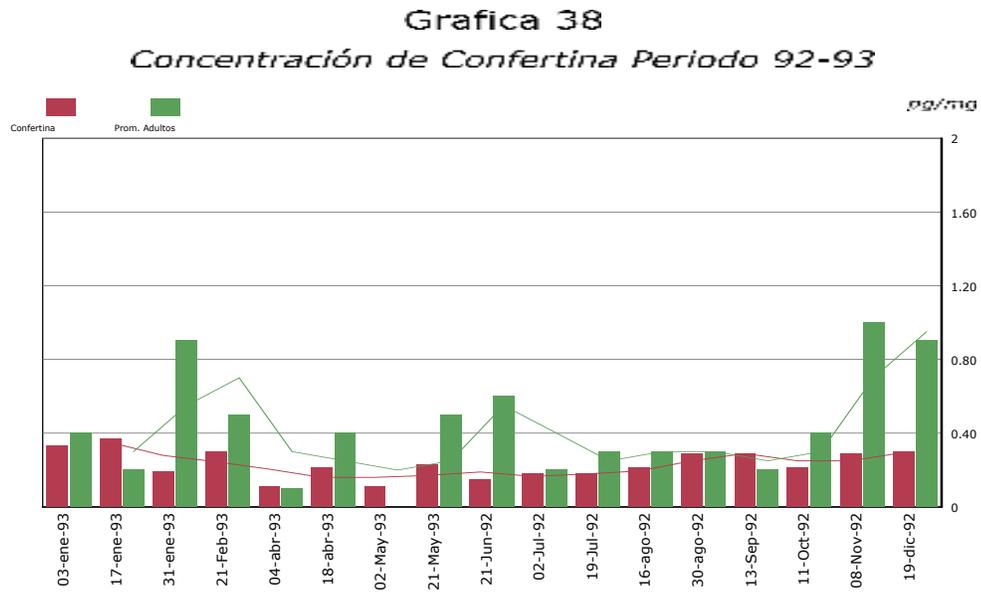
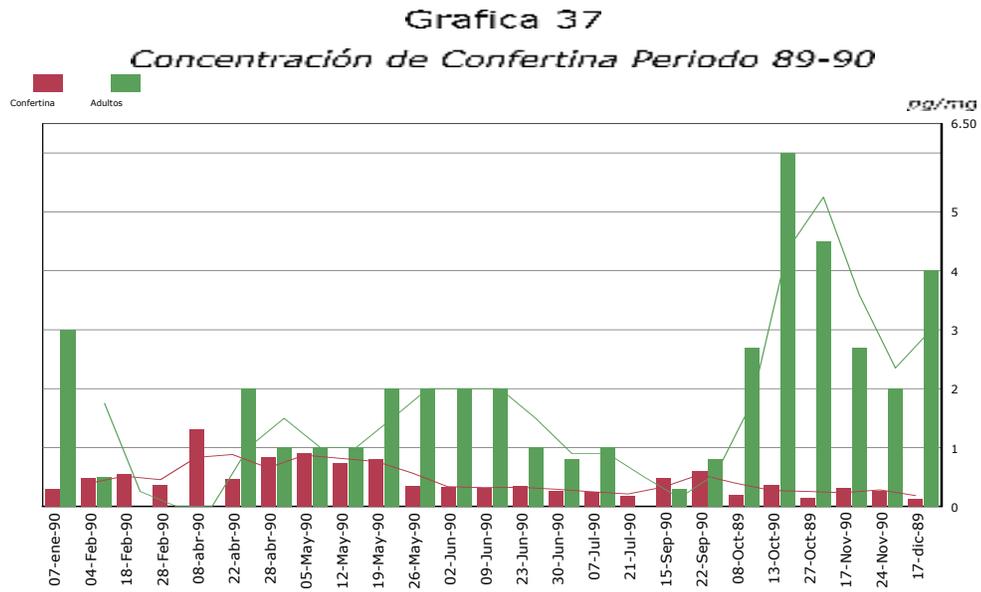
Grafica 35



Grafica 36

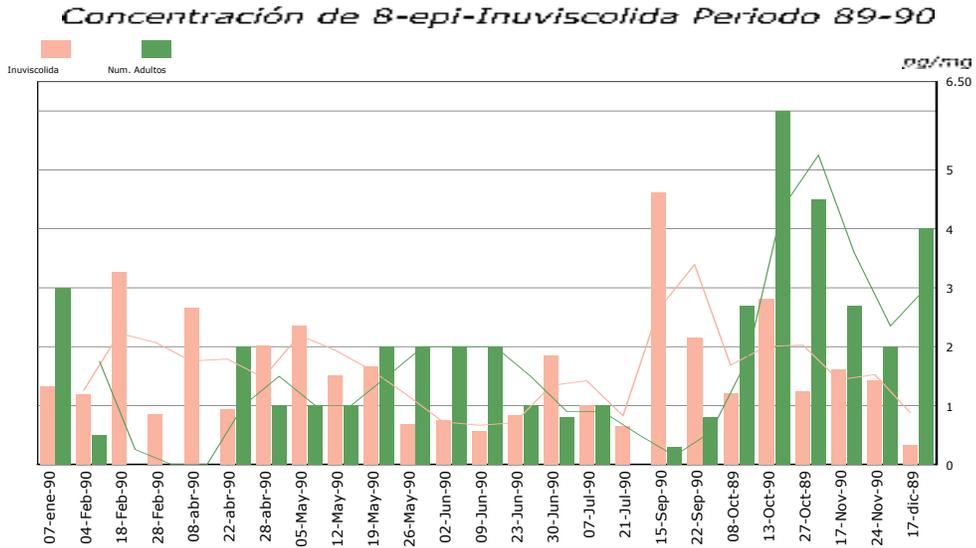


En las gráficas 35 y 36 se observa que cuando aumenta la concentración de Burrodina disminuye el número de individuos adultos de la chicharrita.

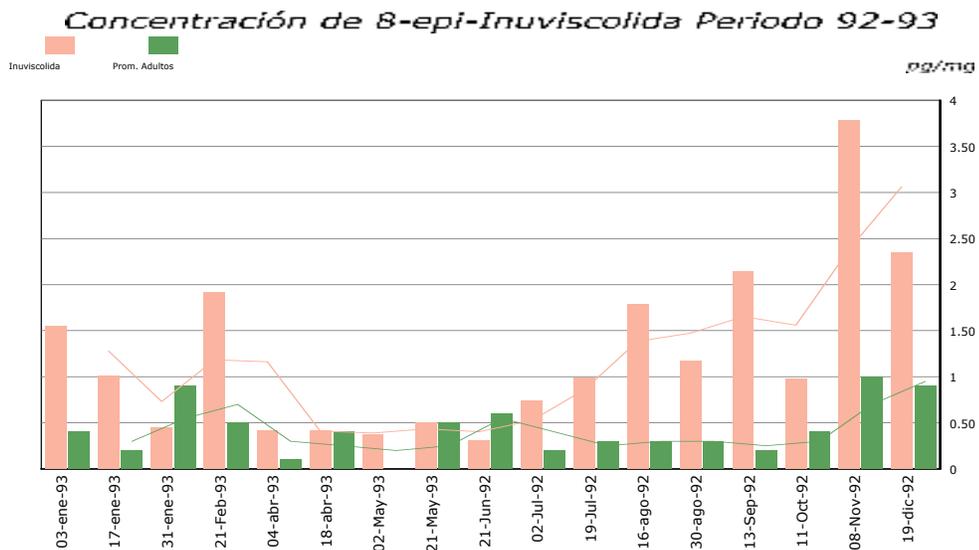


En las gráficas 37 y 38 se ve que la concentración de Confertina en los dos periodos de muestreo, no efecta la variación de población de adultos de la chicharrita.

Grafica 39

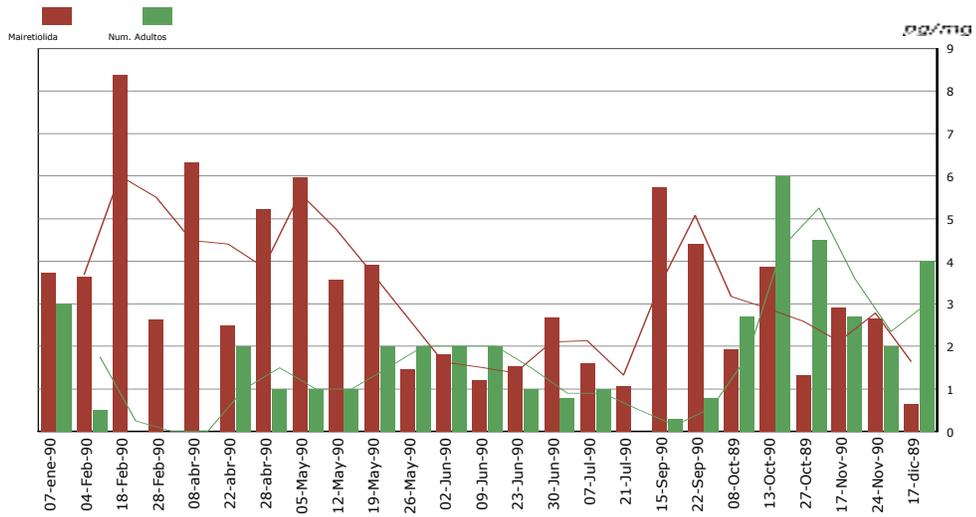


Grafica 40

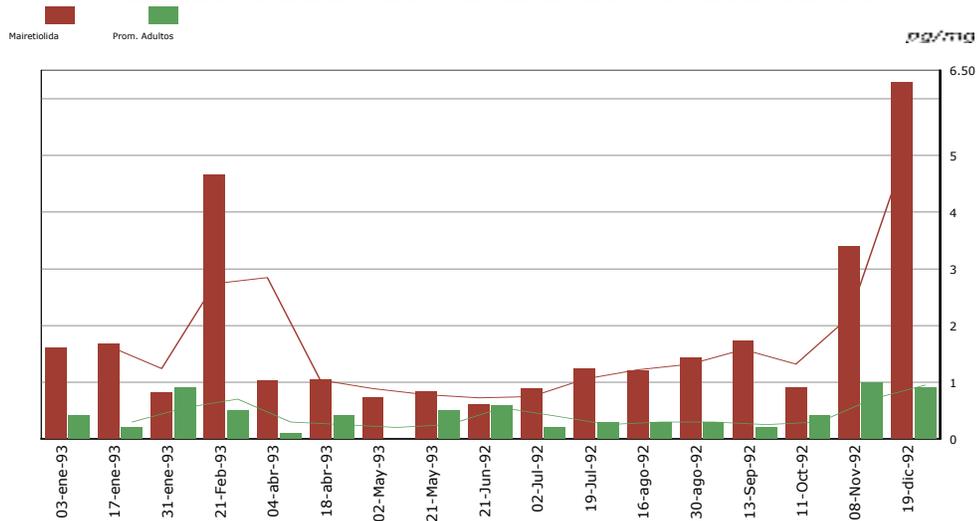


Para el caso de la 8-epi-Inuviscolida en el período 89-90 y 92-93 (graficas 39 y 40) cuando aumenta la concentración de esta lactona en las hojas de *Ageratina mairretiana* D. C., disminuye la cantidad de adultos de *Empoasca sp.*

Grafica 41
 Concentración de Mairretiolida Periodo 89-90

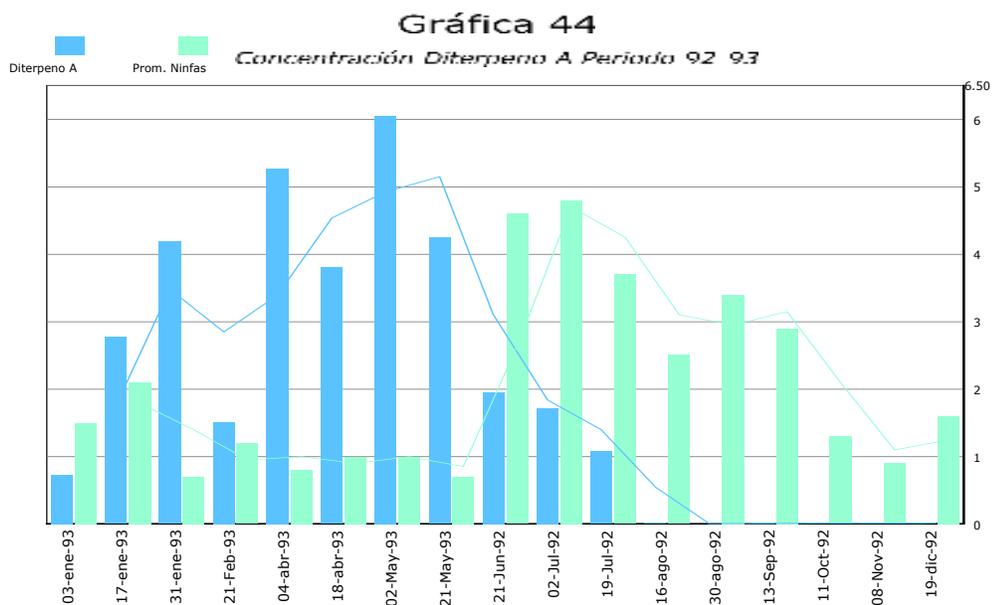
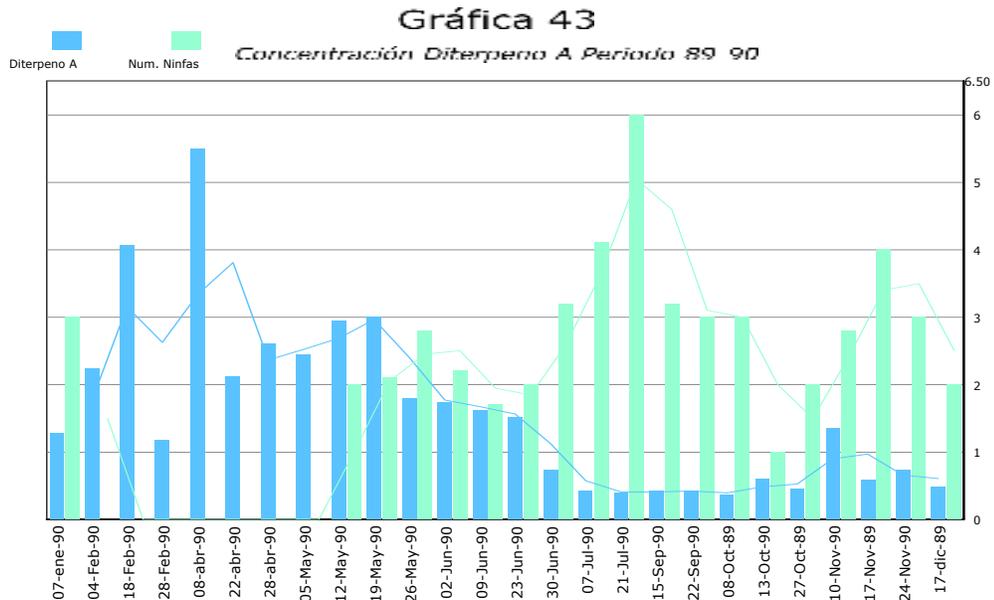


Grafica 42
 Concentración de Mairretiolida Periodo 92-93



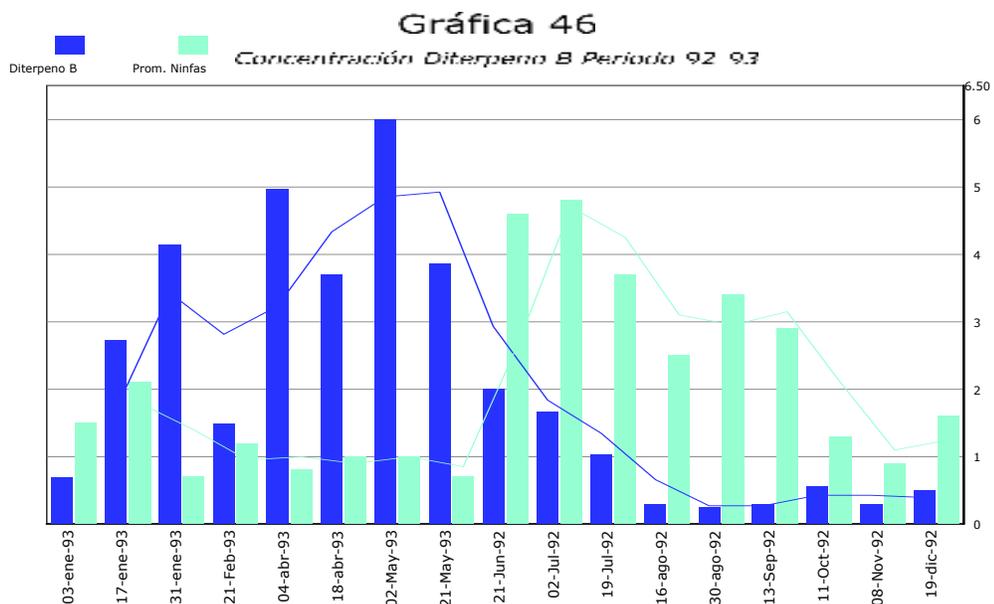
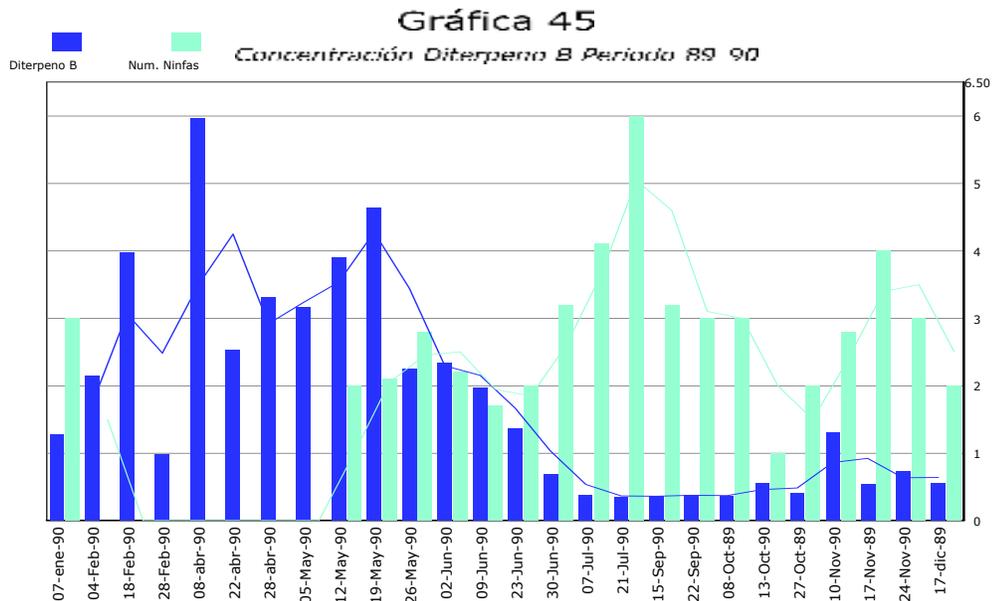
En las gráficas 41 y 42 tenemos que la concentración de Mairretiolida muestra una relación inversa a la densidad poblacional de los adultos de *Empoasca sp.*, para los dos periodos de colecta.

Al correlacionar la información de concentración relativa de los dos diterpenos con la densidad de ninfas y adultos de *Empoasca sp.*, durante cada uno de los dos periodos de muestreo, se tienen las siguientes graficas.



En las gráficas 43 y 44 se observa que la densidad de ninfas de *Empoasca sp.* es inversamente proporcional a la concentración del

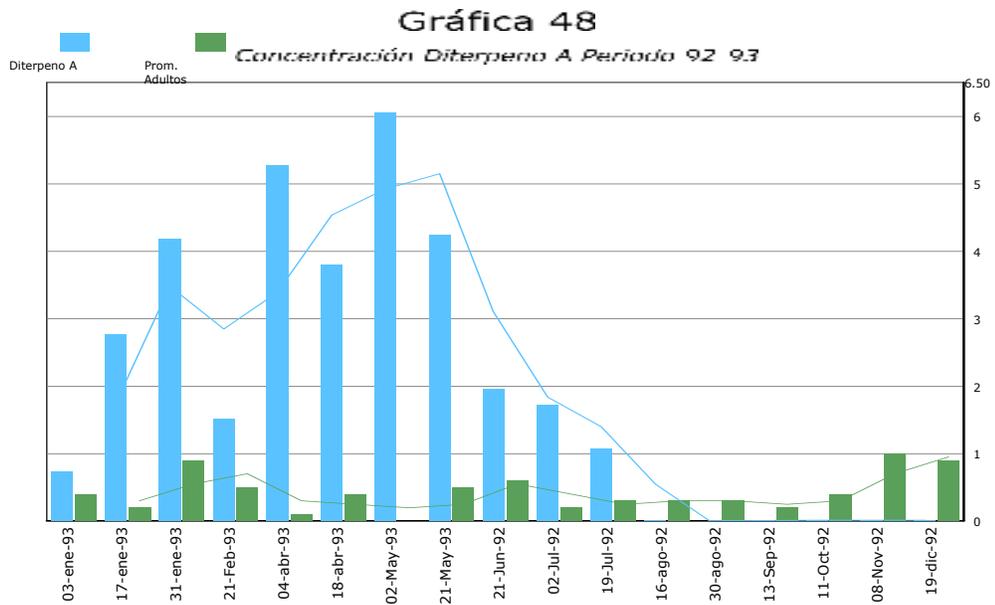
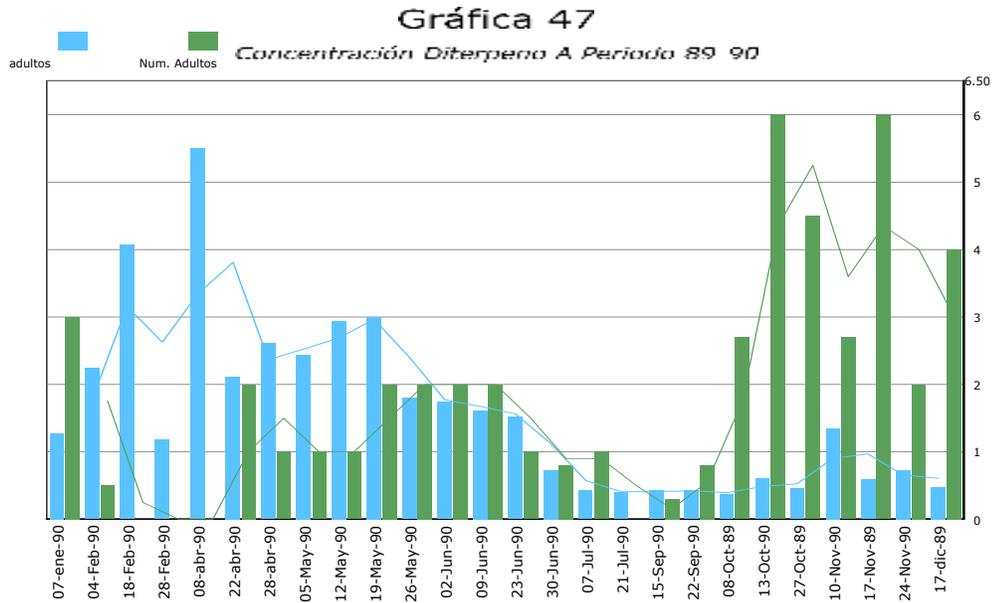
Diterpeno A, a mayor concentración de diterpeno **A** menor densidad de ninfas, con un umbral de disparo, en lo que parece un efecto modulador de la planta sobre el insecto.



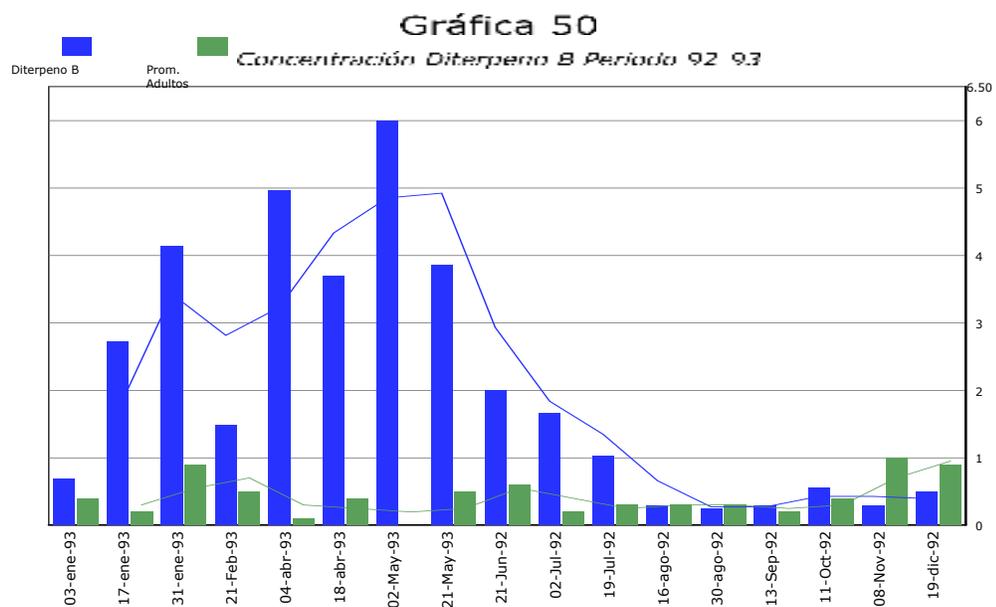
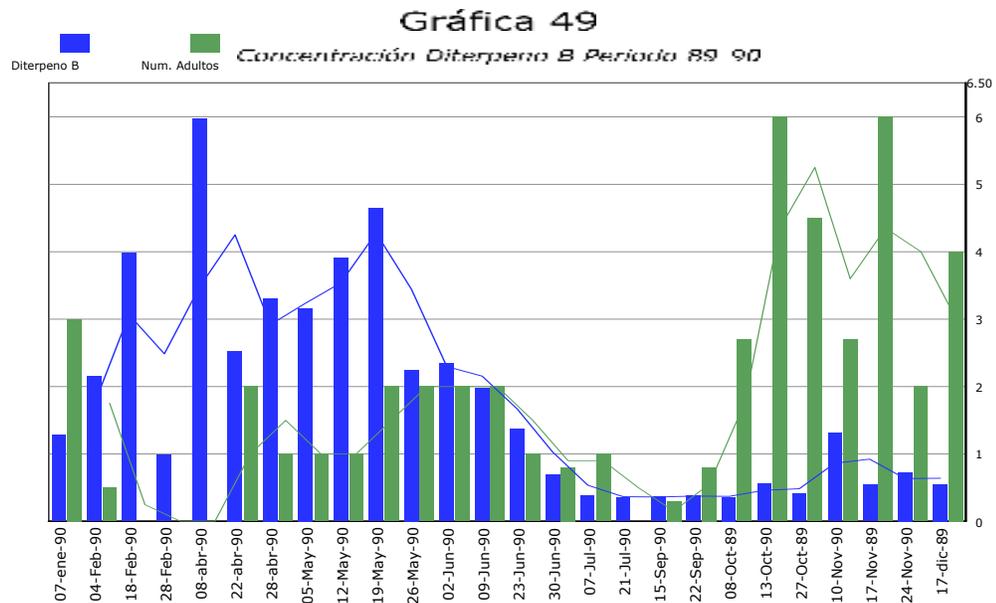
Al observar las gráficas 45 y 46, de la concentración relativa del diterpeno B con respecto a la densidad poblacional de ninfas de

Empoasca sp., en los dos períodos se aprecia el efecto inverso proporcional como en el caso del diterpeno A.

La concentración relativa de los diterpenos A y B con respecto a la densidad poblacional de adultos de ***Epoasca sp.***, para los dos periodos revisados se muestra en las siguientes graficas:



En las gráficas 47 y 48 se ve una relación inversa de la concentración de Diterpeno A con respecto a la densidad de adultos.



En las gráficas 49 y 50 se observa, en los períodos estudiados que la concentración del Diterpeno B afecta a la densidad poblacional de adultos de forma inversa.

7.- Discusión y Conclusiones.

La identificación de la chicharrita solo se pudo llevar hasta el nivel de género, esto es porque en nuestro país existen muy pocos taxónomos que se dediquen al estudio de la Familia *Cicadellidae*, además en la época en que se realizó el estudio había aun menos información sobre estos insectos, de tal forma que no fue posible conseguir las claves taxonómicas para determinar a qué especie pertenece el insecto.

Respecto a las mediciones del área foliar se hicieron de cien hojas en distintos estados de desarrollo, además de medir con un vernier el largo y ancho de esas hojas, entre las que se entraban desde 1.5 cm hasta hojas grandes de 17.0 cm de largo, estas medidas se relacionaron con el área foliar medida, para deducir el modelo matemático que resulto ser lineal con las constantes; pendiente de 6.4×10^{-1} y ordenada al origen de 13.05, que son características para las hojas de *Ageratina mairiana* D. C.

La mayor dispersión de área foliar con respecto al factor de largo por ancho de las hojas de *Ageratina mairiana* D. C., se da en puntos donde las hojas son pequeñas (ya sean tiernas o maduras pequeñas) y en el extremo superior (que son las hojas de más de 15 cm de largo), donde la curva pierde linealidad de la relación **$A = (L \times a) 6.4 \times 10^{-1} + 13.05$** .

Con la ayuda del modelo anterior y un vernier se midieron en campo y colectaron hojas con un tamaño que dan un área foliar de 1.3 ± 0.1 dm² para el periodo 89-90 y 1.5 ± 0.1 dm² para el periodo 92-93 sobre las cuales se censaron los insectos en cada muestreo, estas hojas se preservaron para realizar posteriormente los análisis fitoquímicos.

Al muestrear hojas con una longitud y ancho aproximadamente del mismo estadio fenológico ayuda a que el peso del material vegetal colectado sea constante, lo que permite hacer con mayor facilidad los análisis cromatográficos cuantitativos de los metabolitos secundarios (lactonas sesquiterpénicas y diterpenos).

El muestreo de hojas de ***Ageratina mairiana*** D. C. y los censos de ***Empoasca sp.***, se hicieron en dos periodos no consecutivos y aleatorios, ya que el primero de ellos inicio el 8 octubre de 1989 y terminó el 28 de noviembre de 1990 los intervalos entre colectas fueron de siete días, las colectas y los censos se realizaron sobre tres de los diez individuos de ***Ageratina mairiana*** D. C. que están localizados en la misma hondonada.

El segundo período de muestreo principio el 21 de junio de 1992 y concluyó el 21 de mayo de 1993 en esta ocasión las colectas de hojas y censos de insecto se realizaron cada 14 días, en este periodo el censó se hizo sobre $1.5 \pm 0.1 \text{ dm}^2$ de área foliar en cada uno de diez individuos de ***Ageratina mairiana*** D. C. que se encuentran en la misma hondonada, promediándose la cantidad de insectos, dicho promedio se expresa en las graficas como los encontrados sobre esa área foliar ($1.5 \pm 0.1 \text{ dm}^2$), lo que hace que disminuya el número de individuos censados del primer periodo con respecto al segundo periodo.

Respecto a los estadios del ciclo de vida de ***Empoasca sp.***, sobre las hojas de ***Ageratina mairiana*** D.C., se observaron tres periodos de máxima densidad poblacional, a lo largo de un año, el primero de principios de mayo a fines de junio teniendo el máximo de densidad el 26 de mayo, el segundo de principios de julio, que llega al máximo de

densidad el 21 de julio y 4 de agosto, declinando hacia el 13 de octubre y el tercero entre el 17 de diciembre, estos durante el periodo 89-90.

Para el año 92-93 también se observan tres oscilaciones en la densidad de los estadios ninfales, el primero que entre el 30 de mayo y el 2 de agosto, con el máximo de densidad poblacional el 5 de julio, la segunda oscilación inicia el 16 de agosto alcanzando el máximo de densidad el 30 de septiembre y descendiendo a un mínimo el 6 noviembre, punto de inflexión donde inicia el tercer estadio que llega al máximo de la densidad el 17 de enero baja al mínimo el 21 de marzo.

Los perfiles de distribución poblacional de las ninfas por unidad de área son semejantes en los dos periodos de recolección y censos. Al comparar los dos períodos se observan pequeñas diferencias y un desfase de las oscilaciones, que se atribuyen al intervalo de colecta que fue diferente, así como al número de plantas sobre las cuales se censo a ***Empoasca sp.***

De los datos obtenidos para la densidad de adultos de ***Empoasca sp.*** sobre ***Ageratina mairiana*** D.C., se observa que hay cuatro periodos de oscilación para el periodo 89-90; el primero entre finales de noviembre y principios de febrero, el segundo de mediados de abril a principios de mayo, el tercero de mediados de mayo a mediados de julio y el cuarto de mediados de septiembre a mediados de noviembre. Para el periodo 92-93 se observan los cuatro oscilaciones en la densidad poblacional de adultos pero desfasados un mes con respecto al periodo 89-90, donde se observan con más claridad dos intervalos de tiempo en que la cantidad de individuos llega a cero el primero de mediados de febrero a principios de abril, que coincide con la época de floración y el segundo de mediados de

julio a principios de agosto, que coincide con la época de mayor precipitación pluvial y la de defoliación de ***Ageratina mairiana*** D.C.

La longevidad de individuos del género ***Empoasca*** en condiciones laboratorio y jaulas vivero, se ve afectada por condiciones de temperatura y fotoperiodo según Wilde et. al. 1976 y Leite Filho y Ramalho 1979, esto pudo afectar en las variaciones de datos obtenidos de la densidad poblacional en los estadios de ninfas y adultos de ***Empoasca sp.*** además de la perturbación humana.

Durante el desarrollo del presente trabajo el área de estudio sufrió seria perturbación, por acción humana se pudo y "limpio" el dosel del suelo, dañando y suprimiendo las especies menores de la vegetación secundaria, las cuales son hospederos alternantes de los adultos de ***Empoasca sp.*** lo que se reflejó en la densidad poblacional de los insectos adultos. Esto no ocurre en los estadios juveniles, dado que las ninfas no tienen alas y su desarrollo se da obligadamente sobre las hojas de ***Ageratina mairiana*** D. C.

Para el estudio del efecto de las lactonas sesquiterpénicas sobre la densidad poblacional de ***Empoasca sp.***, estas se dividieron en dos grupos las de tipo Pseudoguayano y las del tipo guayano.

Las de tipo Pseudoguayano que son la 8-10-bis-epi-Aromaticina, la Burrodina y la Confertina, de la variación en concentración de la 8-10-bis-epi-Aromaticina y la Confertina se infiere que no afectan la densidad poblacional de ninfas de ***Empoasca sp.*** en ninguno de los dos periodos analizados (ver gráficas 23, 24, 27 y 28).

En cambio variaciones en concentración de la Burrodina a lo largo de los dos periodos inducen un efecto biomodulador de la densidad

poblacional de ninfas de ***Empoasca sp.*** En las gráficas se observa una correlación inversamente proporcional a mayor concentración de Burrodina menor número de ninfas y a menor concentración de esta pseudoguayanolida mayor numero de ninfas (ver gráficas 25 y 26).

En cuanto a la variación de concentración de las lactonas de tipo guayanolido (8-epi-Inuviscolida y Mairetiolida), en los dos periodos de muestreo, se observa que tienen el mismo efecto que la Burrodina, a mayor concentración de 8-epi-Inuviscolida y Mairetiolida disminuye el número de ninfas (ver gráficas 29, 30, 31 y 32).

De la correlación de la densidad poblacional de adultos de ***Empoasca sp.*** con la variación de concentración de la Pseudoguayanolida, Confertina se deduce que no hay algún efecto sobre los adultos de ***Empoasca sp.***, en los dos períodos. (ver gráficas 37 y 38).

De los datos de la 8-10-bis-epi-Aromaticina se infiere una correlación inversamente proporcional entre su concentración y la densidad poblacional de adultos a mayor concentración menor número de individuos. El mismo efecto se da con la Burrodina de lo que se deduce un efecto repulsivo sobre los adultos de ***Empoasca sp.*** en dos intervalos muy marcados, uno de ellos de principios de febrero al 22 de abril y el segundo del 15 de septiembre al 13 de octubre de 1990 (ver gráfica 35). Para el período 92-93 se observo el mismo comportamiento, estos intervalos son del 16 de agosto al 11 de octubre de 1992 y del 3 enero al 21 de febrero de 1993 (ver gráfica 36).

En cuanto a la variación de concentración de las lactonas de tipo guayanolido la 8-epi-Inuviscolida presenta una relación inversa entre su concentración en las hojas y el número de adultos, es decir a mayor concentración de 8-epi-Inuviscolida hay menor número de adultos, lo cual

indica una actividad repulsiva hacia los adultos de ***Empoasca sp.*** La misma actividad se observa con la Mairetiolida en los dos períodos (ver gráficas 39, 40, 41 y 42)

En los extractos de las hojas de ***Ageratina mairetiana*** D. C. recolectadas en la etapa cercana a la época de defoliación, se observó la presencia de compuestos diferentes a las lactonas. Estos compuestos se separaron y purificaron. El análisis espectroscópico de estos productos reveló su naturaleza diterpenica. Con anterioridad se aisló de ***Ageratina mairetiana*** D. C., (Macías G., 1979 tesis) el Acido mairetiánico, este es un diterpeno con esqueleto de Clerodano, este reporte facilitó la elucidación de la estructura de los dos diterpenos que en esta ocasión fueron aislados de la planta.

En las muestras recolectadas en los dos periodos no se observo la presencia del Acido Mairetianico; los diterpenos que se aislaron se denominaron; diterpeno A y diterpeno B. (ver estructuras de la pagina 113).

En el período 89-90, el diterpeno B está presente de diciembre a junio y la mayor concentración se observó hacia el final de la floración (fines de marzo) etapa en la cual el follaje de ***Ageratina mairetiana*** D.C. disminuye en aproximadamente un 80% con respecto a la etapa vegetativa. Como se ve en las gráficas (43, 44, 45 y 46), la densidad poblacional del insecto es baja y prácticamente no existen ninfas, ni adultos de ***Empoasca sp.*** en este estadio. En las gráficas (43, 44, 45 y 46) se observa un efecto modulador de los dos diterpenos con un umbral de disparo para esta actividad sobre la densidad poblacional de ninfas.

El diterpeno A y el diterpeno B se presentan en una concentración que como en el caso de las ninfas, modulan el número de individuos adultos de ***Epoasca sp.*** (ver gráficas 47, 48, 49 y 50).

El presente estudio es un aporte a la biología poblacional de ***Epoasca sp.*** y en particular a su densidad poblacional con respecto a la concentración de lactonas sesquiterpénicas de ***Ageratina mairetiana*** D.C., así como a las variaciones de concentración de estas lactonas en las hojas de ***Ageratina mairetiana*** D.C. a lo largo del año.

La diferencia en el tipo de estructura de las lactonas; de Guayanolidas y Pseudoguayanolidas no es lo que les confiere la actividad inversamente proporcional a la densidad poblacional de adultos o ninfas de ***Epoasca sp.***,

La 8-10-bis-epi-Aromaticina, la Burrodina, la 8-epi-Inuviscolida y la Mairetiolida deben ser probadas en experimentos posteriores, para determinar su toxicidad y la LD₅₀ sobre individuos en distintos estadios de vida de ***Epoasca sp.***

8.-Bibliografía.

Ahmed A., Douglas A.G., J. Calderón and T.J. Mabry 1985 Labdane Diterpenes from *Brickellia vernicosa* Phytochemistry 25(6):1385-1388.

Anaya A.L., Espinosa-García F. J. y Cruz Ortega R. (eds) 2001 Relaciones Químicas entre Organismos. Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México y Plaza y Valdez 733pp.

Askew J., 1971 Parasitic Insects Am. Elsierier Publishing Co. New York.

Barbosa P., Schultz C.J.(eds) 1989 Insect Out Breaks. University of Maryland, College Park.

Barnes R.D., 1977 Zoología de los Invertebrados 3a. ed., Ed. Interamericana.

Bazzaz A.F., 1990 Annu. Rev. Ecol. Syst. 167

Bryant, J.P., P.B. Reichardt and T.P. Clausen. 1992. Chemically mediated interactions between woody plants and browsing mammals. J. Range Manage., 45: 18-24.

Bell, W.J., and Barth, R.H., Jr., 1971 Nature (London) New Biol. 230: 220-222.

Bentley, M.D., D.E. Leonard, W.F. Stoddard and L.H. Zalkon, 1984 Pyrrolizidine Alkaloids as Larval Feeding Deterrents for Spruce Budworm *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 77:393-397.

Betskouski M. and Marby J.T. 1975 Rev. Latinoamer Quim., 6, 191.

Bohlman F. Zdero Ch., King R., Robinson H., 1973 Neve Elemanolide und Guanolide aus Zinnia- Arten. Phytochemistry 18, 1343.

Borror D.J., D.M. De Long and C.A. Triplehorn, 1976 An Introduction to the Study of Insects 4th. ed. Holt Rinehart & Winston New York.

Bravo H., H. González, 1988 Plagas de Frutales. Colegio de Postgraduados. pags 54-71 México.

Brues C.T., A.T. Melander and F. M. Carpenter, 1954 Zoology: Clasification of Insects. Cambreidge Mass. Printed for The Museum Harvard College Bulletin of The Museum of Comp. Zo.

Burnside, V.W., 1971. General Catalogue of the Homoptera. Index to Genera and Species with Addenda and Corrigenda to Parts 1-17. Journal of the North Carolina State University Agricultural Experiment Station 2980, 1-269.

Carlson, O.V.; Hibbs, E.T. 1962. Direct counts of potato leafhopper, *Empoasca fabae* eggs in *Solanum* leaves. Ann. Entomol. Soc. Am. (EE.UU.) 55:512-515

Coley, P.D., J.P. Bryant & F.S. Chapin III. 1985. Resource availability and plant anti-herbivore defense. Science, 230: 895-899.

Coley, P.D. 1987. Interespecific variation in plant antiherbivore properties: The role of habitat quality and rate of disturbance. New Phytologist 106:2151-263.

Columbia Electronic Encyclopedia 2005, Columbia University Press. Licensed from Columbia University Press. All rights reserved. www.cc.columbia.edu/cu/cup/

Crawley, M.L., 1982 Herbivory The Dynamics of Animal-Plant Interactions. Studies in Ecology 10 Blackwell Sci. Pub. London.

Cheeke, P.R. and R.T. Palo. 1995. Plant toxins and mammalian herbivores: co-evolutionary relationships and antinutritional effects. In: M. Journet, E. Grenet, M-H. Farce, M. Th eriez, C. Demarquilly (Ed.) Recent developments in the Nutrition of Herbivores. Proceedings of the IVth International Symposium on the Nutrition of Herbivores pp: 437-456. INRA Editions, Paris.

De Bach, P., 1974 Biological Control of Insects Pest and Weeds. Reinhold, New York.

DeLong, D. M. 1971. The bionomics of bafhoppers. Ann. Rev. Entomol. (EE.UU.) 16:197-210.

Dirzo, R. 1984 Insect-Plant Interactions: Some ecophysiological consequences of herbivory. In: Medina; E., H.A. Mooney and C. V azquez-Yanez. eds. Physiological ecology of the wet tropics. W. Junk La Haya. pp. 209-224.

- Dirzo, R. 1985 Metabolitos Secundarios en las Plantas Ciencias 36, 137.
- Ebelin W., 1959 Subtropical Fruit Pest Univ. Cal. D.A.
- Edwards, P.J. and S.D. Wratten, 1980 Ecology of Insects Plant Interactions. Studies in Biology 121 Edward Arnold.
- Egerton F.N.; 1968 Leewenhoek as founder of animal demography. J. Hist. Biol., 1:1-22
- Ehrlich, P. and P. H. Raven, 1964 Butterflies and Plants: A study in coevolution. Evolution (Lawrence, Kans.) 18: 586-608.
- Elliger, G.A., Zinkel, D.F., Chan, G.B. and Waiss A.C. Jr., 1976 Experientia 32 1364-1366.
- Emerciano V de P., M.J.P. Ferreira, M.D. Branco, J.E. Dubois, 1998 The application of Bayes' theorem in natural products as a guide for skeletons identification Chemoetrics and Intelligents Laboratory Systems 40. 83-90.
- Enriquez R.G., M.L. Romero, Escobar L.I. Joseph-Nathan P. and Reynolds, 1984 High-performance liquid chromatographic study of *Casimiroa edulis* Journal of chromatographic 287 p 209-214
- Espinoza G.J., 1962 Vegetación de Una Corriente de Lava de Formación Reciente, Localizada en el declive meridional de la Sierra de Chichinutzin. Boletín de la Sociedad Botánica de México 27, 67-98.
- Fang N., T.J. Mabry, 1988. Phytochemistry 27, 283-285.
- Feeny, P., 1976 Plant apparency and chemical defense Recent. Adv. Phytochem. 8:219-2126.
- Feeny, P., 1987 Insects-Plants (Labeyrie, V., Fabres G. And Lachaise, D. eds.) W. Junk Publishers Dordrecht, The Netherlands.
- Feeny, P., K. Sachdev, L. Rosenberry and M. Carter, 1988 Luteolin 7-O-(6''-O Malonyl)- β -D-Glucoside & Transchlorogenic Acid: Oviposition Stimulants for The Black Swallowtail Butterfly. Phytochemistry 27 (11) pp 3439-3448.
- Frankel, G., 1959 The raison d'être of secondary plant substances Science 129:1466-1470.

Frías, C., 1956, Bosquejo Geológico de la Región entre México, D.F. y Taxco Gro 20º Cong. Geol. Internal (México) Libreta-guía A-4 y C-2 p.11-36.

Frías, C., 1956 b (1957), Bosquejo Geológico de la Región Entre México, D.F. y Acapulco, Gro. 20º Cong. geol. Internal. (México) Libreta-guía excusiones A-9 y C-12 en Asoc.mex. geólogos petrol., Bol., V.9, nº 5-6, p 287-332.

Frías, C., 1960 Geología del Estado de Morelos y de Partes Adyacentes de México y Guerrero Región Central Meridional de México. UNAM. Inst. de Geología.

García, E., 2004 Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México.

Geissman T.A., Matsueda S., 1968 Sesquiterpene lactones, constituents of diploid and poliploid *Ambrosia dumosa* Gray. *Phytochemistry* 7, 1613.

Gilbert, L.E. and P.H. Raven (eds) 1975 *Coevolution of Animals and Plants*. University of Texas Press Austin.

Gomez, I A.; Schoonhoven, A. Van. 1977. Oviposición de *Empoasca kraemeri* en frijol y evaluación del parasitismo por *Anagrus* sp. *Revista Colombiana de Entomología* (Col.) 3(1-2):29-38.

Gómez-Pompa Arturo, 1976 *Antología Ecológica*, Ed. Universidad Nacional Autónoma de México.

Harbone J.B. (de), 1972 *Phytochemical Ecology* Academic Press New York.

Harborne, J.B. 1993. *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press. London.

Heywood V.H., Harbone J.B. & B.L. Turner, 1977 *Biology & Chemistry of The Compositae*. Academic Press London vol. 2.

Heywodd V. H., (1981) *The Biology and Chemistry of Compositae*, Ed. Academic Press 2 vol, pag 663

Huffaker, C.B. (ed.) 1971 *Biological Control* Plenum Press New York.

Kitchell, F.J., R.V. O'Neill., 1986 *Consumer Regulation of Nutrient Cycling*. *Bioscience* 29(1):28-33.

Köppen, F., 1936 Handbuch der Klimatologie. Band V., Teil C., Das Geographische System der Klimate Berlin.

Krieger I.R., P.P. Feeny, and C.F. Wilkinson, 1971 Detoxification Enzymes in the Guts of Caterpillars: An Evolutionary Answer to Plant Defenses? Science 172:579-581.

Kupchan S.M., Kelsey J.B., Murayama M. and Cassady J.M. 1968 Tetrahedron Letters, 31, 3517.

Kupchan S.M., Enkin M.A., and Thomas A.M. 1971 J.Med. Chem., 14, 1147.

La Spina, M.; Hermoso de Mendoza, A.; Toledo, J.; Albuje, E.; Gilabert, J.; Badia, V.; Fayos V.; 2005: Prospección y estudio de la dinámica poblacional de cicadélidos (Hemiptera, Cicadellidae) en viñedos de las comarcas meridionales valencianas; Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas nº 31(3), pag. 397 – 406

La Spina, M.; Hermoso de Mendoza, A.; 2005: Los cicadélidos de la vid; Terralia nº 47, pag. 62 – 67.

Lawton, R., 1984 Chemical Ecology of Insects, Insects on Plants.

Lena B., Bradston & Sami Ahmah, 1984 Molecular Aspects of Insect-Plant Association Academic Press.

Leite Filho, A.S.; Ramalho, F.S. 1979. Biología da "Cigarrinha verde" *Empoasca kraemeri* (Ross y Moore, 1957) em feijao de corda. Anais da Soc. Entomol. do Brasil 8(1):93-101.

Maes, J. M., Freytag P. H. & C. Godoy (1993)

Macías G., 1979 Aislamiento y Determinación de la Estructura de un Nuevo Diterpeno. Acido Mairetiano. Tesis (licenciatura) Universidad Autónoma de Puebla.

Mancera V. Cl., 1982 Lactonas Sesquiterpénicas en *Eupatorium mairetianum* D.C. Tesis (Maestría) Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Mann, J., 1987 Secondary Metabolism: Secondary Metabolism and ecology 2 de. Oxford Science Publications pp. 303-321.

May R. M. 1979 La Evolución de los Sistemas Ecológicos. Evolución Prensa Científica S. A. p 103.

Milne & Milne, 1980 The Audobon Soc. Field Guide to North American. Ins. & Spd. N.Y.

Miranda, F., 1941 La Vegetación de los Cerros al Sur de la Meseta del Anahuac; el Cuajototal Inst. Biología (México) Anales vol. 12 p 569-614.

Miranda, F., 1947 Estudio Sobre la Vegetación de México. Rasgos de la Vegetación en la Cuenca del Rio Balsas. Revista Soc. Mexicana Hist. Nat. vol. 8 p 1-4, p 95-114.

Moffitt, H.R.; Reynolds, H.T. 1972. Bioeconomics of Empoasca solana DeLong on cotton in Southern California. Hilgardia (EE.W.) 41:247-297.

Mosser, F., 1956 (inédito), Bosquejo Geológico del extremo Sur de la Cuenca de México; 20º Cong. geol. internal. (México) libreta-guía Excursion C-9

Muller, C H., W.H. Muller & B.L. Haines, 1964. Volatile growth inhibitors produced by aromatic shrubs, Science 143: 471-473

Nienmeyer, H.M., 1988 Hydrodynamic Acids (4-hidroxy-1-4-Benzozin-3-ones) Defense Chemicals in the Gramineae Phytochemistry 27(11): 3349-3358.

Odum Eugen P., 1959 Fundamentals of Ecology W. B. Saunders Co. Philadelphia

Oyama, K. y F. Espinosa, 1986 Herbívoros y Plantas ¿Cómo interactúan? Ciencias 9:38-46.

Paray L. 1953 Las Compuestas del Valle Central de México Bol. Soc. Bot. México 15:1-12 y 19:1-15.

Pimienta, E. and V.S. Polito, 1982 Ovule Abortion in NonPareil Almond Prunus Dulcis (Mill) D.A. Webb. Amer J. Bot. 69(6): 913-920.

Pizzamiglio, M.A. 1979. Aspectos da biología de Empoasca kraemeri (Ross and Moore, 1957) (Homoptera: Cicadellidae) em Phaseolus vulgaris (Linnaeus, 1753) e ocorrência de parasitismo em ovos. Anais da Soc. Entomol. do Brasil 8(2):369-372.

Price P.W. 1984. Insect Ecology. Jhon Wiley & Sonns.

Quayle R., 1941 Insects of citrus & other subtropicals, Com stock Publishers Co. New York, 355-358.

Ramalho, F.S. 1978. Efeitos da Epoca da infestação da Cigarrinha verde, *Empoasca kraemeri* Ross and Moore, 1957 (Homoptera, Typhlocibidae). *Anais da Soc. Entomol. do Brasil* 7(1):30-32.

Rhoades, D.F., and R.G. Cates 1976 Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry In Wallace, J. W., and R. L (eds.) *Biochemical Interactions Between Plants and Insects* pp. 168-213. Plenum Press New York.

Rhoades, D.F. 1979. Evolution of plant chemical defense against herbivores. In: G.A. Rosenthal and D.H. Janzen (Ed.) *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites* pp: 3-54. Academic Press, New York.

Rockstein, M. (de.), 1978 *Biochemistry of Insects*. Academic Press New York.

Rodriguez E. 1977 *Rev. Latinoamer. Quim.*, 8,56.

Romo J., Romo de Vivar A., Vélez A., Urbina E., 1968 Franserin and Confertin: new pseudoguaianolides isolated from *Franseria* and *Ambrosia* species. *Can. J. Chem.* 46, 1535-1538.

Rosenthal G.A. 1986 *The Chemical Defenses of Higher Plants* *Sci. Am.* January.

Rosenthal G.A., D.H. Janzen (eds) 1979 *Herbivores Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*, Academic Press New York.

Sami Ahmad, M., L. Stanton (eds.) 1983 *Herbivorous Insects Host-Seeking Behavior and Mechanisms Spatial Patterns in The Plant Community and Their Effects upon Insect Search*. Academic Press, pp. 125-157.

Schoonalter, T. D., 1981 Insect herbivore relationship to the state of the host plant: biotic regulation, *Oikos* 37(1):126-130.

Schoonhoven, A. Van; Gomez, C.; Avalos, F., 1978. The influence of leafhopper (*Empoasca kraemeri*) attack during various bean (*Phaseolus vulgaris*) plant growth stages on seed yield. *Entomología Experimentalis et Applicata* (Netherlands) 23(2):115-120.

Segnini, Montagne A. 1986 Biología Y Ecología Poblacional de *Empoasca kraemeri* Ross y Moore (Homoptera: Cicadellidae) en caraota (*Phaseolus vulgaris*), II. Ciclo de vida, longevidad, fecundidad y sobrevivencia de *E. Kraemeri* bajo condiciones de laboratorio. Parte de la tesis de grado del primer autor para optar al Doctorado en Entomología, UCV Facultad de Agronomía. Financiada por la Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias. Mérida, Venezuela.

Sequeira L., Heminway R.J. and Kupchan S.M. 1968 *Science* 161, 786.

Smith, I. (ed.) 1960 *Chromatographic and Electrophoretic Techniques 1: Chromatography*. William Heinemann, London and Interscience, New York.

Southwood J., 1984 *Insects on Plants*. Oxford Press.

Trumman, J.W., 1973 *Amer. Sci.* 61: 700-706.

Trumman, J.W., Fallon, A.M., and Wyatt, G.R., 1976 How Moths "Turn On" A Study of the Action Hormones on the Nervous System. *Science* 194: 1432-1434.

Waiss, A.C., Jr. Chan, B.C. and Elliger, C.A., 1977 Hormonal Release of Programmed Behavior in Silk Moths. Probable Mediation by Cyclic AMP. *ACS Simp. Ser.* 62, 115-129.

Wilde, G.; Schoonhoven, A. Van; Gomez Laverde, I. 1976. The biology of *Empoasca kraemeri* on *Phaseolus vulgaris*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* (EE.UU.) 69(3):442-444

Wittaker, R.H. and Feeny P.P., 1971 *Allelochemicals: Chemical Interactions between Species* "Chemical agents are of major significance in adaptation of species and organization of communities" *Science* 171:757-770.

Yoshioka H., and T. J. Mabry, B.N. Timmermann, 1973 *Sesquiterpene Lactones Chemistry, NMR and Plant Distribution*. University of Tokyo Press.

Young, D.A. (1965). Cicadelline types in the British Museum (Natural History) (Homoptera: Cicadellidae). *Bulletin of the British Museum (Natural History), Entomology* 17(4): 163-199.

Young, D.A. (1968). Taxonomic study of the Cicadellinae (Homoptera: Cicadellidae). Part 1. Proconiini. United States National Museum Bulletin 261: 1-287.

Young, D.A. (1977). Taxonomic study of the Cicadellinae (Homoptera: Cicadellidae). Part 2. New World Cicadellini and the genus Cicadella. North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin 239: 1-1135.

Young, D.A. (1979). A review of the leafhopper genus *Cofana* (Homoptera: Cicadellidae). Proceedings of the Entomological Society of Washington 81(1): 1-21.

Young, D.A. (1986). Taxonomic study of the Cicadellinae (Homoptera: Cicadellidae) Part 3. Old World Cicadellini. Technical Bulletin of the North Carolina Agricultural Research Service 281: 1-639.

Young, D.A. and Beier, M. (1964). Types of Cicadellinae (Homoptera: Cicadellidae) in the Natural History Museum in Vienna. Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien 67, 565-575.