



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD DURANGO**

**SUSCEPTIBILIDAD DE *Epilachna varivestis* Mulsant al aceite
esencial de orégano mexicano y de neem en condiciones
de laboratorio**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN GESTIÓN AMBIENTAL**

PRESENTA:

ALEJANDRO LEAL SÁENZ

DIRECTORES:

DR. GERARDO PÉREZ SANTIAGO

M. C. REBECA ÁLVAREZ ZAGOYA



Victoria de Durango, Dgo., Diciembre 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Durango, Dgo. siendo las 9:30 horas del día 28 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-IPN DGO para examinar la tesis titulada:

Susceptibilidad de *Epilachna varivestis* Mulsant al aceite esencial de orégano mexicano y de Neem en condiciones de laboratorio.

Presentada por el alumno:

LEAL

Apellido paterno

SAENZ

Apellido materno

ALEJANDRO

Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	2	0	3
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

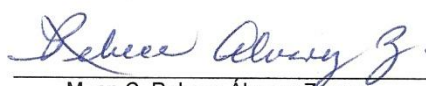
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN GESTIÓN AMBIENTAL

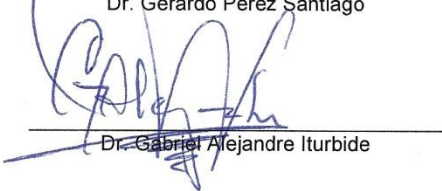
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


Dr. Gerardo Pérez Santiago

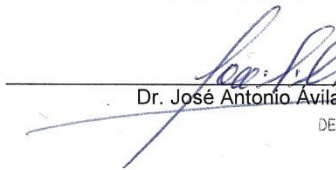

M. en C. Rebeca Álvarez Zagoya


Dr. Gabriel Alejandro Iturbide


M. en C. Martha Celina González Güereca


M. en C. María Pioquinta González Castillo

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. José Antonio Avila Reyes


CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD DURANGO
I.P.N.



SIP-13-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 18 de Noviembre del 2010

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-IPN Durango en su sesión ordinaria No. 3 celebrada el día 4 del mes de Marzo conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

LEAL

SAENZ

ALEJANDRO

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre (s)

Con registro:

B	0	9	1	2	0	3
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Maestría en Ciencias en Gestión Ambiental

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

"Susceptibilidad de *Epilachna varivestis* Mulsant al aceite esencial de orégano mexicano y de Neem en condiciones de laboratorio"

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:

Dr. Gerardo Pérez Santiago y M. en C. Rebeca Álvarez Zagoya3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:
CIIDIR-IPN Unidad Durango

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

Dr. Gerardo Pérez Santiago

Aspirante

Alejandro Leal Saenz

M. en C. Rebeca Álvarez Zagoya

Presidente del Colegio

Dr. José Bernardo Pinal Nájera

CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD DURANGO



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **DURANGO, DGO.**, el día **28** del mes **NOVIEMBRE** del año **2011**, el (la) que suscribe **LEAL SAENZ ALEJANDRO** alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN GESTIÓN AMBIENTAL** con número de registro **B091203**, adscrito a **CIIDIR- IPN UNIDAD DURANGO**, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **DR. GERARDO PÉREZ SANTIAGO** y la **M. EN C. REBECA ÁLVAREZ ZAGOYA** y cede los derechos del trabajo intitulado **“SUSCEPTIBILIDAD DE *Epilachna varivestis* Mulsant AL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO MEXICANO Y DE NEEM EN CONDICIONES DE LABORATORIO”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **ceveline@hotmail.com**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


ALEJANDRO LEAL SAENZ
Nombre y firma

La presente investigación se desarrollo en el laboratorio de Entomología del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango del Instituto Politécnico Nacional, como parte del proyecto, Biodiversidad de artrópodos de los Valles del Guadiana, Poanas y el Mezquital, Durango, con clave SIP 20113571, bajo la dirección del Dr. Gerardo Pérez Santiago y la M. C. Rebeca Álvarez Zagoya.

DEDICATORIA

A mi madre:

Hilda Sáenz García

Por siempre estar a mi lado, apoyándome en los momentos más difíciles, dándome,
la fuerza y el amor que me han dirigido por la vida y me han dado las alas que
necesitaba para volar

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT, PIFI INSTITUCIONAL por las becas otorgadas con la cuales pude realizar mi investigación.

Al CIIDIR-IPN Unidad Durango por proporcionarme una herramienta más en mi vida y darme la oportunidad de ser parte de esta honorable institución.

A mis directores de tesis: Dr. Gerardo Pérez Santiago y M. C. Rebeca Álvarez Zagoya por la paciencia, el profesionalismo y su amistad durante el transcurso de la maestría.

A mis asesores de tesis: M. C. Martha Celina González Güereca y Dr. Gabriel Alejandro Iturbide por realizar valiosas aportaciones al desarrollo de esta tesis, además de proporcionarme su amistad.

Al Dr. Isaías Cháirez Hernández y la M. C. María P. González Castillo por realizar excelentes aportaciones en la revisión de este trabajo y brindarme su amistad incondicional.

Al M. C. Sergio N. Rivas Alvarado por haber aportado información valiosa en la tesis y la amistad brindada en el transcurso de la maestría.

Al M. C. Ramón Silva Vázquez por haberme ayudado en los análisis y la información de los aceites esenciales de orégano utilizados en la tesis.

Al Dr. Armando Cortés Ortiz por ayudarme a la obtención de información de las características climáticas y edafológicas del sitio de Chihuahua, gracias.

A mis maestros durante el transcurso de mi maestría, los cuales me proporcionaron grandes conocimientos y entablé buenas amistades.

A mis compañeros de generación con los cuales compartí momentos buenos y malos, brindándome siempre su amistad, en especial a: Gloria García Rodríguez, Lilia Catalina Corral Torrecillas y José Acevedo Herrera.

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE ACRÓNIMOS.....	i
SIMBOLOGÍA.....	ii
RELACIÓN DE CUADROS.....	iv
RELACIÓN DE FIGURAS.....	v
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
I.-ANTECEDENTES.....	4
1.1 El frijol.....	4
1.1.1 Cultivo de frijol a nivel mundial	4
1.1.2 Producción de frijol en México.....	4
1.1.2.1 Producción de frijol en el estado de Durango.....	5
1.1.3 Plagas de importancia económica en el frijol.....	5
1.2 Conchuela del frijol (<i>Epilachna varivestis</i>).....	5
1.2.1 Taxonomía.....	6
1.2.2 Distribución.....	6
1.2.3 Biología.....	7
1.2.4 Daños	8
1.2.5 Umbral económico.....	9
1.3 Métodos de control.....	9

1.3.1 Cultural.....	10
1.3.2 Biológico.....	10
1.3.3 Químico.....	11
1.3.4 Productos vegetales en el control de plagas.....	11
1.4 Orégano mexicano (<i>Lippia graveolens</i>).....	12
1.4.1 Distribución.....	12
1.4.2 Descripción.....	12
1.4.3 Principios activos y usos.....	13
1.4.4 Métodos de extracción de aceites esenciales.....	13
1.4.5 Control de plagas con orégano mexicano.....	14
1.5 Neem (<i>Azadirachta indica</i>).....	14
1.5.1 Distribución.....	14
1.5.2 Descripción.....	15
1.5.3 Principios activos y usos.....	15
1.5.4 Métodos de extracción de aceites esenciales.....	17
1.5.5 Control de plagas con neem.....	17
1.6 Bioensayos toxicológicos.....	20
1.6.1 Componentes de un bioensayo.....	20
1.6.2 Método de aplicación tópica.....	21
1.6.3 Método de aspersión.....	21
1.7 Análisis estadístico de los resultados de los bioensayos.....	22
II. JUSTIFICACION.....	23
III. OBJETIVOS.....	25
3.1 General.....	25

3.2 Particulares.....	25
IV. MATERIALES Y METODOS.....	26
4.1 Trabajo de laboratorio.....	26
4.2 Colecta del material biológico.....	26
4.2.1 Orégano mexicano (<i>L. graveolens</i>).....	26
4.3 Cría del material biológico.....	27
4.3.1 <i>E. varivestis</i>	27
4.4 Aceites esenciales evaluados.....	27
4.4.1 Orégano de Durango (<i>L. graveolens</i>).....	27
4.4.2 Orégano de Chihuahua (<i>L. graveolens</i>).....	28
4.4.3 Neem (<i>A. indica</i>).....	28
4.5 Pruebas de laboratorio.....	28
4.5.1 Orégano mexicano de Durango y Chihuahua.....	28
4.5.1.1 Obtención de la ventana de respuesta biológica.....	28
4.5.1.2 Preparación de dosis intermedias.....	29
4.5.1.3 Bioensayos.....	29
4.5.1.3.1 Método de aplicación tópica.....	29
4.5.1.4 Contenido de p-cimeno, timol y carvacrol en el aceite de Durango.....	30
4.5.2 Neem.....	30
4.5.2.1 Pruebas de fitotoxicidad en plantas de frijol.....	30
4.5.2.2 Obtención de la ventana de respuesta biológica.....	31
4.5.2.3 Preparación de dosis intermedias.....	31
4.5.2.4 Bioensayos.....	31

4.5.2.4.1 Método de aspersión.....	31
4.5.2.4.2 Concentrado del manejo de las repeticiones.....	32
4.5.2.5 Comparativo de costos de aceite de neem como agente de control contra un plaguicida químico tradicional.....	32
4.6 Análisis de la información.....	33
4.6.1 Metodología estadística utilizada en los aceites de orégano.....	33
4.6.2 Metodología estadística utilizada en el aceite de neem.....	33
V. RESULTADOS.....	34
5.1 Aceite de orégano de Durango y Chihuahua.....	34
5.1.1 Concentraciones intermedias porcentuales.....	34
5.1.2 Dosis letal media, límites fiduciales y pendiente.....	34
5.1.3 Prueba de homogeneidad de los coeficientes de regresión.....	36
5.1.4 Contenidos de p-cimeno, timol y carvacrol.....	37
5.2 Aceite de neem.....	38
5.2.1 Pruebas de fitotoxicidad en plantas de frijol.....	38
5.2.2 Parámetros de la primera repetición.....	40
5.2.3 Parámetros de la segunda repetición.....	43
5.2.4 Parámetros de la tercera repetición.....	45
5.2.5 Parámetros de la cuarta repetición.....	48
5.2.6 Parámetros de la quinta repetición.....	51
5.2.7 Concentrado de los parámetros de las repeticiones.....	54
5.2.8 Registro de mortalidad y sobrevivencia.....	56

5.2.9 Comparativo de costos de aceite de neem como agente de control contra un plaguicida químico tradicional.....	61
VI. DISCUSION.....	64
6.1 Aceites de orégano mexicano de Durango y Chihuahua.....	64
6.1.1 Dosis letal media, limites fiduciales y pendiente.....	64
6.2 Aceite de neem.....	68
6.2.1 Fitotóxicidad en plantas de frijol.....	68
6.2.2 Registro de parámetros en diferentes repeticiones.....	68
6.2.3 Porcentajes de mortalidad y sobrevivencia.....	73
6.2.4 Comparativo de costos de aceite de neem como agente de control contra un plaguicida químico tradicional.....	77
6.3 El empleo de sustancias de origen natural para el control de plagas agrícolas dentro del marco de la Gestión Ambiental.....	78
VII. CONCLUSIONES.....	82
VIII. RECOMENDACIONES.....	84
IX. BIBLIOGRAFIA.....	85
X. ANEXOS.....	101

LISTA DE ACRÓNIMOS

ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosin trifosfato
AZA	Azadiractina
CIIDIR	Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional
CIRENA	Centro de Investigación de Recursos Naturales de Salaíces, Chihuahua
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
DDA	Días después de la aplicación
DMS	Diferencia mínima significativa
EC	Concentración emulsionable
i.a.	Ingrediente activo
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IPN	Instituto Politécnico Nacional
MIP	Manejo Integrado de Plagas
ONG`s	Organismos no gubernamentales
PMA	Precipitación media anual
SAS	Statistical Analysis System

SIMBOLOGÍA

Kg	Kilogramo
Ha	Hectárea
DL₅₀	Dosis letal media
CL₅₀	Concentración letal media
DE₅₀	Dosis efectiva media
d	Dosis
n	Número de individuos
r	Número de organismos muertos
p	Porcentaje de efecto
μ	Media de la población
a	Ordenada en el origen
b	Pendiente
χ²	Chi Cuadrada
gl	Grados de libertad
F	F de student
H.R.	Humedad relativa
μL	Microlitro
IP	Índice de posición
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
μg	Microgramo
mL	Mililitro
ppm	Partes por millón

p v⁻¹	Peso-volumen
DL₉₀	Dosis letal 90
mg	Miligramo

RELACIÓN DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Concentrado de repeticiones de aplicaciones de aceite de neem..	32
Cuadro 2. Número de individuos muertos, en cada tipo de aceite, mortalidad corregida en cada concentración una vez que se corrigió con la fórmula de Abbott, respecto a la mortalidad del testigo de todas las repeticiones.....	34
Cuadro 3. Dosis letal media, límites fiduciales y pendiente de la ecuación de regresión para cada aceite de orégano mexicano evaluado sobre <i>E. varivestis</i>	35
Cuadro 4. Comparación de los contenidos de p-cimeno, timol y carvacrol.....	37
Cuadro 5. Concentrado de parámetros evaluados en las cinco repeticiones..	54
Cuadro 6. Resultados del análisis de varianza en las repeticiones y estados de desarrollo de <i>E. varivestis</i>	55
Cuadro 7. Efectos del aceite de neem sobre el desarrollo de larvas de segundo y tercer instar de <i>E. varivestis</i> , sobre plantas de frijol tratadas a distintas concentraciones a los tres, siete y catorce días.....	56
Cuadro 8. Costos de producción de una hectárea de cultivo de frijol utilizando un plaguicida químico y un bioinsecticida (neem) para llevar el control de <i>E. varivestis</i>	62

RELACIÓN DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	Líneas de respuesta dosis-mortalidad y límites fiduciales del aceite esencial de orégano mexicano de Durango y Chihuahua..... 36
Figura 2	Evaluación de diferentes concentraciones de aceite de neem en plantas de frijol, A) 1 %, B) 2 %, C) 5 %, D) 10 %, E) 12 %, F) 15 %..... 38
Figura 3	Efecto de concentraciones de aceite de neem en el tercer instar de <i>E. varivestis</i> de la primera repetición. A) Horas, B) Ancho, C) Largo y D) Peso. Cada punto representa la media de diez repeticiones $\pm$ error estándar. Letras diferentes en (A, B, C y D) indican diferencias significativas entre muestreos, según la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$ 40
Figura 4	Efecto de concentraciones de aceite de neem en el cuarto instar de <i>E. varivestis</i> de la primera repetición. A) Horas, B) Ancho, C) Largo y D) Peso. Cada punto representa la media de diez repeticiones $\pm$ error estándar. Letras diferentes en (A, B, C y D) indican diferencias significativas entre muestreos, según la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$ 42
Figura 5	Efecto de concentraciones de aceite de neem en el tercer instar de <i>E. varivestis</i> de la segunda repetición. A) Horas, B) Ancho, C) Largo y D) Peso. Cada punto representa la media de diez repeticiones $\pm$ error estándar. Letras diferentes en (A, B, C y D) indican diferencias significativas entre muestreos, según la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$ 43
Figura 6	Efecto de concentraciones de aceite de neem en el cuarto instar de <i>E. varivestis</i> de la tercera repetición. A) Horas, B) Ancho, C) Largo y D) Peso. Cada punto representa la media de diez repeticiones $\pm$ error estándar. Letras diferentes en (A, B, C y D) indican diferencias significativas entre muestreos, según la

	prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$	45
Figura 7	Efecto de concentraciones de aceite de neem en el estado de pupa de <i>E. varivestis</i> de la tercera repetición. A) Horas, B) Ancho, C) Largo y D) Peso. Cada punto representa la media de diez repeticiones $\pm$ error estándar. Letras diferentes en (A, B, C y D) indican diferencias significativas entre muestreos, según la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$	46
Figura 8	Efecto de concentraciones de aceite de neem en el estado de adulto de <i>E. varivestis</i> de la tercera repetición. A) Horas, B) Ancho, C) Largo y D) Peso. Cada punto representa la media de diez repeticiones $\pm$ error estándar. Letras diferentes en (A, B, C y D) indican diferencias significativas entre muestreos, según la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$	47
Figura 9	Efecto de concentraciones de aceite de neem en larvas de tercer instar de <i>E. varivestis</i> de la cuarta repetición. A) Horas, B) Ancho, C) Largo y D) Peso. Cada punto representa la media de diez repeticiones $\pm$ error estándar. Letras diferentes en (A, B, C y D) indican diferencias significativas entre muestreos, según la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$	48
Figura 10	Efecto de concentraciones de aceite de neem en larvas de cuarto instar de <i>E. varivestis</i> de la cuarta repetición. A) Horas, B) Ancho, C) Largo y D) Peso. Cada punto representa la media de diez repeticiones $\pm$ error estándar. Letras diferentes en (A, B, C y D) indican diferencias significativas entre muestreos, según la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$	49
Figura 11	Efecto de concentraciones de aceite de neem en larvas de cuarto instar de <i>E. varivestis</i> de la quinta repetición. A) Horas, B) Ancho, C) Largo y D) Peso. Cada punto representa la media de diez repeticiones $\pm$ error estándar. Letras diferentes en (A, B, C y D) indican diferencias significativas entre muestreos, según la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$	51

Figura 12	Efecto de concentraciones de aceite de neem en estado de pupa de <i>E. varivestis</i> de la quinta repetición. A) Horas, B) Ancho, C) Largo y D) Peso. Cada punto representa la media de diez repeticiones $\pm$ error estándar. Letras diferentes en (A, B, C y D) indican diferencias significativas entre muestreos, según la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$	52
Figura 13	Sobrevivencia a concentración de 0.1 % con larvas de segundo y tercer instar.....	58
Figura 14	Sobrevivencia a concentración de 0.5 % con larvas de segundo y tercer instar.....	59
Figura 15	Sobrevivencia a concentración de 1 % con larvas de segundo y tercer instar.....	60
Figura 16	Sobrevivencia a concentración de 2 % con larvas de segundo y tercer instar.....	61
Figura 17	Esquema de control de plagas agrícolas en el marco de Gestión Ambiental.....	78

RESUMEN

Se realizaron bioensayos toxicológicos en larvas de segundo, tercero y cuarto instar de *Epilachna varivestis*, con aceites esenciales de orégano mexicano (*Lippia graveolens*) de los estados de Durango y Chihuahua, y aceite de neem de la compañía Eco logic® (*Azadirachta indica*). Se usó el método de aplicación tópica para los aceites de orégano, aplicando 10 μL al dorso del insecto en concentraciones de 0.8, 3, 5, 7 y 10 %. Con aceite de neem se empleó el método de aspersión aplicado a la planta utilizando concentraciones del 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 %. Los resultados de mortalidad se procesaron mediante el Análisis Probit, para obtener los valores de DL_{50} . Con el aceite de orégano de Durango se obtuvo una DL_{50} de 38.5 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ y con el de Chihuahua una DL_{50} de 26.15 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. No se encontró diferencia significativa entre los valores de toxicidad en los aceites respecto a su origen, en la prueba de homogeneidad de coeficientes de regresión, obteniendo un valor de $t=0.42 < t=1.94$ al 5 %. En las aplicaciones de neem se encontraron diferencias significativas ($p<0.0001$) de los tratamientos para los parámetros: tiempo, ancho, largo y peso respecto al testigo. Al 5 y 10 % se registró el 100 % de mortalidad a los 7 DDA. Las concentraciones al 0.5, 1 y 2 % a los 14 DDA, registraron porcentajes de mortalidad arriba del 88 % para larvas de segundo y tercer instar. En el segundo instar se encontró el máximo porcentaje de mortalidad.

Palabras clave: Bioensayos, frijol, orégano mexicano, neem, *Epilachna varivestis*

ABSTRACT

Toxicological bioassays were conducted on larvae of second, third and fourth instars of *Epilachna varivestis*, with essential oil of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) from the states of Durango and Chihuahua, and neem oil (*Azadirachta indica*). Topical application of oregano oils were employed, applying 10 μL on the larvae dorsum, at concentrations of 0.8, 3, 5, 7 and 10 %. For Neem oil, spraying method was employed applying over each bean plant, using concentrations at 0.1, 0.5, 1, 2, 5 and 10 %. With oregano oil, mortality results were processed by Probit analysis in order to obtain the LD_{50} values. With oregano oil collected from Durango State, a DL_{50} of 38.5 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ was obtained, whereas Chihuahua oil a DL_{50} of 26.15 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, was obtained. A test of homogeneity of regression coefficients, obtaining a value of $t=0.42 < t=1.94$ at 5 % of significance, which indicates that there was no statistical significance in toxicity values among these oils regarding their origin. In neem results, statistical significances ($p<0.0001$) were observed in treatments at parameters: elapsed time in each larval instar, width, length and weight of larvae, compared with the control. At 5 and 10% neem concentrations, 100% mortality was recorded at 7 DAA. Neem concentrations of 0.5, 1 and 2 % at 14 DAA causes up to 88 % mortality. Second larvae instar shown the highest mortality values.

Keywords: Bioassays, common bean, mexican oregano, neem, *Epilachna varivestis*

INTRODUCCION

El cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) se encuentra distribuido en una amplia zona de México. En el ciclo primavera-verano 2007, se sembraron 1, 685,164 ha, de las cuales se cosecharon 1, 521,301 ha, con una producción de 880,359 toneladas a nivel nacional en los estados de Durango, Chihuahua, Zacatecas, Nayarit, Sinaloa, Guanajuato y Chiapas (Muruaga *et al.*, 1993; INEGI, 2010).

En México, la conchuela (*Epilachna varivestis* Mulsant) es considerada la principal plaga en relación a la producción y desarrollo del cultivo de frijol. Por la cantidad de alimento que consumen las larvas de tercer y cuarto instar, así como los adultos son los que tienen mayor importancia económica. El daño que causa produce un incremento a los costos de producción, debido a la disminución en el rendimiento y la necesidad de realizar aplicaciones de insecticidas para llevar un control. El uso de plaguicidas químicos se estima en cinco millones de toneladas que son aplicadas anualmente en el mundo. Pocos productos químicos son recomendados para su uso en programas de manejo integrado para el control de *E. varivestis* en cultivos de frijol y soya, debido a las consecuencias de estos productos sobre el ambiente y el hombre, además de elevar los costos de producción disminuyendo la rentabilidad del cultivo (Sánchez-Arroyo, 1997; Sancé, 1998).

Los productos botánicos son deseables en el control de plagas debido a las características de control que ejercen y que llevan a cabo un trabajo en conjunto con los enemigos naturales sin afectar la población. Debido a su menor persistencia en el medio ambiente, ocasionando nulos problemas de contaminación en comparación con los insecticidas químicos, contribuyendo a un mejor control de las plagas debido a que su uso no ha generado el surgimiento de cepas de insectos resistentes (Capataz *et al.*, 2007).

El orégano mexicano (*Lippia graveolens* H.B.K.) es originario de México, se encuentra distribuido en varios estados de la República Mexicana debido a que éste

se adapta a diferentes condiciones ambientales. Tiene usos tradicionales y farmacológicos, debido al gran valor comercial que tiene el aceite esencial en el mercado internacional, ocupa el segundo lugar en exportación con aproximadamente 40% de la producción mundial (Arcila-Lozano *et al.*, 2004). Los principales componentes de *Lippia graveolens* son: γ - cariofileno, α - Humuleno, β - Terpineno, α - Tuyeno, Terpeno 3, Carvacrol, Limoneno, m-cimeno, Mirceno, Santalol, Sesquiterpeno I, Terpeneol y Timol (González *et al.*, 2000).

El neem (*Azadirachta indica* A. Juss) es reconocido por sus propiedades bioinsecticidas. Entre sus actividades biológicas están efecto antiinflamatorio, antiséptico, antipirético, repelente de insectos, microbicida e insecticida. El neem produce más de 300 metabolitos secundarios, un tercio son tetranortriterpenoides (limonoides) de interés comercial. Los extractos de neem (*A. indica*) y su ingrediente activo el triterpeno azadiractina $C_{35}H_{44}O_{10}$ el de mayor importancia, debido a que presenta efectos antialimentarios, esterilidad en hembras adultos y la inhibición del desarrollo del insecto, actuando como una toxina, la cual ha tenido mucho éxito en los insectos que han desarrollado resistencia a los insecticidas químicos. Los extractos de neem tiene efectos entre 400 y 500 especies de insectos de los órdenes: Dermaptera, Diptera, Hymenoptera, Isoptera, Lepidoptera, Thysanoptera, Coleoptera, Orthoptera, Hemiptera (Capataz *et al.*, 2007; Orozco y Rodríguez, 2007; Muñoz, 2010).

Debido a la falta de estudios con aceites esenciales de plantas sobre la conchuela del frijol, se realizaron bioensayos toxicológicos en laboratorio, con aplicaciones de aceite esencial de orégano mexicano de los estados de Durango y Chihuahua, así como aceite de neem de la compañía Eco Logic® a larvas de conchuela en el segundo, tercero y cuarto instar a través de los métodos de aplicación tópica y aspersión aplicado a la planta. Se realizó el análisis Probit para la determinación de DL_{50} en los aceites de orégano, así como de ANOVA y prueba de Tukey para comparar el efecto en la alimentación de larvas de conchuela sobre plantas de frijol

tratadas con neem. La importancia radica en la búsqueda de alternativas de control de plagas que sean inocuas al hombre y efectivas como insecticidas o con efectos desfavorables a la plaga, conchuela del frijol.

I. ANTECEDENTES

1.1 El frijol

1.1.1 Cultivo de frijol a nivel mundial

El frijol (*P. vulgaris*) representa la mitad del consumo mundial de las leguminosas y es el de mayor importancia en el consumo humano directo. En la actualidad se cultiva en forma extensiva por todo el mundo (Engleman, 1991; Estrada *et al.*, 2007), es un cultivo que se practica desde hace 4000 años. En América, es uno de los cultivos hortícolas más comunes ya que constituye el alimento básico de gran parte de la población de este continente (Anónimo, 1990; Engleman, 1991). América Latina y África producen siete de los 23 millones de toneladas métricas del frijol producido en el mundo (Estrada *et al.*, 2007).

1.1.2 Producción de frijol en México

Debido a las buenas condiciones medioambientales que favorecen el cultivo de frijol en México, existe una amplia distribución, en la cual los principales estados que destacan en superficie y producción son Durango, Zacatecas, Chihuahua, Nayarit, Sinaloa, Guanajuato y Chiapas (Muruaga *et al.*, 1993).

A nivel nacional en el ciclo otoño-invierno 2006-2007 se sembraron 264,366 ha de las cuales se cosecharon 225,680 ha obteniendo una producción de 252,604 toneladas. En el ciclo primavera-verano 2007 se sembraron 1,685,164 ha de las cuales se

cosecharon 1, 521,301 ha, obteniendo una producción de 880,359 toneladas (INEGI, 2010).

1.1.2.1 Producción de frijol en el estado de Durango

El estado de Durango es el segundo productor de frijol a nivel nacional. En el año agrícola 2008 se sembró una superficie de 224,548 ha y se cosechó una superficie de 214,854 ha, obteniendo un volumen de 121,528 toneladas alcanzando un valor de producción de \$ 1,126, 252 (INEGI, 2009).

1.1.3 Plagas de importancia económica en el frijol

Las principales plagas que atacan al cultivo de frijol son: la gallina ciega (*Phyllophaga* spp.), gusano de alambre (*Conoderus flavangulus* Candeze), conchuela del frijol (*E. varivestis*), chicharrita (*Empoasca* spp.), diabroticas o doradillas (*Diabrotica* spp. y *Ceratoma* spp.), trips (*Thrips tabaci* Lindeman), mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood y *Bemisia tabaci* Gennadius), picudo del ejote (*Apion godmani* Wagner) y en insectos de almacén (*Zabrotes subfasciatus* Bohemann y *Acanthocelides obtetus* Say) (Anónimo, 1990; Pinto *et al.*, 2004; INIFAP, 2005; Serrano, 2005).

1.2 Conchuela del frijol (*Epilachna varivestis*)

E. varivestis es considerada la principal plaga en relación a la producción y desarrollo del cultivo de frijol en México (Vera *et al.*, 2002). Presenta de dos a tres generaciones

al año en la zona frijolera de Durango y su ciclo de vida pasa por los estados de huevo (54.3 días), larvas (1er instar-3.5 días, 2do instar-4.3 días, 3er instar-6.5 días, 4to instar-8.5 días), pupa (7.2 días) y adulto (5.16 días) (García, 1993; Acevedo *et al.*, 2010).

1.2.1 Taxonomía

Clase: Insecta

Orden: Coleoptera

Familia: Coccinellidae

Género: *Epilachna*

Especie: *Epilachna varivestis* Mulsant

1.2.2 Distribución

E. varivestis, se extiende desde Panamá hasta el sur de Canadá. Se tienen datos a partir de 1993 de esta plaga en Nagano y Yamanashi, Japón sobre cultivos de leguminosas (García, 1993; España, 2000). En México, este insecto se encuentra en los estados de Aguascalientes, Chihuahua, Durango, Guanajuato, Hidalgo, México, Michoacán, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala, Zacatecas y en regiones de clima templado ideal para el cultivo (García, 1993; Flores-Mejía y Salas-Araiza, 2004).

1.2.3 Biología

El adulto de *E. varivestis* es un insecto de color amarillo a café cobrizo de cuerpo oval y convexo que mide aproximadamente nueve milímetros de largo; con ocho puntos negros en cada élitro, se caracteriza por tener durante su ciclo de vida una metamorfosis completa (Sancé, 1998; España, 2000; INIFAP, 2005). Pasa por el estado de huevecillo, cuatro instares larvales y los estados de pupa y adulto; su ciclo biológico dura 67.1 días a 25°C y 65 % de H.R. (Acevedo *et al.*, 2010). Las larvas son amarillas, de forma oval y convexas, con espinas bifurcadas (scolus) de puntos negros en el cuerpo, cuando están completamente desarrolladas miden ocho milímetros de largo y cuatro milímetros de ancho. Los huevos miden poco más de 1 mm de largo, son de colores amarillo anaranjado y adheridos en su extremo en grupos de 50 o más, la pupa es lisa, de color amarillo anaranjado y redondeado al frente (Sancé, 1998; España, 2000).

E. varivestis pasa el invierno en estado adulto, en las zonas altas de la sierra, ahí permanece durante el invierno en la hojarasca de los encinos y en los pastizales para después emigrar a los valles para alimentarse (España, 2000; Flores y Salas, 2004).

En el valle de Poanas, Durango, los adultos invernantes llegan al principio de las primeras lluvias de junio, copulan y se alimentan del cultivo de frijol por una o dos semanas, antes de depositar las primeras masas de huevecillos en el envés de la hoja, de las cuales emergen larvas del primer instar, 15 días después y se alimentan del follaje hasta llegar al cuarto instar (García, 1993; España 2000). Cuando se completa el desarrollo, las larvas pegan a la parte posterior de sus cuerpos al envés de las hojas no dañadas del frijol o de otras plantas, frecuentemente reuniéndose en grupos. La pupa se abre paso fuera de la envoltura larvaria juntándola al final de la punta del abdomen, la cual permanece cubierta con esta piel arrugada y espinosa.

La pupación ocurre en siete días aproximadamente. Cuando el adulto emerge presenta una coloración amarillenta, carecen de los ocho puntos negros en cada élitro, los que aparecen 45 minutos después de emerger del estado pupal, puede poner huevos para la segunda generación a las dos semanas siguientes. Los machos son ligeramente más pequeños que las hembras. Los adultos son buenos voladores y viajan a largas distancias dirigiéndose hacia los campos de frijol. En este valle se presentan dos a tres generaciones de larvas por ciclo agrícola. Las larvas del tercero, cuarto instar y el adulto tienen importancia económica por la cantidad de alimento que consumen y la hembra a lo largo de su vida deposita de 300 a 400 huevecillos (García, 1993; Sánchez-Arroyo, 1997; Sancé, 1998; España, 2000).

1.2.4 Daños

Los daños que causan las larvas en el tercer y cuarto instar se aprecian claramente en el envés de las hojas de las plantas (las cuales adquieren un aspecto característico de descarnado como de encaje) dejando tiras angostas y paralelas de hoja intacta entre ellas, donde quedan únicamente las nervaduras, las zonas de las hojas afectadas se secan y adquieren un color marrón ocasionando la muerte de la hoja y de la planta. Los adultos y larvas más desarrollados hacen perforaciones o comen partes completas del follaje del frijol, como *Phaseolus leptostachyus* Benth, *P. vulgaris*, *P. neglectus* Hermann, *P. coccineus* L., *P. maculatus* Scheele, *P. ritensis* M. E. Jones, *P. marechalii* A. Delgado, *P. pedicellatus* Benth., *P. pauciflorus* Benth. y *P. pluriflorus*, Maréchal, Mascherpa & Stanier. (Muruaga et al., 1993), en soya (*Glycine max* L.), trébol (*Medicago spp*), alfalfa (*Medicago sativa* L.) y haba (*Vicia faba* L.) (Sancé, 1998; España, 2000; INIFAP 2005). Cuando la población de esta plaga es abundante ataca las vainas y tallos, y en consecuencia, aniquila por completo la planta (Sancé, 1998; INIFAP, 2005).

1.2.5 Umbral económico

Por la cantidad de alimento que consumen las larvas de tercer, cuarto instar y los adultos tienen mayor importancia económica, el daño que causa produce un incremento a los costos de producción, debido a la disminución en el rendimiento y a la necesidad de realizar aplicaciones de insecticidas para llevar un control (Sancé, 1998; Pinto *et al.*, 2004).

Para estimar el umbral económico de este insecto, se debe determinar los siguientes criterios: 1) pérdida económica asociada a un número específico de las larvas de la conchuela del frijol por unidad de área, y 2) el costo de control (insecticidas y los costos de aplicación) en el área de unidad misma. Cuando el criterio uno es igual al criterio dos, el control se hace económicamente viable y el umbral económico ha sido alcanzado. Los tratamientos deben aplicarse solo cuando el nivel observado de la defoliación y el número de conchuelas, indiquen que el daño se incrementará (Sánchez-Arroyo, 1997).

El umbral económico de daño de *E. varivestis* con base en las pérdidas asociadas al número de larvas por unidad de área y al costo de su control en Wyoming, es de 1 a 1.5 larvas por planta (García, 1993; Sánchez-Arroyo, 1997; Sancé, 1998).

1.3 Métodos de control

Dentro de los métodos de control se pueden utilizar tratamientos químicos, métodos culturales, biológicos y con extractos de plantas.

1.3.1 Cultural

Dentro de las prácticas culturales se pueden realizar diversas actividades que contribuyan a mitigar el daño causado por la conchuela de frijol, entre las que se pueden mencionar: utilizar variedades adaptadas a la región, llevar a cabo la siembra de la planta de acuerdo a la variedad y periodos de lluvia e implementar policultivos. En el caso de la siembra de frijol y maíz ha dado mucho éxito, pues se toma en cuenta a las bacterias fijadoras de nitrógeno en frijol.

1.3.2 Biológico

Entre los diversos enemigos naturales detectados para *E. varivestis*, que se pueden destacar se encuentra la avispa *Pediobius foveolatus* (Crawford) (Hymenoptera: Eulophidae), la cual causa parasitismo (García, 1993; España 2000; García y Carrillo, 2006). El díptero de la familia Tachinidae *Aplomyiopsis epilachnae* Aldrich, que es un parásito natural de *E. varivestis* en varias regiones de México y paraliza a las larvas en el tercer y cuarto instar (García, 1993; Sánchez-Arroyo, 1997; España 2000; García y Carrillo, 2006). Otro ejemplo es el ácaro ectoparásito *Coccipolitus epilachnae* Smiley (Acari: Podapolidae), que se registra para El Salvador el cual se alimenta de la hemolinfa de los élitros de *E. varivestis*. El protozoario microsporidio *Nosema* spp., produce anomalías morfológicas y fisiológicas, provoca mortalidades de 50 a 95% (García, 1993); el depredador *Podisus maculiventris* Say (Heteroptera: Pentatomidae) cuya capacidad depredadora y respuesta funcional en laboratorio y campo sobre *E. varivestis* en soya es de 0.42 y 4.4 presas por depredador por día (García, 1993; España 2000).

1.3.3 Químico

El control de la conchuela de frijol se lleva a cabo por métodos químicos con la aplicación de: Carbaril (Sevin® 80%), Paratión metílico (Folidol® 2%, Diapar® 501 y 750), Ometoato (Folimat®), Azinfos metílico (Gusation® 33%), Oxidemetón-metil (Metasytox®) y Triclorfón (Dipterex® 80%), los cuales se recomiendan aplicar cuando se descubren dos o más conchuelas por metro cuadrado (Anónimo, 1990; García, 1993, Pinto *et al.* 2004; INIFAP, 2005).

1.3.4 Productos vegetales en el control de plagas

Gran cantidad de plantas cuyos extractos poseen propiedades insecticidas, los cuales fueron utilizados en la antigüedad para el control de plagas en cultivos agrícolas, entre ellas el tabaco, el piretro, el derris, la riania, la sabadilla, el ajo, neem, anona y chile. Sin embargo su empleo cayo en desuso con el surgimiento de los plaguicidas sintéticos; los cuales no resolvieron el problema de las plagas agrícolas pero si el surgimiento de plagas secundarias y daños o problemas adicionales (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, 1995; Rodríguez, 2000). Por lo cual nuevas búsquedas encaminadas con el empleo de moléculas presentes en la naturaleza en plantas ya conocidas o en especies con potencial para el control de plagas con las que se siguen encontrando principios activos (Rodríguez, 2000), dentro de las que se encuentran las especies con las que se realizó este trabajo.

1.4 Orégano mexicano (*Lippia graveolens*)

1.4.1 Distribución

L. graveolens es originario de México, se encuentra distribuido en 24 estados de la República Mexicana, debido a que este se adapta a diferentes condiciones ambientales. La mayor producción de orégano para fines comerciales se concentra en los estados de Durango, Guanajuato, Jalisco, Querétaro, San Luis Potosí y Zacatecas. También se encuentra en algunas partes de Honduras. (Huerta, 1997; Arcila-Lozano *et al.*, 2004; González-Güereca *et al.*, 2008).

1.4.2 Descripción

El orégano mexicano (*L. graveolens*) pertenece a la familia Verbenaceae, tiene hojas ovadas, opuestas con los bordes dentados o algunas veces íntegros, de color verde, pubescentes, el color de las flores es blanco, de una altura de 60 cm, crece en suelos bien drenados, con luz solar (Arcila-Lozano *et al.*, 2004). Esta planta tiene usos tradicionales y farmacológicos tales como culinarios, analgésicos, antiinflamatorios, antitusivo, bactericida, expectorante, fungostático, antipiréticos, sedantes, antidiarréico, tratamiento de infecciones cutáneas, antifúngico, tratamiento de desórdenes hepáticos, diurético, antihipertensivo, remedio de desórdenes menstruales, antimicrobiano, repelente, antimalaria, antiespasmódico, tratamiento de enfermedades respiratorias, de sífilis, gonorrea, contra la diabetes, abortivo, anestésico local, cosmético y en licores, no solo como condimento, por lo que debido al gran valor comercial que tiene el aceite esencial en el mercado internacional ocupa el segundo lugar en exportación con aproximadamente 40% de la producción mundial (Arcila-Lozano *et al.*, 2004; González-Güereca *et al.*, 2008).

1.4.3 Principios activos y usos

Los principales componentes de *L. graveolens* son: γ -cariofileno, α -Humuleno, β -Terpineno, α -Tuyeno, Terpeno 3, Carvacrol, Limoneno, m-cimeno, Mirceno, Santalol, Sesquiterpeno I, Terpineol y Timol (González *et al.*, 2000). Los monoterpenoides se clasifican en 35 grupos, son volátiles con olores intensamente pungentes, lo que genera las fragancias y sensaciones olor-sabor de muchas plantas. Su contenido es de acuerdo a la especie, clima, quimiotipo, altitud, época de recolección y estado de crecimiento, por lo que es importante el estudio de factores climáticos y la influencia en el cultivo para un mejor aprovechamiento y explotación de los metabolitos secundarios (Arcila-Lozano *et al.*, 2004; González-Güereca *et al.*, 2008).

En el aceite de orégano que crece silvestre se han detectado presencia dominante de carvacrol y timol. Se ha observado que un incremento de timol provoca un decremento de carvacrol y en cantidades menores se localizan hidrocarburos monoterpenoides y-terpineno y p-cimeno (Arcila-Lozano *et al.*, 2004).

1.4.4 Métodos de extracción de aceites esenciales

Para la extracción de aceites esenciales los métodos más utilizados son la destilación con arrastre de vapor y el uso de solventes orgánicos. Otras alternativas es el uso de CO₂ como solvente (extracción supercrítica y subcrítica), es ideal ya que no es tóxico, ni explosivo y fácil de remover de productos extraídos (Arcila-Lozano *et al.*, 2004).

1.4.5 Control de plagas con orégano mexicano

En 2008, Pérez *et al.*, realizaron un estudio de aplicación de aceite de orégano (*L. graveolens*) sobre el ácaro (*Varroa destructor* Anderson & Trueman), que afecta a la abeja *Apis mellifera* L., obteniendo en laboratorio un porcentaje de mortalidad de 80 % en varroas a una solución del 1 % de aceite de orégano y en pruebas de repelencia al 1 % se encontró un valor superior al 120 en el índice de posición de acuerdo con el criterio que se plantea para la evaluación (Colin *et al.*, 1994). En campo el porcentaje de mortalidad de varroas varió del 31 al 54 %.

Por su parte, González-Castillo *et al.* (2009), observaron que a una concentración al 5 % de aceite de orégano (*L. graveolens*) se obtuvo 87.5 % de mortalidad en el acaro *Tetranychus* sp.

Recientemente otros investigadores Silva *et al.*, 2011 han realizado aplicaciones de aceites de orégano dentro de suplementos alimenticios a las abejas para el control de manera sistémica del parásito de las abejas melíferas *V. destructor*. Iturralde-García *et al.*, 2011 han trabajado con otras especies de orégano mexicano como *Lippia palmeri* Watson realizando pruebas de laboratorio para el control de plagas de granos almacenados en trigo.

1.5 Neem (*Azadirachta indica*)

1.5.1 Distribución

A. indica es originario de la India, se ha extendido en toda Latinoamérica, Asia y África (Orozco y Rodríguez, 2007).

1.5.2 Descripción

A. indica conocida como margosa en la India de donde es originaria, fue descrita en 1830 por De Jussieu, se le conoce como neem en Inglés y paraíso en Español (Vásquez, 2007). Este árbol presenta como sinónimos *Antelea azadirachta*, *Melia azadirachta* y *Melia indica*. Crece hasta una altura de 30 m, altitud que van de 200 a 1200 msnm y temperaturas de 0 a 49°C (Orozco y Rodríguez, 2007). Pruebas fotoquímicas han demostrado presencia de resinas, alcaloides y taninos, se degrada con la luz, pH alcalino y calor. Entre sus actividades biológicas están efectos antiinflamatorio, antisépticas, antipiréticas, repelente de insectos, microbicida e insecticida (Vásquez, 2007). Los extractos acuosos de *A. indica* producen efectos repelentes, antialimentarios, regulación de la fecundidad y la oviposición en muchos insectos plaga (Hernández- Castro *et al*, 2005). El neem no es tóxico para el hombre ni para especies animales (Capataz *et al.*, 2007; Vásquez, 2007; Aguilera *et al.*, 2009). La azadiractina es su principal compuesto con actividad biológica que se encuentra en las semillas (Orozco y Rodríguez, 2007).

1.5.3 Principios activos y usos

A. indica produce más de 300 metabolitos secundarios, un tercio son tetranortriterpenoides (limonoides) de interés comercial. Los extractos de neem tienen como ingrediente activo al triterpeno azadiractina $C_{35}H_{44}O_{10}$, el de mayor importancia debido a que presenta efectos antialimentarios, esterilidad en algunas especies y la inhibición del desarrollo del insecto, actuando como una toxina, la cual

ha tenido mucho éxito en los insectos que han desarrollado resistencia a los insecticidas químicos (Capataz *et al.*, 2007; Orozco y Rodríguez, 2007; Muñoz, 2010). La azadiractina se encuentra principalmente en las semillas y su concentración es muy variable debido a diversificación genética, condiciones ambientales de producción, de extracción y cuantificación. La azadiractina es termolábil y fotosensible, por lo que requiere condiciones adecuadas de almacenamiento.

Los compuestos más abundantes en el neem son azadiractina A y azadiractina B. La azadiractina A posee una concentración de 0.56-3.03 g kg⁻¹ y azadiractina B de 0.04-0.59 g kg⁻¹. Se ha demostrado que la azadiractina no afecta a insectos polinizadores, ni a los mamíferos. La azadiractina interfiere en las glándulas corpora cardíaca y corpora alata, inhibe la producción de la neurohormona protoracicotrópica, la cual regula la biosíntesis de hormonas de la metamorfosis (ecdisona) y la hormona juvenil de los insectos. Estas hormonas son esenciales ya que determinan la muda y maduración de huevos y sin ellas las larvas en sus primeros estados pueden durar hasta tres semanas y morir. Así, los estados larvales pasan al estado de pupa, pero los adultos salen con las alas deformadas y otras deficiencias. Los estados adultos que ingieren demasiada azadiractina muestran una fecundidad reducida. Además de la azadiractina, se ha encontrado que el meliantrol y salanin tiene actividad antialimentaria. El nimbin y el nimbidin presentan actividad antiviral. El deactilazadiractinol, en menor concentración es antihormonal y paraliza el sistema digestivo del insecto. El 3-deacetilsalanin y el salanol, también son antialimentarios (Orozco y Rodríguez, 2007).

1.5.4 Métodos de extracción de aceites esenciales

Para la extracción de aceite esencial de neem, el método más utilizado es presión en frío, a través de un extractor de acero inoxidable, se aplican tres toneladas de presión a una temperatura inferior a los 35°C (González-Gómez *et al*, 2006).

1.5.5 Control de plagas con neem

Los extractos de neem tienen efectos entre 400 y 500 especies de insectos de los órdenes: Blattodea, Dermaptera, Diptera, Hymenoptera, Isoptera, Lepidoptera, Phasmida, Phthiraptera, Siphonoptera, Thysanoptera, (Orozco y Rodríguez, 2007) así como de Coleoptera, Orthoptera, Hemiptera (Aguilera *et al.*, 2009).

Ocete y Del Tío (1998), realizaron aplicaciones de un extracto comercial de neem a las concentraciones de $14.33 \mu\text{g cm}^{-2}$ y $7.16 \mu\text{g cm}^{-2}$, sobre larvas del cuarto instar de *Ocnogyna baetica* Ramb (Lepidoptera, Arctiidae), con el empleo de discos foliares de *Beta vulgaris* L. La dosis más elevada obtiene 54.05 % menor peso seco medio consumido frente al testigo.

López-Meza *et al.*, (2004) mencionan una emergencia de 4 adultos con el uso de Nee-mex® en dosis de 1.5 mL por litro de agua en comparación con el testigo, donde se obtuvo la emergencia de 6 adultos del minador de la hoja *Liriomyza* spp. y sin ningún efecto sobre el parasitoide *Opius forticornis* Cameron.

Por su parte, Salazar-Marcial *et al.*, (2004) obtuvieron repelencia del 60 % al aplicar 200 mg mL⁻¹ de extracto acuoso de *A. indica* sobre adultos de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), a dosis de 100 mg mL⁻¹, *A. indica* y *Lippia berlandieri* S. repelieron del 48.2 y 46.6 % respectivamente.

En otras investigaciones, Solís *et al.*, (2004) efectuaron un estudio a base de azadiractina 3 % EC (Ecozin®) con dosis de 500, 700, 1000 y 1500 mL ha⁻¹ con, tres aplicaciones a intervalos de siete días, obtuvieron una eficacia del 95 al 98 % en control, contra larvas de minador de la hoja en jitomate (*Liriomyza munda* Frick).

López y Estrada, (2005) encontraron que aplicaciones de OleoNim 80® (10mL L⁻¹) mostraron efectividad del 100 % y NeoNim 60® mantuvo índices por encima del 95 % en el control de la palomilla *Diaphania hyalianata* L., en el cultivo de melón. Aplicaciones de CubaNim T® (3 Kg ha⁻¹), OleoNim 80® y NeoNim 60® (1.5 L ha⁻¹) bajo condiciones de cultivo protegido mostraron una efectividad del 75 % sobre *Thrips palmi* Karny en cultivo de pepino. Aplicaciones de extractos acuosos de CubaNim SM® y Foliar Nim HM®, en dosis de 20 g L⁻¹ y 75 g L⁻¹ de agua controlaron la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.) en cultivo de tomate y frijol llevando un control de un 60 y 90 % a las 72 horas.

Okumu *et al.*, (2007) evaluaron la eficacia de la formulación de un aceite de neem (con contenido de azadiractina de 0.03 % p/v) sobre larvas de tercer y cuarto instar de *Anopheles gambiae* (Mopti) expuestas a una dieta con la formulación de aceite de neem en diferentes concentraciones (0.5, 2, 4, 8, 16, 32 ppm) y un grupo control fue expuesto a la formulación de aceite de maíz en concentraciones similares. El aceite de neem tuvo una CL₅₀ de 11 ppm después de ocho días, la cual fue cinco veces más toxica que la formulación de aceite de maíz. La emergencia de adultos fue inhibida de 50 % a 6 ppm; encontraron reducciones significativas en el índice de

crecimiento y pupación, seguido de periodos larvales prolongados fueron observadas en concentraciones de aceite de neem por encima del 8 ppm. La formulación de aceite de maíz, en contraste, no produjo disrupción en el crecimiento con los rangos de las concentraciones probadas.

Ortiz *et al.*, (2008) evaluaron *Melia azaderach* L. sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) y *Mocis latipes* Guerin (Lepidoptera: Noctuidae) por el método de discos de hoja, utilizaron extractos de acetato de etilo, crudos bencénicos y no bencénicos evaluando el efecto antialimentario. Evaluaron también la actividad antialimentaria de los compuestos 21- β -etoximelianodiol y ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico. El extracto bencénico mostró el mejor efecto antialimentario en larvas de *S. frugiperda* y *M. latipes*, con 0.06 y 0.75, respectivamente. El ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico presentó actividad antialimentaria en larvas de *M. latipes*, mientras que el 21- β -etoximelianodiol, fue inactivo.

Aguilera *et al.*, (2009) evaluaron el producto comercial Neem® como regulador de crecimiento aplicando a cinco dosis (0.5 mL L⁻¹, 1 mL L⁻¹, 2 mL L⁻¹, 4 mL L⁻¹ y 5 mL L⁻¹) al picudo *Aegorhinus superciliosus* (Guérin) (Coleoptera: Curculionidae), además de un testigo sin insecticida. Con 2 mL de neem se obtuvo la menor postura 36.5 huevos contra 174.74 huevos del testigo; sin embargo, la dosis de 5 mL de neem presentó la menor cantidad de larvas emergidas con 14.25 contra 111 del testigo y el menor porcentaje de emergencia de larvas con 29.08 % contra 62.38 % del testigo. La DE₅₀ se determinó en 0.0290 mL de neem y la DE₉₀ en 8.923 mL de neem por litro de agua. Concluyendo que la azadiractina, formulada como neem, produce un efecto en la inhibición de la embriogénesis en *A. superciliosus*

Avendaño-Meza *et al.*, (2009) realizaron un bioensayo de infestación de mosquita blanca *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring sobre calabaza, el producto ACCEEM®

0.50 % (neem más canela) registró un promedio de 203.45 insectos con una eficacia del 86 %, registrando una media de 7.9 ninfas con una eficacia del 98.3 %.

Molina *et al.*, (2010) evaluaron el extracto acuoso de neem, el cual provocó mortalidad en las concentraciones de 15 y 20 % superiores al 19.5 %, registrando también una reducción en peso de 1.15 veces respecto al testigo en adultos del picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae).

1.6 Bioensayos toxicológicos

El bioensayo se puede definir como cualquier método que determina la propiedad de una sustancia o material medida en la respuesta biológica que genera (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, 1995). El uso del bioensayo toxicológico o de dosis-mortalidad, para obtener los niveles de susceptibilidad o resistencia, es un auxiliar de gran valor para el manejo eficiente de los grupos toxicológicos de insecticidas (Pérez, 1996), y es un componente principal dentro del control químico para alargar la vida útil de los productos sintéticos o de origen natural, que se dispone para el control de plagas, así como para reducir el surgimiento de la resistencia dentro del Manejo Integrado de Plagas (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, 1995).

1.6.1 Componentes de un bioensayo

Un bioensayo está compuesto por el estímulo y la respuesta. El estímulo es el factor que genera una respuesta en el organismo ensayado, este puede ser químico, físico o eléctrico. La respuesta es el efecto o manifestación que genera la aplicación del estímulo; este puede ser la muerte, el derribo, un nivel enzimático, la frecuencia de

los latidos del corazón, la temperatura. (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, 1995).

1.6.2 Método de aplicación tópica

En la aplicación tópica, se usan jeringas de 500, 250 y 100 μl , que combinadas con los microaplicadores, dan volúmenes de disparo de 1.0 a 0.1 μl insecto⁻¹. Se utiliza como solvente la acetona generalmente debido a que tiene una toxicidad muy baja y una alta volatilidad (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, 1995). La aplicación tópica en *E. varivestis* se realizó de acuerdo con los métodos propuestos por Busvine, (1971) y Hassan (1985).

1.6.3 Método de aspersión

El bioensayo de aplicación por aspersión es el más usado. Consiste en la aspersión de una cantidad conocida de un insecticida sobre un organismo (puede ser insecto de diferente estado de desarrollo), una planta, plántula, hoja o disco de hoja, por un tiempo estándar o hasta que la hoja gotee la solución. Se pueden utilizar aspersores manuales sin el control de presión y volumen, así como la torre de aspersión Potter-Burgarjon, en la cual se estandariza con precisión, la altura de la boquilla, la presión inicial y el volumen asperjado. Se utilizan de 30 a 60 insectos para cada una de las cuatro a ocho dosis, utilizando siempre un testigo al cual solo se le aplica acetona. A las 24- 48 horas se registran como muertos los insectos paralizados, moribundos o que no reaccionen al contacto con un pincel (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, 1995).

1.7 Análisis estadístico de los resultados de los bioensayos

Para el cálculo de los $DL_{50}/CL_{50}/CE_{50}$ generalmente se usa el análisis Probit. En un experimento típico de pruebas de toxicidad aguda se tiene la siguiente situación:

- Concentración de la sustancia o dosis (d).
- Número de individuos (n).
- Número de organismos muertos o afectados (r).
- Porcentaje de efecto (p).

Para el análisis Probit se utilizó el programa Statistical Analysis System (SAS) con los datos obtenidos, proporciono el logaritmo de la DL_{50} (μ), de la ordenada del origen y la pendiente de la recta ajustada (α y β), el valor del estadístico (t) para la prueba de X^2 (Infante y Calderón, 1994; Díaz *et al.*, 2004).

II. JUSTIFICACION

Los plaguicidas sintéticos son una herramienta útil para el control de las plagas agropecuarias; sin embargo, el mal uso de ellos a través de grandes periodos de uso frecuente e intensivo y a falsas ideas como la de la erradicación de plagas o su exterminio, ha dado origen a otros problemas como son el surgimiento de plagas secundarias, la presencia del fenómeno de la resistencia en las plagas primarias y actualmente representan una fuente de contaminación ambiental y de salud pública; a través de intoxicaciones agudas y crónicas a las personas encargadas de la aplicación de los agroquímicos, así como también afectan la inocuidad de los productos en el mercado internacional. Por lo que, actualmente se ha retomado la idea en la búsqueda de moléculas o principios activos ya existentes en la naturaleza que ofrezcan una alternativa para el control de las plagas agrícolas o pecuarias, que no representen una fuente de contaminación y permitan una producción sustentable y a un cambio de paradigma, con el propósito de la no erradicación o exterminio de las plagas, sino de mantener umbrales que permitan una producción rentable y sostenible con el empleo de diversos métodos biológicos y alternativos que en un orden secuencial, racional y científico, permitan la rentabilidad de la agricultura.

Uno de los principales cultivos en México por su alto contenido nutricional de consumo y valor cultural es el frijol, el cual se encuentra amenazado con una serie de plagas que reducen su producción y calidad, por ende, un daño económico a los mexicanos. Una de las principales plagas es la conchuela de frijol, la cual ataca en sus primeros instares larvarios, siendo el segundo, tercero y cuarto instar donde produce un mayor daño a la planta, el uso de plaguicidas no ha mermado por completo la existencia de la plaga y sí ha ocasionado resistencia y la mayor severidad de ésta. El estudio de compuestos en plantas como el orégano mexicano (*L. graveolens*) y neem (*A. indica*) son una alternativa para establecer un control en la conchuela del frijol sin afectar a sus enemigos naturales, dentro de un programa de Manejo Integrado de Plagas, en las que todas las partes construyan y mejoren un

todo. De estas plantas se han encontrado estudios muy prometedores para poder llevar un control de *E. varivestis* debido a los metabolitos secundarios que poseen, los cuales tienen un daño sobre varios órdenes de insectos, considerando que estos productos no son residuales y no persisten en el ambiente por mucho tiempo, teniendo además una acción sinergista con los enemigos naturales de las plagas.

III. OBJETIVOS

3.1 General

Evaluar los aceites esenciales de orégano mexicano (*Lippia graveolens*) y neem (*Azadirachta indica*) sobre la biología (en efectos letal, subletal y/o antialimentario) de *Epilachna varivestis*.

3.2 Particulares

Obtener la ventana de respuesta biológica del aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens*) de los estados de Durango y Chihuahua, así como de neem (*Azadirachta indica*) sobre *Epilachna varivestis*.

Determinar DL₅₀ (Dosis letal media) del aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens*) de los estados de Durango y Chihuahua, en el tercero y cuarto instar larval de la conchuela de frijol (*Epilachna varivestis*) en condiciones de laboratorio.

Evaluar el aceite esencial de neem (*Azadirachta indica*) sobre el ciclo de vida (letal, subletal, antialimentario) de *Epilachna varivestis*.

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 Trabajo de laboratorio

El trabajo se desarrolló en el laboratorio de Entomología de las instalaciones del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango (CIIDIR). Se utilizaron individuos de *E. varivestis* del segundo, tercero y cuarto instar, procedentes de una cría de laboratorio, los cuales se mantienen en condiciones de 25 ± 2 °C y 50-60 % H.R. y un fotoperiodo de 24:0 luz-oscuridad.

4.2 Colecta del material biológico

4.2.1 Orégano mexicano (*L. graveolens*)

Las muestras de orégano fueron recolectadas en octubre del 2010 en el kilómetro 70 de la carretera Durango- Mezquital ubicado en las coordenadas 23° 29. 046" N, 104° 26, 756" W, a 1845 msnm. con un clima seco semicálido (BSh). El área presenta suelos Coluviales y Aluviales [Q (al)], con abundantes afloramientos de roca y textura de franco-arenosa a arcillosa. Una exposición SW y una PMA de 500 mm. La vegetación presente se caracteriza por matorral xerófilo, compuesto por especies como mezquite (*Prosopis juliflora* Swartz), gatuño (*Mimosa biuncífera* Benth.), huizache (*Acacia tortuosa* L.), ocotillo (*Fouquieria splendens* Engelm.), nopal (*Opuntia* spp.), sangregado (*Jatropha dioica* L.), entre otras (Flores, 2009)

4.3 Cría del material biológico

La conchuela de frijol se obtuvo de una cría establecida en el laboratorio de entomología, la cual se ha mantenido desde 2007. El material es procedente del ejido Francisco I. Madero del municipio de Guadalupe Victoria, Durango.

4.3.1 *E. varivestis*

Se mantiene la cría de *E. varivestis* en plantas de frijol (*P. vulgaris*) cultivadas en macetas, de donde se registraron y tomaron datos de los diferentes instares larvarios para la obtención del material biológico del segundo, tercero y cuarto instar larvario. Se maximizó el número de plantas de frijol para la alimentación de mayor número de larvas para la realización de la ventana de respuesta biológica y los bioensayos con el aceite esencial de orégano mexicano y neem.

4.4 Aceites esenciales evaluados

4.4.1 Orégano de Durango (*L. graveolens*)

De la planta de orégano se separó la hoja y se obtuvo el aceite esencial por el método de destilación por arrastre de vapor (Arcila-Lozano *et al.*, 2004).

4.4.2 Orégano de Chihuahua (*L. graveolens*)

Proporcionado por el Centro de Investigación de Recursos Naturales de Salas, Chihuahua (CIRENA), así como la información de los componentes mayoritarios Silva y Morales, (2008).

4.4.3 Neem (*A. indica*)

El aceite esencial de neem se adquirió con la compañía “Eco Logic”[®] establecida en Mérida Yucatán, la cual especifica que el aceite esencial se obtuvo por presión en frío.

4.5 Pruebas de laboratorio

4.5.1 Orégano mexicano de Durango y Chihuahua

4.5.1.1 Obtención de la ventana de respuesta biológica

Se determinó la dosis máxima y mínima en el aceite esencial de orégano que ocasionan el 0 % y 100 % de mortalidad de acuerdo a métodos propuestos por Busvine, (1971) y Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, (2005).

4.5.1.2 Preparación de dosis intermedias

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron en la ventana de respuesta biológica se determinaron las soluciones intermedias.

4.5.1.3 Bioensayos

4.5.1.3.1 Método de aplicación tópica

En la evaluación del aceite esencial de orégano se utilizó el método de aplicación tópica empleando una microjeringa de 50 μ l (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, 1995). En una caja Petri de 14 cm de diámetro con papel filtro, se colocaron de 10 a 14 larvas de conchuela de tercer y cuarto instar, de acuerdo a la cantidad de individuos por día. Posteriormente, se les aplicó superficialmente al dorso, 10 μ l de solución de las dosis intermedias mediante el empleo de una microjeringa (Hamilton®, USA). Para la realización de este proceso, los insectos se colocaron durante cinco minutos en refrigeración para facilitar su manejo durante la manipulación en el laboratorio. Posteriormente a la aplicación del aceite esencial de orégano, las larvas se pasaron a macetas de frijol como sustrato alimenticio para que la mortalidad no ocurra por inanición. Se realizaron de diez a once repeticiones en días diferentes, incluyendo un testigo por serie, al que sólo se le aplicó acetona (Busvine, 1971; Lagunes-Tejeda y Vázquez-Navarro, 1994). Todas las pruebas se realizaron bajo condiciones ambientales en el laboratorio. Las lecturas de mortalidad se tomaron a las 24 horas después de la aplicación, observando cada insecto tratado de forma individual. El criterio que se tomó para determinar muerte a la larva fue la permanencia de inmovilidad, en posición dorsal o lateral, o que presentaran

movimientos anormales y no reaccionaran al presionarle el dorso con un pincel de punta de camello.

4.5.1.4 Contenido de p-cimeno, timol y carvacrol en el aceite de Durango

La cuantificación de los componentes mayoritarios del aceite esencial de Durango fue determinado por el M.C. Ramón Silva V. en el Centro de Investigación para los Recursos Naturales (CIRENA), de Salas de Chihuahua. Se utilizó un cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer CLARUS 500, con inyector automatizado y detector de ionización a la flama. Los componentes del aceite esencial se cuantificaron e identificaron por comparación de estándares analíticos (p-cimeno, carvacrol y timol).

4.5.2 Neem

4.5.2.1 Pruebas de fitotoxicidad en plantas de frijol

Se efectuaron dos repeticiones para pruebas de fitotoxicidad de aceite de neem a las concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 12 y 15 % más un testigo el cual sólo se le aplicó Tween 80®, en plantas de frijol de segundo foliolo. Se establecieron periodos de observación por tres días para registrar algún efecto en el desarrollo o daño fisiológico de la planta.

4.5.2.2 Obtención de la ventana de respuesta biológica

Se determinó la dosis máxima y mínima en el aceite esencial de neem que ocasionan el 0 % y 100 % de mortalidad de acuerdo a métodos propuestos por Busvine, (1971) y Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez (2005).

4.5.2.3 Preparación de dosis intermedias

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron en la ventana de respuesta biológica se determinaron las soluciones intermedias.

4.5.2.4 Bioensayos

4.5.2.4.1 Método de aspersión

Se realizó la aplicación de concentraciones (0.1, 0.5, 1, 2, 5 y 10 %) y un testigo a base de agua más Tween 80® a plantas de segundo foliolo de frijol de acuerdo al método propuesto por Lagunés-Tejeda y Villanueva-Jiménez (1995), utilizando un aplicador manual. Se dejaron en reposo media hora para después colocar 20 larvas de segundo y tercer instar, se realizaron cinco repeticiones. Los tratamientos se dejaron a temperatura de 25 ± 2 °C y 60 ± 10 % H. R.; se registró la lectura cada cuatro horas durante el ciclo de vida del insecto, observando los cambios de instares, mortalidad, registro de tamaño y peso, oviposición, emergencia de larvas.

4.5.2.4.2 Concentrado del manejo de las repeticiones

En el Cuadro 1, se muestra el número de repeticiones que se realizaron, las fechas en las que se realizaron las aplicaciones, así como el instar y concentraciones que se evaluaron.

Cuadro 1. Concentrado de repeticiones de aplicaciones de aceite de neem

Repetición	Fecha	Instar	Concentración de las aplicaciones (%)
Primera	04-04-11	Segundo	2, 5, 10
Segunda	13-04-11	Segundo	0.1, 0.5, 1, 2
Tercera	24-04-11	Tercer	0.1, 0.5, 1, 2
Cuarta	10-05-11	Segundo	0.1, 0.5, 1, 2
Quinta	01-06-11	Tercer	0.1, 0.5

4.5.2.5 Comparativo de costos de aceite de neem como agente de control contra un plaguicida químico tradicional

Se consultó a un productor del Valle de Poanas Durango así como a casas productoras de agroquímicos (Insecticidas del Guadiana A.C. Durango) para estimar el análisis en relación a la diferencia entre usar un plaguicida químico (Paration) en el ataque de *E. varivestis* y el uso del aceite de neem de la compañía Eco logic® evaluado en esta investigación de acuerdo a los mejores resultados en relación a la mortalidad.

4.6 Análisis de la información

4.6.1 Metodología estadística utilizada en los aceites de orégano

Los datos obtenidos de mortalidad de los bioensayos toxicológicos se corrigieron con la fórmula de Abbott (1925), (la máxima mortalidad tolerada es del 10 %) cuando se presentó mortalidad en el testigo. Posteriormente los datos de mortalidad corregida y dosis empleadas se sometieron al análisis Probit (Hubert, 1979), para la determinación de las DL_{50} , límites fiduciales y ecuaciones de regresión, con el empleo del programa estadístico SAS (SAS Institute, 2000). Se elaboraron las gráficas Dosis vs Unidades Probit, para cada aceite con intervalos de confianza, con el paquete estadístico STATISTICA (2004). Adicionalmente se realizó la prueba de Homogeneidad de los coeficientes de regresión, para determinar si existe diferencia estadística en los valores de DL_{50} de los aceites y en las ecuaciones de regresión de acuerdo con el método propuesto por Gomez y Gomez (1983).

4.6.2 Metodología estadística utilizada en el aceite de neem

Se realizó un ANOVA empleando el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2000) para obtener las diferencias significativas entre los distintos parámetros de las medias de los tratamientos utilizando una prueba de Tukey, la misma metodología se utilizó para obtener las diferencias de los porcentajes de mortalidad en los diferentes tiempos establecidos y bajo diferentes tratamientos. Se realizó un análisis de sobrevivencia de Kaplan Meier utilizando el programa STATISTICA (2004).

V. RESULTADOS

5.1 Aceite de orégano de Durango y Chihuahua

5.1.1 Concentraciones intermedias porcentuales

En el Cuadro 2 se muestra las concentraciones intermedias porcentuales para cada uno de los aceites de acuerdo a su origen.

Cuadro 2. Número de individuos muertos, en cada tipo de aceite, mortalidad corregida en cada concentración una vez que se corrigió con la fórmula de Abbott, respecto a la mortalidad del testigo de todas las repeticiones.

Concentración %	Individuos muertos con aceite de Durango	Individuos muertos con aceite de Chihuahua
0.8	5	16
3	43	63
5	80	99
7	94	110
10	127	130

5.1.2 Dosis letal media, límites fiduciales y pendiente

En el Cuadro 3 se muestran los resultados obtenidos con cada uno de los aceites de orégano, de los análisis Probit para cada aceite, así como los límites fiduciales que

indican el intervalo de concentraciones dentro de los cuales se encuentra la DL_{50} con un 95% de confianza.

Cuadro 3. Dosis letal media, límites fiduciales y pendiente de la ecuación de regresión para cada aceite de orégano mexicano evaluado sobre *E. varivestis*.

Origen del aceite	N (Número de Individuos Tratados)	DL_{50} ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	Límites fiduciales al 95% ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	Pendiente
Durango	780	38.5	(35.0 - 42.1)	3.09
Chihuahua	780	26.1	(23.1 – 29.0)	2.64

La DL_{50} del aceite de orégano de Chihuahua resultó ser más baja que la del estado de Durango. Una forma de contraste de la toxicidad de estos aceites, es la comparación de la amplitud del intervalo de confianza, como una medida de la precisión de los valores calculados y de la pendiente como una medición de la sensibilidad, para lo cual se elaboró la Figura 1, donde se muestran las líneas de respuesta dosis-mortalidad, los intervalos de confianza correspondiente al aceite de orégano de Durango y de Chihuahua contra Unidades Probit.

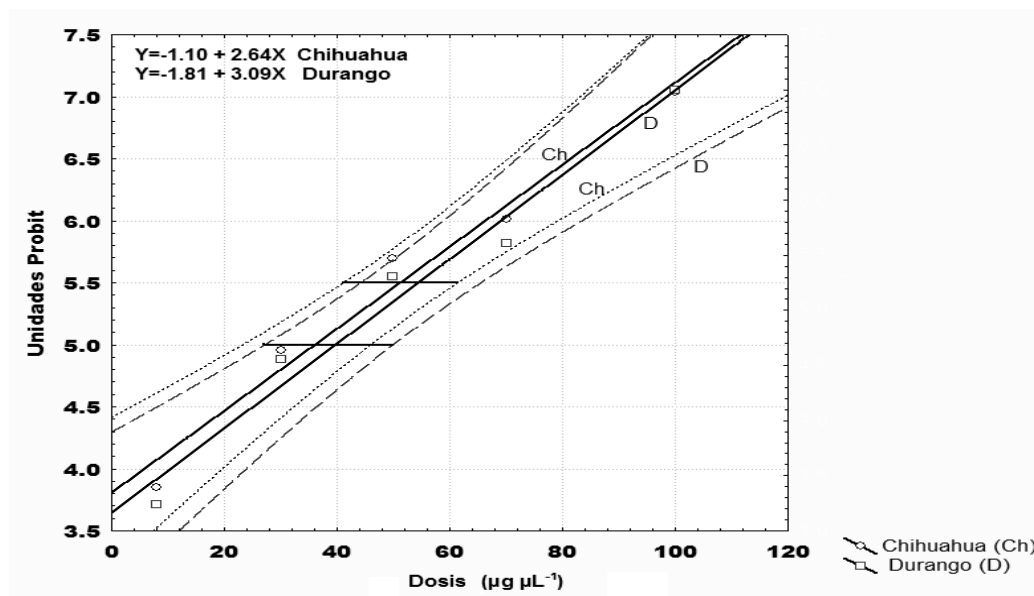


Figura 1. Líneas de respuesta dosis-mortalidad y límites fiduciales del aceite esencial de orégano mexicano de Durango y Chihuahua.

En la Figura 1 se observa que existe una sobreposición o traslape de los intervalos de confianza a todo lo largo de las rectas de ambos aceites, por lo cual no son significativamente diferentes de acuerdo a los criterios planteados por Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez (1995).

5.1.3 Prueba de homogeneidad de los coeficientes de regresión

Adicionalmente, se elaboró la prueba de Homogeneidad de los coeficientes de regresión de las ecuaciones, se planteó la hipótesis de que los coeficientes de regresión son similares, es decir que el efecto insecticida del aceite de orégano de Durango y Chihuahua son semejantes. Esta se obtuvo con los datos del Cuadro 1. Estas propiedades se determinaron a través de la prueba de Homogeneidad de los coeficientes de regresión, propuesta por Gomez y Gomez (1983). Con esta prueba se planteó la hipótesis de que los coeficientes de regresión son similares y al realizar

la prueba de t para las comparaciones con un $n=8$, se obtuvo un valor de $t=0.42$, que al comparar con el valor de t de tablas, se encontró un valor de $t=1.94$ para un nivel de significancia de 5%, por lo que el valor absoluto calculado para t es menor que el valor tabular de t al 5% de nivel de significancia. No se rechaza la hipótesis de que los coeficientes de regresión son los mismos para los dos aceites de orégano mexicano, por lo que se concluye que los dos coeficientes de regresión son homogéneos.

5.1.4 Contenidos de p-cimeno, timol y carvacrol

En el Cuadro 4, se aprecia la comparación entre ambos aceites, destacándose el de Chihuahua con mayor contenido de carvacrol. También se obtuvo la proporción entre los componentes carvacrol, timol y p cimeno del estado de Durango la cual es de 242: 1, 1:21 y 1: 46 con respecto al del estado de Chihuahua.

Cuadro 4. Comparación de los contenidos de p-cimeno, timol y carvacrol

Origen del aceite	Carvacrol (%)	Timol (%)	p-Cimeno (%)
*Durango	0.23	66.88	8.28
**Chihuahua	55.68	3.20	0.18

* Analizados en CIRENA por Cromatografía de gases (Anexo 1)

**Silva y Morales, 2008

5.2 Aceite de neem

5.2.1 Pruebas de fitotóxicidad en plantas de frijol

Se encontró que con concentraciones menores al 5 % no tuvieron ningún efecto en el desarrollo o algún daño a las hojas de la planta, con concentraciones superiores al 10 % mostraron daño fisiológico en las hojas de las plantas, y a medida que se aumentó la concentración (12 y 15 %), ocasionó mayor daño en las hojas de la planta al tercer día de la observación (Figura 2).

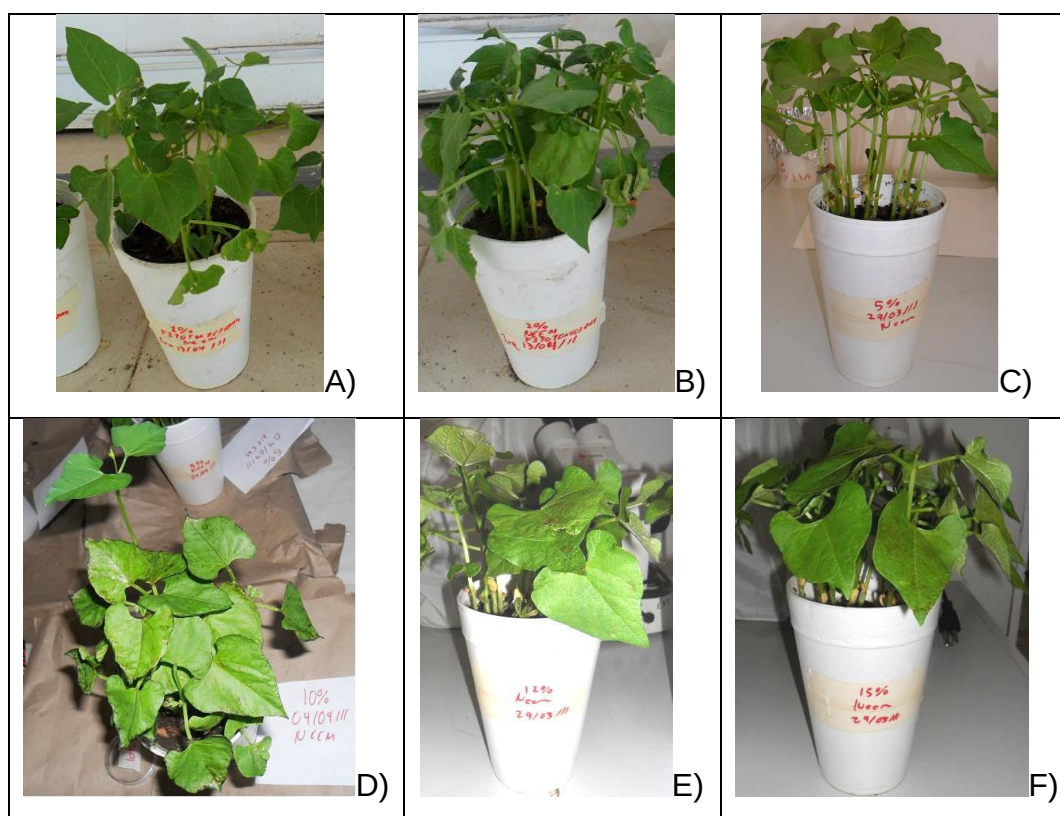


Figura 2. Evaluación de diferentes concentraciones de aceite de neem en plantas de frijol, A) 1 %, B) 2 %, C) 5 %, D) 10 %, E) 12 %, F) 15 %

Estas pruebas se realizaron con el objetivo de establecer las concentraciones, las cuales no tuvieran algún efecto fitotóxico en la planta de frijol del segundo foliolo, debido, a que las pruebas fueron alimentarias, siendo los tratamientos menores al 5 % (Figura 2 A, B y C) los que mostraron la respuesta más satisfactoria, por lo contrario se puede observar en la Figura 2D, pequeñas manchas necróticas en el haz de la hoja a medida que se aumentó la concentración (Figura 2E y 2F), estas manchas eran más frecuentes en la planta de frijol causando un marchitamiento en la planta y muerte a los pocos días por efecto de fitotóxicidad del aceite de neem a concentraciones mayores al 5 %; a pesar de que las fotografías no ilustraron bien este fenómeno en la vida real se observó este daño fisiológico en la planta.

5.2.2 Parámetros de la primera repetición.

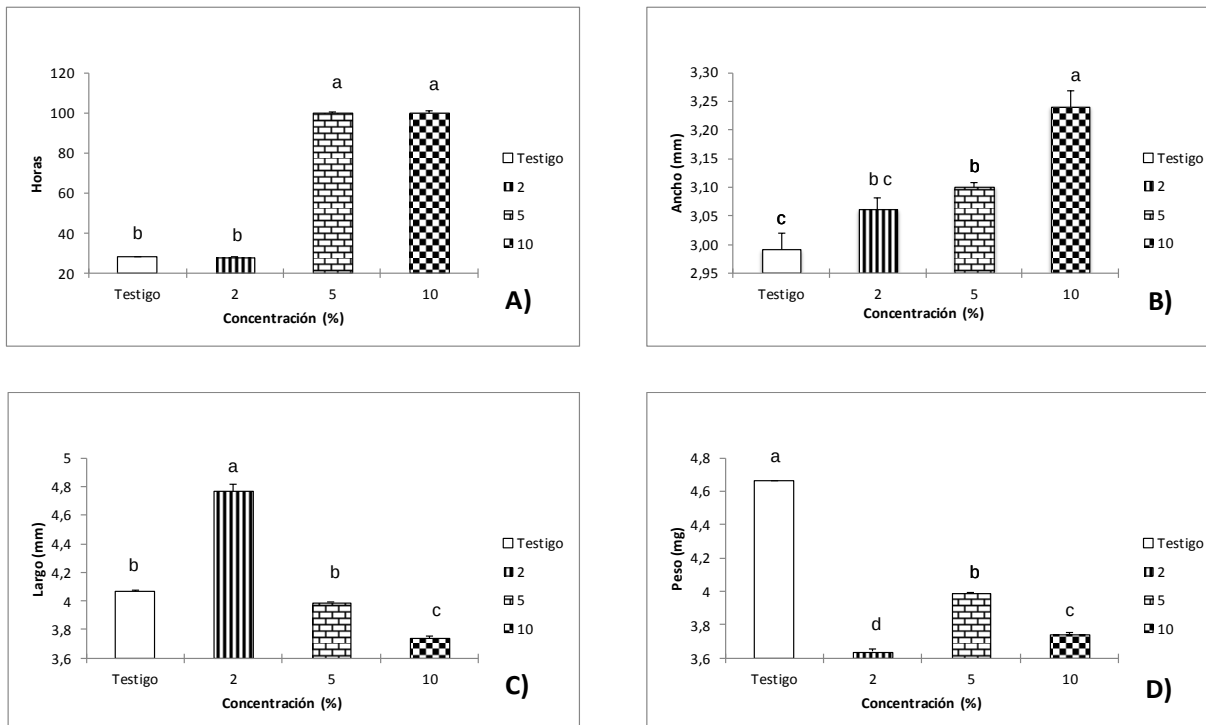


Figura 3. Efecto de concentraciones de aceite de neem en el tercer instar de *E. varivestis* de la primera repetición. A) Horas, B) Ancho, C) Largo y D). Peso. Cada punto representa la media de diez repeticiones ± error estándar. Letras diferentes en (A, B, C y D) indican diferencias significativas entre muestreos, según la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

En esta primera repetición con larvas de conchuela de segundo instar sometidas a los tratamientos al 2, 5 y 10 % y el testigo, se observa en la Figura 3A, que hubo diferencia significativa en la comparación de medias con un $\alpha=0.05$ ($F=8602.43$; $gl=3$; $p<0.0001$) de los tratamientos al 5 y al 10 %, formando un grupo respecto al 2 % y el testigo, en horas entre los distintos tratamientos en cuanto a la duración y cambio del segundo al tercer instar, en los tratamientos al 5 y 10 % no se registró el cambio de exuvia, la duración en horas de las larvas testigo fue 28 horas, que corresponde a

valores normales citados por otros autores (García, 1993), tomando los valores de medidas para los tratamientos a las horas marcadas en la gráfica, se contaban con tan solo de tres a cuatro larvas por tratamiento en estas últimas, por lo que el neem afectó el proceso de muda. En la Figura 3B muestra diferencias significativas respecto al testigo con la prueba de Tukey con un $\alpha=0.05$ ($F=20.93$; $gl=3$; $p<0.0004$) donde a medida que incrementó la concentración de neem aplicado a hojas de frijol, incrementó el ancho de la larva. El tratamiento al 10 % mostró el mayor valor de ancho y el testigo la menor medida del ancho, esto debido a la edad en las que se tomó a las larvas. En la Figura 3C se observan diferencias estadísticas entre todos los tratamientos con la prueba de Tukey con un $\alpha=0.05$ ($F=229.39$; $gl=3$; $p<0.0001$). La mayor longitud de las larvas correspondió a las larvas sometidas al tratamiento de neem al 2 %, ya que era más corta la edad de las larvas del grupo testigo. Los otros dos tratamientos fueron inferiores a la longitud del testigo. En contraste, a las medidas en ancho y largo, en la Figura 3D muestran diferencias significativas respecto al testigo con la prueba de Tukey con un $\alpha=0.05$ ($F=2200.13$; $gl=3$; $p<0.0001$), el mayor peso lo registraron las larvas del tratamiento testigo con valores superiores a los tres tratamientos; el menor peso se registró en el tratamiento al 2 %; si bien, en las concentraciones al 5 y 10 %, presentaron menor peso con respecto al testigo, manifestándose efecto antialimentario del aceite de neem en los tratamientos aplicados.

Únicamente larvas del testigo cambiaron al cuarto instar, las larvas del tercer instar sometidas a los tratamientos del 5 y 10 % no llegaron al cuarto instar. El registro de las mediciones de larvas del tratamiento al 2 % se efectuó sin el cambio de instar, este registro se realizó con tres larvas, las cuales no se alimentaron durante el transcurso del experimento, concluyendo en la muerte de las larvas.

En las Figura 4A, no hubo diferencia significativa con un $\alpha=0.05$ ($F=5.24$; $gl=1$; $p>0.084$) debido a que no hubo cambio de instar por parte del tratamiento al 2 % y se

efectuó el registro de medidas solo con el cambio del testigo. Se encontraron diferencias significativas en los parámetros de las Figuras 4B, 4C y 4D con un $\alpha=0.05$ en ancho ($F=839$; $gl=1$; $p<0.0001$), largo ($F=2242.31$; $gl=1$; $p<0.0001$) y peso ($F=1254.45$; $gl=1$; $p<0.0001$) respectivamente, observándose que las larvas del grupo tratado con soluciones de neem al 2 %, disminuyeron respecto a las larvas del grupo testigo.

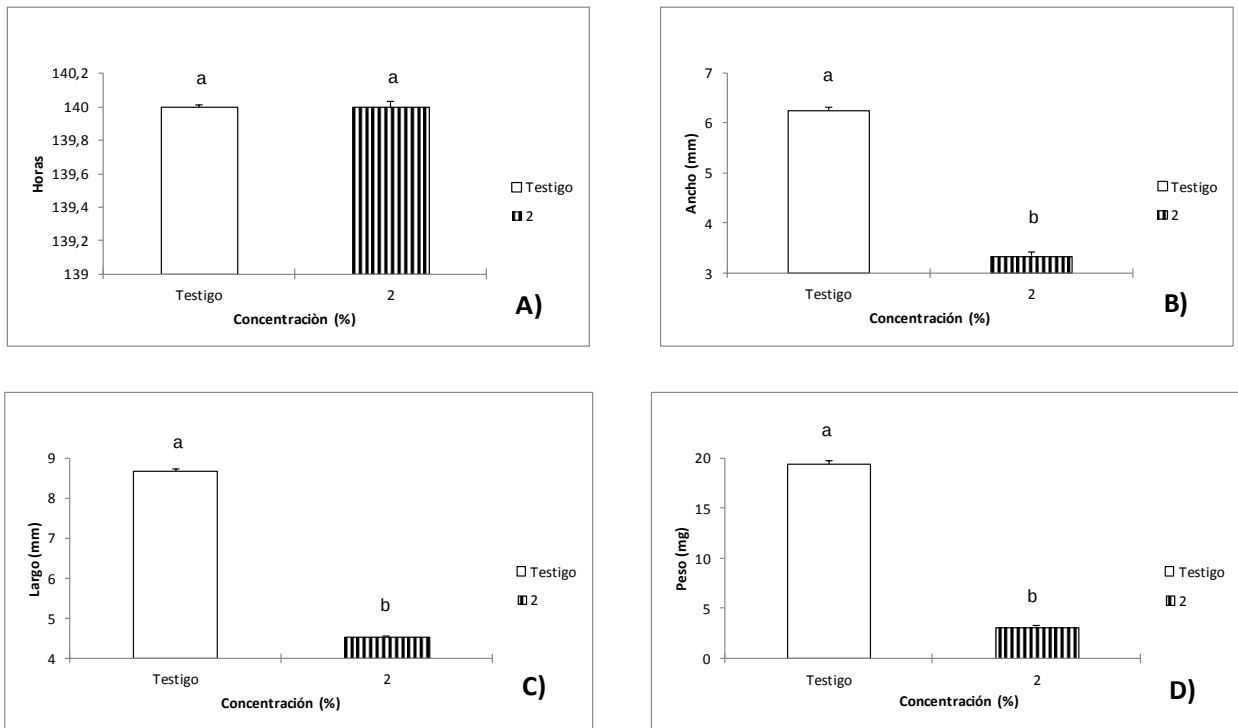


Figura 4. Efecto de concentraciones de aceite de neem en el cuarto instar de *E. varivestis* de la primera repetición. A) Horas, B) Ancho, C) Largo y D) Peso. Cada punto representa la media de diez repeticiones $\pm$ error estándar. Letras diferentes en (A, B, C y D) indican diferencias significativas entre muestreos, según la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

De esta primera repetición, solo los individuos del grupo testigo concluyeron el ciclo biológico y dieron origen a una segunda generación, ya que los demás tratamientos,

mostraron inanición como consecuencia de efecto antialimentarios y se prolongó el estado de larva de este instar.

5.2.3 Parámetros de la segunda repetición

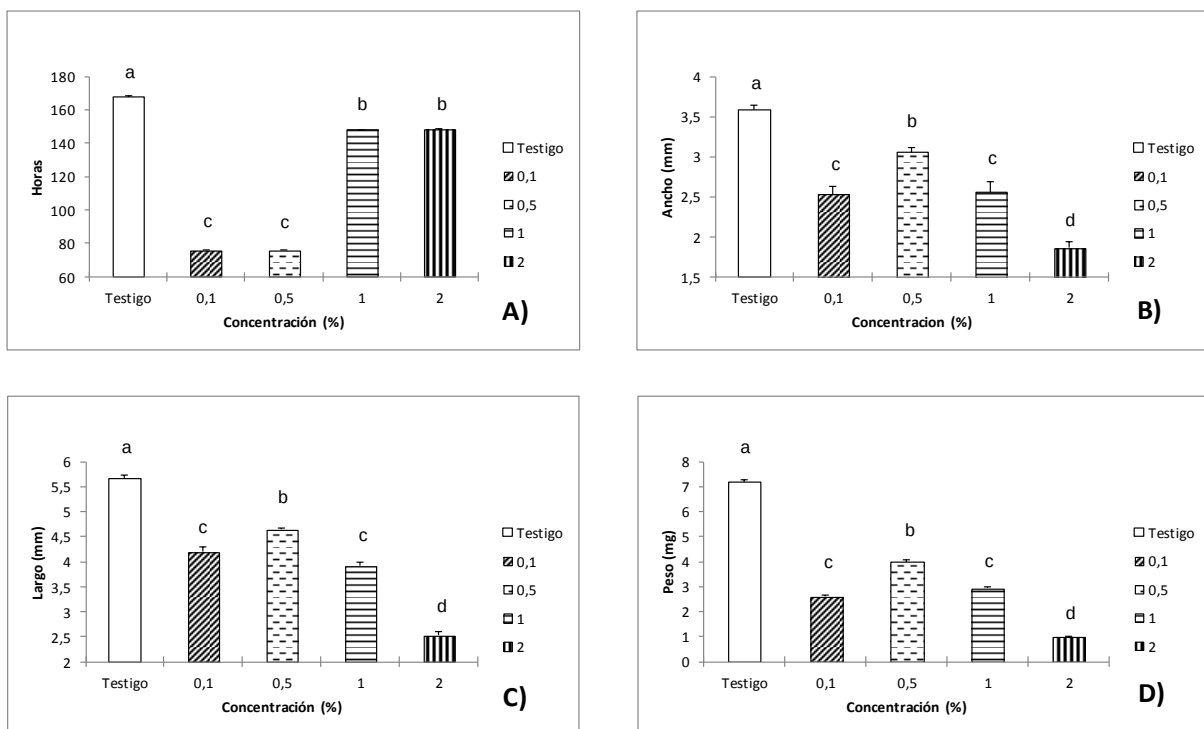


Figura 5. Efecto de concentraciones de aceite de neem en el tercer instar de *E. varivestis* de la segunda repetición. A) Horas, B) Ancho, C) Largo y D) Peso. Cada punto representa la media de diez repeticiones $\pm$ error estándar. Letras diferentes en (A, B, C y D) indican diferencias significativas entre muestreos, según la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

En la segunda repetición se incluyeron tres concentraciones adicionales de aceite de neem al 0.1 %, 0.5 % y 1 %, la duración en horas como se muestra en la Figura 5A fue mayor en el grupo de larvas testigo, se encontraron diferencias significativas con un $\alpha=0.05$ ($F=10678.5$; $gl=4$; $p<0.0001$) debido a que se trataron larvas más jóvenes

con respecto a las empleadas en los tratamientos, de ahí que, en los tratamientos al 0.1 y 0.5 % la duración en horas fue menor. Se observó que el tiempo para el cambio de exuvia en todos los tratamientos fue menor que el testigo, el tratamiento al 1 % no cambió al tercer instar, con las cinco larvas que quedaron, se realizó la toma de mediciones. Se encontraron diferencias significativas en los parámetros de las Figuras 5B, 5C y 5D, en la prueba de comparación de medias con un $\alpha=0.05$ en ancho ($F=68.26$; $gl=4$; $p<0.0001$), largo ($F=278.25$; $gl=4$; $p<0.0001$) y peso ($F=1135.51$; $gl=4$; $p<0.0001$), respectivamente.

Todos los tratamientos fueron inferiores en medida respecto al testigo y el que registró las lecturas menores fue el tratamiento al 2 %. Mientras que las larvas del grupo testigo continuó el ciclo hasta la segunda generación.

5.2.4 Parámetros de la tercera repetición

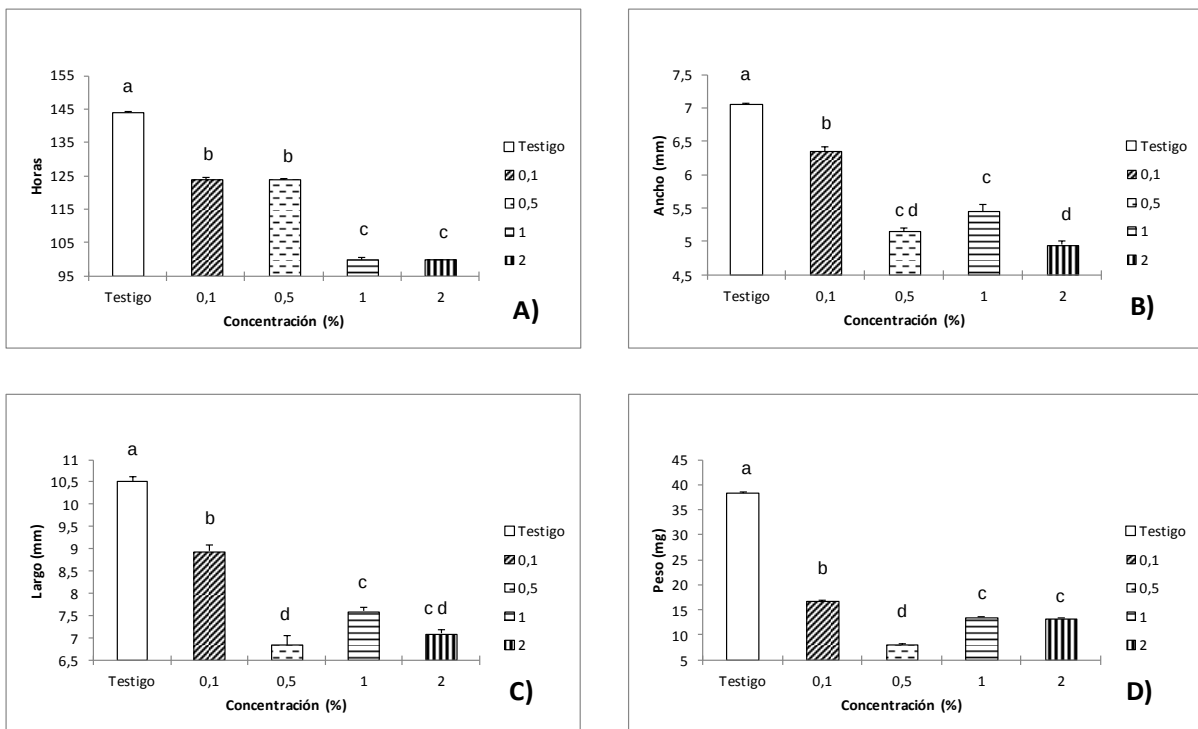


Figura 6. Efecto de concentraciones de aceite de neem en el cuarto instar de *E. varivestis* de la tercera repetición. A) Horas, B) Ancho, C) Largo y D) Peso. Cada punto representa la media de diez repeticiones $\pm$ error estándar. Letras diferentes en (A, B, C y D) indican diferencias significativas entre muestreos, según la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

En la tercera repetición, en todos los tratamientos el tiempo de cambio de tercer al cuarto instar (Figura 6A), fueron inferiores en relación con las larvas del grupo testigo, esto se demuestra en la comparación de medias con un $\alpha=0.05$ ($F=2813.94$; $gl=4$; $p<0.0001$). Se encontraron diferencias significativas en los parámetros de las Figuras 6B, 6C y 6D aplicando la prueba de Tukey con un $\alpha=0.05$ en ancho ($F=178.76$; $gl=4$; $p<0.0001$), largo ($F=147.11$; $gl=4$; $p<0.0001$) y peso ($F=9319.28$; $gl=4$; $p<0.0001$), respectivamente. Se pueden observar que las más altas mediciones corresponden en todos los casos por el grupo testigo y que el tratamiento al 0.5 y 2 % registraron las menores mediciones. Sólo las larvas de los grupos testigo y del

tratamiento al 0.1 % llegaron a pupa y adulto. Con los datos que proporcionaron se generaron las gráficas de las Figuras 7 y 8, respectivamente.

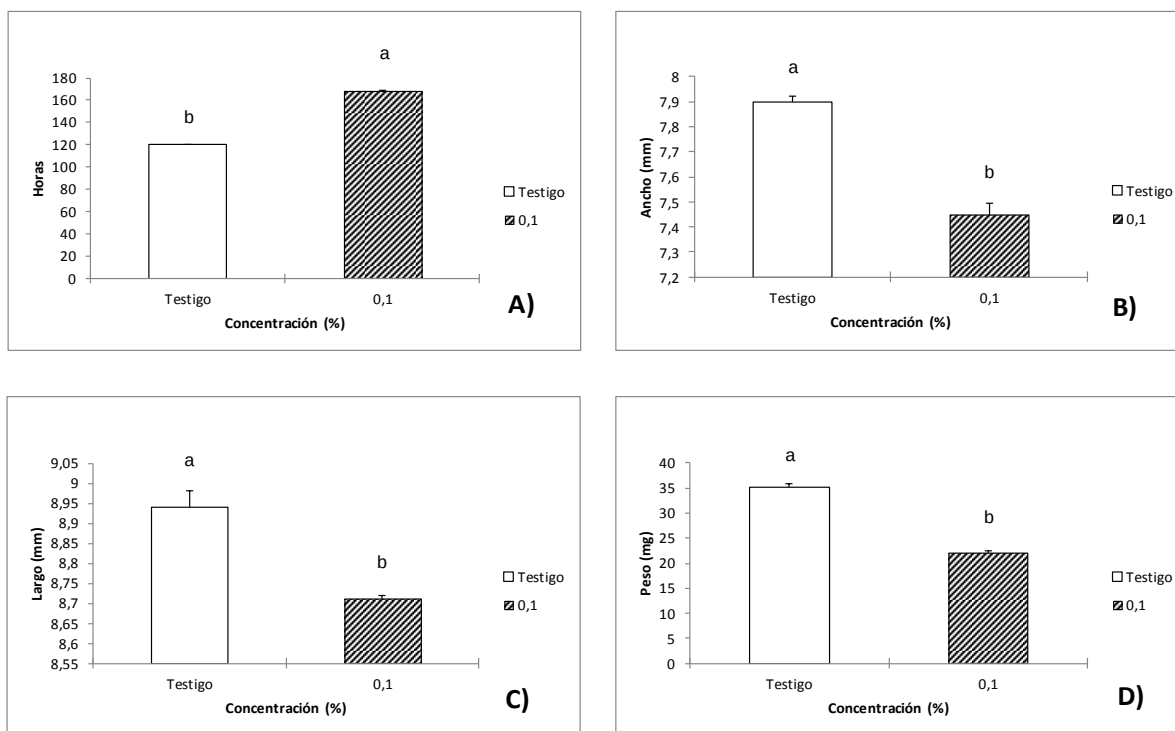


Figura 7. Efecto de concentraciones de aceite de neem en el estado de pupa de *E. varivestis* de la tercera repetición. A) Horas, B) Ancho, C) Largo y D) Peso. Cada punto representa la media de diez repeticiones $\pm$ error estándar. Letras diferentes en (A, B, C y D) indican diferencias significativas entre muestreos, según la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

En la Figura 7A se observa que para el tratamiento al 0.1 % tardó más tiempo que el grupo testigo, encontrando diferencia significativa con un $\alpha=0.05$ ($F=10024.27$; $gl=1$; $p<0.0001$). Se encontraron diferencias significativas en los parámetros de las Figuras 7B, 7C y 7D con un $\alpha=0.05$ en ancho ($F=87.71$; $gl=1$; $p<0.0007$), largo ($F=13.98$; $gl=1$; $p<0.0201$) y peso ($F=207.02$; $gl=1$; $p<0.0001$), respectivamente. Estos parámetros fueron mayores en las pupas del grupo testigo, como consecuencia del efecto antialimentario como se observa en la Figuras 7B, 7C y 7D.

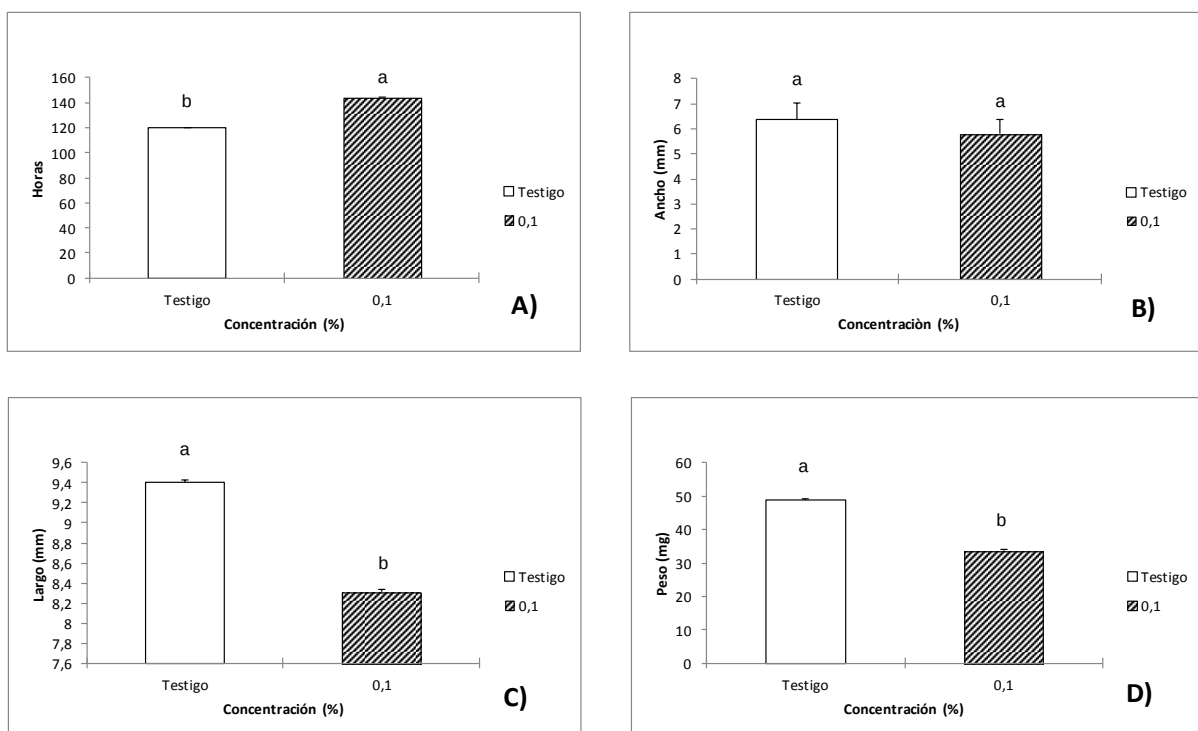


Figura 8. Efecto de concentraciones de aceite de neem en el estado de adulto de *E. varivestis* de la tercera repetición. A) Horas, B) Ancho, C) Largo y D) Peso. Cada punto representa la media de diez repeticiones $\pm$ error estándar. Letras diferentes en (A, B, C y D) indican diferencias significativas entre muestreos, según la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

Para emergencia de pupa al estado adulto en el tratamiento al 0.1 %, tardó más tiempo en emerger que las pupas del grupo testigo, como se observa en la Figura 8A, aplicando una prueba de Tukey, con $\alpha=0.05$ ($F=1323.06$; $gl=1$; $p<0.0001$). En la Figura 8B, el ancho no mostró diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey con una significancia de $\alpha=0.05$ ($F=0.03$; $gl=1$; $p>0.8671$). Se encontraron diferencias significativas en los parámetros de las Figuras 8C y 8D aplicando la prueba de Tukey con un $\alpha=0.05$ en largo ($F=712.87$; $gl=1$; $p<0.0001$) y peso ($F=469.32$; $gl=1$; $p<0.0001$), respectivamente. En el estado adulto las mediciones de largo y peso del grupo testigo fueron mayores que en el tratamiento al 0.1 %.

5.2.5 Parámetros de la cuarta repetición

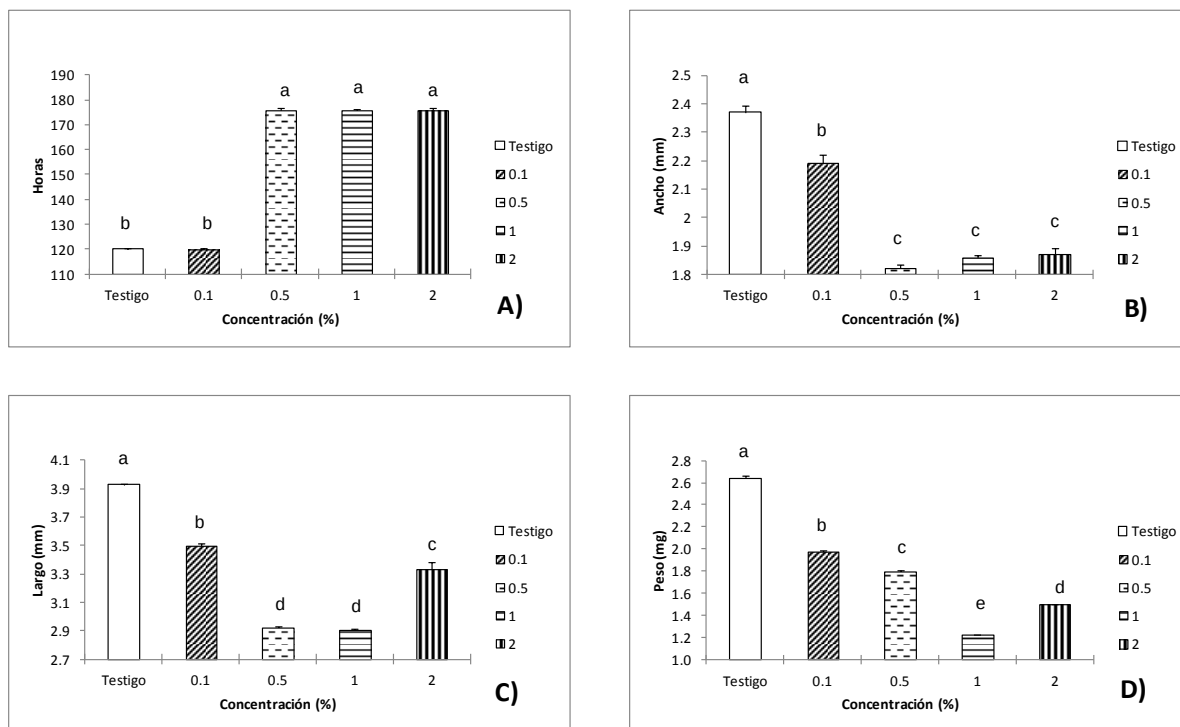


Figura 9. Efecto de concentraciones de aceite de neem en larvas de tercer instar de *E. varivestis* de la cuarta repetición. A). Horas, B). Ancho, C). Largo y D) Peso. Cada punto representa la media de diez repeticiones $\pm$ error estándar. Letras diferentes en (A, B, C y D) indican diferencias significativas entre muestreos, según la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

La cuarta repetición, incluyo larvas del grupo testigo y cuatro concentraciones de aceite de neem al 0.1, 0.5, 1 y 2 %; sólo las larvas del grupo testigo y el tratamiento al 0.1 %, llevaron a cabo el desarrollo normal y cambiaron del segundo a tercer instar larval. Las larvas de los tratamientos restantes no lograron cambiar de instar, por lo que el registro que se tiene es mayor que el de los grupos anteriormente mencionados, esto se observa en la Figura 9A donde se observan dos grupos, el testigo y el tratamiento al 0.1 %, y el grupo restante de tratamientos, los cuales de

acuerdo a la prueba de Tukey marcó diferencia significativa con un $\alpha=0.05$ ($F=2784.14$; $gl=4$; $p<0.0001$). Posteriormente, los tratamientos al 0.5, 1 y 2 % causaron inanición y muerte de las larvas, se encontraron diferencias significativas en los parámetros de las Figuras 9B, 9C y 9D, con un $\alpha=0.05$ en ancho ($F=124.61$; $gl=4$; $p<0.0001$), largo ($F=266.9$; $gl=4$; $p<0.0001$) y peso ($F=2987.22$; $gl=4$; $p<0.0001$) respectivamente. Sin embargo, en las larvas del tratamiento al 2 % se observan algunos valores altos con respecto a los tratamientos previos, lo cual es atribuido a un error de medición con el número de individuos sobrevivientes. Únicamente el testigo y el tratamiento al 0.1 % llegaron al cuarto instar. Por lo que, los datos que se muestran a continuación solo se refieren a larvas del grupo testigo y a las correspondientes al tratamiento del 0.1 %. Solo larvas del grupo testigo llegaron al estado adulto.

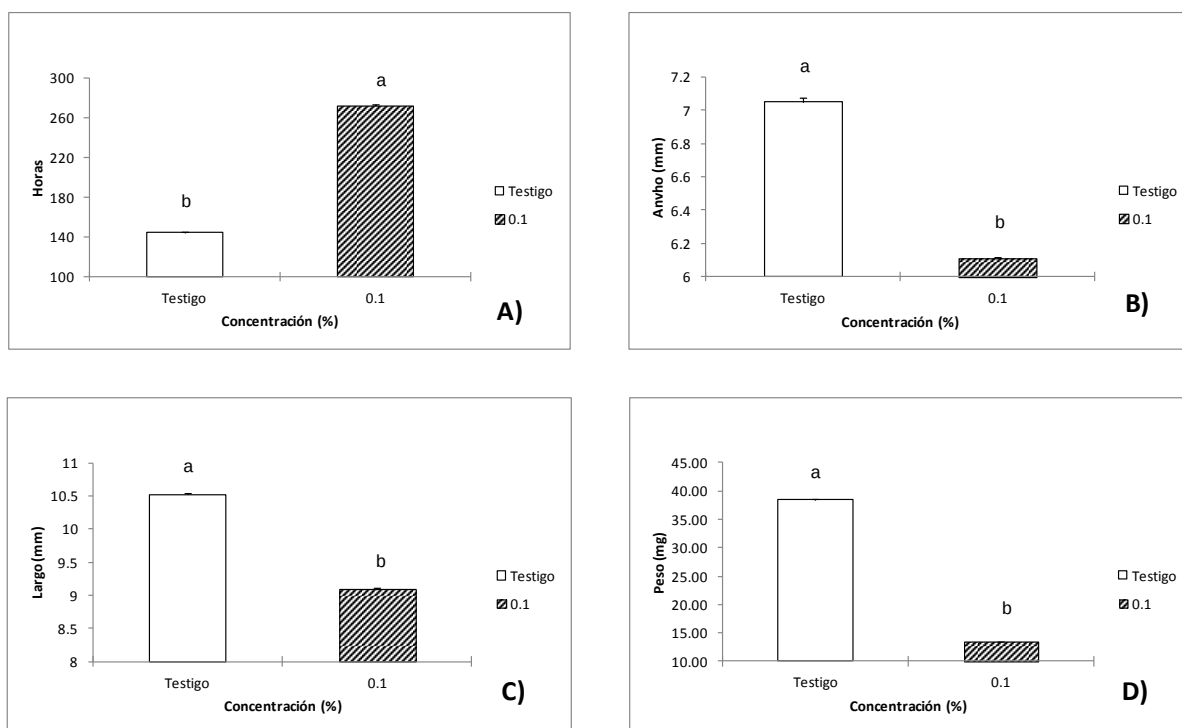


Figura 10. Efecto de concentraciones de aceite de neem en larvas de cuarto instar de *E. varivestis* de la cuarta repetición. A) Horas, B) Ancho, C) Largo y D) Peso. Cada punto representa la media de diez repeticiones $\pm$ error estándar. Letras diferentes en (A, B, C y D) indican diferencias significativas entre muestreos, según la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

En la Figura, 10A se observa diferencia significativa con $\alpha=0.05$ ($F=15858.9$; $gl=1$; $p<0.0001$), en la duración para el cambio al cuarto instar del tratamiento al 0.1 % con respecto al testigo. A pesar de que no se encontró diferencia en duración en el instar anterior, aquí si se manifiesta, como una consecuencia del efecto antialimentario desde el estado de desarrollo previo al actual, lo cual fue más claro en este cuarto instar ocasionando que ocurriera la muerte de las larvas, por lo que solo las larvas del grupo testigo alcanzaron los estados de pupa y adulto. Adicionalmente, se encontraron diferencias significativas en los parámetros de las Figuras 10B, 10C y 10D con $\alpha=0.05$ en ancho ($F=917.78$; $gl=1$; $p<0.0001$), largo ($F=3952.36$; $gl=1$; $p<0.0001$) y peso ($F=13315.3$; $gl=1$; $p<0.0001$) respectivamente, observando una marcada diferencia entre el testigo y el tratamiento al 0.1%.

5.2.6 Parámetros de la quinta repetición.

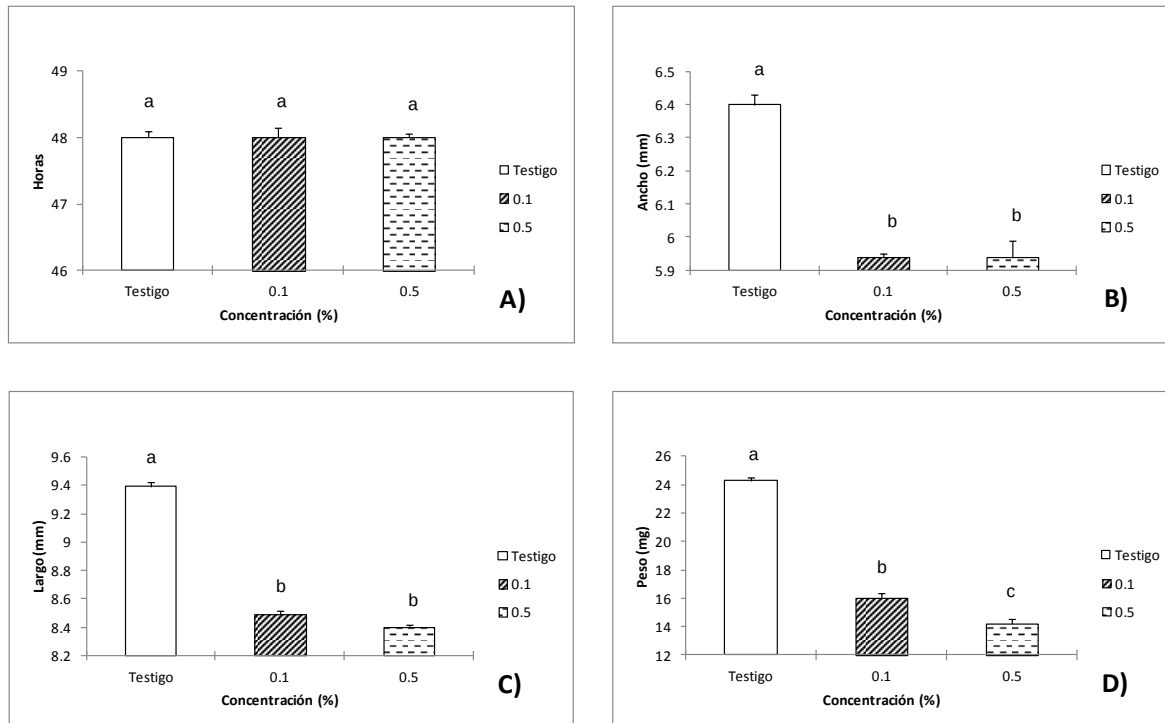


Figura 11. Efecto de concentraciones de aceite de neem en larvas de cuarto instar de *E. varivestis* de la quinta repetición. A) Horas, B) Ancho, C) Largo y D) Peso. Cada punto representa la media de diez repeticiones ± error estándar. Letras diferentes en (A, B, C y D) indican diferencias significativas entre muestreos, según la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

La quinta repetición incluyó larvas del grupo testigo y dos concentraciones al 0.1 y 0.5 %, inició con larvas de tercer instar para registrar cambios posteriores con el propósito de llegar al estado adulto con mayor número de individuos, para registrar efectos en la reproducción, como número de huevecillos y la viabilidad o eclosión de los mismos. El cambio del testigo con los dos tratamientos, se registró al mismo tiempo como lo muestra la Figura 11A, no hubo diferencias significativas con $\alpha=0.05$ ($F=0.78$; $gl=2$; $p>0.5008$). Por lo contrario, las diferencias estuvieron marcadas en el

desarrollo de la larva, mostrando diferencias significativas en los parámetros de las Figuras 11B, 11C y 11D, con un $\alpha=0.05$ en ancho ($F=56.05$; $gl=2$; $p<0.0001$), largo ($F=426.6$; $gl=2$; $p<0.0001$) y peso ($F=268.11$; $gl=2$; $p<0.0001$), respectivamente. Los tratamientos al 0.1 % y 0.5 % mostraron valores inferiores en relación al testigo.

Sin embargo, sólo larvas del tratamiento al 0.1 % y del grupo testigo llegaron al estado de pupa.

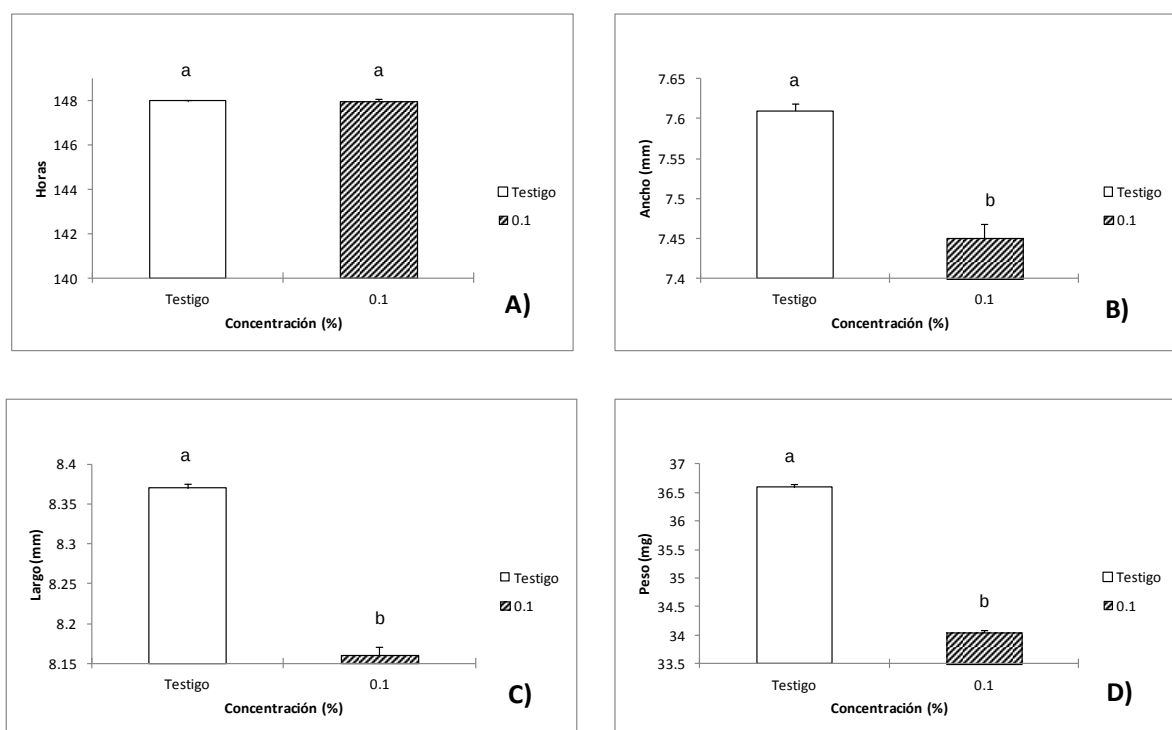


Figura 12. Efecto de concentraciones de aceite de neem en estado de pupa de *E. varivestis* de la quinta repetición. A) Horas, B) Ancho, C) Largo y D) Peso. Cada punto representa la media de diez repeticiones $\pm$ error estándar. Letras diferentes en (A, B, C y D) indican diferencias significativas entre muestreos, según la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

No se observaron diferencias significativas en la Figura 12A con $\alpha=0.05$ ($F=0.82$; $gl=1$; $p>0.4169$) en cuanto al tiempo en el cambio del cuarto instar a pupa; las

diferencias estuvieron marcadas en las medidas de la pupa encontrando diferencias significativas en los parámetros de las Figuras 12B, 12C y 12D, con $\alpha=0.05$ en los parámetros ancho ($F=48.66$; $gl=1$; $p<0.0022$), largo ($F=194.4$; $gl=1$; $p<0.0002$) y peso ($F=1157.52$; $gl=1$; $p<0.0001$), respectivamente. Pupas del grupo testigo fueron superior en peso en comparación al tratamiento al 0.1 %; sin embargo, se presentó una mortalidad debido al aumento repentino del calor ambiental lo cual ocasionó que las pupas no llegaran al estado adulto por lo cual el trabajo solo llegó a esta etapa.

5.2.7 Concentrado de los parámetros de las repeticiones

En el Cuadro 5 se muestra el concentrado de las cinco repeticiones, se puede observar en general que a mayor concentración de las soluciones de neem aplicadas a plantas de frijol, hubo disminución de los parámetros: ancho, largo y peso en los distintos tratamientos respecto al testigo, como se mencionó anteriormente para cada caso.

Cuadro 5. Concentrado de parámetros evaluados en las cinco repeticiones

Repetición	Horas					Ancho (mm)					Largo (mm)					Peso (mg)				
	T	2%	5%	10%		T	2%	5%	10%		T	2%	5%	10%		T	2%	5%	10%	
04-04-11 3 instar	28b	28b	100a	100a		2.99c	3.06bc	3.10b	3.14a		4.07b	4.77a	3.99b	3.74c		4.66a	3.64d	3.99b	3.74c	
04-04-11 4 instar	140a	140a	-	-		6.23a	6.34b	-	-		8.65a	4.54b	-	-		19.33a	3.18b	-	-	
	T	0.1%	0.5%	1%	2%	T	0.1%	0.5%	1%	2%	T	0.1%	0.5%	1%	2%	T	0.1%	0.5%	1%	2%
13-04-11 3 instar	168a	76c	76c	148b	148b	3.59a	2.53c	3.06b	2.56c	1.86d	5.65a	4.20c	4.64b	3.92c	2.53d	7.20a	2.60c	4.00b	2.93c	0.98d
24-04-11 4 instar	144a	124b	124b	100c	100c	7.05a	6.35b	5.15cd	5.45c	4.95d	10.52a	8.95b	6.85d	7.60c	7.10cd	38.42a	16.76b	8.10d	13.59c	13.34c
24-04-11 Pupa	120b	168a	-	-	-	7.90a	7.45b	-	-	-	8.94a	8.71b	-	-	-	35.15a	21.99b	-	-	-
24-04-11 Adulto	120b	144a	-	-	-	6.37a	5.79a	-	-	-	9.40a	8.31b	-	-	-	49.00a	33.60b	-	-	-
10-05-11 3 instar	120b	120b	176a	176a	176a	2.37a	2.19b	1.82c	1.86c	1.87c	3.93a	3.50b	2.92d	2.91d	3.33c	2.64a	1.98b	1.80c	1.23e	1.50d
10-05-11 4 instar	144b	272a	-	-	-	7.05a	6.11b	-	-	-	10.52a	9.10b	-	-	-	38.42a	13.40b	-	-	-
	T	0.1%	0.5%			T	0.1%	0.5%			T	0.1%	0.5%			T	0.1%	0.5%		
01-06-11 4 instar	48a	48a	48a			6.40a	5.94b	5.94b			9.39a	8.49b	8.40b			24.28a	16.05b			14.20c
01-06-11 pupa	148a	148a	-			7.61a	7.45b	-			8.37a	8.16b	-			36.59a	34.04b			-

En el Cuadro 6 se muestra los resultados de probabilidad, grados de libertad y el valor de F, para lo diferentes estados de desarrollo de cada una de las repeticiones de acuerdo a la información obtenida en cada una de las diferentes repeticiones

Cuadro 6. Resultados del análisis de varianza en las repeticiones y estados de desarrollo de *E. varivestis*

3 instar												
Repetición	Horas			Ancho (mm)			Largo (mm)			Peso (mg)		
	F	gl	p	F	gl	p	F	gl	p	F	gl	p
04-04-11	8602.43	3	<.0001	20.93	3	0.0004	249.39	3	<.0001	2200.13	3	<.0001
13-04-11	10678.5	4	<.0001	68.26	4	<.0001	278.25	4	<.0001	1135.51	4	<.0001
10-05-11	2784.14	4	<.0001	124.61	4	<.0001	266.90	4	<.0001	2987.22	4	<.0001
4 instar												
04-04-11	5.24	1	0.0840	839.00	1	<.0001	2242.31	1	<.0001	1254.45	1	<.0001
24-04-11	2813.94	4	<.0001	178.76	4	<.0001	147.11	4	<.0001	9319.28	4	<.0001
10-05-11	15858.9	1	<.0001	917.78	1	<.0001	3952.36	1	<.0001	13315.3	1	<.0001
01-06-11	0.78	2	0.5008	56.05	2	0.0001	426.60	2	<.0001	268.11	2	<.0001
Pupa												
24-04-11	10024.7	1	<.0001	87.71	1	0.0007	13.98	1	0.0201	207.02	1	0.0001
01-06-11	0.82	1	0.4169	48.66	1	0.0022	194.40	1	0.0002	1157.52	1	<.0001
Adulto												
24-04-11	1323.06	1	<.0001	0.03	1	0.8671	712.87	1	<.0001	469.32	1	<.0001

5.2.8 Registro de mortalidad y sobrevivencia

En el Cuadro 7 se observan los porcentajes de mortalidad de larvas de segundo y tercer instar de *E. varivestis*, tomando lecturas a los tres, siete y catorce días después de la primera aplicación de aceite de neem a las concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 2, 5 y 10 %, así como los porcentajes de sobrevivencia en relación al cambio de muda y a los adultos que lograron emerger.

Cuadro 7. Efectos del aceite de neem sobre el desarrollo de larvas de segundo y tercer instar de *E. varivestis*, sobre plantas de frijol tratadas a distintas concentraciones a los tres, siete y catorce días.

Tratamiento (%)	Mortalidad (%)			Sobrevivencia (%)	
	3DDA	7DDA	14DDA	Pupas	Adultos
Testigo	5 b	17 d	25 b	87.5 a	82.5 a
0.1	6.25 b	28.75 d	61.25 ab	75 a	62.5 b
0.5	3.75 b	36.25 cd	88.75 a	-	-
1	6.67 b	63.33 bc	88.33 a	-	-
2	11.25 b	71.25 ab	96.25 a	-	-
5	35 a	100 a	-	-	-
10	40 a	100 a	-	-	-
DMS	12.26	33.96	36.95	14.92	8.15

Valores con la misma letra dentro de factor en cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey, a una $p \leq 0.05$.

DMS= diferencia mínima significativa

DDA= Días después de la aplicación.

En el Cuadro 7, la lectura de porcentaje de mortalidad a los 3DDA mostró diferencias significativas con un $\alpha=0.05$ ($F=31.47$; $gl=6$; $p<0.0001$), formando dos grupos, el

grupo con los tratamientos al 5 y 10 % en los cuales no hay diferencia entre ellos, pero sí entre el grupo testigo y los demás tratamientos inferiores en concentración. En el mismo cuadro se puede observar que la lectura de porcentaje de mortalidad a los 7DDA mostró diferencias significativas con un $\alpha=0.05$ ($F=19.57$; $gl=6$; $p<0.0001$), a diferencia de los tratamientos al 5 y 10 % que no mostraron diferencias significativas entre ellos, pero sí hubo diferencia contra todos los demás tratamientos; al igual que el tratamiento al 0.1 % y el testigo donde no hubo diferencia significativa entre ellos pero si con los demás tratamientos. La lectura de porcentaje de mortalidad a los 14 DDA mostró diferencias significativas con un $\alpha=0.05$ ($F=11.31$; $gl=6$; $p<0.0001$), donde todos los tratamientos tuvieron diferencias estadísticas en comparación al testigo, pero entre ellos no las hubo. Solo el tratamiento al 0.1 % y el testigo llegaron al estado de pupa no mostrando diferencias significativas con un $\alpha=0.05$ ($F=3.73$; $gl=1$; $p<0.0894$), mientras que en el estado adulto si hubo diferencias significativas con un $\alpha=0.05$ ($F=32$; $gl=1$; $p<0.0005$).

Con los datos obtenidos del Cuadro 7 se realizó una gráfica de porcentaje de sobrevivencia utilizando el análisis de Kaplan Meier con el uso del programa STATISTICA, (2004) manejando la concentración al 0.1 %, 0.5 %, 1 % y 2 % debido a que estos tratamientos fueron los que registraron la mayor sobrevivencia de todas las concentraciones, realizando adicionalmente un comparativo entre larvas de segundo y tercer instar.

El análisis de supervivencia corresponde a una distribución exponencial, donde se muestra que existe una diferencia significativa entre el grupo de larvas del segundo instar y el grupo de larvas de tercer instar, es decir, la concentración que se efectuó en el insecto (Figura 13, 14, 15, 16). Como se puede observar en las Figuras 13, 14, 15 y 16, las larvas del segundo instar son más susceptibles al efecto de los metabolitos del neem que los tratamientos con larvas del tercer instar, estas últimas requirieron más tiempo para ocasionar la mortalidad de la mayoría de los individuos

aunado que si hubo el desarrollo al estado adulto por algunas larvas en la concentración al 0.1 % las cuales se eliminaron al final del experimento, las demás concentraciones de las figuras 14, 15 y 16 registraron la mortalidad al 100 % en los tiempos que se muestra en la curva de sobrevivencia.

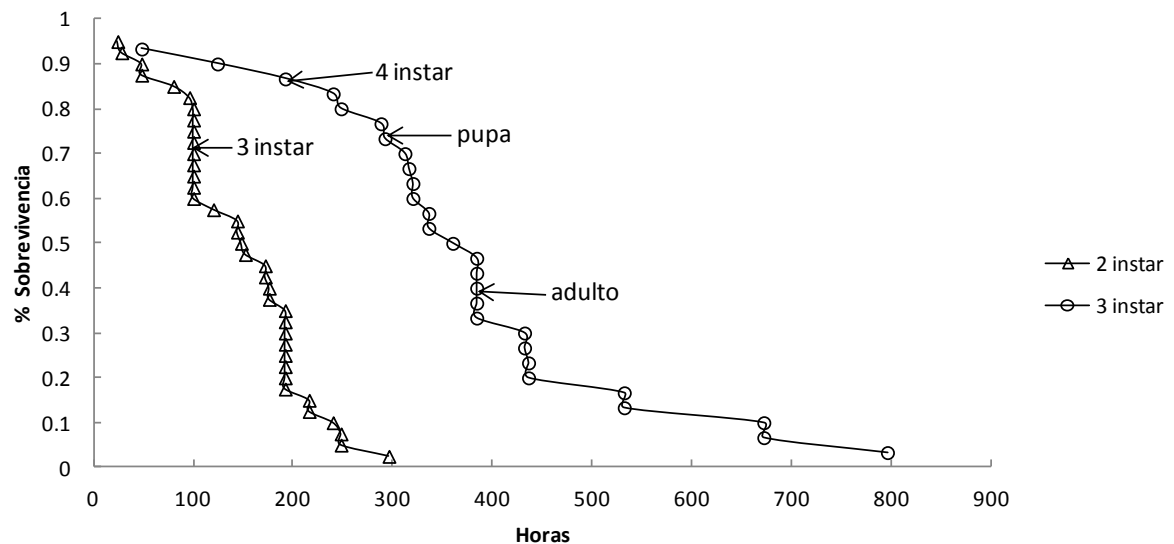


Figura 13. Sobrevivencia a concentración de 0.1 % con larvas de segundo y tercer instar

En la Figura 13 se puede observar como a la concentración más baja al 0.1 % los tratamientos que comenzaron con larvas de segundo instar solo alcanzaron el tercer instar en comparación con los tratamientos con larvas de tercer instar donde llevaron a cabo todo su ciclo biológico, sólo el 20% alcanzaron el estado adulto.

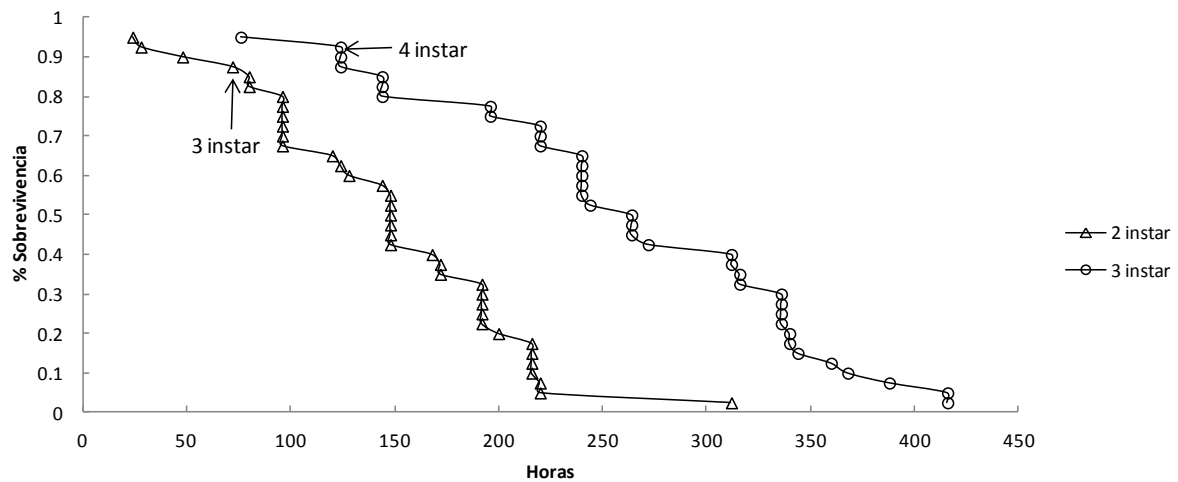


Figura 14. Sobrevivencia a concentración de 0.5 % con larvas de segundo y tercer instar

En la Figura 14, a la concentración del 0.5 %, los tratamientos que iniciaron con larvas del segundo instar sólo registraron cambio al tercer instar después perecieron a las horas que marca la figura, en el caso de tratamientos que iniciaron con larvas de tercer instar también alcanzaron el cambio a cuarto instar, para después disminuir el porcentaje de sobrevivencia y llegar a cero individuos. Se puede observar como la aplicación en larvas en segundo instar de la conchuela de frijol ocasiona mayor mortalidad en menor tiempo.

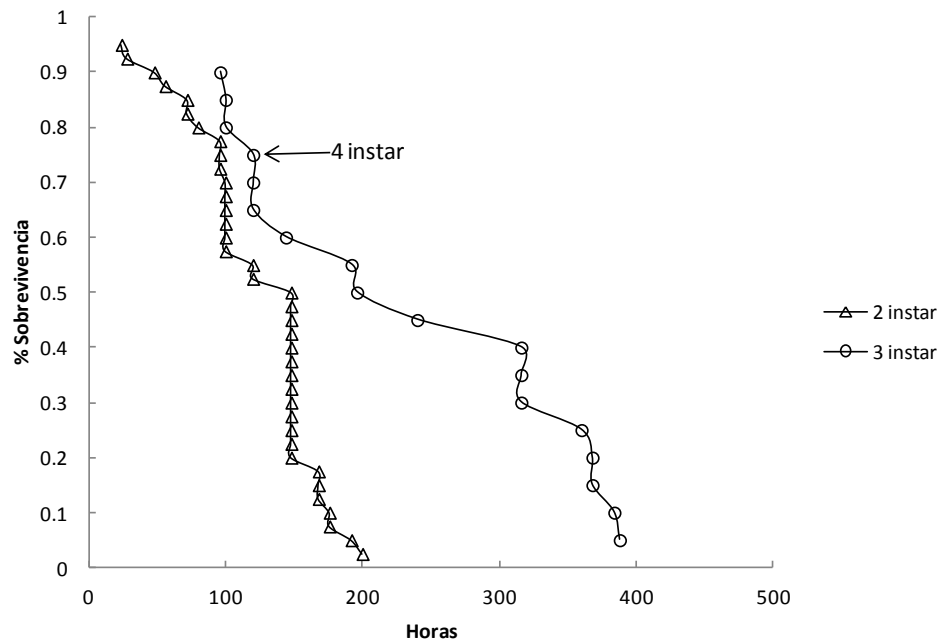


Figura 15. Sobrevivencia a concentración de 1 % con larvas de segundo y tercer instar

En la Figura 15 la concentración al 1 % en tratamientos que iniciaron con larvas de segundo instar interrumpió el cambio hacia el siguiente instar, registrando el 100% de mortalidad a las 200 horas, en comparación con los tratamientos iniciados con larvas de tercer instar los cuales si cambiaron a cuarto instar y requirieron el doble de tiempo para alcanzar el 0 % de sobrevivencia.

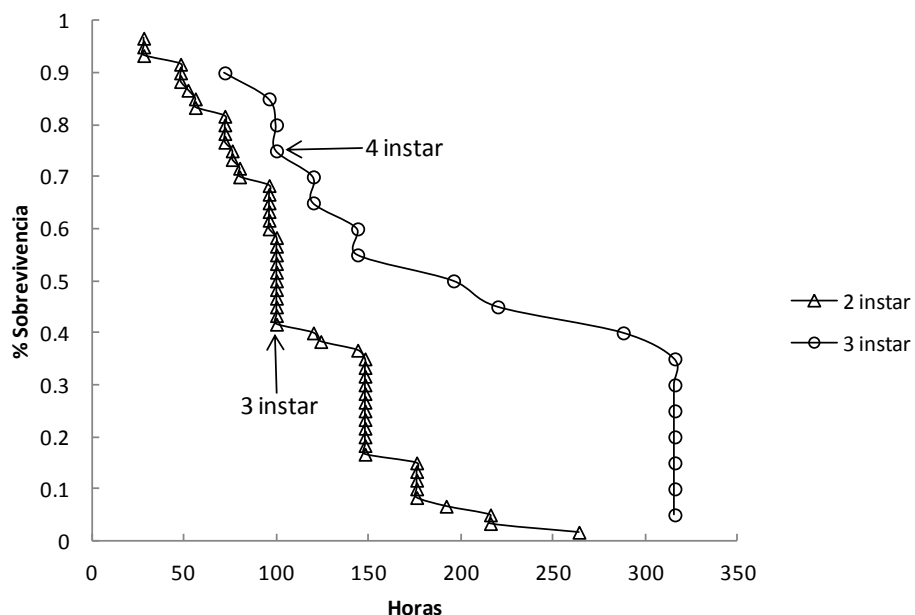


Figura 16. Sobrevivencia a concentración de 2 % con larvas de segundo y tercer instar

En la Figura 16 a la concentración del 2 % se observa que los tratamientos iniciados con larvas de segundo instar requirieron menor tiempo para el 0 % de supervivencia y como el tratamiento con larvas iniciado en el tercer instar requirió mayor tiempo para efectuar el mismo propósito, es decir a mayor edad de la larva presenta menor susceptibilidad al efecto de neem a esta concentración.

5.2.9 Comparativo de costos de aceite de neem como agente de control contra un plaguicida químico tradicional

Se calcularon los costos para la producción de una hectárea de frijol con el uso de aplicaciones de insecticida químico (paratión) en la conchuela de frijol con dos aplicaciones por ciclo agrícola, obteniendo un costo de producción de \$6730.00, cabe aclarar que en esta estimación de costos ya está incluido el precio de la mano

de obra en cada actividad (Rivas, com. pers., 2011). También se efectuó el cálculo de producción de una hectárea de frijol, utilizando el aceite de neem a la concentración del 0.5 % realizando dos aplicaciones para el control de *E. varivestis*, obteniendo un costo de producción de \$6820.00 (Cuadro 8)

Cuadro 8. Costos de producción de una hectárea de cultivo de frijol utilizando un plaguicida químico y un bioinsecticida (neem) para llevar el control de *E. varivestis*

Actividad	Cantidad	Precio (\$)	Importe (\$)	
			Paratión	Aceite de neem
Barbecho	1	800.00	800.00	800.00
Rastra	1	400.00	400.00	400.00
Siembra	1	400.00	400.00	400.00
1ra escarda	1	400.00	400.00	400.00
2da escarda	1	400.00	400.00	400.00
Cosecha	1	1000.00	1000.00	1000.00
Desgrane	1	1000.00	1000.00	1000.00
Fertilizantes	1	1000.00	1000.00	1000.00
Semilla	30Kg	16.00	480.00	480.00
Paratión	2L	425.00	850.00	-
Aceite de neem	2L	470.00	-	940.00
TOTAL			\$6730.00	\$6820.00

Se puede estimar una diferencia de costos de \$90.00, la cual es muy pequeña en comparación a los beneficios ambientales que se obtienen en sustitución de los plaguicidas químicos. Sin embargo si se considera el número de aplicaciones que se deben efectuar a lo largo del cultivo del frijol, se abaten costos económicos y hay menor repercusión de daños ambientales e inocuidad alimentaria, a corto, mediano y largo plazo. Por lo que se destaca no solo la importancia económica en la aplicación

de uno u otro producto, sino, en el abatimiento continuo de la plaga y de otros organismos que causan daño al cultivo (Cuadro 8).

VI DISCUSIÓN

6.1 Aceites de orégano mexicano de Durango y Chihuahua

6.1.1 Dosis letal media, limites fiduciales y pendiente

En el Cuadro 3 se observa que la DL_{50} del aceite de orégano de Chihuahua es más baja que la del estado de Durango. Con el aceite de Chihuahua se requiere menor cantidad de producto para obtener el 50% de mortalidad de la población de conchuela, es decir, presenta mayor toxicidad.

En la Figura 1, se puede observar que aunque los limites fiduciales del aceite de orégano de Chihuahua son más angostos, lo cual significa mayor precisión en el resultado obtenido con respecto al aceite de Durango. Este último presentó mayor valor de pendiente, es decir, una mayor sensibilidad de la respuesta de los individuos tratados ante un cambio en la dosis empleada (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, 1995).

De acuerdo con la prueba de Homogeneidad de los coeficientes de regresión, no se encontró diferencia en la toxicidad de los aceites, a pesar de la diferencia en la composición de los tres principales compuestos activos en proporción mayoritaria, (Cuadro 4). Se postula que debido al mayor contenido de carvacrol habría mayor mortalidad, autores como Regnault-Roger y Philogéne, (2004) mencionan una alta toxicidad en plantas como el orégano y el tomillo, en donde sus principales componentes son el carvacrol y timol que presentan efecto insecticida hacia coleópteros, concluyendo que el efecto de las plantas aromáticas no se debe a un

solo compuesto, sino a una serie de compuestos de metabolitos secundarios. Se observa del aceite de Durango la proporción de 242:1 respecto al de Chihuahua en contenido de carvacrol, 1:21 para el timol y 1: 46 para el p-cimeno, mostrando una gran diferencia en contenidos de los dos aceites (Cuadro 4).

Entre las muestras obtenidas del aceite de Durango y de Chihuahua existen ciertas diferencias en relación a factores climático y edafológicos, en el primero la altitud donde se realizó la colecta es a 1845 msnm y el de Chihuahua se encuentra una altitud de 1488 msnm, la precipitación media anual en el primero es de 500 mm, mientras que en el segundo es de 394 mm, en el lugar de colecta del aceite de Durango se encuentra en suelos Coluviales y Aluviales [Q (al)], con abundantes afloramientos de roca y textura de franco-arenosa a arcillosa., el lugar de colecta del aceite de Chihuahua se realizó en suelos Xerosol Lúvico (XI), Xerosol cálcico (Xk), Rendzina (E), clase textural media (2) y una fase química salina-sódica (sn). Ambos sitios de muestreo tienen un clima seco semicálido BS0hw(w) y una vegetación de matorral xerófilo (Flores, 2009; Cortés O. A. com. pers. 2011). Se pueden observar notables diferencias entre los distintos lugares donde se realizó la colecta de plantas de orégano mexicano, de donde se extrajo los aceites empleados en esta investigación. Se podría postular que debido a estas diferencias ambientales, la cantidad de contenido de carvacrol, timol y p-cimeno, varíen de acuerdo a su origen, pero algunos autores señalan que este tipo de variaciones de los compuestos mencionados, no se deben a factores ambientales en los cuales se desarrolla la planta, y más bien corresponden a variación genética, dentro de la misma especie (Turgut y Silva, 2005; Silva V. R. com. pers. 2011).

Karpouhtsis *et al.*, (1998) encontraron que la actividad insecticida de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L., *Coridothymus capitatus* L. y *Satureja thymbra* L. con contenido de carvacrol de 74.56, 81.46 y 3.12 %, y contenido de timol de 0.71, 1.46 y 34.72 % sobre *Drosophila melanogaster* mostró un fenómeno de sinergismo.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los hallazgos registrados por los autores anteriores, lo que se demuestra en la prueba de homogeneidad de la pendiente, donde la actividad insecticida de los aceites esenciales no es linealmente dependiente de estos componentes.

Ayvaz *et al.*, (2010), señalan que el aceite esencial de orégano (*Origanum onites* L.), el cual contiene un contenido de carvacrol del 70.27 % y de timol de 9.34 % fue altamente efectivo contra *Plodia interpunctella* Hübner y *Ephestia kuehniella* Zeller con el 100% de mortalidad obtenida después de las 24 h a 9 y 25 $\mu\text{L L}^{-1}$ para estas especies, respectivamente. El mayor componente de esta especie botánica son los monoterpenos, principalmente el timol y el carvacrol, se ha reportado actividad biológica de terpenoides de plantas incluyendo repelencia y deterrencia, reducción de la palatabilidad, inhibición de crecimiento alterando la disponibilidad de proteína, inhibición de enzimas y toxicidad directa. Existen diversas familias botánicas como Verbenácea y Lamiaceae, que son familias promisorias para el control de plagas a través de métodos botánicos (Ayvaz *et al.* 2010), esto se demuestra con los resultados obtenidos en la presente investigación, donde hubo mortalidad a las 24 horas de la aplicación del aceite de orégano mexicano.

Los compuestos monoterpénicos actúan como neurotóxicos contra diferentes especies de insectos. Se ha demostrado la inhibición de la acetil colinesterasa aislada de diferentes especies de insectos. Se sugiere que los aceites probados pueden causar actividad insecticida vía uno o más modos de acción (Abd y Yasser, 2009). Este tipo de reacción se manifestó a la media hora después de haberse aplicado el tratamiento a las larvas de conchuela; a mayor concentración había movimientos anormales así como una necrosis inmediata a las concentraciones del 7 y 10 %.

A la fecha no se ha encontrado o no se tiene información disponible acerca de los mecanismos de acción de estas moléculas sobre los sistemas o tipos de células de los insectos. Para el caso de los microorganismos, se ha documentado que en pruebas con el aceite esencial del orégano (*L. graveolens*), indica que los diferentes compuestos fenólicos del aceite esencial de orégano tienen capacidad antimicrobiana trabajando en forma sinergista, es decir actúan en conjunto, lo cual explicaría su gran potencial de inhibición. Aunado a que es muy posible que dichos compuestos alteren los mecanismos de transporte de nutrientes a través de las membranas celulares de los microorganismos, al enlazarse a componentes específicos como lipoproteínas y glicoproteínas implicadas en el enlace y transporte de nutrientes hacia el interior de las células (Díaz *et al.*, 2000). Chávez *et al.*, (2008) en ensayos previos comprobaron el efecto antibacteriano del aceite esencial de orégano (*O. vulgare*) contra *Escherichia coli*, en una concentración del 75%. Mencionan que estos componentes tienen la capacidad de destruir la estructura de la membrana celular, causando el incremento de su permeabilidad y, por consiguiente la salida de iones inorgánicos, ATP, ácidos nucleicos y aminoácidos.

Respecto a valores de DL₅₀ para otras especies de insectos y con especies vegetales, en particular con oréganos en otras investigaciones Cetin *et al.*, (2006) encontraron que el aceite esencial de *O. onites* tuvo una DL₅₀ de 0.29 % contra larvas de tercer y cuarto instar de *Thaumetopoea wilkinsoni* Tams. (Lepidoptera: Thaumetopoeidae) plaga forestal del pino (*Pinus brutia* Ten.) en Turquía. Estas concentraciones son más bajas que las encontradas en la presente investigación debido a que órdenes como Coleoptera requieren de mayor cantidad de ingrediente activo para conseguir el mismo efecto, es decir depende de su ciclo biológico, del estado de desarrollo de la plaga y del grosor de la quitina de su exoesqueleto. Por su parte, Cetin y Yanikoglu (2006), encontraron actividad insecticida de dos aceites esenciales aislados de dos especies de orégano (*Origanum onites* L. y *Origanum minutiflorum* O.) los cuales fueron investigados contra larvas del tercer y cuarto instar del mosquito *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) obteniendo valores de DL₅₀ y DL₉₀ de 24.8 y 61.3 ppm respectivamente, para *O. onites*; y de 73.8 y 118.9 ppm

respectivamente, para *O. minutiflorum*. Los autores mencionan que esta actividad fue atribuida al carvacrol, el mayor constituyente de los aceites de las dos especies mencionadas previamente.

6.2 Aceite de neem

6.2.1 Fitotóxicidad en plantas de frijol

En la prueba de fitotóxicidad de la Figura 2, se observa que a concentraciones menores al 5 % (Figura 2C) no ocasionó ningún daño a la planta, pero a medida que aumentaba la concentración del 10 % (Figura 2D) eran más frecuentes pequeñas manchas necróticas en el haz de la hoja (Figura 2E y 2F). Autores como Gutiérrez-García *et al.*, (2010), mencionan que un formulado de aceite de neem a concentraciones más bajas del 2 % no ocasionó fitotóxicidad en las plantas. Los resultados de estos investigadores, coinciden con los resultados obtenidos en la presente investigación, donde al evaluar las concentraciones que se muestran en la Figura 2, se encontró que conforme aumenta la concentración al 5 %, el daño hacia la planta de frijol era mayor debido a fitotóxicidad y que a concentraciones menores al 2 % no había ningún tipo de daño hacia la planta por fitotóxicidad.

6.2.2 Registro de parámetros en diferentes repeticiones

Los resultados de esta investigación coinciden en señalar que en tratamientos con extractos o emulsiones de neem en el desarrollo de insectos son menores en cuanto a tamaño y peso que en los tratamientos testigo, la mortalidad como consecuencia de inanición, así como dificultad para alcanzar el estado adulto (Musabyimana *et al.*,

2001). Por otra parte, concuerdan con lo obtenido por Valladares *et al.*, (2003), quienes manejaron concentraciones de un extracto de hojas senescentes de *Melia azedarach* L. (Meliaceae) sobre pruebas de elecciones en cinco especies de lepidópteros y coleópteros, entre ellas *Epilachna paenulata* Germar, observaron que la alimentación de larvas disminuyó conforme incrementó la concentración de extracto de hojas senescentes (amarillas) de *M. azedarach*.

Resultados similares se obtuvieron en la presente investigación donde se mostró una relación negativa entre peso y concentración, así como también encontraron los autores que ninguno de los individuos llegó a la fase de pupa como ocurrió en esta investigación. Estos posibles efectos en el desarrollo, son atribuidos a la inhibición de la producción de enzimas en el mesenterón.

Giraldo-Vanegas *et al.*, (2006) evaluaron la efectividad de los extractos de hojas y semillas de neem (*A. indica*) para reducir los niveles de las chicharritas de la caña de azúcar *Saccharosydne saccharivora* Westwood, encontraron que extractos de hojas y semillas de neem a concentraciones de 5 % p v⁻¹ y 4 % p v⁻¹ redujeron las poblaciones de este insecto de 62.92 % a 10.28 % y de 63.75 % a 8.19 % respectivamente, estos resultados se mostraron a los 44 días después de aplicado el primer tratamiento.

En los tratamientos establecidos en el presente estudio, concentraciones al 5 y 10 % para alcanzar el 100 % de mortalidad de las larvas, fue hasta los 5 ó 6 días. Para el tratamiento al 2 %, se requirieron 12 días para obtener el 100 % de mortalidad de las larvas. Cabe destacar la importancia del efecto paulatino de los extracto de neem sobre los insectos, ya que no es un efecto de derribo (Knock down) como ocurre en los productos de origen sintético convencionales. Se atribuye que el efecto inmediato de los extractos de semillas de neem se puede deber al alto contenido de

azadiractina, la cual actúa como repelente y fagodisuasivo (antialimentario), como lo registran varios autores trabajando con otras especies de insectos.

En contraste con los resultados obtenidos por dos Santos *et al.*, (2004), en la concentración al 2 %, mencionan que los extractos acuosos de neem (*A. indica*), no redujeron el ciclo de vida de *Aphis gossypii* Glover con concentraciones de 23.8, 122.0, 410.0 y 1410.0 mg 100 mL⁻¹ de agua destilada, a excepción de la concentración más alta donde solo sobrevivieron al primer estado ninfal, en concordancia con los resultados obtenidos en esta investigación donde a concentraciones del 5 y 10% la mortalidad fue más rápida y las conchuelas de frijol solo sobrevivieron al primer estado larval. Estos autores también mencionan un decremento en el número de mudas conforme aumenta la concentración de extractos acuosos de semillas de neem. Este efecto también se vio reflejado en todas las repeticiones establecidas, debido al principio activo principal del neem, la azadiractina, la cual causa una interrupción en las concentraciones de ecdisona y la hormona juvenil en la hemolinfa, afectando a la muda, metamorfosis y reproducción (dos Santos *et al.*, 2004; Al-Fifi, 2009; Tirado, 2010).

La incapacidad de las larvas para alcanzar el estado de pupa en los tratamientos al 0.5, 1, 2, 5 y 10 % de todas las repeticiones evaluadas en este estudio, coincide con los resultados obtenidos por Valladares *et al.*, (2003), donde ninguno de los individuos alimentados de *E. paenulata* con el extracto de hojas senescentes (amarillas) de *M. azederach*, llegó a pupar manejando concentraciones de 2, 5 y 10 %. En este trabajo se manejaron concentraciones inferiores al 2 % obteniendo los mismos resultados, y con menor riesgo hacia un posible efecto de fitotoxicidad.

En larvas del cuarto instar de la cuarta repetición del 10-05-11 a la concentración del 0.1 %, se encontró un 47 % de mayor duración del desarrollo en comparación al

testigo, estos resultados son similares a los encontrados por Metspalu *et al.* 2010 donde evaluaron una formulación comercial de Neem EC® al 0.01% donde se demostró una prolongación significativa de 20% de mayor duración en el desarrollo de larvas de *Mamestra brassicae* L. en comparación al testigo.

El peso de las pupas de la segunda repetición del 24-04-11, el testigo tuvo 37 % mayor peso en comparación a la concentración del 0.1 %. Por su parte, Metspalu *et al.*, (2010), encontraron un 16 % de mayor peso del testigo en comparación al tratamiento al 0.01 %. Estos mismos autores señalan que en estado larval y pupal se reflejan los efectos antialimentarios y disuasivos que ejerce el neem, y cómo al alimentarse la larva llega a afectar en estado de pupa, este efecto se explica por el ingrediente activo primario del neem la azadiractina, la cual inhibe el comportamiento de la alimentación por resultado del bloqueo de receptores de entrada para fagoestimulantes o por la estimulación de células de receptores disuasivos, o ambos. En éste trabajo de tesis las larvas no perecieron los primeros días del experimento, la mortalidad comenzó a los 4-5 días, cuando comenzaron a mudar al cuarto estado de desarrollo. Resultados similares se encontraron en este experimento en todas las concentraciones, donde a partir del cuarto día causó una mortalidad mayor en los tratamientos. Estos autores señalan que puede presentarse un alto nivel de hormona juvenil, la cual persiste en el organismo, permitiendo el crecimiento pero inhibiendo la metamorfosis. Sin embargo, es también posible un resultado de intoxicación, cambios histopatológicos pueden ocurrir en la *corpora cardiaca* del insecto, causando desórdenes en la secreción de hormonas (Metspalu *et al.*, 2010).

Los efectos antialimentarios observados en conchuela del frijol, son altamente correlacionados con la respuesta sensorial de quimiorreceptores en las partes bucales de los insectos. La azadiractina estimula específicamente células disuasivas en quimiorreceptores y también bloquea el encendido de células receptoras de azúcar, la cual normalmente estimula la alimentación, estas acciones causan

inanición y muerte de estas especies por disuasión de la alimentación (Mordue y Nisbet, 2000), esto explica los efectos antialimentarios que se observaron en este experimento. Los efectos en la fisiología pueden ser vistos como reducción de crecimiento, incremento de mortalidades, mudas anormales y mudas retardadas (Mordue y Nisbet, 2000; Tirado, 2010). Estos efectos están relacionados a la disrupción del sistema endocrino que controla el crecimiento y la muda. Las mudas afectadas son exactamente una disrupción en la síntesis y la liberación de ecdisteroides (hormona de la muda) y otras clases de hormonas (Mordue y Nisbet, 2000; Al-Fifi, 2009; Musabyimana *et al.*, 2001).

Con las aplicaciones de aceite de neem se tienen las ventajas ecológicas y eficientes en comparación con los insecticidas convencionales disminuyendo los posibles casos de resistencia de los insectos debido a la mezcla de compuestos que actúan (Mordue y Nisbet, 2000; Huerta *et al.*, 2008; Martínez-Vento *et al.* 2010). Autores como Raudonis *et al.*, (2010) han evaluado biopesticidas naturales de neem para dos especies de insectos depredadores (*Chrysopa perla* L., *Coccinella septempunctata* L.) y la araña depredadora (*Amblyseius andersoni* Chant), en una huerta de árboles de manzana, obteniendo resultados ligeramente tóxicos, los cuales son permitidos para el uso en cultivos orgánicos aplicados para el control de áfidos. Córdor-Golec (2007) menciona que el neem genera impactos mínimos en parasitoides, si es aplicado en dosis bajas en campo. La aplicación oportuna (estado del hospedero) juega un importante papel en no afectar a los parasitoides. Por lo que los insecticidas biológicos son más seguros que los sintéticos, a los organismos benéficos y al ambiente, por lo que la aplicación de materiales de neem contribuirá a la preservación de la biodiversidad (Musabyimana *et al.*, 2001).

El neem puede causar un retardo en el desarrollo de los insectos, sin embargo, su potencial como insecticida es afectado por la cantidad y la frecuencia de aplicación, duración del estado de vida del insecto, su biología, comportamiento, así como el tipo

de exposición (dos Santos *et al.*, 2004), potencial reproductivo de los insectos, inhibidor de la ovoposición, actividad antialimentaria, reguladora del crecimiento, esterilizante (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, 1995).

6.2.3 Porcentajes de mortalidad y sobrevivencia

La mortalidad registrada de acuerdo a la concentración y el transcurso del tiempo manifestada en todas las repeticiones, es también similar a la encontrada por otros autores, donde la mortalidad aumentó con el tiempo y con la cantidad de azadiractina, en órdenes como Coleoptera, Diptera, Hemiptera y en ácaros (Musabyimana *et al.*, 2001; Ahmed *et al.*, 2004; Huerta *et al.*, 2008; Esparza-Díaz, 2010; Tirado, 2010; Pinto *et al.*, 2006). En otras investigaciones como la de Chirinos *et al.*, (2007) donde compararon tratamientos químicos y de azadiractina, encontraron que el mejor tratamiento fue el producto químico imidacloprid (0.06% p/v i.a.) seguido del tratamiento de azadiractina (0.45% p/v i.a.), sobre el insecto de la escama suave *Capulinia* sp. en plantas de guayabo, esto debido a que se establecieron observaciones hasta las 72 horas; consideran que son buenos resultados, pero es necesario ampliar el periodo de observación de estos productos, para poder establecer un criterio adecuado de los efectos que produce el neem. De acuerdo al trabajo realizado en la presente investigación, donde se observó que en el transcurso del tiempo se podían observar efectos en el desarrollo del insecto a los 7 o 14 días de haber transcurrido el inicio de tratamientos, es decir, para lograr efecto letal de neem, requiere mayor número de días. Las larvas de conchuela del frijol en el presente estudio que permanecían en los tratamientos, murieron durante el periodo de observación por inanición (Figuras 13, 14, 15 y 16).

En el Cuadro 7 se muestra como la mortalidad aumentó en el transcurso de los días, solo las concentraciones más altas, al 5 y 10 %, mostraron diferencias significativas en contraste con el testigo y los demás tratamientos. La mortalidad a los 7 días después de la aplicación fue al 100 % en los dos tratamientos más altos y de un 28 a

71 % en los demás tratamientos, se observan diferencias significativa en la mayoría de los tratamientos y mostrando un aumento en la mortalidad de todos los tratamientos. A los 14 días, los tratamientos del 0.5, 1 y 2 % mostraron mortalidades por encima del 88%, mientras que el tratamiento al 0.1 % registró una mortalidad arriba del 60%.

Se puede observar el efecto paulatino del aceite de neem en las diferentes concentraciones manejadas en este estudio y el aumento de la mortalidad en el transcurso de los días. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Huerta *et al.*, (2008) donde manejando concentraciones de 0.32 %, 0.75 % y 1.07 % de extractos de frutos de *M. azedarach* utilizando agua como solvente sobre la dieta de *Drosophila melanogaster* (Meigen), obteniendo con extracto de frutos de *M. azedarach* a los 2 días después de la aplicación un porcentaje de mortalidad de 12% en la concentración al 1.07 % mientras que el tratamiento al 0.32 y 0.75 % no registraron mortalidad en esta primera lectura. El registro a los 7 días de extracto de frutos mostró un 20 % de mortalidad para la concentración al 0.32 % y al 1.07 %, mientras que para la concentración al 0.75 % solo registro un 8 % de mortalidad. El registro a los 14 días de extracto de frutos mostro un 20 % de mortalidad para la concentración al 0.32 %, 32 % de mortalidad para la concentración al 75 % y una mortalidad del 40 % para la concentración del 1.07 %. Estos resultados son semejantes a los obtenidos en esta investigación, de acuerdo al transcurso del tiempo y al aumento de la concentración se obtiene mayor mortalidad de los insectos con concentraciones menores al 2 %.

Los resultados de mortalidad obtenidos en esta investigación a la concentración 10 % coinciden con los obtenidos por Hernández-Castro *et al.*, (2005), que a esta misma concentración con extractos acuosos de semillas de neem obtuvieron una mortalidad del 37 % a las 24 horas de registro sobre *Aphis nerii* Boyer de Fonscolombe. Pinto *et al.*, (2006), a concentraciones de 13.3 % y 6.66 % de aceites esenciales de neem

obtuvieron un 5 y 6.2 % de mortalidad a las 72 horas después de su aplicación sobre el Coleóptero *Sitophilus zeamais* Motschulsky, a estas altas concentraciones obtuvieron porcentajes de mortalidad bajos; en el presente estudio se obtuvieron mortalidades más altas con concentraciones más bajas, para ese número de días.

Ahmed *et al.*, (2009) evaluaron el aceite de neem a concentraciones de 0.25, 0.5 y 1 % sobre *Tribolium castaneum* Westwood. a las 48 horas, obteniendo porcentajes de mortalidad de 41.78 %, 45 % y 56.33 %, respectivamente. Resultados similares se obtuvieron en la presente investigación, donde al aumentar la concentración aumenta la mortalidad, el porcentaje de esta última depende en gran medida de la biología, estado del desarrollo del insecto, de ahí el porqué del desarrollo de este estudio.

Resultados similares a los 14 días después de la aplicación los obtuvieron Musabyimana *et al.*, (2001), donde al evaluar el aceite de neem emulsificado a concentraciones de 1, 2.5 y 5 % en el coleóptero *Cosmopolites sordidus* Germar encontraron porcentajes de mortalidad del 43, 57 y 50, respectivamente. En la presente investigación los porcentajes de mortalidad fueron más altos a los 14 días, para el caso del tratamiento al 5 % la mortalidad total ocurrió a los 7 días, mientras que a la concentración de 1 y 2 % la mortalidad fluctuó por arriba del 88%. Estas diferencias en la toxicidad se deben a la susceptibilidad del sistema de los insectos aun siendo del mismo orden, los mecanismo de destoxificación difieren entre familias y especies.

Solo se tienen porcentajes de sobrevivencia para el tratamiento al 0.1 % y el testigo los cuales llegaron al estado de pupa y adulto, en el estado de pupa no se observó diferencia significativa entre el testigo y el tratamiento, fue en el estado de adulto donde se registró una mayor viabilidad por parte del testigo que el tratamiento al 0.1%, en este último dato se puede observar que aun causando la menor mortalidad

a los primeros 14 días después de la aplicación de neem el tratamiento al 0.1%, el registro del número de emergencia de adulto fue menor que el testigo mostrando efectos en el desarrollo del insecto. Ahmed *et al.*, (2009) a la concentración de 1% de aceite de neem sobre *Tribolium castaneum* encontró un porcentaje de sobrevivencia pupal de un 28.45% mientras que en el testigo se registró una sobrevivencia de 62.33%, lo cual fue significativamente diferente. En contraste, en la presente investigación no se encontró diferencias significativas en la sobrevivencia de pupas de *E. varivestis*. Resultados obtenidos por Musabyimana *et al.*, 2001 coinciden con los de esta investigación en adultos, donde manejando aceite de neem a concentraciones mayores del 1% no obtuvieron adultos del Coleóptero *Cosmopolites sordidus* Germar. Por lo que concentraciones al 0.1% no sería muy viable realizar su aplicación en campo, ya que es muy poco el efecto letal que se está obteniendo y está permitiendo el desarrollo al estado adulto como lo muestran los datos obtenidos donde si hay diferencia significativa entre el testigo y el tratamiento. En los adultos del tratamiento al 0.1% se observaron deformaciones en los élitros de algunas larvas así como movimientos anormales, esto debido a la azadiractina. Autores como Kondandaram *et al.*, (2008), encontraron en aplicaciones del producto comercial Econeem®, a concentraciones al 1 % disturbios fisiológicos, prolongación del estado ninfal, metamorfosis incompleta, ninfas y adultos deformes de la chinche *Dysdercus koenigii* Fab. Estos autores mencionan que esto se debe a disturbios en las funciones normales de la hormona juvenil en los insectos tratados (Kondandaram *et al.*, 2008). Pandey y Tiwari (2011), observaron en aplicaciones de productos de neem comercial (Neemark®, Multineem® y Neemmazal®) en la chinche *Dysdercus cingulatus* Fab. malformaciones en varios grados de las alas de los adultos en concentraciones menores al 2.5 %. Autores como Huerta *et al.*, (2008) y Viñuela *et al.*, (1998) también observaron la emergencia de adultos con malformaciones significativas.

En las gráficas de sobrevivencia se aprecia como larvas de segundo instar son más susceptibles al efecto del neem que larvas de tercer instar en las concentraciones al

0.1, 0.5, 1 y 2 %. Y como a medida que va aumentando la concentración el porcentaje de sobrevivencia se va reduciendo en tiempo.

6.2.4 Comparativo de costos de aceite de neem como agente de control contra un plaguicida químico tradicional

La diferencia obtenida en los costos de producción de una hectárea de frijol mediante el uso tradicional de un plaguicida químico en contraste con el uso de aceite de neem a la concentración de 0.5 %, mostró una diferencia de tan solo \$ 90.00, la cual es muy baja en pro de todos los beneficios que se perciben al hacer uso de un plaguicida de origen natural. Se reportan pérdidas de hasta un 70% de la producción si no se efectúa un control sobre *E. varivestis* (España, 2000), generando una pérdida de hasta \$10,500.00 por hectárea (Rivas A. S., com. pers. 2011). La concentración al 0.5% que se estableció para obtener los costos con aplicación de aceite de neem fue debido a que en esta concentración se obtuvo un porcentaje de mortalidad arriba del 88%, a los 14 días después de haber aplicado el producto a la planta de frijol (Cuadro 8). La aplicación de productos a base de moléculas sintetizadas de forma natural brinda la seguridad de no generar resistencia por los insectos, ya que son un conjunto de metabolitos los que actúan de forma sinergista para generar esos efectos en el desarrollo de los insectos, no generando problemas ambientales por la persistencia de las moléculas, ya que éstas son fotosensibles y termodegradables en el ambiente.

No se efectuó el cálculo de costos para el aceite de orégano mexicano debido a que se realizó aplicación tópica al insecto, es decir, pruebas de susceptibilidad, los resultados obtenidos en este tipo de pruebas de laboratorio son las bases para realizar las pruebas de efectividad o pruebas de campo, para conocer si un

insecticida o conjunto de insecticidas sirven para eliminar una plaga en un cultivo de cierta región (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, 1995).

6.3 El empleo de sustancias de origen natural para el control de plagas agrícolas dentro del marco de la Gestión Ambiental

El papel del gestor ambiental, es de realizar el papel de mediador entre los productores, técnicos y apoyos diversos para el mejor control de las plagas, incluyendo los aspectos social, económico, técnico-científico, que reditúen en la mejora del nivel de vida de los habitantes de las áreas agrícolas afectadas. Mediante la búsqueda de alternativas, estrategias, técnicas y transferencias tecnológicas que generen el desarrollo sustentable agrícola, a corto, mediano y largo plazo, considerando el uso de técnicas y estrategias inocuas al ambiente. Por lo cual se propone el siguiente esquema:

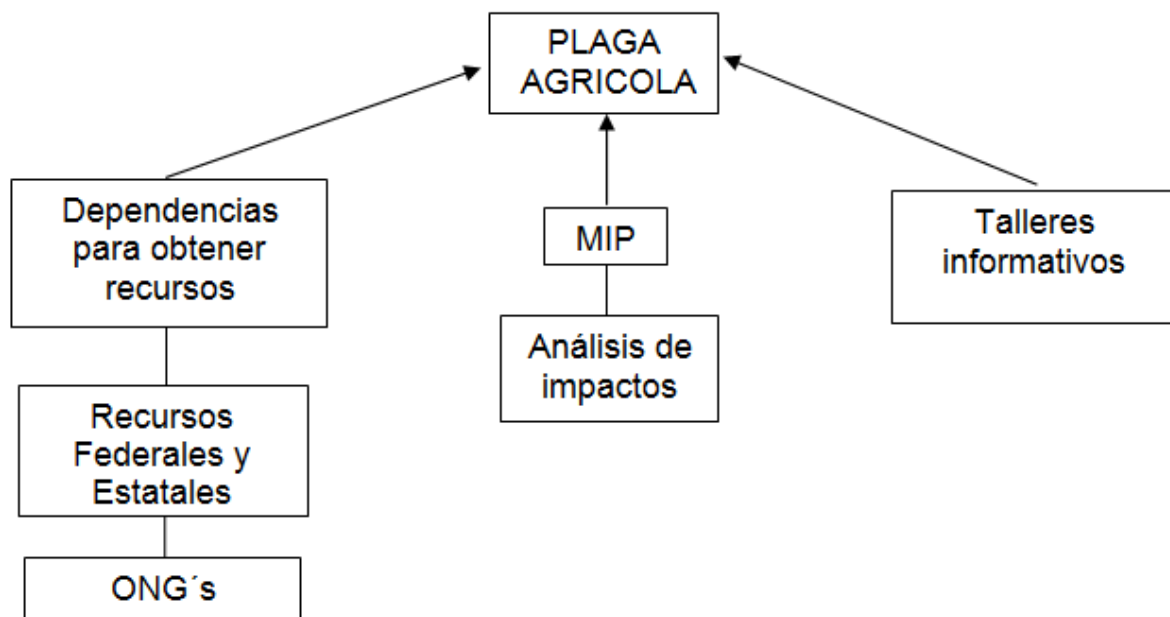


Figura. 17 Esquema de control de plagas agrícolas en el marco de Gestión ambiental

Un buen manejo es a través del manejo integrado de plagas (MIP), el cual tiene como objetivo llevar a cabo el control de la plaga haciendo uso de todos los métodos, estrategias y técnicas posibles, incluyendo el control químico. Entre los métodos que maneja el MIP podemos citar: 1.- Cultural. Consiste en la manipulación del medio donde se tiene un cultivo determinado con el fin de hacerlo menos atractivo para la plaga. 2.- Variedades de plantas resistentes. Consiste en plantas no modificadas transgénicamente las cuales pueden soportar mejor el ataque de los insectos o enfermedades sin dejar de dar buenos rendimientos. 3.- Los métodos físicos. Se basan en el uso de barreras físicas o mecánicas como el uso de aparatos o técnicas que evitan que el insecto llegue a la planta o árbol. 4.- El control legal el cual incluye reglamentos que imponen la inspección y certificación de ciertos productos, como las semillas, para asegurar que estén libres de plagas y enfermedades. 5.- El control competitivo. Que consiste en desalojar de una zona a una especie por medio de otra que sea un homólogo ecológico. 6.- El control químico. Con el uso mínimo de productos sintéticos de manera oportuna de acuerdo al ciclo de la plaga. 7.- El control biológico. Que caracteriza fundamentalmente su base funcional y ecológica con enemigos naturales de la plaga (nativos o introducidos), la cual intenta lograr una regulación permanente de poblaciones. 8.- Control alternativo. Tiene como sustento el uso de productos de origen natural en la etapa más susceptible de la plaga, en armonía con el control biológico y los depredadores naturales.

En este último apartado del MIP, se explica porque se realizó el presente trabajo de investigación, el cual requiere un cambio de paradigma en los agricultores, sobre la forma de llevar el desarrollo de sus cultivos. Cambiar la idea de que la muerte instantánea o Know-down de la plaga, es la única alternativa para la solución del problema. Hay que entablar las bases para crear éste nuevo paradigma, donde se le haga comprender al productor la importancia del desarrollo de los insecticidas con moléculas naturales, los diferentes efectos que estas moléculas tienen en el control paulatino de las plagas. El mostrarle al productor, mediante la práctica propia de aplicación de los productos sugeridos en ésta tesis, así como del buen manejo del

equipo, de los tiempos y períodos de aplicación, que al estar la plaga presente después de la aplicación, no es indicio de que no se haya establecido un control; por el contrario, puede estar la plaga físicamente presente en la planta, pero sin presentar alimentación o haciéndolo en muy poca cantidad, lo cual no genera ningún costo de acuerdo al umbral económico.

Establecer las fechas de aplicación de productos naturales de acuerdo a la etapa más susceptible de la larva y de la etapa de mayor daño por su voracidad. Con ayuda de este tipo de investigaciones se puede inferir: la etapa en la cual la plaga es más susceptible a la aplicación de los ingredientes activos en el aceite o extracto que se esté manejando, así como las dosis que optimizan la inversión en los productos, para obtener el mejor control de la plaga problema (Matthews, 1992; Badii *et al.*, 2000).

Ecológicamente las redes tróficas son beneficiadas en la aplicación y desarrollo de este tipo de productos, ya que son compatibles con el control natural de los depredadores y parasitoides de muchas plagas en las que se establezca el control. De esta forma, al disminuir el uso de moléculas sintéticas en el medio ambiente, no se genera en las plagas la problemática de resistencia de las plagas a los insecticidas y surgimiento de posibles plagas secundarias, que se ha venido manejando desde inicios de la revolución verde en los años 70`s, ya que son un conjunto de compuestos en los extractos o aceites naturales los cuales interactúan para generar ese efecto neurotóxico, antialimentario, desarrollo del instar, inhibición de la oviposición o malformaciones en estados larvales o adultos, los cuales generan seguridad debido a que es difícil el desarrollo de resistencias por parte de las plagas (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, 1995).

Resumiendo, la importancia que como gestor ambiental tiene el presente trabajo radica en la aplicación oportuna de compuestos naturales, aplicados en bajas concentraciones, que sean factibles de reducir a la mayoría de los insectos que se comportan como plaga, que para este caso es *E. varivestis* . Con ello, se contribuye a la mejora de la producción agrícola, a costos económicos equivalentes a la aplicación de productos químicos sintéticos, pero con consecuencias a largo plazo de: el establecimiento de enemigos naturales de la plaga, la reducción paulatina de la plaga, así como la seguridad de que el alimento que se consume no lleva tóxicos, ni para el hombre, ni para los animales que se alimentan del rastrojo del frijol, disminuiría el problema de resistencia por parte de las plagas agrícolas lo cual traducido a términos del productor es menor aplicación de productos.

La inclusión de estas técnicas propuestas es un reto para el gestor ambiental, ya que conlleva la convivencia directa con los productores, el uso de sus parcelas demostrativas con ésta propuesta innovadora para hacer comprender la importancia de conservar el entorno para el desarrollo de los depredadores y parasitoides nativos, que en armonía con estos productos naturales genera un mayor control.

VII. CONCLUSIONES

Se obtuvieron valores de DL_{50} , con aceite de Durango se obtuvo una DL_{50} de $38.5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ y con el de Chihuahua una DL_{50} de $26.15 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. Los cuales se sugieren como valores iniciales de susceptibilidad de las larvas de conchuela de frijol a los aceites de orégano mexicano de acuerdo a su origen.

No se encontró diferencia en la toxicidad de los aceites esenciales de orégano mexicano (*L. graveolens*) procedente de los estados de Durango y Chihuahua, en larvas de *E. varivestis*.

No se encontró diferencia significativa entre los aceites de Durango y Chihuahua con la prueba de Homogeneidad de los coeficientes de regresión, registrando el aceite de Chihuahua un contenido de carvacrol 1:242 en comparación con el de Durango. La actividad insecticida de los aceites esenciales no es linealmente dependiente del carvacrol.

Con el aceite de neem no se obtuvieron resultados de DL_{50} y CL_{50} debido a que a las 24 horas no se registró mortalidad, por lo que se procedió a realizar aplicaciones en la alimentación de la larva para establecer el registro en todo su ciclo de vida y observar los posibles daños.

Concentraciones menores al 5 % no causan daños fitotóxicos en plantas de frijol, concentraciones superiores causaron necrosis en el haz de las hojas aumentando el daño conforme se elevaba la concentración.

En las cinco repeticiones realizadas con concentraciones 0.1, 0.5, 1, 2, 5 y 10 %, los tratamientos fueron inferiores en los parámetros (ancho, largo y peso), de las larvas en comparación al testigo.

Larvas de segundo instar son más sensibles a la aplicación del aceite de neem a todas las concentraciones establecidas en este estudio. Conforme aumenta el tiempo de la edad de la larva, son más resistentes a los efectos de la azadiractina.

Concentraciones al 0.1 % requirieron mayor tiempo para el cambio de cuarto instar a pupa y de pupa a adulto en comparación al testigo.

Concentraciones al 0.5 y 1 % registraron mortalidades superiores al 88% a los 14 días después de la aplicación.

Concentraciones al 5 y 10 % registraron mortalidad del 100% a los 7 días después de la aplicación, la concentración al 2 % alcanzó el 96.25% de mortalidad a los 14 días después de la aplicación.

La concentración al 0.1 % llegó a pupar, pero los adultos emergidos presentaron deformaciones en los élitros, acompañados con movimientos anormales.

Las diferencia en costos de producción de una hectárea de frijol utilizando un plaguicida químico (paration) contra el costo del aceite de neem al 0.5 %, mostro una diferencia de \$90.00 a favor del plaguicida químico, por lo que es viable la aplicación de insecticidas naturales para el control de *E. varivestis*.

VIII. RECOMENDACIONES

Establecer mayor número de tiempo de observación en aplicaciones de aceite de orégano, como se efectuó en el trabajo de aceite de neem, para poder observar posibles efectos subletales o mayores mortalidades en el transcurso de los días.

Realizar repeticiones con aceite de neem a concentraciones menores al 0.1 %, para observar efectos sobre la fecundidad de *E. varivestis*.

Al establecer la siembra del cultivo de frijol en el mes de julio, los primeros adultos invernantes llegarían durante los diez primeros días del periodo de lluvia de acuerdo a información manejada por otros autores. Por lo que, de acuerdo a la información obtenida sobre el ciclo de vida de la conchuela del frijol, la primera aplicación del aceite de neem se realizaría a los 24 días después de haber encontrado a los primeros adultos invernantes, debido a que duran dos semanas en alimentarse y copular, después de este tiempo habría larvas de segundo instar, para después realizar una segunda aplicación a los 7 días cuando la mayoría de las larvas se encuentra en tercer instar. Las aplicaciones se efectuarían en la mañana, tomando las recomendaciones de los productos químicos en relación a las condiciones ambientales que deben predominar para realizar una adecuada aplicación. Así como el empleo de aspersores especiales, las cuales bañen completamente el envés de la hoja, debido a que es en esta zona donde se encuentran ubicadas las larvas de *E. varivestis*.

IX. BIBLIOGRAFIA

Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economy Entomology*. 18: 265-267 pp.

Abd, El-Aziz M.F and Yasser A. El-Sayed. 2009. Toxicity and biochemical efficacy of six essential oils against *Tribolium confusum* (DuVal) (Coleoptera: Tenebrionidae). Egypt. Acad. J. Biolog. Sci., 2 (2): 1 – 11 pp.

Acevedo, P. A. I., V. M. Pinto, R. Garza G., S. Ramírez A., J. Vera G. 2010. Estimación del Comportamiento Poblacional de *Epilachna varivestis* Mulsant Utilizando un Modelo de Simulación. *Southwestern Entomologist*. 35(4): 557-567 pp.

Aguilera, P. A, M. Zampezzi V., X. Arenada D., C. Klein K., R. Rebolledo R. 2009. Efectividad de la azadirachtina en la inhibición de la embriogénesis de *Aegorhinus superciliosus* (Guérin) (Coleoptera: Curculionidae). *IDESIA (Chile)*. 27(1): 47-55 pp.

Ahmed, S., A. Zainab, S. Nisar, N. Rana. 2009. Effect of new formulations of neem products on biology of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae:). Pak. Entomol. 31(2): 133-137 pp.

Al-Fifi. Z.I.A. 2009. Effect of Different Neem Products on the Mortality and Fitness of Adult *Schitocerca gregaria* (Forskål). *JKAU:Sci*. 21(2): 299-315 pp.

Anónimo. 1990. Frijol y chícharo. Manual para la educación agropecuaria. Producción vegetal; 12. Ed. SEP- TRILLAS. México. 58 pp.

Arcila-Lozano C. C., G. Loarca-Piña, S. Lecona-Urbe, E. González de Mejía. 2004. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de nutrición*. 54 (1): 100-111 pp.

Avendaño-Meza, F., R. Gastélum-Luque, M. López-Meza, R. Medina-López, M. G. Yañez J., J. E. Retes-Manjarrez, L. López-Higuera. 2009. Extractos vegetales para el combate de mosquita blanca *Bemisia argentifolii* B&P en calabaza en el valle de Culiacán. Memorias del Congreso Nacional de Entomología Mexicana. Ed. Sociedad Mexicana de Entomología, A. C. 1ra edición. México. 8: 520-523 pp.

Ayvaz A., O. Sagdic, S. Karaborklu, I. Ozturk. 2010. Insecticidal activity of the essential oils from different plants against three stored-product insects. *Journal of Insect Science* 10 (21) 13 pp.

Badii, M. H., A. E. Flores, H. Quiróz, R. Foroughbakhch, R. Torres. 2000. Manejo integral de plagas (MIP). En: Fundamentos y perspectivas de control biológico. Ed. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. 417-432 pp.

Busvine, J. R. 1971. A critical review of the techniques for testing insecticides. *Commonwealth Agricultural Bureaux*. 2a. Ed. Great Britain. 345 pp.

Capataz, T. J., F. Orozco S., R. Vergara R, R. Hoyos S. 2007. Efecto antialimentario de los extractos de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith en condiciones de laboratorio. *Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 60(1): 3703-3715 pp.

Cetin, H and A. Yanikoglu. 2006. A study of the larvicidal activity of *Origanum* (Labiatae) species from southwest Turkey, *Journal of Vector Ecology* 31 (1): 118-122 pp.

Cetin, H., F. Erler and A. Yanikoglu. 2006. Toxicity of Essential Oils Extracted from *Origanum onites* L. and *Citrus aurentium* L. against the Pine Processionary Moth, *Thaumetopoea wilkinsoni* Tams. *Folia Biologica (Kraków)*. 54 (3-4): 153-157 pp.

Chávez T. L., F. M. Díaz C., G. Escalante R., E. Estrada M. 2008. Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* a la Gentamicina en cultivos de *Escherichia coli*. *CIMEL*. 13(2): 45-48 pp.

Chirinos, D. T, F. Geraud- Pouey, L. Bastidas, M. García, Y. Sánchez. 2007. Efecto de algunos insecticidas sobre la mota blanca del guayabo, *Capulinia* sp. (Hemiptera: Eriococcidae). *Interciencia*. 32(8): 547-553 pp.

Colin, M. E., F. Cioavarella, G. Otero-Colina, L. P. Benzulces. 1994. A method for characterizing the biological activity of essential oils against *Varroa jacobsoni*. In: New perspectives on Varroa. Matheson. A. (ed). International Bee Research Association. Cardiff. U.K.: 109-114 pp.

Cóndor-Golec A. F. 2007. Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) insecticides on parasitoids. *Perú. Biol.* 14(1): 069-074 pp.

Cortés, O. A. 2011. Profesor Investigador del CIIDIR-IPN U. Dgo. Comunicación personal.

Díaz de la G. R. I., F. Báez I., J. C. Ramos P., M. Ibaven L. y J. L. Ibave G. 2000. Extractos de *Lippia*, su caracterización y actividad biológica contra fitopatógenos. SEP- CONACYT. Universidad Autónoma de Chihuahua. México. 20 pp.

Díaz, B. M. C., G. D. Bulus R., Y. Pica G. 2004. 5. Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad. *En: Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas.* Ed. Instituto Mexicano de la Tecnología del Agua. México. 99-124 pp.

Dos Santos M. T., N. Pereira C., A. Leite T., A. Leal B. 2004. Effect of neem extract on the cotton aphid. *Pesq. Agropec. Bras., Brasília.* 39(11): 1071-1076 pp.

Engleman, E. M. 1991. Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México. *En: Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.* 140 pp.

España, L. M. P. 2000. Caracterización enzimática de aislados de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), y su virulencia sobre *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). Tesis de Maestría en Ciencias con Especialidad en el Área de Biotecnología. Universidad de Colima. Tecomán, Colima. 93 pp.

Esparza-Díaz, G., J. López-Collado, J. A. Villanueva-Jiménez, F. Osorio-Acosta, G. Otero-Colina, E. Camacho-Díaz. 2010. Concentración de azadiractina, efectividad insecticida y fitotoxicidad de cuatro extractos de *Azadirachta indica* A. Juss. *Agrociencia*. 44(7) 821-833 pp.

Estrada, G., G. Guillén, J. E. Olivares, C. Díaz, X. Alvarado, F. Sánchez. 2007. La transformación genética y genómica del frijol. *Biotecnología*. 14: 281-290 pp.

Flores-Mejía S. y M. D. Salas-Araiza. 2004. Coccinélidos (Coleoptera: Coccinellidae) del estado de Guanajuato en la colección Leopoldo Tinoco Corona de la Universidad de Guanajuato. *Acta Universitaria*. 14 (002): 8-16 pp.

Flores, R. E. 2009. Potencial productivo del orégano (*Lippia graveolens* HBK.) y calidad de su aceite esencial en dos localidades de el Mezquital, Dgo. Tesis de Maestría en Ciencias en Gestión Ambiental. CIIDIR-IPN Unidad Durango. México. 130 pp.

García, G. C. 1993. Control biológico de la conchuela del fríjol con *Pediobius foveolatus* (Crawford) (Hymenoptera: Eulophidae) multiplicado en microtúneles instalados en campo. Tesis de Maestría en Ciencias con Especialidad en Entomología. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 54 pp.

García, G. C. y J. L. Carrillo S. 2006. Procedimiento para retardar la emergencia de *Pediobius foveolatus* (Crawford) (Hymenoptera: Eulophidae) y la actividad de *Epilachna varivestis* (Mulsant) en laboratorio. *Folia Entomología Mexicana*. 45(002): 219-220 pp.

Giraldo-Vanegas, H., A. Vargas, A. Sarmiento, E. Hernández, F. Amaya, M. Ramírez, F. Ramírez, E. J. Contreras. 2006. Evaluación de bioplaguicidas para el manejo del saltahojas verde de la caña de azúcar *Saccharosydne saccharivora* (Westwood) (Hemiptera: Delphacidae), en el valle San Antonio-Ureña, Táchira, Venezuela. *Agronomía. Trop.* 56(2): 253-276 pp.

Gomez, K. and A. Gomez. 1983. Statistical procedures for agricultural research. Second edition. A Wiley Interscience Publication. New York, USA. 680 pp.

González, G. M. C., I. Cháirez H., J. Calderón P. 2000. Composición química del orégano en el estado de Durango. *Interciencia* CIIDIR IPN-Unidad Durango. 1(2): 61-64 pp.

González-Gómez R., G. Otero-Colina, J. A. Villanueva-Jiménez, J. A. Pérez-Amaro, y R. M. Soto-Hernández. 2006. Toxicidad y repelencia de *Azadirachta indica* contra *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Agrociencia.* 40 (6): 741-751 pp.

González-Güereca, M. C., A. A. Meré R., G. Pérez S. 2008. Orégano mexicano y orégano europeo: usos y propiedades. *Divulgación Científica Tecnológica Humanística. COCyTED.* 12 (7): 12-13 pp.

González-Castillo, M. P., M. Quintos- Escalante y C. Guerrero- Guerrero. 2009. Efectividad biológica de extractos vegetales para el control del ácaro *Tetranychus* sp. del maíz. Memorias del Congreso Nacional de Entomología Mexicana. Ed. Sociedad Mexicana de Entomología, A. C. 1ra edición. México. 8: 828-832 pp.

Gutiérrez-García, S. C., J. Sánchez-Escudero, J. F. Pérez-Domínguez, A. Carballo-Carballo, D. Bergvinson, M. M. Aguilera- Peña. 2010. Efecto del nim en el daño ocasionado por el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en tres variables agronómicas de maíz resistente y susceptible. *Acta Zoológica Mexicana* 26(1): 1-16 pp.

Hassan, S. A. 1985. Standard methods to test the side-effects of pesticides on natural enemies of insects and mites developed by the IOBC/WPRS Working Group 'Pesticides and beneficial Organisms'. EPPO Bulletin 15: 214-255 pp.

Hernández-Castro, E., V. Utrera-Landa. J. A. Villanueva-Jiménez, D. A. Rodríguez-Lagunes, M. M. Ojeda-Ramírez. 2005. Extractos de neem en el comportamiento de *Aphis nerii* y la transmisión del virus de la mancha anular del papayo. J. Agric. Univ. P. R. 89(1-2): 75-84 pp.

Hubert, J. J. 1979. *Bioassay*. Kendall/Hunt Publishing Company. Canada. 163 pp.

Huerta, C. 1997. Orégano mexicano: oro vegetal. CONABIO. Biodiversitas. 15: 8-13 pp.

Huerta, A., I. Chiffelle, D. Lizana, J. E. Araya. 2008 Actividad insecticida de extracto del fruto de *Melia azederach* en distintos estados de madurez sobre *Drosophila melanogaster*. *Bol. San. Veg. Plagas*. 34: 425-432 pp.

INEGI. 2009. Anuario estadístico de Durango 2009. ISSN 0188-8641. México. 373-393 pp.

INEGI. 2010.

<http://www.inegi.org.mx/sistemas/TabuladosBasicos/Default.aspx?c=17176&s=est>

Consultado en 01 de marzo del 2010.

Infante, G. S. y L. C. Calderón A. 1994. Manual de análisis Probit. Colegio de Postgraduados. Industria Editorial Mexicana. México. 107 pp.

INIFAP. 2005. Fríjol. Guía para la asistencia técnica agrícola. Valle del Guadiana. Ed. Fundación Produce Durango A. C. México. 210pp.

Iturralde-García, R. D, J. Borboa-Flores, F. S. Wong-Corral, R. I. Sánchez-Mariñez, M.O. Cortez-Rocha. 2011. "Efecto de aceites esenciales sobre la mortalidad y repelencia de *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) en granos de trigo almacenado". Memorias de resúmenes de V reunión nacional de orégano y otras aromáticas. Editores: G. Pérez, M. P. González. Instituto Politécnico Nacional CIIDIR-Durango, México: 15 pp.

Karpouhtsis, I., E. pardia, E. Feggou, S. Kokkini, Z. G. Scouras and P. Mavragani-Tsipidou. 1998. Insecticidal and Genotoxic Activities of Oregano Essential Oils. J. Agric. Food Chem. Thessaloniki, Greece. 46 (3): 1111- 1115 pp.

Kodandaram, M.H., N.S. Azad T., A. N. Shylesha. 2008. Toxicity and morphogenetic effects of different botanicals on red cotton bug *Dysdercus koenigii* Fab. (Hemiptera:

Pyrrhocoridae) in North Eastern Hill (NEH) región of India. Journal of Biopesticides. 1(2): 187-189 pp.

Lagunes-Tejeda A. y M. Vázquez-Navarro. 1994. Bioensayo. *In*: El bioensayo en el manejo de insecticidas y acaricidas. Ed. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. México. 159 pp.

Lagunes-Tejeda A. y J. A. Villanueva-Jiménez. 1995. Bioensayo. *In*: Toxicología y manejo de insecticidas. 1ra edición. Ed. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. México. 264 pp.

López-Meza M., R. Gastélum-Luque, V. Acosta-Villegas, M. C. Olivas-Olivas, A. G. Perea-Sánchez, G. Perea-Sánchez. 2004. Efecto del Nee-mex en la emergencia de adultos de minador de la hoja *Liriomyza spp* y el parasitoide *Opius forticornis* Cameron en el cultivo de tomate. Memorias del Congreso Nacional de Entomología Mexicana. Ed. Sociedad Mexicana de Entomología A. C. 1ra edición. México. 3: 564-567 pp.

López D. M. T. y J. Estrada O. 2005. Los bioinsecticidas de nim en el control de plagas de insectos en cultivos económicos. La Habana Cuba. *Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo*. Tomo XXXVII. (2): 41-49 pp.

Martínez-Vento, N., J. Estrada-Ortiz., F. Góngora-Rojas, R. López-Castilla, L. Martínez-González, S. Curbelo-Gómez. 2010. Bioplaguicida de *Azadirachta indica* A. Juss (Nim) y la poda, una alternativa para el control de *Hypsipyla grandella* Zeller en

plantaciones de *Cedrela odorata* L. Chapingo. *Serie ciencias forestales y del ambiente* .16 (1): 61-68 pp.

Matthews, G. A. 1992. El papel del control químico. *En: Métodos para la aplicación de pesticidas*. Ed. Continental S.A de C.V. México 365 pp.

Metspalu, L., K. Jõjar, A. Ploomi, K. Hiiesar, I. Kivimägi, A. Luik. 2010. Effects of Biopesticide Neem EC on the *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera, Noctuidae). *Agronomy Research*. 8 (2) 465-470 pp.

Molina O. J., F. J. Castillo C., R. Lezama G., M. González R., C. A. Ángel- Sahagún, J. E. Foster. 2010. Efecto antibiótico del extracto acuoso de Neem sobre adultos del picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). *Memorias del Congreso Nacional de Entomología Mexicana*. Ed. Sociedad Mexicana de Entomología, A. C. 1ra edición. México. 9: 614-617 pp.

Mordue, L. A. J. and A. J. Nisbet. 2000. Azadirachtin from the Neem *Azadirachta indica*: its Action Against Insects. *An. Soc. Entomol. Brasil*. 29(4): 615-632 pp.

Muñoz, V. S. 2010. http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/neem_canola.htm. El aceite de neem *Azadirachta indica* A. Juss, y su relación con el control de áfidos en canola variedad Hyola 401. ZOE Tecno-Campo. Consultado en 07 de enero del 2010.

Muruaga, M. J. S., J. A. Acosta G., R. Garza G. 1993. Estudio preliminar de las enfermedades y plagas insectiles en las colectas de *Phaseolus* de México. *Agronomía Mesoamericana*. 4: 86-90 pp.

Musabyimana, T., R. C. Saxena, E. W. Kairu, C. P.K.O. Ogot, Z.R. Khan. 2001. Effects of Neem Seed Derivatives on Behavioral and Physiological Responses of the *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera:Curculionidae). *Journal of Economy Entomology*. 94(2): 449-454 pp.

Ocete R. y R. Del Tío. 1998. Valoración de la capacidad antialimentaria de un extracto comercial de Nim (*Azadirachta indica* Juss, Meliaceae) sobre *Ocnogyna baetica* Ramb (Lepidoptera, Arctiidae). *Bol. San. Veg. Plagas*. 24: 5-10 pp.

Okumu, F. O., B. G. J. Knols, U. Fillinger. 2007. Larvicidal effects of a neem (*Azadirachta indica*) oil formulation on the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*. 6(63): 1-8 pp.

Orozco, S. F. y M. Rodríguez M. 2007. Cultivos de células en suspensión de *Azadirachta indica* para la producción de un bioinsecticida. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 6(3): 251-258 pp.

Ortiz, N. Y., R. Avilés P., I. Spengler S., Y. Rodríguez D., M.E. Álvarez V., Y. Lorenzo R., Y. Martínez S., N. Ramos G. 2008. Efecto antialimentario de *Melia azedarach* L. en dos especies de insectos fitófagos (Lepidoptera: Noctuidae). *Fitosanidad*.. 12(2): 89-92 pp.

Pandey, J. P and R. K. Tiwari. 2011. Neem Based Insecticides Interaction with Development and Fecundity of Red Cotton Bug, *Dysdercus cingulatus* Fab. *International Journal of Agricultural Research*. 6(4): 335-346 pp.

Pérez, S. G. 1996. Susceptibilidad de *Varroa jacobsoni* (Gamasida: Varroidae) y de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) a cinco plaguicidas. Tesis de Maestría en Ciencias con especialidad en Entomología y Acarologia. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 87 pp.

Pérez, S. G., M.C. González G., A. Meré R. 2008. Repelencia y letalidad con aceite de orégano (*Lippia graveolens* H.B.K. var. *berlandierii*) en *Varroa destructor*. 3ra reunión nacional sobre orégano. RESPYN Edición Especial No.1. Saltillo. Coahuila.

Pinto, V. M., P. O. Cruz C., S. Ramírez A., J. F. Solís A., L. E. Castillo M. 2004. Evaluación de alternativas para el manejo integrado de plagas del frijol ejotero en Chapingo, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 27 (4): 385-389 pp.

Pinto, J. A. R., R.I.N. de Carvalho, S. P. Netto, F. C. Ceruti, A. P. Tavares, L. Guerreiro, A.K.N. Santos. 2006. The study of behavioral response of control effectiveness of the *Sitophilus zeamais* L. (Coleoptera: Curculionidae) and different concentrations of essential oils. 9th International Working Conference of Stored Product Protection. *Alternative Methods to Chemical Control*.. 829-834 pp.

Raudonis, L., L. Duchovskienė, A. Valiūskaitė, E. Survilienė. 2010. Toxicity of biopesticides to green apple aphid, predatory insects and mite in an apple- tree orchard. *Zemdirbiyste- Agriculture*. 97(1): 49-54 pp.

Regnault-Roger, C. y B. J. R. Philogéne. 2004. ¿Nuevos fitoinsecticidas para el tercer milenio?. Vincent. Biopesticidas de origen vegetal. Ed. Mundi-Prensa. Madrid España: 19-38 pp.

Rivas, A. S. N. 2011. Profesor Investigador del CIIDIR-IPN U. Dgo. Comunicación personal.

Rodríguez, H. C. 2000. Plantas contra plagas. Potencial práctico de ajo, anona, nim, chile y tabaco. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México. México. 133 pp.

Salazar-Marcial L., L. D. Ortega-Arenas, C. Rodríguez-Hernández y D. Ochoa-Martínez. 2004. Repelencia de adultos de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) con extractos vegetales. Memorias del Congreso Nacional de Entomología Mexicana. Ed. Sociedad Mexicana de Entomología A. C. 1ra edición. México. 3: 508-513 pp.

Sancé, N. S. N. 1998. Evaluación de extractos orgánicos para el control de la conchuela *Epilachna varivestis* Mulsant en el cultivo de frijol *Phaseolus vulgaris* L., en dos localidades del municipio de Chiquimula. Tesis de Licenciatura: Ingeniero Agrónomo. Universidad de San Carlos de Guatemala. Chiquimula, Guatemala. 44pp.

Sánchez-Arroyo, H. 1997. Mexican Bean Beetle, *Epilachna varivestis* Mulsant (Insecta: Coleoptera: Coccinellidae). *UF University of Florida IFAS Extension*. EENY-015. 1-6 pp.

SAS Institute. 2000. Statistical Analysis Systems. SAS User's guide. Statistics version 8.1. SAS Inc. Cary, North Carolina, USA.

Serrano, C. L. M. 2005. Sistema de investigación del cultivo de frijol en México. Tesis de Doctor en problemas económico agroindustriales. Universidad Autónoma Chapingo. Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial. Chapingo, Estado de México. 154 pp.

Silva, V. R. y G. Morales. A. 2008. Ensayo de la calidad del aceite esencial de orégano en el estado de Chihuahua. 3ra reunión nacional sobre orégano. RESPYN Edición Especial No.1. Saltillo. Coahuila, México.

Silva, V. R., F. Carmona, R. Salcido E., A. Calderón S., L. Calderón. 2011. Evaluación de aceite de orégano sobre varroa *Varroa destructor* Anderson & Trueman. Memorias de resúmenes de V reunión nacional de orégano y otras aromáticas. Editores: G. Pérez, M. P. González. Instituto Politécnico Nacional CIIDIR-Durango, México: 18 pp.

Silva V. R. 2011. Profesor Investigador de CIRENA. Comunicación personal.

Solís A. J. F., H. Sánchez S. y J. Morgado G. 2004. "Azadiractina 3% EC (Ecozin) para el control del minador de la hoja *Lyriomiza munda* en jitomate". Memorias del Congreso Nacional de Entomología Mexicana. Ed. Sociedad Mexicana de Entomología A. C. 1ra edición. México. 3: 519-522 pp.

STATISTICA. 1984-2004. Stat Soft, Inc. 2300 East 14th Street Tulsa, OK 74104, USA.

Tirado, P. C. 2010. Efecto del extracto de neem (*Azadirachta indica*) sobre la supervivencia, reproducción y desarrollo de *Varroa destructor*. Tesis de maestría en ciencias agropecuarias. Universidad Autónoma Metropolitana. D.F. México. 43 pp.

Turgut, D. N. and R Silva V. 2005. Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grown under controlled conditions. *Journal of Applied Horticulture*. 7 (1): 20-22 pp.

Valladares, G., L. Garbin, M. T. Defagó, C. Carpinella, S. Palacios. 2003. Actividad antialimentaria e insecticida de un extracto de hojas senescentes de *Melia azedarach* (Meliaceae). *Soc. Entomol. Argent.* 62(1-2): 53-61pp.

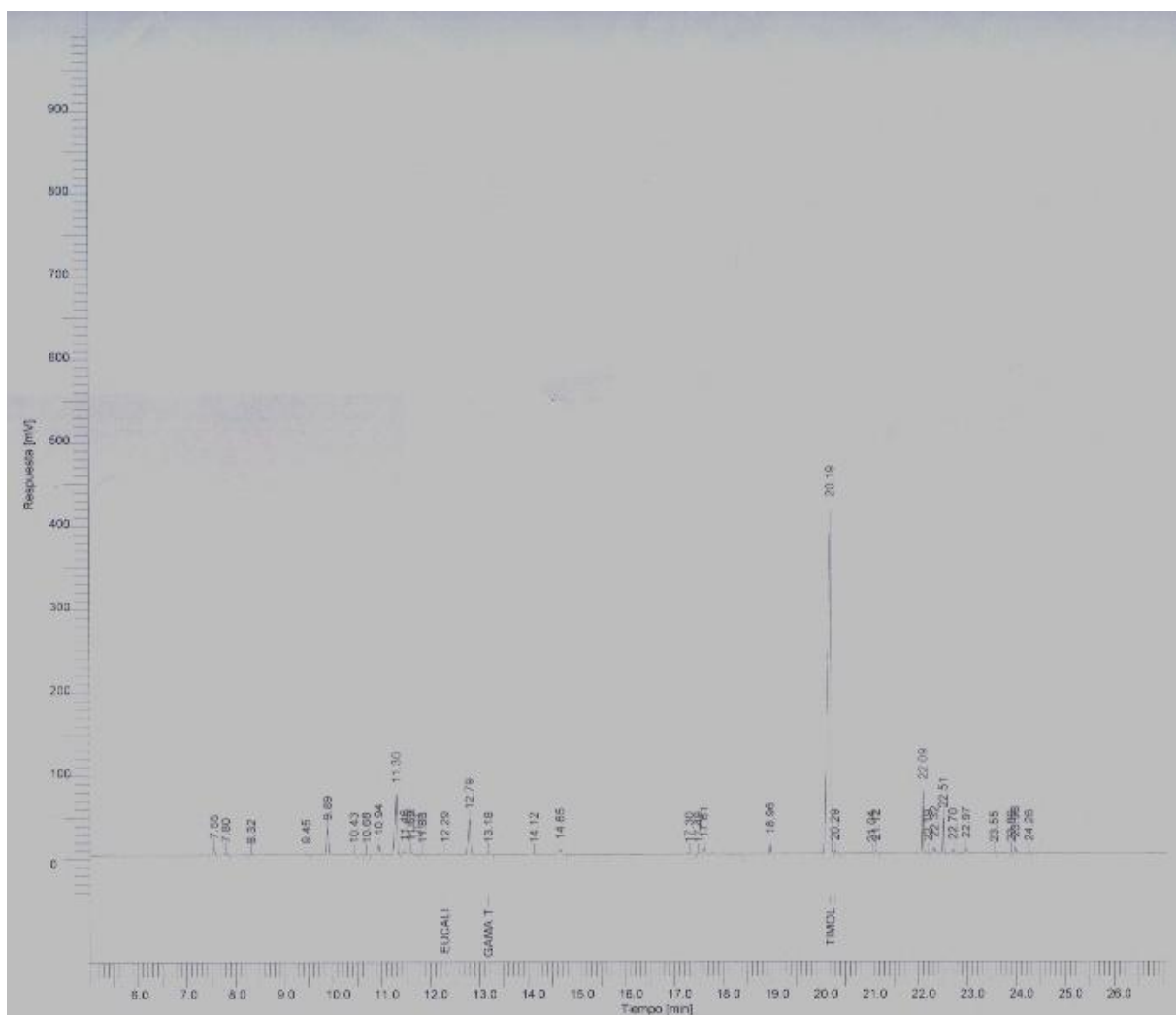
Vásquez, H. A. 2007. <http://www.cic.ues.edu.sv/REVISTA%20CIC-UES%20MINERVA/articulos/Ciencias%20de%20la%20Salud/Articulo%20sobre%20la%20Salud.pdf> Utilización del extracto alcohólico de *Azadirachta indica* A. Juss contra las bacterias de importancia médica *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. *Minerva Revista en línea CIC-UES*. 1: 1-10 pp. Consultado en 07 de enero del 2010.

Vera, G. J., V. M. Pinto, L. L. Landois P., J. L. Leyva V. 2002. Simulación de la dinámica poblacional de la conchuela del frijol, *Epilachna varivestis* Muls., mediante un modelo fenológico de desarrollo acumulativo. *Agrociencia*. 36(001): 115-122 pp.

Viñuela, E., A. Adán, M. González, F. Budia, G. Smagghe, P. Del Estal. 1998. Spinosad y azadiractina: efectos de dos plaguicidas de origen natural en el chinche

depredador *Podisus maculiventris* (Say) (Hemiptera: Pentatomidae). *Bol. San. Veg. Plagas*. 24: 57-66 pp.

X. ANEXOS



Anexo 1. Cromatograma del aceite esencial del Mezquiteal, Durango (Colecta 2010)